

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

2° Congresso nazionale

**Le micotossine
nella filiera agro-alimentare**

Istituto Superiore di Sanità
Roma, 16-18 ottobre 2006

RIASSUNTI

A cura di
Marina Miraglia, Valentina Minardi e Carlo Brera
Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari

ISSN 0393-5620
ISTISAN Congressi
06/C8

Istituto Superiore di Sanità

2° Congresso nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 16-18 ottobre 2006. Riassunti.

A cura di Marina Miraglia, Valentina Minardi e Carlo Brera
2006, ix, 101 p. ISTISAN Congressi 06/C8

Il Congresso si propone di focalizzare i principali aspetti legati alle implicazioni di carattere sanitario, agronomico, industriale e diagnostico relativamente alla contaminazione da micotossine nei prodotti della filiera agro-alimentare, sulla base di un principio di intercorrelazione fra la valutazione e la gestione del rischio. L'evento si rivolge pertanto a tutti gli operatori del sistema alimentare e mangimistico, con l'invito a fornire il proprio contributo di esperienze tecnico scientifiche, operative e gestionali al fine di creare un quadro quanto più completo del problema delle micotossine nel nostro Paese. Ciò al fine di minimizzare l'impatto sanitario di questi contaminanti e le eventuali ricadute negative sul "sistema" alimenti e mangimi. Infine, gli argomenti trattati in questo Congresso saranno orientati sia alla diffusione di informazioni scientifiche in grado di tutelare il consumatore italiano, sia all'acquisizione degli strumenti operativi in grado di garantire una maggiore competitività sul mercato europeo ed internazionale.

Parole chiave: Micotossine, Analisi del rischio, Alimenti

Istituto Superiore di Sanità

2nd National conference. Mycotoxins in agri-food chain. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 16-18 October 2006. Abstract book.

Edited by Marina Miraglia, Valentina Minardi and Carlo Brera
2006, ix, 101 p. ISTISAN Congressi 06/C8 (in Italian and English)

The Conference is aimed at focusing on the main aspects related to the direct sanitary, agronomic, industrial and diagnostic implications regarding mycotoxin contamination in agri-food chain products, on the basis of a mutual correlation between the risk assessment and management. Therefore, this event is addressed to all the stakeholders of the food and feed chain, and their own contribution in the scientific, operating and managerial experiences that will create a scenario that is a complete representation of problem of mycotoxins in our country. This approach would contribute to decrease the sanitary impact of these xenobiotics on human and animal health and the negative consequences for the food and feed system. Finally, the topics addressed at this Conference can help the dissemination of scientific information related to safeguarding the Italian consumer to the exposure of such toxic substances and to achieve better competitiveness in the European and international markets.

Key words: Mycotoxins, Risk analysis, Foodstuffs

Si ringrazia la Sig.ra Viviana Renzi per il lavoro svolto nell'organizzazione del Congresso.

Comitato scientifico:

Marina Miraglia, Barbara De Santis e Carlo Brera

Per informazioni su questo documento scrivere a: carlo.brera@iss.it

Il rapporto è disponibile online sul sito di questo Istituto: www.iss.it

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Egiziana Colletta e Patrizia Mochi*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© 2006 Istituto Superiore di Sanità (Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma)

INDICE

Programma	iii
Note per la consultazione	ix
Relazioni di apertura	1
Prima sessione	
Parte I. Valutazione dell’impatto delle micotossine sulla salute dell’uomo e degli animali	5
Parte II. Esperienze del settore della produzione e della trasformazione	15
Seconda sessione	
Impatto delle micotossine sulla filiera agro-alimentare e mangimistica	23
Terza sessione	
Metodologie innovative utilizzate nel settore diagnostico	37
Sessione poster	53
Indice degli autori	99

PROGRAMMA

Lunedì 16 ottobre 2006

8.30 Registrazione dei partecipanti

9.00 Indirizzo di benvenuto

Enrico Garaci

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità

Paolo Aureli

*Direttore del Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti
e per i Rischi Alimentari*

9.20 Relazioni di apertura

Micotossine: quale sistema agro-zootecnico?

Gianfranco Piva

Criteri innovativi per la generazione di nuovi dati sulle micotossine

Marina Miraglia

10.40 Intervallo

Prima sessione

Parte I

VALUTAZIONE DELL'IMPATTO DELLE MICOTOSSINE SULLA SALUTE DELL'UOMO E DEGLI ANIMALI

Moderatori: Gianfranco Piva, Carlo Brera

11.00 Relazione plenaria

Il ruolo dell'EFSA nella definizione del rischio da micotossine

Vittorio Silano

11.40 *Presenza di ocratossina A e tricoteceni in alimenti destinati ai bambini
in età prescolare e scolare*

Maria Letizia Fracchiolla

12.00 *Valutazione critica del pericolo per la salute del consumatore legato alla presenza
di aflatossina M₁ (AFM₁) in prodotti caseari in funzione della tecnologia*

Roberto Giangiacomo

12.20 *Valutazione quantitativa del rischio aflatossine nel latte*

Marcello Trevisani

- 12.40 *Valutazione della esposizione del consumatore alle micotossine: approccio deterministico e probabilistico*
Valentina Minardi
- 13.00 *Indagine sulla presenza di aflatossine e ocratossina a in prodotti a base di liquirizia*
Terenzio Bertuzzi
- 13.30 Pranzo e discussione poster
- 14.30 Relazione plenaria
Probabilistic exposure assessment and risk analysis of mycotoxins
Tine Kuiper-Goodman
- 15.10 Relazione plenaria
Effetti tossici e meccanismi di azione delle micotossine
Giorgio Cantelli Forti
- 15.50 Intervallo

Prima sessione

Parte II

ESPERIENZE DEL SETTORE DELLA PRODUZIONE E DELLA TRASFORMAZIONE

Moderatori: Gianfranco Piva, Carlo Brera

- 16.00 *L'esperienza conserve Italia, azienda alimentare italiana, sul problema micotossine: prevenzione, monitoraggio e gestione*
Renzo Boni
- 16.20 *Indagine pluriennale sulla diffusione delle micotossine nelle partite commerciali di mais: risultati della campagna 2005/2006, correlazioni con l'andamento climatico e l'area di coltivazione*
Carla Corticelli
- 16.40 *Prevenzione ocratossina A nel caffè COOP: procedure di campionamento CO.IND in fase di pre-acquisto della materia prima*
Davide Garbini
- 17.00 *Campionamento dei molini a mais italiani per la ricerca delle fumonisine nei prodotti della trasformazione industriale*
Francesca Vanara
- 17.30 Chiusura della prima giornata

Martedì 17 ottobre 2006

Seconda sessione

**IMPATTO DELLE MICOTOSSINE SULLA FILIERA AGRO-ALIMENTARE
E MANGIMISTICA**

Moderatori: Marina Miraglia, Giovanni Monastra

- 9.00 Relazione plenaria
*Il ruolo del Ministero della Salute nella gestione del rischio
da micotossine in alimenti e mangimi*
Silvio Borrello
- 9.40 Relazione plenaria
Il ruolo dell'agricoltura per la sicurezza e la qualità degli alimenti
Luigi Tozzi
- 10.10 *Ricadute della contaminazione da micotossine sul settore della trasformazione*
Daniele Rossi
- 10.40 Intervallo
- 11.00 *La legislazione vigente relativa alle micotossine in alimenti e mangimi*
Carmelo Cicero, Marinella Collauto
- 11.30 *Sviluppo della fusariosi della spiga di frumento e contaminazione di micotossine
associate alla malattia in campo in Italia in confronto con tre nazioni europee:
4 anni di indagini del progetto UE RAMFIC*
Antonio Moretti
- 11.50 *Percorsi produttivi per il controllo della contaminazione da fusarium-tossine*
Amedeo Reyneri
- 12.10 *Aspetti sanzionatori e responsabilità degli operatori*
Gaetano Forte
- 12.30 Tavola Rotonda
*Strategie e programmi di intervento per il controllo delle micotossine:
una scelta o una necessità?*
Moderatori: Silvio Borrello, Gaetana Ferri, Donato Greco
Partecipanti: Rolando Manfredini, Luigi Tozzi, Carlo Brera,
Elena Brugna, Elvira Cecere, Daniele Rossi
- 13.30 Pranzo e discussione poster

- 14.30 *Prevenzione delle micotossine nei prodotti vegetali*
Paola Battilani
- 15.10 *Polisaccaridi da basidiomiceti come nutraceutici e mezzo per il controllo di micotossine*
Corrado Fanelli
- 15.30 *Sistema regionale di sorveglianza per la presenza di micotossine in alimenti e mangimi in Emilia Romagna*
Laura Vicinelli
- 15.50 *Contaminazione da fumonisine nella granella di mais: valutazione del rischio nella fase di campo*
Guido Maffioli
- 16.10 *Indagine sulla presenza di tossine T-2 e HT-2 in campioni di cereali e loro derivati provenienti dal nord Italia*
Roberto Causin
- 16.30 *L'ocratossina A nella filiera vitivinicola: metodi analitici e distribuzione durante i processi di vinificazione di uve rosse*
Michele Solfrizzo
- 16.50 *Valutazione del fattore di trasferimento di aflatossina M₁ nei formaggi a pasta dura a lunga stagionatura e studio della sua distribuzione nella forma*
Simonetta Menotta, Giorgio Fedrizzi
- 17.10 *Impiego di dati meteorologici per la previsione del rischio di contaminazione da aflatossina B₁ nella granella di mais*
Paola Battilani
- 17.30 Chiusura della seconda giornata

Mercoledì 18 ottobre 2006

Terza sessione

METODOLOGIE INNOVATIVE UTILIZZATE NEL SETTORE DIAGNOSTICO

Moderatori: Angelo Visconti, Carlo Brera

- 9.00 *Presentazione della International Society for Mycotoxicology*
Angelo Visconti

- 9.10 Relazione plenaria
Ricadute della legislazione comunitaria sulle problematiche legate alla fase diagnostica nella determinazione delle micotossine
Carlo Brera
- 9.50 Relazione plenaria
Metodi di analisi per il controllo delle micotossine: criteri e parametri di accettabilità
Angelo Visconti
- 10.30 *Presentazione del video su procedure di campionamento per il controllo delle micotossine*
Carlo Brera
- 11.10 Intervallo
- 11.25 *Studio di validazione di un metodo in HPLC per la determinazione della aflatoossina B₁ in campioni di mais*
Francesca Debegnach
- 11.45 *Applicazione e caratteristiche di colonnine di immunoaffinità rigeneranti per l'analisi delle micotossine su matrici alimentari*
Enrico Arletti
- 12.05 *Determinazione di tricoteceni e aflatoossine nei cereali: metodi HPLC-FLD e LC/ESI/MS a confronto*
Chiara Dall'Asta
- 12.25 *Impiego di naso elettronico abbinato a modelli chemometrici per la determinazione della contaminazione da deossinivalenolo in triticum durum*
Vittorio Dell'Orto
- 12.45 *Metodo rapido per la determinazione di deossinivalenolo in frumento e derivati basato sulla polarizzazione di fluorescenza*
Michelangelo Pascale
- 13.05 Pranzo e discussione poster
- 14.30 *Analisi simultanea di dieci fusariotossine nei cereali: un nuovo approccio mediante LC-MS/MS*
Alberto Ritieni
- 14.50 *Studio di parametri che possono influire sulla performance di metodi immunochimici per il dosaggio di AFM₁ in matrici casearie*
Tiziana M.P. Cattaneo

- 15.10 *Determinazione dello zearalenone e dei suoi metaboliti α - e β -zearalenolo nel mais mediante alternate Isotope-Coded Derivatization Assay (AIDA)*
Stefano Sforza
- 15.30 *Utilizzo di una piastra immunoelettrochimica per la determinazione dell'aflatossina B₁ nel mais*
Silvia Piermarini
- 15.50 *Determinazione di patulina in cromatografia liquida/spettrometria di massa tandem in succhi, puree di frutta e baby foods*
Cecilia Bergamini
- 16.10 *Confronto fra metodiche HPLC, ELISA e fluorimetrica per la determinazione della aflatossina M₁ in latte vaccino: risultati preliminari*
Sandro Tenti
- 16.30 *Determinazione delle micotossine: risultati dei proficiency test organizzati a livello nazionale dall'AIA*
Ugo Paggi
- 16.50 Valutazioni finali e chiusura del Congresso

NOTE PER LA CONSULTAZIONE

Il secondo Congresso sulle micotossine comprende tre sessioni orali e tre sessioni poster distribuite su tre giornate. Le presentazioni ed i contributi dei poster evidenziano i principali aspetti che caratterizzano la problematica delle micotossine relativamente alla valutazione e gestione del rischio, i metodi di analisi e di campionamento. Complessivamente, il programma presenta comunicazioni orali e poster.

Le aree tematiche prese in considerazione sono:

- aspetti tossicologici;
- valutazione del rischio;
- gestione del rischio;
- tecnologie alimentari;
- metodi di analisi e di campionamento;
- monitoraggio di alimenti e mangimi;
- procedure di prevenzione e di decontaminazione.

Relazioni di apertura

MICOTOSSINE: QUALE SISTEMA AGRO-ZOOTECNICO?

Gianfranco Piva

Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza

L'esposizione della popolazione alla ingestione di alimenti contenenti micotossine è una realtà. Secondo dati presentati al *World Mycotoxin Forum* del 2005 le popolazioni che vivono nella fascia compresa fra il 42° parallelo nord e sud sono esposte alle aflatossine. Il 70% dei mangimi per animali (EFSA - 2004) contengono micotossine. Nonostante ormai oltre il 96% dei paesi del mondo abbia adottato norme legislative più o meno rigorose, il problema è ben lontano dall'essere risolto.

Il controllo normativo sulla fase finale della filiera agro alimentare, vegetale ed animale, in molte situazioni, rappresenta solo una presa di coscienza del problema e non consente soluzioni immediate. L'approccio legislativo è poi, in genere parziale, in quanto pone dei limiti per le singole micotossine e non considera le problematiche derivanti da interazioni dovute alla presenza di più micotossine.

Emblematico è il caso dell'allevamento animale, ove non infrequente è il caso di presenza di micotossine a livello sub clinico ed entro i limiti normativi, con situazioni di aumento di morbilità non specifica. Ne deriva la necessità di maggiori interventi farmacologici, con conseguente rischio di residui. Alle micotossine sono riconosciuti effetti negativi sulla risposta immunitaria, riduzione della capacità di controllo dei fenomeni ossidativi e depressione dei processi di sintesi cellulare a livello degli epitelii dell'apparato digerente che potrebbero motivare quanto sopra segnalato.

La situazione è poi complicata dalla dinamica dei "cambiamenti climatici" e dalla peculiarità con la quale si è sviluppato, in molte aree altamente produttive, il sistema agro-zootecnico in questi ultimi decenni.

Basti pensare alla dipendenza dell'allevamento intensivo del nord Italia, ma anche di altre zone, dalla produzione del mais. Per questo cereale si verificano periodicamente situazioni di crisi idriche dovute alla combinazione di scarsa disponibilità idrica per l'irrigazione di soccorso ed a periodi di aridità ed alte temperature, quando maggiori sono le esigenze della pianta. La conseguenza è aumento della esposizione al rischio di micotossine, aflatossine in particolare.

Ne deriva la considerazione se non sia il caso, in zone non specificamente dotate, di ripensare al sistema agro-zootecnico, in particolare con la rivalorizzazione di coltivazioni di cereali a minori esigenze idriche nei periodi critici, anche rinunciando parzialmente ad efficienza produttiva.

Sarebbe interessante sviluppare un modello e verificarlo operativamente adottando lo slogan fatto proprio dall'INRA in Francia *Research today for agriculture tomorrow*.

CRITERI INNOVATIVI PER LA GENERAZIONE DI NUOVI DATI SULLE MICOTOSSINE

Marina Miraglia

Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La disponibilità di dati di concentrazione per le molteplici categorie di analiti rilevanti per la sicurezza alimentare rappresenta la base per la corretta effettuazione dell'analisi del rischio.

Tuttavia, la correttezza delle informazioni derivanti da tali dati dipende in larghissima misura dalla qualità del dato stesso. L'accezione più ampia di questo termine comprende non soltanto la qualità del dato analitico o del sistema di campionamento del campione di laboratorio da una massa di prodotto, ma anche la opportuna selezione delle caratteristiche del campione individuato, compresa la distribuzione geografica e temporale dei campioni prelevati.

Questo è particolarmente importante per le micotossine a causa delle molte peculiarità che caratterizzano questi contaminanti, inclusa la loro distribuzione eterogenea nelle derrate alimentari: la necessità di affidabili dati di concentrazione per le micotossine dovrebbe pertanto portare sia alla drastica rivisitazione dei dati esistenti sia alla programmazione ad hoc per la generazione di nuovi dati.

In particolare, la produzione di nuovi dati di concentrazione di micotossine in alimenti e mangimi dovrebbe essere effettuata sulla base del criterio del *fit for purpose*, in quanto ciascun elemento dell'analisi del rischio (valutazione, gestione e comunicazione) richiede dati con caratteristiche particolari.

La valutazione del rischio necessita di dati di concentrazione per le micotossine miranti a valutare l'impatto di questi contaminanti sulla salute umana. Saranno pertanto privilegiati dati multimicotossine provenienti dai cibi al consumo per la valutazione dell'esposizione e gli alimenti analizzati dovranno essere in linea con le classificazioni degli alimenti impiegate per la valutazione dei consumi. Ulteriori elementi per la selezione dei campioni da analizzare per ottenere i dati.

Anche la gestione del rischio necessita di dati *ad hoc*, a loro volta differenziati a seconda che si parli di dati miranti alla prevenzione, al controllo o alla verifica della idoneità dei provvedimenti adottati.

Trasversalmente alle necessità di qualità sopraindicate sussiste inoltre quella della qualità del dato analitico, comune a tutte le categorie di analiti, e quella della rappresentatività del campionamento.

Una indagine retrospettiva della tipologia e qualità dei dati finora disponibili ed al loro effettivo uso nell'effettuazione dell'analisi del rischio mostra come i requisiti di qualità dei dati di concentrazione siano piuttosto carenti e molte delle conclusioni finora tratte dall'analisi del rischio in tema di micotossine potrebbero essere non corrette.

**Prima sessione
Parte I**

**Valutazione dell'impatto delle micotossine
sulla salute dell'uomo e degli animali**

Moderatori

Gianfranco Piva, Carlo Brera

PRESENZA DI OCRATOSSINA A E TRICOTECENI IN ALIMENTI DESTINATI AI BAMBINI IN ETÁ PRESCOLARE E SCOLARE

Maria Letizia Fracchiolla, Francesco Arioli, Lisa Vallone, Ivan Dragoni, Giuseppe Pompa
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare, Università degli Studi, Milano

L'ocratossina A (OTA) ed i tricoteceni (TCT) sono micotossine contaminanti tipiche dei cereali. Tra i TCT, il deossinivalenolo (DON) è il più frequente nei cereali. Sotto il profilo del rischio sanitario, i bambini sono la fascia di popolazione più "a rischio" in quanto i cereali hanno una notevole importanza nella loro dieta. L'Unione Europea ha indicato un TDI (*Tolerable Daily Intake*) per l'OTA di 0,005 µg/kg e per il DON di 1 µg/kg. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di caratterizzare il rischio da OTA e TCT nei bambini degli asili nido e delle scuole (materna, elementare e media) di Milano nell'anno 2004. Per l'allestimento dei campioni sono stati prelevati giornalmente gli alimenti a base di cereali (pasta, ecc.) scegliendo come rappresentativo (tipologia e quantità) il pasto destinato ai bambini di età compresa tra 24-36 mesi per il nido (totalmente biologico) e quelli delle elementari (6-10 anni) per le scuole (in parte convenzionale). Per l'OTA il campione è stato estratto con una miscela metanolo:soluzione di bicarbonato 50:50, purificato su colonna ad immunoaffinità ed analizzato in HPLC con rivelatore fluorimetrico. Per i TCT, il campione è stato estratto con acetonitrile:acqua 84:16, purificato su colonna *Mycosep* ed esaminato mediante GC-MS con rivelatore a trappola ionica. Dall'analisi dei risultati ottenuti è emerso che l'OTA era presente nel 100% dei casi con una concentrazione media di 0,048 µg/kg nei campioni del nido e di 0,161 µg/kg in quelli delle elementari. L'unico TCT ad essere stato rilevato nei campioni era il DON con un'incidenza del 100% ed una concentrazione media di 45 µg/kg per il nido e di 82 µg/kg per le elementari.

Dai dati raccolti è emerso che i cereali costituiscono il 42% del pasto totale offerto giornalmente ai bambini del nido ed il 44% di quello delle elementari. Considerando un peso medio di un bambino del nido di 14 kg e 28 kg quello di un bambino delle elementari ed un consumo di 0,237 kg e di 0,302 kg, rispettivamente per i bambini del nido e delle scuole elementari, si può dire che l'esposizione all'OTA da noi riscontrata rappresentava rispettivamente il 16% ed il 35% del TDI stabilito dall'UE. Anche per quanto riguarda il DON, dai dati a nostra disposizione, è emerso che il TDI non è stato superato ma rappresentava il 76% per il nido e l'89% per le elementari.

VALUTAZIONE CRITICA DEL PERICOLO PER LA SALUTE DEL CONSUMATORE LEGATO ALLA PRESENZA DI AFLATOSSINA M₁ (AFM₁) IN PRODOTTI CASEARI IN FUNZIONE DELLA TECNOLOGIA

Tiziana M.P. Cattaneo, Roberto Giangiaco
*Consiglio per la Ricerca in Agricoltura (CRA), Istituto Sperimentale Lattiero Caseario,
Lodi*

L'attuale regolamento comunitario n. 683/2004 fissa dei valori limite di aflatoxine ammesse nel latte destinato all'alimentazione umana. Manca per contro una disposizione legislativa che fissi limiti per i derivati del latte.

Disposizioni nazionali suggeriscono un metodo di calcolo del contenuto di aflatoxina nei formaggi che tiene conto del contenuto ammesso nel latte moltiplicato per il fattore di resa casearia (circolare Ministero della Salute n. 609/1774/3.98 del 12 dicembre 2003).

La letteratura nazionale ed internazionale esistente sui fattori di concentrazione in diversi prodotti lattiero caseari è molto limitata, datata e raramente applicabile ai processi caseari nazionali. Nel contesto del progetto finalizzato "Valutazione dei fattori di concentrazione di AFM₁ in funzione dei prodotti di trasformazione del latte e dei reflui derivanti - AFLARID", sono state condotte caseificazioni sperimentali a partire da latte naturalmente contaminato a vari livelli di concentrazione di aflatoxina. Lo studio era rivolto alla valutazione dell'affinità dell'aflatoxina per le frazioni caseiniche in stretto legame con le tecnologie di produzione di formaggi molli (crescenza), paste acide (caprino) e paste filate fresche (mozzarella a fermentazione lattica, mozzarella per acidificazione con acido citrico), nonché di ricotta ottenuta dai rispettivi sieri. Sulla base dei bilanci di massa, sono stati calcolati i fattori di concentrazione reali nei diversi prodotti, realizzati con processi caseari tipici della tradizione casearia nazionale.

Applicando il calcolo così come previsto dalla normativa comunitaria a queste trasformazioni, emerge un quadro differenziato in funzione del processo tecnologico. La valutazione del contenuto ammissibile, calcolato secondo il Regolamento comunitario, risulta però decisamente sovrastimato in molti casi e poco compatibile con i tassi contenuti, ammessi per il latte di partenza.

Vengono presentati e discussi i valori sperimentali ottenuti da cui emerge l'opportunità di rivedere l'attuale disposizione, fissando contenuti massimi ammissibili per categorie di prodotto.

VALUTAZIONE QUANTITATIVA DEL RISCHIO AFLATOSSINE NEL LATTE

Marcello Trevisani (a), Andrea Serraino (a), Alessandra Canever (a), Andrea Borsari (b)
(a) Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi, Bologna
(b) Granarolo SpA, Bologna

Per poter condurre un'analisi quantitativa del rischio aflatossine nella popolazione italiana è necessario raccogliere dati sulla frequenza di distribuzione dei livelli di contaminazione in campioni di latte che siano rappresentativi prodotto in commercio, evitando di trattare insieme i dati derivanti da programmi di monitoraggio e quelli della sorveglianza realizzati in situazioni di allerta ed emergenza. Inoltre, per fornire una stima relativa al rischio di intossicazione "cronica" è importante avere dati relativi ad un arco di tempo tale da poter definire un valore medio di esposizione nell'arco della vita. È anche importante definire la distribuzione di concentrazione che si ha nelle diverse realtà produttive, in quanto la qualità della materia prima lavorata, i volumi trattati e le condizioni di processo possono determinare una differente concentrazione finale nel prodotto. Abbiamo utilizzato i dati di un'ampia indagine condotta dall'industria nel periodo 2001-2004, per stimare il livello di esposizione nella popolazione italiana ed il maggior rischio stimato in conseguenza dell'emergenza verificatasi nell'autunno 2003. Il modello stocastico calcola l'esposizione considerando la correlazione tra età, quantità di latte consumata e peso corporeo. La prevalenza relativa degli individui nelle diverse classi della popolazione è stata ponderata con un metodo stocastico sulla base dei dati di un censimento della popolazione italiana realizzato dall'ISTAT nel 2001. L'assunzione di aflatossina con il latte è stata simulata utilizzando l'equazione $Y_i = \sum(X_{v,i,t} * C_{v,i,t})$ dove $X_{v,i,t}$ è la quantità di latte (grammi) di origine v , consumata dal soggetto i il giorno t ($t = 1, \dots, T$) e $C_{v,i,t}$ è la concentrazione di aflatossina espressa in ng per grammo di latte. Poiché sulla base delle valutazioni tossicologiche è emerso che gli individui infetti da virus dell'epatite virale di tipo B sono molto più suscettibili all'azione genotossica e cancerogena dell'aflatossina, si è reso necessario definire la prevalenza relativa degli infetti nelle diverse classi di età (fortunatamente la vaccinazione ha ridotto la prevalenza nei bambini ed adolescenti). Questi dati sono stati ricavati da diversi studi recentemente realizzati da studiosi che collaborano con l'osservatorio italiano sulle epatiti infettive. Per la caratterizzazione del rischio sono stati utilizzati i coefficienti di potenza cancerogena dell'aflatossina M_1 calcolati dal *panel* di esperti incaricati dall'organizzazione mondiale della sanità (JECFA - Joint Expert Committee on Food Additives).

Sulla base dei dati storici relativi al latte alimentare raccolti nel periodo gennaio 2001-agosto 2003 si stima che il numero medio di casi aggiuntivi di epatocarcinoma era pari a 0,004-0,011 per milione per anno, mentre sulla base dei dati relativi al periodo settembre 2003-dicembre 2004 i valori sono aumentati a 0,007-0,014. Ponendo attenzione agli estremi ($\geq 95^\circ$ percentile) della distribuzione cumulativa di probabilità si può osservare un incremento che va da valori tra 0,011 e 0,026 a valori tra 0,017 e 0,031 (casi per milione per anno). Questo incremento limitato è dovuto al coefficiente di potenza carcinogenetica che è molto basso per gli individui non infetti da virus dell'epatite B ed al piano di sorveglianza attuato durante l'emergenza.

VALUTAZIONE DELLA ESPOSIZIONE DEL CONSUMATORE ALLE MICOTOSSINE: APPROCCIO DETERMINISTICO E PROBABILISTICO

Carlo Brera, Valentina Minardi, Francesca Debegnach, Barbara De Santis, Marina Miraglia
*Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore
di Sanità, Roma*

La valutazione dell'esposizione è parte integrante della valutazione del rischio e si può definire come il processo di stima qualitativa e/o quantitativa della probabile assunzione di agenti biologici, chimici o fisici attraverso il consumo di alimenti (WHO, 1997). Considerata la pericolosità delle micotossine e la loro larga incidenza in una vasta gamma di alimenti, diventa sempre più centrale il considerarne l'assunzione umana e i possibili effetti sulla salute.

Nell'ambito della valutazione quantitativa dell'esposizione alle micotossine, si possono evidenziare due approcci, uno deterministico e uno probabilistico, i quali utilizzano diverse fonti di dati per ottenerne una stima. Entrambi i metodi si basano sulla semplice funzione di calcolo della esposizione, data dalla quantità di alimento consumato per la concentrazione della micotossina trovata nell'alimento stesso, relativamente al peso corporeo.

L'approccio deterministico utilizza stime dell'incidenza delle micotossine nelle matrici alimentari e stime dei consumi alimentari; la media dell'esposizione per diversi gruppi di consumatori è basata generalmente sul consumo medio giornaliero e sulla concentrazione media della micotossina nell'alimento; il limite superiore di esposizione è basato sul 95^{mo} percentile del consumo alimentare e il 90^{mo} percentile della concentrazione della tossina sotto osservazione.

L'approccio probabilistico valuta l'intera distribuzione dei parametri di esposizione potenzialmente, prendendo in considerazione l'incertezza e la variabilità dei parametri stessi. Inoltre questo tipo di approccio viene affiancato alla valutazione dell'effetto per la definizione del *margin of exposure* (MoE, rapporto tra NOAEL (*No-Observed-Adverse-Effect Level*) o BMD (*Benchmark Dose*)) e la quantità stimata di esposizione, individuando il livello di assunzione della tossina da parte della popolazione al quale corrisponde l'effetto tossico. L'approccio probabilistico permette di quantificare il margine di esposizione e di effetto dei singoli contaminanti, di compararne i rischi derivanti, nonché di valutare la combinazione di più contaminanti presenti contemporaneamente.

Nell'ambito del progetto Europeo SAFE FOODS (6° Programma Quadro), è stato implementato il *software* MCRA (*Monte Carlo Risk Assessment*) basato su un modello probabilistico di calcolo dell'esposizione ai vari contaminanti chimici (pesticidi, micotossine e tossine naturali). Utilizzando *database* di consumi alimentari individuali nazionali e *database* nazionali di monitoraggio di incidenza delle micotossine nelle varie matrici alimentari, il *software* MCRA simula i consumi giornalieri per la settimana. Per le micotossine si ottiene una stima di assunzione cronica su sette giorni. L'approccio deterministico produce l'intera distribuzione dell'esposizione e non una stima puntuale come si ottiene dall'approccio deterministico.

Il MoE è considerato uno strumento rilevante per la valutazione probabilistica del rischio integrato.

INDAGINE SULLA PRESENZA DI AFLATOSSINE E OCRATOSSINA A IN PRODOTTI A BASE DI LIQUIRIZIA

Terenzio Bertuzzi, Alessia Gualla, Paola Fortunati, Amedeo Pietri
*Istituto di Scienze dell'Alimentazione e della Nutrizione, Università Cattolica del Sacro
Cuore, Piacenza*

La liquirizia è una pianta erbacea perenne, appartenente alla famiglia delle Leguminose papilionate, coltivata nei paesi del bacino mediterraneo e in Germania, Russia, Cina e Australia. Alla raccolta l'umidità è circa pari al 50%, perciò viene eseguita un'essiccazione fino al raggiungimento del 10% di umidità. Indagini sulla contaminazione da ocratossina A (OTA) in prodotti contenenti liquirizia sono state condotte in Germania, evidenziando in alcuni campioni una contaminazione molto elevata (valore massimo 216 µg/kg). Non sono noti studi micologici mirati all'identificazione di ceppi fungini produttori di micotossine e alle modalità di contaminazione in campo o dopo la raccolta. Al fine di confermare la contaminazione non trascurabile riscontrata nelle precedenti indagini, è stato condotto uno studio per valutare la presenza di OTA e di aflatossine (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂) in 20 prodotti a base di liquirizia prelevati al dettaglio durante il 2004. L'indagine è stata effettuata sia su prodotti biologici che convenzionali. Dopo macinazione dei campioni, estrazione e purificazione con colonna ad immunoaffinità, l'analisi è stata condotta mediante HPLC con rivelazione fluorimetrica; per le aflatossine è stata effettuata una pre-derivatizzazione con acido trifluoroacetico e l'eventuale presenza è stata confermata dalla scomparsa nell'estratto non derivatizzato di AFB_{2a} e AFG_{2a}. L'OTA è stata confermata mediante metilazione dell'estratto purificato e analisi HPLC dell'estere metilico. Entrambi i metodi hanno dato percentuali di recupero superiori al 90%, con buoni valori di ripetibilità. I limiti di rivelazione e di quantificazione sono risultati di 0,02 e 0,05 µg/kg per le aflatossine e di 0,05 e 0,1 µg/kg per l'OTA. Quest'ultima è risultata presente in 18 campioni (90%), con un valore medio di 17,62 ± 23,39 µg/kg, una mediana di 7,42 µg/kg e un valore massimo di 80,11 µg/kg. Il 40% dei campioni ha mostrato una contaminazione superiore a 10 µg/kg e quelli maggiormente contaminati contenevano un'elevata percentuale di liquirizia pura. I prodotti a base di liquirizia sono frequentemente consumati dai bambini, per cui è stato calcolato quanto contribuiscano all'ingestione giornaliera tollerabile (*Tollerable Daily Intake* - TDI). Assumendo giornalmente circa 3 g di prodotti a base di liquirizia e considerando il valore della mediana, la quantità media di OTA ingerita è pari a 22,3 µg. Nel caso di un bambino del peso di 35 kg, l'assunzione per kg di peso corporeo è pari a 0,64 ng, equivalente al 13% del TDI (5 ng/kg, *Scientific Committee on Food of the European Commission*). L'indagine relativa alla presenza di aflatossine ha evidenziato una contaminazione abbastanza contenuta. Nel 50% dei campioni non è stata rilevata presenza di aflatossine, il valore medio di AFB₁ è risultato di 0,96 ± 1,66 µg/kg, la mediana di 0,05 e quello massimo di 6,9 µg/kg. Per entrambe le tossine non è stata riscontrata nessuna differenza statisticamente significativa fra campioni convenzionali e biologici.

PROBABILISTIC EXPOSURE ASSESSMENT AND RISK ANALYSIS OF MYCOTOXINS

Tine Kuiper-Goodman
Health Canada, HPFB, Food Directorate, Ottawa

To gain a better understanding of the risk assessment and management of mycotoxins, Health Canada has launched a program involving probabilistic exposure assessments based on Canadian occurrence data for various finished foods or raw food commodities, gathered over the last decade. Such assessments tend to provide a more realistic estimate of exposure for various age/sex groups of the population, since they utilize available information regarding variability and uncertainty in model variables. For food consumption, we used recent USDA (United States Department of Agriculture) food consumption data (two non-consecutive days), which included extensive information on infants and young children. The software package FARE® as well as SAS programs, developed in house, were used to assess exposure. Various approaches to derive exposure will be discussed and the resulting exposure data will then be compared with various risk metrics, such as tolerable or short-term daily intakes. At this meeting recently completed results for patulin will be presented, as well as preliminary data for some other mycotoxins (ochratoxin and deoxynivalenol).

For patulin the mean occurrence in apple juice (major food of concern) was 10.3 ng/g (no ML) using a parametric distribution for censored data. Older infants and young children had the highest frequency of consumption (up to 38%, with up to 44% repeat consumers). Because the highest 2-day average juice consumption was seen in one-year olds (mean 16.8 and 90th percentile 34.1 g/kg bw) we focussed our analyses on this age group. Adjusting these data to usual chronic consumption resulted in about 20% lower mean values. Mean and 90th percentile usual exposure were below the chronic Tolerable Daily Intake (TDI) of 0.4 µg/kg bw.

A short-term TDI was developed to deal with occasional excursions above the chronic TDI. In the case of ochratoxin and deoxynivalenol, most persons (age one year and up) consumed foods containing these mycotoxins on both days of the survey, and there was little difference between the two-day average consumption of “all persons”, “eaters only” and the day one of “usual” consumption. As expected, ochratoxin exposure (ng/kg bw) for young children was higher than for older age groups. Mean adjusted exposure for all age groups tended to be below 5 ng/kg bw; generally, the 90th as well as 95th percentiles were below 15 ng/kg bw. As expected, exposure values decreased when the EC MLs were applied to the occurrence data.

EFFETTI TOSSICI E MECCANISMI DI AZIONE DELLE MICOTOSSINE

Giorgio Cantelli Forti

Dipartimento di Farmacologia Alma Mater Studiorum, Università degli Studi, Bologna

Le micotossine rappresentano un gruppo eterogeneo di sostanze chimiche, a basso peso molecolare, prodotte dal metabolismo secondario di funghi a micelio filamentoso che possono ritrovarsi in alimenti di origine vegetale o in prodotti provenienti da animali alimentati con mangimi contaminati.

L'interesse per questo gruppo di contaminanti alimentari deriva da una serie di indagini scientifiche che hanno dimostrato una significativa correlazione tra il consumo di alimenti contaminati da micotossine e gravi effetti tossici per la salute umana.

Oggi per le principali micotossine che rappresentano un'emergenza socio-sanitaria sono stati identificati il meccanismo d'azione e gli effetti tossici acuti e/o cronici indotti a carico di specifici organi e tessuti. Alcuni studi epidemiologici hanno, infatti, evidenziato un'associazione positiva tra l'esposizione alimentare ad aflatossina B₁ e l'aumento dell'incidenza dei tumori del fegato (epatocarcinoma). L'attività cancerogena di questa micotossina è riconducibile alla capacità del suo metabolita epossidico di legarsi al DNA formando addotti stabili con le basi puriniche e pirimidiniche. È stato dimostrato che l'esposizione alimentare ad Ocratossina A causa nell'uomo la Nefropatia Endemica dei Balcani, una malattia renale caratterizzata da alterazioni funzionali e degenerazione dei tubuli prossimali. L'attività tossica di questa micotossina è dovuta alla sua capacità di inibire la sintesi proteica, soprattutto nelle cellule renali. I tricoteceni presentano un'ampia attività biologica e la tossina T2 è il composto dotato di maggior tossicità. La tossina T2 inibisce la sintesi di proteine ed acidi nucleici, ed altera la struttura e la funzionalità della membrana plasmatica. L'insieme di questi effetti tossici interferisce con i processi di emopoiesi e causa la Leucopenia Tossica Alimentare dell'uomo, una micotossicosi più volte segnalata nell'Europa centrale, caratterizzata da una sintomatologia progressiva (nausea, vomito emorragie gastrointestinali, laringiti e faringiti necrotiche, infezioni sistemiche) ed elevato tasso di mortalità (80% dei pazienti).

Gli studi più recenti nel settore della tossicologia alimentari indicano che le micotossine possono avere un ruolo determinante nell'eziologia di alcune patologie. È stato proposto che l'esposizione ad aflatossine possa concorrere all'insorgenza di patologie degenerative dell'infanzia come la cirrosi infantile dell'India, la sindrome di Reye e l'epatopatia infantile dell'Africa. Una serie di studi *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato che l'aflatossine e l'ocratossina possono indurre effetti immunotossici. Queste nuove informazioni suggeriscono che la valutazione del rischio da micotossine è un problema complesso, non ancora completamente definito, che deve essere affrontato ed indagato con innovativi ed approfonditi studi tossicologici.

**Prima sessione
Parte II**

**Esperienze del settore della produzione
e della trasformazione**

Moderatori

Gianfranco Piva, Carlo Brera

L'ESPERIENZA CONSERVE ITALIA, AZIENDA ALIMENTARE ITALIANA, SUL PROBLEMA MICOTOSSINE: PREVENZIONE, MONITORAGGIO E GESTIONE

Renzo Boni, Mirka Dalla Bella, Monica Monti, Sonia Portillo, Fabio Gangini
Laboratorio Centrale Analisi Conserve Italia, San Lazzaro di Savena, Bologna

A seguito di sviluppi scientifici emersi negli ultimi anni nell'ambito delle micotossine, sono state emanate direttive europee e decreti nazionali con il preciso scopo di tutelare la salute del consumatore. L'industria alimentare deve pertanto essere consapevole di questo problema ed attivarsi adeguatamente puntando su prevenzione, monitoraggio e gestione.

Conserve Italia, società cooperativa agricola presente sul mercato con i principali marchi Valfrutta, Yoga, Dergy, Cirio, da anni ha intrapreso la strada della "qualità" dei suoi prodotti, con il vantaggio di poter gestire al meglio "il campo" perché di competenza dei propri soci.

In breve questi i punti di forza:

- prevenzione: scelta varietale più idonea, monitoraggio costante del campo, trattamenti mirati, raccolta adeguata, trasformazione gestita;
- monitoraggio: controllo analitico presso il Laboratorio centrale nelle varie fasi di preraccolta, arrivo in stabilimento, trasformazione, per le seguenti micotossine: aflatossine B₁-B₂-G₁-G₂, ocratossina A, zearalenone, fumonisina B₁-B₂, deossinivalenolo (DON), patulina;
- gestione: possibilità di non raccogliere, non accettare, non trasformare o richiamare prodotti non conformi.

INDAGINE PLURIENNALE SULLA DIFFUSIONE DELLE MICOTOSSINE NELLE PARTITE COMMERCIALI DI MAIS: RISULTATI DELLA CAMPAGNA 2005/2006, CORRELAZIONI CON L'ANDAMENTO CLIMATICO E L'AREA DI COLTIVAZIONE

Carla Corticelli (a), Giovanni Della Porta (b), Elena Mattioli Valle (a), Barbara Silvi Antonini (a), Alberto Verderio (b)

(a) Associazione Interprofessionale Cerealicola (ASSINCER), Bologna

(b) Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA), Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Bergamo

Da 6 anni ASSINCER e CRA, Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Bergamo, realizzano, attraverso progetti finanziati dalla Regione Lombardia ed in collaborazione con i produttori della filiera del mais, un campionamento sistematico delle partite commerciali di mais prodotte in Italia: ogni anno vengono analizzati 330 campioni "coacervo" derivati con metodi di campionamento dinamico da una rete di circa 60 impianti di stoccaggio, i quali "contengono" il 9-10% della produzione nazionale.

Nella presentazione vengono riportati i nuovi dati della campagna 2005/2006 relativi alla concentrazione di aflatossine, fumonisine, DON e ocratossine a confronto con la serie storica disponibile dalle indagini precedenti.

Vengono inoltre discusse in termini di capacità previsionali le correlazioni del contenuto delle diverse micotossine con l'andamento stagionale e con le macroaree di coltivazione, considerate per determinismi agronomici ed ambientali.

Si ringraziano per la collaborazione al progetto le seguenti Associazioni di settore: AIRES (Associazione Italiana Raccoglitori, Essicatori, Stocicatori di cereali e semi oleosi); ASSCAER (Associazione Consorzi Agrari Emilia Romagna); CONFAI (Confederazione Agromeccanici).

PREVENZIONE OCRATOSSINA A NEL CAFFÉ COOP: PROCEDURE DI CAMPIONAMENTO CO.IND IN FASE DI PRE-ACQUISTO DELLA MATERIA PRIMA

Claudio Mazzini (a), Davide Garbini (a), Susanna Tarozzi (b), Silvia Pezzoli (b), Marco Zucchelli (b)

(a) *COOP ITALIA SC, Casalecchio di Reno, Bologna*

(b) *COIND, Castel Maggiore, Bologna*

Per l'industria alimentare e la grande distribuzione, le micotossine rappresentano ormai un conclamato problema da gestire e monitorare, causa la nota pericolosità per la salute umana ed animale. CO.IND, partner di COOP Italia in veste di fornitore di prodotti a marchio, è una struttura aziendale che già opera secondo un sistema qualità certificato UNI EN ISO 9001:2000, ma è in procinto di un nuovo ulteriore passo avanti, ovvero arrivare al recepimento delle norme ISO 22000, i cui requisiti sono applicabili all'intera filiera. È infatti ormai opinione pienamente condivisa che, l'arma più efficace contro un problema come quello della contaminazione micotossine nelle derrate, consista nell'approccio globale di filiera, dal campo allo stoccaggio. Tra le varie filiere che COOP sta gestendo, ve ne sono alcune in cui sono emerse maggiori difficoltà di controllo del rischio, specialmente nel caso di quelle che si sviluppano a partire da paesi extra - EU, come per esempio cacao e caffè. Risultati positivi sono comunque stati raggiunti individuando aziende direttamente in tali paesi e sensibilizzandole sul tema. La politica comune di miglioramento continuo perseguita in questi ultimi 10 anni da COOP - CO.IND, ha trovato conferma nelle recenti novità legislative comunitarie, entrate in vigore tra 2005/2006, circa i tenori massimi ammissibili di ocratossina A (OTA) in alcuni alimenti ed i relativi metodi di campionamento ed analisi di controllo ufficiali. CO.IND adotta, a partire dal 1999, implementazioni della gestione del rischio OTA nei propri prodotti optando per il controllo sistematico, di tutte le forniture di caffè crudo in entrata, in modo da essere certi che non vengano immessi nel processo partite con contaminazioni superiori agli standard interni stabiliti. Si opera cioè in termini di valutazione preventiva. Prendendo spunto dalle normative vigenti, è stato approntato un opportuno piano di campionamento, adatto a verificare la distribuzione di una contaminazione puntuale all'interno di una partita. Ad eccezione di pochi casi, il campionamento viene quindi eseguito in fase di preacquisto, e solo dopo l'analisi dei risultati si decide per l'acquisto o meno della partita, spostando così a monte la gestione del rischio. Ma il presente piano di controllo, essendo stato progettato per le contaminazioni di tipo *spot*, può venire sfruttato, oltre che per controlli sul caffè, anche per indagare la presenza di OTA su altre matrici considerate critiche, per esempio cacao e liquirizia, nonché per verifiche di altri contaminanti non equamente distribuiti nella massa.

CAMPIONAMENTO DEI MOLINI A MAIS ITALIANI PER LA RICERCA DELLE FUMONISINE NEI PRODOTTI DELLA TRASFORMAZIONE INDUSTRIALE

Enrico Costa (a), Francesca Vanara (b), Amedeo Reyneri (b), Amedeo Pietri (c), Roberto Causin (d), Carlo Brera (e)

(a) Associazione Italiana Raccoglitori Essiccatori Stocicatori (AIRES), Treviso

(b) Dipartimento di Agronomia, Selvicoltura e Gestione del Territorio, Università degli Studi di Torino, Grugliasco

(c) Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza

(d) Dipartimento del Territorio e Sistemi Agroforestali, Università degli Studi, Padova

(e) Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La presenza di fumonisine nei prodotti della trasformazione del mais è un problema la cui importanza è andata crescendo, sia per la maggiore attenzione rivolta alle contaminazioni nei cereali sia per l'entrata in vigore di severe normative (Reg. CE 856/2005), relative alla contaminazione da fumonisine dalla granella ai diversi prodotti derivati ad uso alimentare.

La normativa prevede limiti per la granella e per le singole frazioni derivanti dal processo di molitura. La severità dei limiti prospettati su tutti i prodotti della trasformazione molitoria richiede una verifica dei tassi di abbattimento che si verificano durante le lavorazioni per individuare condizioni critiche e tipologie in grado di esercitare una più efficace decontaminazione. Su tale base, i principali molini a mais italiani hanno deciso di svolgere un'indagine coordinata volta a raccogliere le informazioni necessarie a definire la ripartizione delle fumonisine nei più importanti prodotti derivati.

Hanno partecipato al progetto 15 impianti con processi di trasformazione rappresentativi delle principali modalità di trasformazione ad uso alimentare (molini a secco, a umido e a semiumido). Gli areali di origine della materia prima sono Veneto, Friuli, Lombardia, Piemonte e alcuni areali maidicoli esteri. La metodica di campionamento, unica per tutti gli impianti e coordinata da un responsabile presente al momento del prelievo, prevede il prelievo di campioni elementari e la formazione del campione globale secondo le modalità e le quantità previste dal Reg. CE 401/2006 sul campionamento delle micotossine nei cereali. I prodotti campionati nel corso della lavorazione sono stati individuati in ciascun impianto in funzione delle specifiche trasformazioni, ma seguendo sempre il principio di prelevare tutte le frazioni che nel loro insieme possano ricostruire la granella di origine. I campioni globali così prelevati sono stati consegnati all'ISAN dell'Università di Piacenza, per la macinazione, omogeneizzazione e analisi con metodica HPLC.

I primi dati confermano quanto già riportato in letteratura, con tenori inferiori al mais di partenza per i prodotti ad uso alimentare quali farine e *grits*. Le tipologie di impianti esaminati non influenzano in modo netto la ridistribuzione delle fumonisine nei prodotti

comuni (germe, farinetta). Si osservano invece delle differenze nei prodotti finiti, evidenziando un aumento della contaminazione al ridursi della granulometria (da $> 4000 \mu$ per gli spezzati grossi a $< 250 \mu$ per le farine più fini). I dati raccolti consentono di definire il coefficiente di redistribuzione della tossina nei prodotti finiti specificando, grazie alla presenza di lotti di granella a diversa contaminazione, qual è il livello di variazione del coefficiente in funzione del livello di contaminazione iniziale.

Seconda sessione
Impatto delle micotossine
sulla filiera agro-alimentare e mangimistica

Moderatori

Marina Miraglia, Giovanni Monastra

SVILUPPO DELLA FUSARIOSI DELLA SPIGA DI FRUMENTO E CONTAMINAZIONE DI MICOTOSSINE ASSOCIATE ALLA MALATTIA IN CAMPO IN ITALIA IN CONFRONTO CON TRE NAZIONI EUROPEE: 4 ANNI DI INDAGINI DEL PROGETTO UE RAMFIC

Antonio Moretti (a), Antonia Susca (a), Giuseppina Mule (a), Alberto Ritieni (b)
(a) *Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA), Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari*
(b) *Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Università degli Studi Federico II, Parco Gussone, Napoli*

La fusariosi della spiga di frumento è causato da un complesso di specie del genere *Fusarium* che producono metaboliti tossici nocivi sia alla salute umana ed animale sia dannosi per le piante sulle quali essi si accumulano. Fra questi, particolarmente importante è il deossinivalenolo (DON), potente inibitore della sintesi proteica. Dalla stagione 2001 fino a quella 2004, abbiamo monitorato lo sviluppo della fusariosi della spiga di frumento in Italia, confrontando i nostri dati con quelli ottenuti da altri gruppi in tre nazioni Europee (Irlanda, Ungheria e Inghilterra), caratterizzate da condizioni ambientali molto differenti. In Italia, i dati sono stati raccolti su un totale di 60 siti diversi. Per ogni campione derivante da un singolo sito sono state raccolte 300 spighe con campionamento *random*. I dati raccolti hanno riguardato: l'analisi dei sintomi della malattia all'infiorescenza; l'indagine sulla presenza nelle spighe dei patogeni fungini causanti la fusariosi e la loro quantificazione eseguita attraverso analisi molecolari con l'uso di PCR quantitativa all'infiorescenza, alla maturazione latte e al raccolto; l'analisi della presenza di micotossine, in particolare DON, beauvericina ed enniatine, nelle cariossidi alla raccolta; l'analisi dei dati climatici orari relativi a precipitazioni, umidità relativa e temperatura nell'intervallo fra i 15 giorni precedenti la fioritura fino al raccolto. I dati di campo hanno permesso di ottenere una approfondita conoscenza delle specie prevalenti e della loro interazione. Le principali acquisizioni hanno rivelato che *F. poae* è stata la specie prevalente in ambito Italiano; negli ambienti più freddi *F. graminearum* aumentava la propria presenza, mentre *F. culmorum* raramente è stato isolato in Italia e le specie fungine causanti la fusariosi hanno dimostrato di essere correlate positivamente per quel che concerne la loro presenza/assenza. Infine, la contaminazione da micotossine, in particolare DON, ha riguardato il 42% dei campioni italiani, sebbene, in generale, il livello di micotossine presenti è stato molto basso con l'eccezione di due campioni dell'Italia centrale contenenti livelli di DON molto alti (fino a 15 parti per milione). Infine, i dati di campo hanno indicato che il livello di micotossine non era correlato alla biomassa fungina (calcolata come DNA totale della specie indagata) con l'eccezione di *F. graminearum* e che all'interno di ogni singolo campo, per alcuni dei quali negli ultimi 2 anni di indagini si sono effettuati dei sub-campioni, la contaminazione da parte di ogni singola specie e le micotossine ad esse associate, variavano notevolmente.

PERCORSI PRODUTTIVI PER IL CONTROLLO DELLA CONTAMINAZIONE DA *FUSARIUM*-TOSSINE

Amedeo Reyneri, Massimo Blandino, Francesca Vanara
Dipartimento di Agronomia, Selvicoltura e Gestione del Territorio, Università degli Studi di Torino, Grugliasco

La cerealicoltura italiana negli ultimi anni sente sempre di più l'esigenza di differenziare le sue produzioni, selezionando e destinando a specifiche destinazioni d'uso (alimentare, zootecnico, ...) le partite in funzione di aspetti qualitativi e del livello di contaminazione da micotossine.

Nella maiscoltura la selezione delle partite e la messa a punto di processi produttivi dedicati non è ancora diffusa, ma l'entrata in vigore del Reg CE 586/2005 impone una decisa accelerazione. Per arrivare alla produzione di partite caratterizzate è necessario un grande sforzo da parte di tutti i soggetti della filiera, partendo soprattutto dalla produzione primaria in campo, seguita dalla fase di stoccaggio per gli aspetti organizzativi della gestione della formazione dei silos di stoccaggio.

Il presente lavoro si pone come obiettivo quello di sintetizzare numerose esperienze maturate negli ultimi anni per la messa a punto di percorsi produttivi e della organizzazione della filiera maidicola italiana.

L'adeguamento dei percorsi produttivi alla destinazione d'uso della granella può essere condotto prevedendo diversi livelli di attenzione alle pratiche agricole e di post raccolta che influenzano la sanità del prodotto finito. In sintesi si possono ipotizzare 3 livelli, identificabili come livello "minimo", "intermedio" e "massimo". Nel primo caso è richiesta un'epoca di raccolta tempestiva con brevi tempi di prestoccaggio, ed eventualmente il trattamento contro i fitofagi. Al livello intermedio si aggiungono agli elementi precedenti la classe di precocità dell'ibrido, il momento della semina e il trattamento insetticida. Il livello massimo richiede, oltre a quanto detto prima, la specifica dell'ibrido il livello limite di umidità alla maturazione, un'attenzione maggiore in fase di raccolta essiccazione e conservazione.

Per la gestione di queste partite è necessaria una fase di verifica del prodotto verde al momento della consegna. L'analisi immediata delle impurità e del contenuto in micotossine consente la separazione necessaria per la formazione di silos di categorie diversificate.

La scelta della procedura varierà quindi in funzione dell'esigenze del mercato che è stato prestabilito. L'introduzione dei diversi livelli potrebbe essere graduale, con misurazione dei progressi conseguiti nel corso dell'introduzione di progressivi livelli di controllo. L'esame combinato dei numerosi casi di studio consente una prima valutazione dell'efficacia dei diversi interventi adottati e un approccio più critico alla qualità e alla sanità nella moderna.

ASPETTI SANZIONATORI E RESPONSABILITÀ DEGLI OPERATORI

Gaetano Forte
Studio Legale Forte, Ferrara

- Le fattispecie sanzionatorie applicabili in caso di riscontro di micotossine. Quadro generale delle disposizioni sanzionatorie e finalità delle norme coinvolte.
- I reati del codice penale. Esame dei reati del codice penale applicabili e applicati nel caso di positività alle micotossine.
- La legge 283/62. Individuazione della norma penale speciale utilizzabile per sanzionare la presenza di micotossine.
- Le diverse responsabilità degli operatori all'interno della filiera agro-alimentare. Disamina dell'apporto dei singoli soggetti della filiera nella realizzazione della contaminazione e definizione delle diverse responsabilità.
- Il ruolo dell'autocontrollo nell'ambito della difesa. Le modalità per la gestione del problema della contaminazione da micotossine nell'ambito dell'eventuale difesa in giudizio.
- Cenni su alcuni casi concreti.

PREVENZIONE DELLE MICOTOSSINE NEI PRODOTTI VEGETALI

Paola Battilani (a), Amedeo Pietri (b)

(a) *Istituto di Entomologia e Patologia Vegetale, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

(b) *Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

Le micotossine hanno acquisito in questi ultimi anni notevole interesse, in quanto sono state classificate al primo posto nella lista dei rischi alimentari cronici per la popolazione. Uno strumento utilizzato a livello mondiale per la salvaguardia del consumatore è la definizione di livelli massimi di presenza nelle materie prime e nei derivati. Si tratta di uno strumento utile, ma con notevoli limiti, dovuti ai differenti valori massimi fissati dalle legislazioni dei vari paesi e a disparità nella loro applicazione. Inoltre, i limiti legali non esercitano nessuna azione per ridurre la contaminazione, ma impongono solo limiti nella commercializzazione dei prodotti. La gestione razionale del problema deve perciò basarsi sulla prevenzione, che risulta tanto più efficace quanto più è completa la base di conoscenze e quanto più sono coinvolti tutti gli operatori della filiera.

Le micotossine sono metaboliti secondari di alcune specie fungine appartenenti principalmente ai generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* che si sviluppano a partire dal campo e possono proseguire la loro attività in post-raccolta. Per tutti questi funghi, i fattori principali che ne determinano l'attività sono quelli meteorologici, quali temperatura, umidità e pioggia; quindi, gli studi delle popolazioni fungine e delle loro esigenze ecologiche costituiscono la conoscenza di base. I rapporti con l'ospite, spesso rappresentato da diverse specie vegetali, condizionano il ciclo di infezione del fungo e lo sviluppo epidemico. Pertanto, in ciascuna area geografica, in relazione alle condizioni climatiche e alle colture presenti, si crea una condizione di rischio più o meno elevato per le diverse tossine. Le tecniche colturali sono note per influenzare i parassiti e anche nel caso dei funghi micotossigeni svolgono un ruolo importante, essenzialmente per l'influenza che esercitano sul vigore e sullo stato di stress delle piante. In particolare, gli interventi di controllo dei parassiti mostrano un effetto quantificabile. Il momento di raccolta dei prodotti, come pure la gestione post-raccolta, influenzano il livello di contaminazione.

Tutte le informazioni utili per prevenire la contaminazione da micotossine possono essere raggruppate in linee guida, che rappresentano il supporto per gli operatori di filiera.

Uno strumento molto utile nella prevenzione è rappresentato dai modelli in grado di prevedere l'attività dei funghi nel tempo e quindi di quantificare il rischio di sintesi delle micotossine. Questi utilizzano principalmente i dati meteorologici come input, ma possono tenere conto di qualunque fattore, se sono disponibili dati quantitativi sul suo effetto. Per questo sono in corso diversi progetti per la messa a punto di modelli previsionali in grado di supportare le attività di prevenzione della contaminazione da micotossine nelle diverse filiere produttive.

POLISACCARIDI DA BASIDIOMICETI COME NUTRICEUTICI E MEZZO PER IL CONTROLLO DI MICOTOSSINE

Slaven Zjalic (a), Anna Adele Fabbri (a), Massimo Reverberi (a), Alessandra Ricelli (b), Federico Punelli (a), Corrado Fanelli (a)

(a) *Dipartimento di Biologia Vegetale, Università degli Studi La Sapienza, Roma*

(b) *Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA), Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari*

La capacità dei glucani estratti da basidiomiceti di stimolare la immunomodulazione e la risposta antiossidante nell'uomo è ben nota. Inoltre è stato evidenziato che questi composti sono in grado di proteggere il fegato da danni dovuti ad aflatossine. In particolare, in diversi studi è stata riportata attività antitumorale, antivirale, antibatterica, ipocolesterolemica, epatoprotettiva e regolativa della pressione sanguigna di glucani estratti da alcuni basidiomiceti eduli e non tossici come, ad esempio, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* e *Trametes versicolor*. Studi più recenti dimostrano che gli estratti di alcuni di questi funghi sono in grado di controllare la sintesi di alcune micotossine tossiche e carcinogene come aflatossine, ocratossina A, fumonisina B₁ e zearalenone in differenti sistemi sperimentali. In questo lavoro sono discussi i meccanismi che presiedono l'inibizione della sintesi di aflatossine, *in vitro* e su semi, dimostrata da estratti grezzi e parzialmente purificati di *L. edodes* e *T. versicolor*. Analisi molecolari e *knock-out* genico dimostrano che alcuni geni coinvolti nella modulazione della difesa antiossidante della cellula fungina sono anche coinvolti nel controllo della biosintesi di aflatossine. La delezione di *yap1-like*, fattore trascrizionale responsabile della coordinazione della risposta di difesa antiossidante, altera il *timing* della biosintesi di aflatossine confermando così che lo *stress* ossidativo e il suo controllo sono implicati nella loro sintesi. I risultati ottenuti utilizzando polisaccaridi fungini hanno mostrato una stimolazione della difesa antiossidante di un isolato tossigeno di *Aspergillus parasiticus* e una marcata e durevole inibizione (circa 90%) della biosintesi di aflatossine sia *in vitro* che su semi di grano.

L'aggiunta di polisaccaridi potrebbe essere un mezzo utile per migliorare la qualità di mangimi e generi alimentari e renderli più salubri visto che queste sostanze sono considerate modificatori di risposta biologica (*biological response modifier-BRM*).

SISTEMA REGIONALE DI SORVEGLIANZA PER LA PRESENZA DI MICOTOSSINE IN ALIMENTI E MANGIMI IN EMILIA ROMAGNA

Cecilia Bergamini (a), Simonetta Menotta (b), Lucia Nocera (c), Marco Tamba (b), Laura Vicinelli (c)

(a) Agenzia Regionale Prevenzione e Ambiente dell'Emilia Romagna, Bologna

(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Bologna

(c) Servizio Veterinario Igiene Alimenti, Regione Emilia Romagna, Bologna

La presenza di micotossine nei prodotti alimentari ha imposto l'adozione di modalità e criteri di controllo armonizzati in ambito regionale. Si è ritenuto di predisporre a partire dal 2004 un programma coordinato per la sorveglianza del livello di contaminazione da micotossine delle granelle e delle farine dei cereali destinati all'alimentazione umana e zootecnica, dei mangimi per gli animali e delle produzioni lattiero casearie e di altri prodotti di origine vegetale destinati all'alimentazione umana.

Ai fini di una visione complessiva del problema in tutta la filiera alimentare, l'Assessorato regionale alle Politiche per la salute e l'Assessorato regionale all'agricoltura hanno fornito indicazioni per l'esecuzione dei controlli ufficiali, le verifiche sull'autocontrollo delle aziende produttive, nonché linee guida rivolte ai produttori ed agli stocicatori per prevenire il rischio micotossine.

I controlli sono stati espletati dai Servizi Veterinari e SIAN dei Dipartimenti di Sanità Pubblica delle Aziende USL, avvalendosi dei laboratori di ARPA Emilia Romagna per i campioni di alimenti vegetali destinati al consumo umano, e dell'IZS Lombardia ed Emilia Romagna per gli alimenti zootecnici, il latte ed i derivati del latte.

Nel corso del 2004 sono stati effettuati complessivamente circa 350 campioni di alimenti alla produzione e al commercio, 250 campioni di alimenti per uso zootecnico, e sono state sottoposte mensilmente a monitoraggio 300 aziende di bovini da latte al fine di rilevare percentuali di contaminazioni mensili superiori all'1% di aflatossina M₁ permettendo di verificare da maggio a dicembre circa 2300 aziende su un totale di 6.000 aziende presenti sul territorio regionale.

Nel 2005, anche sulla base dei risultati ottenuti nell'anno precedente, sono stati sensibilmente ridotti i campioni, in particolare il numero di aziende di bovini da latte campionate è stato portato a 100 mensili, consentendo tuttavia di rilevare le irregolarità al fine di apportare le opportune azioni correttive.

Oltre all'aflatossina M₁ sono state ricercate nelle matrici di origine vegetale anche l'aflatossina B₁ e totali, l'ocratossina A e, a partire dal 2006, anche le fusariotossine.

CONTAMINAZIONE DA FUMONISINE NELLA GRANELLA DI MAIS: VALUTAZIONE DEL RISCHIO NELLA FASE DI CAMPO

Andrea Maiorano (a), Guido Maffioli (b), Cesare Ramponi (b), Amedeo Reyneri (a)
(a) *Dipartimento di Agronomia, Selvicoltura e Gestione del Territorio, Università degli Studi di Torino, Grugliasco*
(b) *Dipartimento Agronomico Studi e Sperimentazioni, Pioneer Hi-Bred Italia Srl, Sissa, Parma*

La crescente attenzione rivolta al problema delle micotossine sta sollecitando la ricerca di soluzioni agronomiche in grado di permettere un adeguato controllo delle *fusarium*-tossine. La messa a punto di percorsi colturali in grado di ridurre la crescita e lo sviluppo delle muffe tossigene nella granella di mais è stato l'obiettivo di una ricerca svolta in collaborazione con Pioneer Hi-Bred Italia dal 2003 al 2005. Lo studio ha interessato tutti i principali ambienti maidicoli della Pianura Padano-Veneta, con l'implementazione di diverse strategie colturali in oltre 50 aziende e la conseguente valutazione del livello di contaminazione da fumonisina B₁. L'elaborazione dei dati emersi dalle oltre 1200 analisi chimiche eseguite nei tre anni di sperimentazione ha evidenziato l'importanza delle diverse operazioni colturali prese in considerazione:

- epoca di semina. Sono state messe a confronto tre epoche di semina: anticipata (mediamente ad inizio marzo, appena si presentavano le condizioni agrometeorologiche ideali per la semina), intermedia (entro la seconda settimana di aprile), tardiva (dalla seconda settimana di aprile);
- densità di semina. Confrontate tre diverse densità per lo stesso ibrido Pioneer di classe 500: densità ottimale (individuata di volta in volta dalla ditta sementiera) e densità inferiore e superiore alla ottimale con una differenza di 1,5 piante/m²;
- lotta chimica contro la piralide (confronto fra i campioni di parcelle trattate e non trattate). È stato valutato anche l'effetto combinato dell'epoca di semina con il trattamento;
- epoca di raccolta. Testati 3 momenti di raccolta differenti, ovvero raccolta a tre umidità della granella (30%-26%-22%);
- concimazione azotata: 5 livelli di concimazione azotata da 0 a 450 kg N/ha.

La quantificazione del ruolo esercitato dalle singole operazioni e/o dalla loro interazione sulla contaminazione da fumonisina B₁ ha permesso di "pesare" ogni scelta agronomica con un punteggio. È stata ottenuta una previsione del rischio di accumulo di fumonisina B₁ nella granella alla raccolta, in rapporto al percorso colturale e all'andamento meteorologico dell'annata. I risultati ottenuti indicano che è possibile prevedere il rischio legato ai diversi scenari colturali e, su questa base, orientare le decisioni nella fase di campo, anche considerandone la convenienza economica (costo/beneficio delle singole operazioni colturali). In conclusione, lo studio ha individuato alcuni importanti fattori su cui è possibile intervenire per aumentare significativamente le probabilità di ottenere un prodotto finale alla raccolta che, in base alla destinazione d'uso, rispetti i limiti attuali e futuri definiti dalle normative comunitarie.

INDAGINE SULLA PRESENZA DI TOSSINE T-2 E HT-2 IN CAMPIONI DI CEREALI E LORO DERIVATI PROVENIENTI DAL NORD ITALIA

Roberto Causin (a), Carla Mastella (b), Valentina Mergoni (c), Gianfranco Pizzolato (d),
Lucia Bailoni (b)

(a) *Dipartimento Territorio e Sistemi Agroforestali (TeSAF), Sezione Patologia Vegetale,
Università degli Studi, Padova*

(b) *Dipartimento di Scienze Animali, Università degli Studi, Padova*

(c) *OR SELL, Carpi, Bologna*

(d) *GLM-AIRES, Bologna*

Tra le *Fusarium*-tossine, le T-2 ed HT-2 sono le meno conosciute per diffusione e livello di contaminazione in *food* e *feed*. Per queste sostanze esiste solo una TDI (*Tolerable Daily Intake*) provvisoria molto bassa (0,06 µg/kg) e, proprio per la carenza di dati disponibili, non è ancora stato stabilito se per T-2 ed HT-2 debbano essere fissate delle soglie massime e quale valore queste debbano eventualmente assumere. Con il presente lavoro si fornisce un contributo utile ad aumentare le conoscenze sulla contaminazione da parte di queste micotossine in grano, orzo, avena, mais e loro derivati, provenienti da aree di coltivazione del nord Italia e prelevati in centri di stoccaggio, molini e mangimifici. I campioni analizzati sono stati ottenuti seguendo la metodologia ufficiale e prendendo in esame lotti ritenuti al loro interno omogenei per varietà, provenienza, tecniche di coltivazione e lavorazione post-raccolta. Il dosaggio delle tossine è stato effettuato mettendo a confronto due diverse metodologie analitiche: un metodo immunoenzimatico di tipo competitivo (ELISA) che consente la determinazione della sola T2 nell'intervallo 0,025-0,5 mg/kg ed il metodo HPLC che, invece, permette una sensibilità più elevata. La comparazione è stata effettuata allo scopo di valutare se il test ELISA possa essere utilizzato come strumento sufficientemente affidabile di screening di massa. I dati sono stati sottoposti ad elaborazione utilizzando il pacchetto statistico SAS (1990).

Come in parte atteso, gli esiti delle analisi hanno evidenziato una contaminazione da T-2 e HT-2 diversificata tra i diversi cereali e tra i prodotti da questi ottenuti; la concentrazione di queste micotossine è risultata, in generale, contenuta rispetto ai valori noti per le altre *Fusarium*-tossine sulle stesse matrici. I risultati analitici e le differenze tra i due metodi utilizzati vengono quindi discussi.

L'OCRATOSSINA A NELLA FILIERA VITIVINICOLA: METODI ANALITICI E DISTRIBUZIONE DURANTE I PROCESSI DI VINIFICAZIONE DI UVE ROSSE

Michele Solfrizzo, Giuseppe Panzarini, Angelo Visconti
*Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA), Consiglio Nazionale delle Ricerche,
Bari*

È stata determinata l'evoluzione dell'ocratossina A (OTA) durante la vinificazione in laboratorio (microvinificazione) e su scala industriale di uve rosse con l'obiettivo di: a) determinare la distribuzione percentuale dell'OTA nelle frazioni della vinificazione (mosto/vino, vinacce e fecce); b) verificare l'effetto dei processi di vinificazione (macerazione, torchiatura, sedimentazione delle fecce) sulla concentrazione di OTA nei mosti e nei vini.

La microvinificazione è stata eseguita con 87 kg di uve Negroamaro e 90 kg di uve Primitivo naturalmente contaminate con OTA. Il campionamento, sia durante la microvinificazione che su scala industriale, è stato eseguito subito dopo la pigiatura, macerazione (5 giorni), svinatura, torchiatura e sedimentazione delle fecce (2 travasi). I campioni liquidi (mosti e vini) sono stati analizzati con il metodo IMA/HPLC/FLD (riconosciuto dal CEN, AOAC e OIV) leggermente modificato, mentre per l'analisi delle frazioni solide (vinacce, fecce, vinaccioli) è stato sviluppato un nuovo metodo HPLC che utilizza miscele di acetonitrile:acqua e acetonitrile:metanolo:acqua per l'estrazione dell'OTA dal campione e colonne ad immunoaffinità per la purificazione dell'estratto grezzo. Questo metodo è risultato applicabile anche per l'analisi delle uve con limite di rivelabilità, valori di recuperi e di ripetibilità rispettivamente di 0,1 µg/kg, 78-88% e 4-11%.

Dai risultati delle analisi e dei pesi delle frazioni ottenute durante la microvinificazione del Negroamaro è stato accertato che il 95% dell'OTA presente nelle uve contaminate si distribuisce e rimane adeso alle vinacce (98% nelle bucce e 2% nei vinaccioli), l'1% si lega alle fecce, mentre il 4% si scioglie nel mosto/vino. Gli stessi risultati sono stati ottenuti con il Primitivo che aveva concentrazioni di OTA più elevate.

La concentrazione di OTA nel mosto appena pigiato di Negroamaro (0,69 µg/L) è rimasta invariata nel mosto prelevato dopo la macerazione e la svinatura e nel vino dopo i due travasi. Risultati simili sono stati ottenuti con il Primitivo dove le concentrazioni di OTA erano di circa 6 volte superiori a quelle trovate per il Negroamaro. In questo caso però si è osservato un aumento del 46% della concentrazione di OTA durante la macerazione, probabilmente dovuto alla maggiore quantità di OTA che ha richiesto un tempo più lungo per raggiungere l'equilibrio tra la tossina disciolta nel mosto e quella adesa alle vinacce. Comunque dopo la macerazione anche nel Primitivo la concentrazione dell'OTA rimaneva costante durante le fasi di svinatura e di travaso per la separazione delle fecce. Questi risultati sono stati confermati anche su scala industriale monitorando due cantine per due annate consecutive. Queste informazioni sono utili per gli operatori del settore vitivinicolo per programmare gli interventi finalizzati alla riduzione dell'OTA nei mosti contaminati a concentrazioni superiori al limite di legge.

VALUTAZIONE DEL FATTORE DI TRASFERIMENTO DI AFLATOSSINA M₁ NEI FORMAGGI A PASTA DURA A LUNGA STAGIONATURA E STUDIO DELLA SUA DISTRIBUZIONE NELLA FORMA

Luca Zarenghi (a), Giorgio Fedrizzi (b), Simonetta Menotta (b), Marian Antonietta Masselli (b),
Danio Ungari (a), Marzio Gorreri (a), Lucia Nocera (c)

(a) Servizio Veterinario, Azienda USL, Parma

(b) Reparto Merceologia Alimenti Origine Animale, Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Bologna

(c) Servizio Veterinario Igiene Alimenti, Regione Emilia Romagna, Bologna

La contaminazione da aflatoossina M₁ del latte nel 2003 ha coinvolto anche la produzione dei formaggi; questa è una realtà molto importante per la regione Emilia Romagna. Tutto il formaggio prodotto con latte non conforme è stato destinato alla distruzione. Tre di queste forme, di cui era nota la concentrazione del latte con cui erano state prodotte, sono state destinate ad un lavoro sperimentale. Le forme sono state sezionate ed analizzate per valutare la distribuzione dell'aflatoossina M₁ al loro interno. Il latte utilizzato per la loro produzione aveva concentrazioni di 62 ng/kg, 94 ng/kg e 103 ng/kg. Ciascuna forma è stata idealmente suddivisa in quattro anelli concentrici a partire dall'interno: nucleo centrale, mezzo raggio, sottocrosta e crosta. Il materiale è stato omogeneizzato separatamente ed in ciascuna porzione è stata effettuata la determinazione dell'aflatoossina M₁ e dell'umidità. Parte del formaggio è stato omogeneizzato *in toto* escludendo la crosta e sono state effettuate le stesse determinazioni. La concentrazione media di M₁ riscontrata nell'omogenato totale della prima forma (latte 62 ng/kg) era di 297 ng/kg; nella seconda (latte a 103 ng/kg) era 191 ng/kg e della forma prodotta col latte a 94 ng/kg era 346 ng/kg. Ciascuna concentrazione dell'omogenato era in linea con la media delle singole frazioni analizzate separatamente. Da ciò si è supposta una distribuzione omogenea di aflatoossina M₁ all'interno della forma. Sono stati analizzati inoltre 23 campioni di forme prodotte con latte non conforme a concentrazione nota e provenienti da 13 caseifici diversi. Lo scopo era quello di valutare sperimentalmente il fattore di concentrazione dell'aflatoossina M₁ fra il latte e il formaggio. Le concentrazioni del latte di partenza erano comprese fra 55 e 280 ng/kg, quelle delle corrispondenti forme erano 80-640 ng/kg. I coefficienti di trasferimento erano compresi fra 0,7 e 5,4. Dai risultati sperimentali non è stato possibile individuare alcuna correlazione fra le concentrazioni del latte e quelle delle corrispondenti forme. Nonostante la variabilità, non sono mai stati ottenuti fattori di concentrazione pari a 9.

IMPIEGO DI DATI METEOROLOGICI PER LA PREVISIONE DEL RISCHIO DI CONTAMINAZIONE DA AFLATOSSINA B₁ NELLA GRANELLA DI MAIS

Carlo Barbano (a), Gianfranco Piva (b), Paola Battilani (a)

(a) *Istituto di Entomologia e Patologia Vegetale, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

(b) *Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

Nel 2003 in Italia è stata riscontrata, per la prima volta, la presenza di aflatoossina B₁ (AFB₁) oltre i limiti di legge, nella granella di mais prodotta nelle regioni del nord Italia. Sono stati avviati pertanto studi finalizzati alla caratterizzazione climatologica degli areali di produzione maidicola e alla valutazione di come i parametri meteorologici possono influenzare l'accumulo di AFB₁ nella granella di mais nel corso della stagione vegetativa. Negli anni 2002 - 2004, sono stati prelevati alla raccolta complessivamente 280 campioni di granella provenienti da altrettanti campi, localizzati in 5 regioni (Friuli Venezia Giulia, Veneto, Lombardia, Piemonte ed Emilia Romagna) e coltivati secondo le ordinarie tecniche colturali della zona. In questi campioni è stato determinato il contenuto di AFB₁ mediante HPLC. I dati sono stati georeferenziati con le coordinate geografiche (latitudine e longitudine) dei comuni di ubicazione dei campi di mais ed archiviati in un database. Inoltre, sono stati raccolti i dati giornalieri di temperatura, pioggia e umidità relativa di 67 stazioni meteorologiche localizzate nelle regioni sopra citate per gli anni 1996 - 2005. Con i dati di temperatura media e pioggia sono stati calcolati gli Indici di Aridità (IA) su base decadale, dalla prima decade di Giugno alla seconda di settembre. Anche i dati meteorologici e le loro elaborazioni sono stati inclusi nel database.

È stata eseguita l'analisi spaziale degli IA ed i risultati sono stati rappresentati mediante mappe *raster* al fine di caratterizzare l'area monitorata in tutti gli anni considerati.

Dopo le analisi statistiche preliminari, è stata eseguita l'analisi della regressione logistica con lo scopo di sviluppare un modello in grado di stimare la probabilità che la granella risulti contaminata alla raccolta in base ai valori di IA registrati nel corso della stagione vegetativa. L'analisi ha selezionato, per la previsione della contaminazione delle cariossidi di mais, i valori di IA dell'ultima decade di giugno, della prima di agosto e dell'ultima di agosto. Secondo le validazioni effettuate, le stime del modello sono corrette nell'89% dei casi considerati; non sono mai state riscontrate sottostime e l'11% di casi mal classificati sono stati sempre falsi allarmi (sovrastime). Questo strumento, che consente di prevedere la contaminazione della granella di mais con AFB₁ prima della raccolta, può essere utilizzato per la definizione degli areali a rischio e per una migliore gestione del prodotto post-raccolta.

Lavoro svolto nell'ambito del progetto AFLARID finanziato dal MiPAF.

Terza sessione

**Metodologie innovative utilizzate
nel settore diagnostico**

Moderatori

Angelo Visconti, Carlo Brera

METODI DI ANALISI PER IL CONTROLLO DELLE MICOTOSSINE: CRITERI E PARAMETRI DI ACCETTABILITA'

Angelo Visconti

Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA), Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari

Numerosi metodi di analisi sono stati sviluppati per il controllo dei livelli di contaminazione delle principali micotossine in vari prodotti alimentari. Tali metodi prevedono, generalmente, una fase di estrazione della tossina dalla matrice, una fase di purificazione dell'estratto allo scopo di eliminare possibili interferenze dovute alla matrice ed infine la rivelazione e determinazione della tossina mediante un'opportuna tecnica strumentale. La purificazione dell'estratto è una fase cruciale dell'analisi, soprattutto quando la tossina è presente in matrice a livelli di tracce (ppb o ppt). Le tecniche di purificazione più utilizzate sono quelle che utilizzano minicolonne opportunamente impaccate con fasi stazionarie di elevata purezza e omogeneità (colonne SPE o MycoSep®) o con anticorpi specifici per la micotossina (colonne ad immunoaffinità). Le principali tecniche per la determinazione delle micotossine sono essenzialmente tecniche cromatografiche ed immunometriche (in particolare ELISA e *membrane-based immunoassay*). La cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) con rivelazione a fluorescenza, UV o a spettrometria di massa (MS) è la tecnica strumentale più frequentemente utilizzata poiché garantisce una buona sensibilità, precisione e accuratezza dei risultati. In particolare, metodi analitici che utilizzano colonne ad immunoaffinità in combinazione con l'HPLC sono stati recentemente validati mediante studi interlaboratorio e adottati come metodi ufficiali di analisi di micotossine sia dall'AOAC (*Association of Official Analytical Chemists International*), sia dal CEN (*European Committee for Standardization*). La gas-cromatografia (GC) viene utilizzata prevalentemente per l'analisi dei tricoteceni. Le tecniche immunometriche, rispetto alle altre tecniche strumentali, presentano una serie di vantaggi tra cui rapidità di esecuzione (con possibilità di analizzare un numero elevato di campioni al giorno), semplicità nella preparazione ed esecuzione del saggio ed investimenti strumentali estremamente contenuti. Per tale motivo esse vengono preferite nei laboratori di controllo qualità nelle fasi di "screening" del prodotto. Tuttavia la possibilità di avere risultati falsi-positivi a causa di interazione dell'anticorpo con sostanze interferenti (cross-reattività) impone la conferma dei risultati con metodiche analitiche più consolidate (per es. l'HPLC). I criteri e i parametri di accettabilità (valori di recupero, precisione *inter-* e *intra-*laboratorio) dei metodi di analisi da utilizzare per il controllo del tenore massimo delle principali micotossine nei prodotti alimentari sono stati recentemente stabiliti a livello comunitario. Alcuni metodi emergenti basati su tecniche innovative quali la polarizzazione di fluorescenza, *Molecularly Imprinted Polimers* (MIP), spettroscopia infrarossa (MIR, NIR), elettroforesi capillare (CE), e biosensori elettrochimici ed ottici SPR sono stati recentemente proposti per l'analisi di micotossine, sebbene la loro applicazione a campioni reali necessita ulteriori approfondimenti.

RICADUTE DELLA LEGISLAZIONE COMUNITARIA SULLE PROBLEMATICHE LEGATE ALLA FASE DIAGNOSTICA NELLA DETERMINAZIONE DELLE MICOTOSSINE

Carlo Brera, Marina Miraglia, Barbara De Santis, Francesca Debegnach, Elena Pannunzi
*Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore
di Sanità, Roma*

Nel settore delle micotossine, la normativa europea e nazionale degli ultimi anni è stata formulata sulla base di alcuni criteri omogenei quali la tutela della salute pubblica, la praticabilità da un punto di vista tecnologico, l'esistenza di metodi di analisi validati e di procedure di campionamento caratterizzate da componenti di natura sia statistica che sostanzialmente pragmatica.

In particolare, a livello comunitario, la fase diagnostica è stata ampiamente regolamentata sia con l'emanazione di Direttive *ad hoc*, verticali e orizzontali, che con norme riguardanti la definizione di metodi validati e la fissazione delle caratteristiche di efficienza dei metodi per la determinazione delle micotossine.

Più specificatamente, relativamente alla valutazione quantitativa, sono stati introdotti nuovi parametri come la valutazione dell'incertezza di misura, la obbligatorietà di esprimere il fattore di recupero nel rapporto di prova, il criterio di accettabilità di un prodotto correlando la sua conformità ad un intervallo di valori attorno al valore medio considerando l'incertezza di misura, l'introduzione, per i prodotti alimentari di origine animale, di norme da utilizzare nelle analisi di campioni ufficiali e di criteri comuni per l'interpretazione dei risultati analitici provenienti dai laboratori di controllo ufficiali (errore α e β , limite di decisione), l'istituzione obbligatoria di Laboratori nazionali di riferimento, e la obbligatorietà da parte dei laboratori di acquisire l'accreditamento delle prove.

Analogamente, per quanto concerne la fase di campionamento, le recenti normative hanno innanzitutto assicurato la disponibilità di un unico strumento normativo sottoforma di Regolamento a sostituzione delle numerose precedenti Direttive, l'identificazione univoca dei ruoli spettanti alle diverse realtà coinvolte nel controllo ufficiale dei prodotti alimentari (prelevatori, laboratori di analisi, revisione delle analisi), la descrizione delle modalità di prelevamento nei diversi siti di campionamento dall'importazione al dettaglio, e la descrizione delle procedure relative alla preparazione del campione.

A seguito pertanto dell'entrata in vigore di tali provvedimenti normativi, le varie strutture coinvolte nei controlli di legge sono e saranno chiamate a fronteggiare i requisiti richiesti con una pianificazione delle priorità (formazione, accreditamento, logistica delle strutture) per garantire che le attività di controllo effettuate siano tali da soddisfare effettivamente il criterio di tutela della salute del consumatore.

STUDIO DI VALIDAZIONE DI UN METODO IN HPLC PER LA DETERMINAZIONE DELLA AFLATOSSINA B₁ IN CAMPIONI DI MAIS

Carlo Brera, Francesca Debegnach, Valentina Minardi, Elena Pannunzi, Barbara De Santis,
Marina Miraglia

*Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore
di Sanità, Roma*

Le aflatossine sono micotossine prodotte da specie di *Aspergillus*, principalmente *A. flavus* e *A. parasiticus*. La produzione di micotossine è influenzata dal clima, ed in particolare dalle condizioni di umidità. Le aflatossine sono sostanze chimicamente riferibili alla difuranocumarina; la serie B contiene un anello ciclopentenonico responsabile della maggiore tossicità. Gli effetti tossici delle aflatossine sono riconducibili ad epatotossicità, iperplasia dei condotti biliari, emorragia del tratto gastrointestinale e dei reni, l'aflatossina B₁ è genotossica e classificata dallo IARC nel gruppo 1. I prodotti passibili di contaminazione includono mais, arachidi, cotone, spezie, mandorle, pistacchi, nocciole e noci del Brasile.

Al fine di valutare l'efficienza di un metodo in HPLC per la determinazione della aflatossina B₁ (AFB₁) in campioni di mais è stato organizzato uno studio di validazione interlaboratorio. I livelli di contaminazione dei materiali impiegati sono stati opportunamente scelti tenendo in considerazione i limiti di legge attualmente in vigore nella Comunità Europea. Allo studio di validazione hanno partecipato 22 laboratori nazionali e 7 europei.

Si riporta brevemente il metodo sottoposto a validazione. Il campione viene estratto con una miscela metanolo-acqua (80+20), filtrato, diluito con una soluzione tampone (PBS-phosphate buffered saline), filtrato su filtro a microfibra e purificato mediante passaggio su colonna di immunoaffinità. L'aflatossina B₁ viene eluita con metanolo, separata e quantificata in HPLC e rivelata con spettrofluorimetro dopo derivatizzazione pre o post colonna. La derivatizzazione pre-colonna, impiegata da 8 laboratori, è stata eseguita preparando il derivato dell'acido trifluoroacetico (TFA). La derivatizzazione post-colonna prevede la formazione del bromo derivato ed è stata effettuata sia mediante la reazione in una camera a T con una soluzione di PBPB (pyridinium hydrobromide perbromide-16 laboratori), sia mediante la generazione di bromo in cella elettrochimica (5 laboratori). Le tecniche di derivatizzazione impiegate non hanno presentato performance significativamente differenti, quindi, ai fini della trattazione statistica sono state considerate equivalenti.

Per lo studio interlaboratorio ai partecipanti è stato richiesto di analizzare 5 materiali a diversi livelli di contaminazione. Il protocollo di lavoro prevedeva che le analisi fossero effettuate in due diverse giornate. I campioni inviati per le analisi erano blind duplicates. I valori medi del recupero sono rispettivamente 82 e 84% per i campioni ad alta e bassa concentrazione. Le deviazioni standard relative di ripetibilità (RSD_r) e riproducibilità (RSD_R) variano rispettivamente tra 9,86 e 28,71% e 18,59 a 36,83%. Il metodo presenta parametri accettabili di variabilità intra- e inter- laboratorio come evidenziato dai valori ottenuti dall'equazione di HORRAT.

APPLICAZIONI E CARATTERISTICHE DI COLONNINE DI IMMUNOAFFINITÀ RIGENERANTI PER L'ANALISI DELLE MICOTOSSINE SU MATRICI ALIMENTARI

Enrico Arletti
Generon srl, Modena

Ormai è prassi che l'analisi strumentale di laboratorio per la determinazione delle micotossine sia preceduta da una fase di purificazione effettuata con l'ausilio di sistemi di purificazione su colonnina di immunofinità in grado di separare attraverso un anticorpo le micotossine dai coestrattivi interferenti migliorando notevolmente il tracciato strumentale e conferendo all'analisi ulteriori vantaggi in termini di accuratezza di dati sperimentali.

Le colonnine di immunofinità attualmente in uso sono monouso ossia in grado di essere utilizzate per una sola purificazione dopodiché non sono più idonee all'uso. Prove di laboratorio in merito al possibile riutilizzo di tali colonnine monouso ha di fatto evidenziato un netto calo della capacità di trattenimento sin dal secondo riutilizzo.

Oggetto della presentazione saranno le nuove colonnine multiuso Monolite TM, prime al mondo in grado di essere riutilizzate più volte direttamente su matrice mantenendo inalterato il rendimento.

Il sistema che qui presentiamo è un sistema di purificazione "tipo" di immunofinità a doppia colonna, una colonna monouso detta Valiax ed una colonna multiuso chiamata Monolite TM. La colonna Valiax preserva la Monolite TM da dannosi effetti matrice preservandone di fatto l'attività per lungo tempo con inalterate capacità di legame di affinità per le micotossine.

Tale nuovo sistema è un brevetto italiano di proprietà di Generon e garantisce innumerevoli vantaggi tra cui:

- possibilità di misurare il recupero effettivo della colonna sui vari campioni in modo accurato (Spike), infatti non cambiando la colonna si è certi che il recupero ottenuto è quello relativo effettivamente al sistema di misura utilizzato;
- maggior pulizia del tracciato HPLC o strumentale in quanto la doppia colonna del sistema Monolite TM-Valiax consente su diverse matrici di ottenere un tracciato con minori interferenze rispetto alle colonne monouso;
- notevole risparmio economico tanto maggiore quanto più numerosi saranno i cicli di riutilizzo della monolite.

Durante la presentazione saranno descritte nel dettaglio le caratteristiche del sistema Monolite TM e saranno portati innumerevoli esempi di applicazioni su svariate matrici alimentari utilizzando differenti strumentazioni.

DETERMINAZIONE DI TRICOTECENI E AFLATOSSINE NEI CEREALI: METODI HPLC-FLD E LC/ESI/MS A CONFRONTO

Chiara Dall'Asta, Mattia Mangia, Gianni Galaverna, Stefano Sforza, Arnaldo Dossena,
Rosangela Marchelli

Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università degli Studi, Parma

La tecnica di elezione per la quantificazione delle micotossine è stata, fino ad oggi, la rivelazione in fluorescenza. Infatti, essa è robusta, specifica e consente un'elevata sensibilità, grazie al basso rumore di fondo. Pertanto, i più comuni metodi di analisi per le micotossine prevedono solitamente una rivelazione in fluorescenza, preceduta, se necessario, da uno *step* di derivatizzazione pre- o post-colonna. Tali metodi, però, non possono prescindere da un adeguato trattamento del campione che, solitamente, prevede una fase di estrazione e uno *step* di *clean-up* e concentrazione dell'analita su colonnine ad immunoaffinità (IAC).

Il principale svantaggio di tali metodi è la difficoltà di analisi simultanea di più micotossine: infatti, la purificazione mediante IAC è solitamente tossina-specifica e spesso le tecniche di derivatizzazione con marcatori fluorescenti sono ottimizzate solo per un analita.

La possibilità di analisi multiresiduali è invece la maggiore potenzialità dei metodi basati sulla spettrometria di massa che inoltre consentono un minor trattamento del campione. Tali metodi, però, spesso non consentono un'elevata sensibilità, soprattutto per quelle micotossine normate a livello di tracce.

In questa comunicazione verranno confrontate le tecniche di analisi HPLC-FLD e LC/ESI/MS sia per l'analisi multiresiduale di tricoteceni che di aflatossine. In particolare, verranno descritti e confrontati due metodi innovativi recentemente sviluppati dal nostro gruppo di ricerca per la quantificazione simultanea di tricoteceni di classe A e B sia mediante HPLC-FLD previa derivatizzazione con cumaroil-3-carbonil cloruro sia mediante LC-ESI-MS con l'uso di NaCl come agente di cationizzazione. Successivamente, verranno illustrati i risultati ottenuti nell'analisi di aflatossine sia mediante HPLC-FLD che mediante LC/ESI/MS/MS. In particolare, il metodo basato sulla rivelazione spettroscopica prevede l'utilizzo di ciclodestrine direttamente disciolte nella fase mobile cromatografica come agenti di incremento di fluorescenza. Invece, la tecnica di spettrometria di massa tandem prevede, oltre ad un'accurata scelta dei parametri di frammentazione, l'utilizzo di un'opportuna fase mobile in grado di favorire la solitamente scarsa ionizzazione delle aflatossine, in modo da permettere un'elevata sensibilità anche in assenza di uno *step* di *clean-up* e preconcentrazione del campione mediante immunoaffinità.

IMPIEGO DI NASO ELETTRONICO ABBINATO A MODELLI CHEMOMETRICI PER LA DETERMINAZIONE DELLA CONTAMINAZIONE DA DEOSSINIVALENOLO IN *TRITICUM DURUM*

Vittorio Dell'Orto (a), Giovanni Savoini (a), Alessandro Nichilo (b), Anna Campagnoli (a),
Federica Cheli (a)

(a) *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare,
Università degli Studi, Milano*

(b) *Molino Casillo Francesco SRL, Corato, Bari*

Il naso elettronico (EN) viene definito come uno “Strumento costituito da una serie di sensori elettronici caratterizzati da una parziale specificità ai composti chimici in grado di discriminare odori liberati da singole molecole o miscele”. Tali proprietà rendono l'EN uno strumento estremamente versatile ed a basso costo di esercizio, indicato quindi anche come metodo rapido ed economico di controllo della qualità delle derrate alimentari.

Allo scopo di valutare l'efficacia applicativa dell'EN alla determinazione della tossina deossinivalenolo (DON) nel grano duro (*Triticum durum*) sono stati considerati 300 campioni, provenienti da diverse regioni geografiche (Francia, Siria, Grecia, USA, Canada, Turchia, Italia, Francia, Spagna, Australia) e forniti da diversi laboratori d'analisi europei. Ciascun campione è stato sottoposto ad analisi batteriologica e per la verifica di naturale presenza di muffe, funghi, micotossine (deossinivalenolo, tossina T2, ocratossina A, aflatossine B₁, B₂, G₁, G₂, totali), metalli pesanti (Pb, Cd, Cr), composti organofosforati (59 parametri), e piretroidi (18 parametri). I campioni risultati positivi (da 0,03 a 2,50 ppm) per il solo DON ed una selezione di campioni risultati negativi a tutto il pannello analitico, sono stati aliquotati e destinati alle successive analisi tramite EN PEN2 (*Air sense Analytics GmbH, Sherwin, Germania*), strumento dotato di 10 sensori MOS (Semiconduttori ad Ossidi di Metallo). In una prima fase le analisi sono state impostate inviando lo spazio di testa dei campioni direttamente ai sensori dello strumento, successivamente, ulteriori aliquote degli stessi campioni sono stati preventivamente sottoposti a pretrattamento tramite un arricchitore/desorbitore EDU2 (*Air sense Analytics GmbH, Sherwin, Germania*). Entrambi i protocolli analitici sono stati applicati più volte variando le impostazioni delle due apparecchiature (tempi e temperature). I diversi data set ottenuti (costituiti sempre da campioni analizzati in triplo) sono stati infine sottoposti ad analisi chemometrica tramite il software SAS utilizzando in forma esplorativa l'Analisi della Componente Principale (PCA) e modelli di regressione multipla per verificare l'efficacia dei diversi protocolli analitici impiegati. Una seconda fase dell'analisi dei dati è seguita all'individuazione del protocollo più efficiente ed ha avuto lo scopo di validare, tramite metodo *leave one out*, il modello multivariato più adeguato a predire la concentrazione di DON presente nei campioni.

I risultati ottenuti (*Predictive Error Sum of Squares* = 0,39, $r^2 = 0,89$ r^2 aggiustato = 0,87) hanno dimostrato che il protocollo applicato, associato ad una adeguata analisi dei data set consente di riconoscere la presenza di DON nonché di discriminare i diversi campioni in funzione del loro livello di contaminazione.

METODO RAPIDO PER LA DETERMINAZIONE DI DEOSSINIVALENOLO IN FRUMENTO E DERIVATI BASATO SULLA POLARIZZAZIONE DI FLUORESCENZA

Vincenzo Lippolis (a), Michelangelo Pascale (a), Roberto Ranieri (b), Marco Silvestri (b),
Alessandro D'Alessandro (b), Angelo Visconti (a)

(a) *Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA), Consiglio Nazionale delle
Ricerche, Bari*

(b) *Barilla G. & R. Fratelli SpA, Parma*

Il deossinivalenolo (DON), noto anche come vomitossina, è una micotossina appartenente al gruppo dei tricoteceni prodotta da *Fusarium culmorum* e *Fusarium graminearum*, funghi fitopatogeni largamente diffusi nei cereali. Il DON risulta essere uno dei più comuni contaminanti del frumento ed è stata accertata la sua capacità nell'indurre effetti tossici di varia natura in diverse specie animali.

La Commissione Europea ha recentemente emanato, con decorrenza 1° luglio 2006, i valori massimi ammissibili di DON in cereali e derivati. Lo sviluppo di metodi analitici rapidi, sensibili ed accurati per la determinazione di DON risulta essere di fondamentale importanza al fine di monitorare la contaminazione da DON a livelli prossimi a quelli riportati nella regolamentazione europea e preservare la salute del consumatore all'esposizione alla micotossina. È stato messo a punto un metodo rapido, basato sulla Polarizzazione di Fluorescenza (FP), per la determinazione di DON in campioni di frumento duro e tenero, semola e pasta. Il metodo prevede l'estrazione del campione con tampone PBS, filtrazione e determinazione del contenuto di DON mediante immunosaggio FP. L'immunosaggio si basa sulla competizione per un anticorpo monoclonale DON-specifico tra il DON e un derivato fluorescente del DON (DON-FL) ottenuto attraverso reazione selettiva del DON, sulla funzionalità idrossilica in posizione C3, con 4'-(amminometil)-fluoresceina. Il valore della polarizzazione di fluorescenza, misurato per l'estratto del campione sottoposto ad immunosaggio, risulta essere inversamente proporzionale al contenuto di DON. Il limite di determinazione del metodo FP è di 0,08 µg/g di DON per tutte le matrici analizzate con un tempo complessivo di analisi inferiore a 15 minuti. I recuperi medi, ottenuti nel range 0,25-1,75 µg/g, sono rispettivamente del 98% per il frumento duro, 101% per il frumento tenero, 102% per la semola, 101% per la pasta con deviazioni standard relative minori del 5% (n = 4).

Uno studio comparativo tra il metodo FP e il metodo HPLC/UV che prevede l'utilizzo di colonnine ad immunoaffinità (utilizzato come metodo di riferimento) ha mostrato una buona correlazione tra le concentrazioni di DON ottenute con le due metodiche analitiche (coefficiente di correlazione, $r > 0,995$) per 35 campioni naturalmente contaminati di frumento duro, 32 di frumento tenero, 22 di semola, 26 di pasta. Il metodo FP presenta quindi performance in termini di accuratezza, precisione, sensibilità e rapidità tali da garantirne l'utilizzo per un adeguato monitoraggio della contaminazione da DON nei vari prodotti della filiera del frumento.

ANALISI SIMULTANEA DI DIECI FUSARIOTOSSINE NEI CEREALI: UN NUOVO APPROCCIO MEDIANTE LC- MS/MS

Rosalia Ferracane, Maria Carmela Somma, Alberto Ritieni

Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Università degli Studi Federico II, Portici, Napoli

Lo scopo di questo lavoro scientifico è quello di sviluppare un metodo rapido, sensibile ed efficiente di estrazione e di analisi simultanea di dieci micotossine prodotte da funghi del genere *Fusarium*: nivalenolo (NIV), deossinivalenolo (DON), 3 acetil-deossinivalenolo (3-AcDON), diacetossiscirpenolo (DAS), neosolanolo (NEO), HT-2, T-2, fusarenone X (FUS-X), zearalanone (ZAN) e zearalenone (ZON). L'analisi quantitativa e l'identificazione strutturale sono eseguite mediante cromatografia liquida accoppiata ad uno spettrometro di massa *tandem* (LC-MS/MS). Si utilizza allo scopo uno spettrometro di massa API 3000 triplo quadrupolo (Sciex, Ontario), equipaggiato con un'interfaccia APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*). L'analisi di spettrometria di massa è stata eseguita in MRM (*Multiple Reaction Monitoring*).

Nello sviluppo del metodo si valuta l'efficienza di tre differenti metodi estrattivi applicati a due matrici cerealicole molto diffuse quali il mais ed il grano. L'estrazione dei campioni è eseguita secondo la procedura tradizionale, utilizzando 5 g di campione e 50 mL di una miscela estraente acetonitrile/acqua (84:16 v/v). Nei primi due metodi si utilizza una procedura di *clean-up*, basata sull'utilizzo di colonne C18 della Phenomenex o di colonne R-Biopharm della Rhone LTD. Nel terzo metodo testato gli estratti organici sono filtrati su RC da 0,22 µm ed analizzati direttamente per LC-MS/MS senza ulteriori fasi di *clean-up*.

La differente efficienza dei tre metodi è valutata confrontando i valori di recupero ottenuti su entrambe le matrici contaminate ad un livello di 250 µg/kg. Le percentuali di recupero (comprese tra l'80 e il 90%) evidenziano una maggiore convenienza del terzo metodo selezionato che non prevedendo l'utilizzo del *clean-up* consente un risparmio in termini di costi e di tempo. Tale metodo è ottimizzato dopo la verifica delle due matrici non contaminate e poi artificialmente contaminate a tre diversi livelli di contaminazione: 250 µg/kg, 100 µg/kg e 30 µg/kg. La linearità delle curve di calibrazione di tutte le micotossine analizzate è compresa tra 10 e 1.000 µg/kg, il limite di determinabilità è compreso tra 0,2 e 3,3 µg/kg e quello di quantificabilità tra 0,5 e 5 µg/kg.

STUDIO DI PARAMETRI CHE POSSONO INFLUIRE SULLA PERFORMANCE DI METODI IMMUNOCHEMICI PER IL DOSAGGIO DI AFM₁ IN MATRICI CASEARIE

Tiziana M.P. Cattaneo (a), Elena V. Panarelli (a), Stefania Iametti (b), Amedeo Pietri (c), Lucia Monti (a)

(a) *Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA), Istituto Sperimentale Lattiero Caseario, Lodi*

(b) *Dipartimento di Scienze Molecolari Agro-alimentari, Facoltà di Agraria, Università degli Studi, Milano*

(c) *Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

La disponibilità di metodi immunochimici basati sul principio ELISA per la determinazione di aflatossina M₁ (AFM₁) in latte e derivati non può prescindere da valutazioni di precisione, di accuratezza e di semplicità che sono regolati dalla norma UNI EN ISO 14675/2003. L'influenza del tipo di matrice casearia analizzata, i relativi metodi di estrazione, così come il tipo di anticorpi utilizzati e l'intervallo di linearità dei diversi sistemi immunochimici oggi commercializzati possono dare origine ad errori analitici con conseguenze negative sulla risposta quantitativa.

Per cercare di dare risposte concrete, all'interno del progetto finalizzato MiPAF "Ricerca per la riduzione della contaminazione da aflatossine nel latte e derivati – AFLARID", questa problematica è stata affrontata sottoponendo ad analisi ELISA diverse matrici di origine casearia, utilizzando tre differenti *kit* immuno-enzimatici competitivi a 96 pozzetti, caratterizzati da specifiche tecniche e procedure di estrazione diverse.

Il dosaggio di AFM₁ è stato effettuato nel latte di partenza, nei derivati (panna, burro, crescenza, caprino, ricotta, mozzarella da fermentazione lattica e ottenuta per acidificazione con acido citrico) e nei reflui corrispondenti (siero, scotta, latticello) da operatori diversi e in due differenti laboratori. I *kit* commerciali utilizzati garantivano un'alta specificità, con valori di reattività per l'AFM₁ del 100%, limiti di rilevabilità di 5 ng/kg per il latte, 25 ng/kg per il burro e 37,5 ng/kg per i formaggi. Il livello di cross-reazione, con altre tossine eventualmente presenti nel latte, era stimato essere sempre inferiore al 20%. La risposta e la precisione ELISA è stata stimata anche per confronto con i dati analitici ottenuti per HPLC applicato alle specifiche matrici.

Tutti i *kit* ELISA utilizzati hanno fornito risultati comparabili ai dati HPLC su matrici liquide e/o ad elevato tenore lipidico. Elevate quantità di AFM₁ pregiudicano la precisione della determinazione ELISA. Il dosaggio in derivati del latte è peraltro influenzato dal tipo di anticorpi utilizzati, dall'ampiezza dell'intervallo di linearità di risposta e dalle procedure di estrazione.

DETERMINAZIONE DELLO ZEARALENONE E DEI SUOI METABOLITI α - E β -ZEARALENOLO NEL MAIS MEDIANTE ALTERNATE ISOTOPE-CODED DERIVATIZATION ASSAY (AIDA)

Stefano Sforza, Alessandra Moseriti, Chiara Dall'Asta, Gianni Galaverna, Rosangela Marchelli

Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università degli Studi, Parma

Lo zearalenone (ZEA) è una micotossina ad azione estrogenica prodotta da alcune specie di *Fusarium* che possono svilupparsi in campo sui cereali in opportune condizioni ambientali. L'Unione Europea ha recentemente fissato mediante la disposizione 856/2005/EG i limiti di legge per lo zearalenone nei cereali, nei prodotti a base di cereali e nei baby food a 100 ng/g, 50 ng/g e 20 ng/g, rispettivamente.

Nella presente comunicazione verrà descritta l'applicazione all'analisi dello zearalenone di un nuovo approccio di diluizione isotopica chiamato *Alternate Isotope-Coded Derivatization Assay* (AIDA) per la quantificazione mediante LC/MS di molecole per i quali non sia possibile reperire lo standard interno isotopico.

In particolare, tale approccio si propone di ottenere un derivato isotopico dell'analita mediante reazione *in situ* tra l'analita stesso ed un opportuno reagente disponibile commercialmente in due forme isotopiche pure e a basso costo. L'analisi LC/ESI/MS verrà quindi condotta in modo da monitorare contemporaneamente le due forme *light* ed *heavy* del derivato ottenuto. I dati qui riportati per la determinazione dello zearalenone e i suoi metaboliti α - e β -zearalenolo (ZOLs) in farina di mais mostrano come l'approccio sviluppato sia potenzialmente in grado di superare molti dei problemi solitamente legati alla quantificazione accurata delle micotossine negli alimenti mediante tecniche cromatografiche accoppiate alla spettrometria di massa.

UTILIZZO DI UNA PIASTRA IMMUNOELETTROCHIMICA PER LA DETERMINAZIONE DELL'AFLATOSSINA B₁ NEL MAIS

Silvia Piermarini, Laura Micheli, Danila Moscone, Giuseppe Palleschi
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università degli Studi Tor Vergata, Roma

In questo lavoro, viene proposto un metodo di analisi dell'aflatossina B₁ (AFB₁) nel mais mediante una nuova immunoplastra elettrochimica. I pozzetti della piastra elettrochimica sono utilizzati sia come supporto sia come trasduttore di segnale per la realizzazione di immunosensori, e la tecnica di rivelazione utilizzata è l'amperometria ad impulsi intermittenti (IPA). La piastra elettrochimica è stata caratterizzata dal punto di vista della scelta del potenziale da applicare, di concentrazione di substrato enzimatico e di studio delle procedure di pretrattamento. Si è quindi passati al saggio ELISA utilizzando un format di tipo competitivo indiretto. Lo studio è stato effettuato prima in tampone per valutare il limite di rivelabilità, la sensibilità, la riproducibilità, la stabilità e per ottimizzare i tempi di analisi, mostrando un buon intervallo di lavoro comprendente i limiti di legge imposti dalla Comunità Europea per questa micotossina. L'immunoplastra è stata applicata per l'analisi di campioni di mais fortificati con l'AFB₁ dopo e prima trattamento del campione per valutare, rispettivamente, l'effetto matrice e l'efficienza di estrazione.

L'immunoplastra realizzata permette il connubio tra la sensibilità degli immunosensori elettrochimici basati su elettrodi stampati e la manualità della piastra ELISA a 96 pozzetti, consentendo la possibilità di effettuare curve di calibrazione ed analisi di numerosi campioni, in replicati, nello stesso istante.

Gli autori desiderano ringraziare per i finanziamenti ricevuti il Ministero delle Politiche Agricole, progetto "Aflarid" e la EUROLAB srl.

DETERMINAZIONE DI PATULINA IN CROMATOGRAFIA LIQUIDA/SPETTROMETRIA DI MASSA TANDEM IN SUCCHI, PUREE DI FRUTTA E *BABY FOODS*

Cecilia Bergamini, Manuela Di Giovanni, Barbara Romagnoli, Veronica Menna
Agenzia Regionale Prevenzione e Ambiente dell'Emilia Romagna, Sezione Provinciale di Bologna

La patulina è una micotossina prodotta da alcuni funghi del genere *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssochlamys*, la si può ritrovare su diversi tipi di frutta, specie se ammuffita, ma gli alimenti maggiormente contaminati sono i prodotti derivati dalle mele.

Il Reg (CE) N° 1425/2003 stabilisce dei limiti massimi diversi per la patulina in succhi di frutta (50 µg/kg), prodotti solidi a base di mele (25 µg/kg) e prodotti per l'infanzia (10 µg/kg).

Con la tecnica HPLC/DAD è difficile rilevare contaminazioni da patulina di alcuni ppb, come richiesto per il controllo ufficiale dei *baby foods*, per questo motivo è stato messo a punto un metodo analitico più sensibile e affidabile in cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa *tandem* con interfaccia *elettrospray* in modalità negativa (LC/ESI/MS/MS).

Il campione viene estratto in acetato di etile come previsto dal metodo AOAC 2000.02.

100 µL dell'estratto sono iniettati in colonna C18 (5cm, 2,1mm, 5µm) ed eluiti in condizione isocratica con una miscela di acqua/acetonitrile 90:10 allo 0,1% di NH₄OH.

I parametri di formazione dello ione molecolare (m/z 153) e le transizioni da monitorare (153>109 di quantificazione, 153>125 e 153>135 di conferma) sono stati ottimizzati mediante infusione diretta di una soluzione standard 1 µg/mL in fase mobile.

La curva di calibrazione presenta una buona linearità (R²=0,998) nell'intervallo di concentrazione da 0,05 µg/mL a 1 µg/mL, in questo modo è possibile analizzare campioni che presentano un tenore di patulina compreso tra 5,0 µg/kg – 100,0 µg/kg.

L'efficienza di estrazione è stata valutata mediante aggiunte standard in matrice a due livelli di concentrazione 80 µg/kg e 10 µg/kg, in entrambi i livelli il recupero percentuale medio è pari a 98%.

L'elaborazione statistica dei dati, eseguita secondo le "Linee guida e la validazione dei metodi analitici e per il calcolo dell'incertezza di misura" di ARPA Emilia Romagna, attesta la distribuzione normale delle prove e l'assenza di dati anomali con un livello di confidenza del 95%, le caratteristiche del metodo soddisfano i requisiti richiesti dal Reg. CE 401/2006 della Commissione 23/02/2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale delle micotossine negli alimenti.

CONFRONTO FRA METODICHE HPLC, ELISA E FLUORIMETRICA PER LA DETERMINAZIONE DELLA AFLATOSSINA M₁ IN LATTE VACCINO: RISULTATI PRELIMINARI

Sandro Tenti (a), Paolo Berzaghi (a), Matteo Luppi (b), Severino Segato (a)

(a) *Dipartimento di Scienze Animali, Università degli Studi di Padova, Legnaro, Padova*

(b) *Safefood VICAM Italia, San Vitale Baganza, Parma*

Il contenuto di aflatoossina M₁ in campioni di latte vaccino provenienti da aziende venete è stato determinato con tre metodiche analitiche: test ELISA ed HPLC, quali tecniche tradizionali, e una fluorimetrica, quale tipologia di analisi innovativa. La metodica fluorimetrica si basa sulla purificazione con colonnine di immunoaffinità in fase liquida e successiva quantificazione con spettrofluorimetro statico da banco (Vicam, USA). Rispetto alla metodica ELISA, quella fluorimetrica si caratterizza per una simile rapidità di analisi, permettendo tuttavia di procedere alla determinazione della M₁ anche in un numero molto limitato di campioni senza l'aggravio del costo analitico derivante dalla necessità di impiegare parte dei pozzetti della piastra per gli standard di calibrazione.

In particolare, si sono utilizzati 28 campioni per il confronto HPLC vs ELISA e 25 per quello HPLC vs fluorimetro. I risultati ottenuti con le diverse metodiche analitiche sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante il calcolo dello scostamento medio (*bias*), l'Errore Standard delle Differenze (ESD) e attraverso procedure di regressione per il calcolo del coefficiente di determinazione (r^2) e del coefficiente angolare.

Per il confronto HPLC vs ELISA il data set ha evidenziato valori analitici di M₁ compresi fra un minimo di 6 ed un massimo di 94 ppt (HPLC). L'ELISA ha mostrato una buona relazione ($r^2 = 0,89$) con il metodo di riferimento, con un ESD pari a 14 ed un *bias* di pari a +5 ppt; la relazione tra le due metodiche è risultata lineare con un coefficiente angolare di poco superiore all'unità (1,09). Per il confronto HPLC vs fluorimetro, l'intervallo di variazione della M₁ è variato da 10 a 116 ppt. In questo secondo confronto, la correlazione tra le due metodiche si è dimostrata eccellente ($r^2 = 0,97$), con un errore analitico sostanzialmente dimezzato (ESD = 7 ppt) ed un *bias* ridotto (+3 ppt) rispetto all'HPLC. Anche in questo caso si è rivelata un'ottima linearità ed un coefficiente angolare pari a 1,08.

Sulla base dei dati ottenuti, si può concludere che il metodo fluorimetrico, basato sulla purificazione con colonnine di immunoaffinità e successiva lettura in spettrofluorimetro da banco, si caratterizza per una maggior accuratezza rispetto al più diffuso metodo ELISA; inoltre, a ciò, vanno associati i vantaggi di rapidità e facilità di esecuzione e di minor costo della strumentazione e del materiale di consumo. Per queste sue caratteristiche, il metodo in spettrofluorimetro da banco si candida come una valida metodica utilizzabile sia in laboratorio, ma anche da parte degli operatori della filiera latte.

DETERMINAZIONE DELLE MICOTOSSINE: RISULTATI DEI *PROFICIENCY TEST* ORGANIZZATI A LIVELLO NAZIONALE DALL'AIA

Laura Monaco, Anna M. Toscano, Alessia D'Achille, Ugo Paggi
Associazione Italiana Allevatori, Laboratorio Standard Latte, Maccaresse, Roma

I limiti imposti dalla legislazione comunitaria per il contenuto in micotossine nei prodotti ad uso zootecnico ed agro-alimentare hanno reso necessario un sistema di autocontrollo della precisione analitica dei laboratori preposti all'esecuzione delle analisi.

Il laboratorio dell'AIA organizza *proficiency test* e produce materiali di riferimento nel settore lattiero-caseario e più in generale in quello agro-alimentare.

Nell'ambito della determinazione delle micotossine, il laboratorio dell'AIA ha organizzato nel 2003 il primo *proficiency test* a livello nazionale sulla aflatossina M₁ nel latte.

Dal 2004 organizza circuiti interlaboratorio anche per la ricerca di aflatossina B₁ nel mais, ocratossina A nel vino e nel grano, per un numero complessivo di 13 *ring test* a cui hanno partecipato mediamente circa 50 laboratori.

I risultati di tali circuiti hanno fornito dati relativi alla precisione analitica dei laboratori partecipanti non disponibili prima di suddetta attività.

È stato possibile confrontare i risultati ottenuti con le metodiche Elisa ed HPLC, determinare la ripetibilità e riproducibilità dei due metodi a determinati livelli di concentrazione e osservarne l'andamento nel tempo.

Dalle numerose elaborazioni statistiche ampiamente illustrate nella relazione, risulta ad esempio che, per livelli di contaminazione di aflatossina M₁ intorno a 0,05 microgrammi per chilogrammo, il metodo di riferimento (HPLC) ed il metodo di screening (Elisa) presentano valori di riproducibilità sovrapponibili, mentre per livelli prossimi a 0,025-0,02 microgrammi per chilogrammo è sistematicamente inferiore nel metodo di *screening*.

I risultati ottenuti, nonostante la maggiore standardizzazione dei metodi analitici e il miglioramento dei *kit* di *screening*, evidenziano ancora una significativa dispersione dei dati intorno ai valori limite imposti dalla legislazione in vigore.

Sessione poster

SCREENING DEL DEOSSINIVALENOLO (DON) SU FRUMENTO DURO IN COLTURA BIOLOGICA

Gabriella Aureli, Maria Grazia D'Egidio, Fabrizio Quaranta, Andreina Belocchi, Cristina Pilo
*Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA), Istituto Sperimentale
per la Cerealicoltura, Roma*

In Italia il frumento duro è fra i cereali a paglia la specie più suscettibile alla fusariosi della spiga (*Fusarium head blight*), causata principalmente da *F. graminearum* e *F. culmorum*, funghi produttori di micotossine tra le quali il deossinivalenolo (DON), viene considerata la più importante sia per diffusione sia perché spesso correlata alla presenza di altre fusariotossine. La maggiore sensibilità del grano duro all'infezione può almeno in parte essere attribuita allo spostamento, avvenuto negli ultimi anni, delle aree di coltivazione in zone meno vocate per tale coltura.

Nel caso delle coltivazioni biologiche il mancato ricorso a trattamenti con prodotti di sintesi per il controllo dei funghi patogeni, determina una maggiore attenzione verso eventuali rischi sanitari legati al grado di contaminazione delle derrate. La riduzione del rischio può essere perseguita con azioni di tipo preventivo durante la coltivazione come, ad esempio, l'adozione di idonee tecniche agronomiche e l'impiego di varietà che presentino un maggior grado di resistenza allo sviluppo della fusariosi.

Nell'ambito della rete di confronto varietale di frumento duro in coltura biologica (progetto BIOCER) è stato effettuato per più anni uno screening per la determinazione del livello di contaminazione da DON su campioni provenienti da diverse località dislocate nei principali areali di coltivazione del territorio nazionale. A tal fine è stato impiegato il metodo immunoenzimatico (ELISA) che, oltre alla rapidità ed al buon grado di attendibilità, offre il vantaggio di individuare come positivi al test anche quei campioni che, pur non presentando una concentrazione rilevabile della micotossina principale (DON), possono contenere livelli significativi di composti tossici ad essa collegati (es. precursori acetilati).

I risultati dello screening hanno consentito di evidenziare innanzitutto l'importanza dell'ambiente agro-climatico in merito all'entità ed all'incidenza della contaminazione da DON nei raccolti e l'individuazione delle zone del territorio nazionale più a rischio di contaminazione. I dati ottenuti, inoltre, hanno fornito alcune indicazioni anche sulla diversa risposta delle varietà considerate riguardo all'accumulo di DON nella granella, evidenziando la generale tendenza di quelle più tardive ad un basso grado di contaminazione e di alcune precoci ad una maggiore sensibilità.

ESPERIENZE SUL TRATTAMENTO ANTIPIRALIDE AL MAIS PER IL CONTENIMENTO DELLE MICOTOSSINE NELLA GRANELLA

Franco Cinti (a), Silvia Grandi (a), Fiorindo Gaspari (a), Viviana Babini (a), Mirco Casagrandi (b), Giovanna Del Pupo (b), Alice Falchi (b)

(a) *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-ambientali (DiSTA), Università degli Studi, Bologna*

(b) *AgriOK SpA, Bologna*

Come è noto, le rosure e le gallerie scavate nelle spighe di mais dalla seconda generazione di piralide (*Ostrinia nubilalis* Hb.) rappresentano delle potenziali vie di accesso per attacchi fungini e perciò condizioni predisponenti per la presenza di aflatossine nella granella. Il controllo della piralide può quindi contribuire a contenere lo sviluppo delle micotossine così come avevamo osservato in una precedente prova nella quale si erano rilevati andamenti favorevoli, anche se assai variabili, sul contenuto di aflatossine in granella di mais a seguito del trattamento antipiralide con Karate.

Nella presente ricerca il campo di indagine è stato allargato in termini di località ove si è sperimentato (si è passati da 8 a 14) e in termini di modalità di intervento, utilizzando 15 prodotti fitosanitari diversi e prevedendo sia trattamenti unici contro la prima o la seconda generazione dell'insetto, sia interventi doppi (contro sia la prima che la seconda generazione). Successivamente, sulla granella di mais sono stati determinati i contenuti di aflatossine (B₁, B₂, G₁, G₂) e di fumonisine (B₁, B₂).

In 9 delle 14 località la presenza di aflatossine è risultata talmente bassa da non consentire la valutazione dell'efficacia del trattamento mentre in quelle dove la contaminazione è stata rilevante, l'effetto del trattamento è risultato mediamente positivo con riduzione della contaminazione fino al 50% anche se non nella totalità delle circostanze. Per quanto riguarda le fumonisine, si sono rilevati livelli di contaminazione generalmente preoccupanti e solamente in una località il trattamento antipiralide si è rivelato efficace.

In conclusione, questa esperienza evidenzia la difficoltà di contenere in modo decisivo la contaminazione da micotossine della granella di mais ricorrendo soltanto al controllo della piralide.

INDAGINE SULLA PRESENZA ALLO STOCCAGGIO DI MICOTOSSINE IN GRANELLA DI MAIS OTTENUTA CON DIVERSE MODALITÀ DI COLTIVAZIONE

Roberta Piccaglia (a), Marco Bortolotti (a), Elia Sandrini (a), Viviana Babini (a), Mirco Casagrandi (b), Giovanna Del Pupo (b), Alice Falchi (b)

(a) Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-ambientali (DiSTA), Università degli Studi, Bologna

(b) AgriOK SpA, Bologna

La presenza di aflatossine in granella di mais è la risultante di numerosi fattori tra i quali rivestono particolare importanza la modalità di coltivazione, la lavorazione post raccolta (pulitura ed essiccamento) e lo stoccaggio.

La nostra ricerca, continuazione di quella presentata al Congresso ISS 2004, ha preso in considerazione 8 centri di stoccaggio cui sono state conferite “partite” di granella di mais prodotte con metodi convenzionali oppure seguendo un protocollo AgriOK che prevede interventi atti a scongiurare stress alla coltura (scelta di ibridi non troppo tardivi, concimazioni bilanciate, interventi irrigui) ed a controllare gli attacchi della piralide.

Sulla granella di mais sono stati determinati i contenuti di aflatossine (B₁, B₂, G₁, G₂) e di fumonisine (B₁, B₂) sia ante che post essiccamento.

I risultati della prova pongono in evidenza in primo luogo l’elevata variabilità del livello di contaminazione da aflatossine nelle diverse realtà produttive che oscilla da valori prossimi allo zero a valori di aflatossina B₁ (AFB₁) di 150-180 ppb. In corrispondenza di alta contaminazione, l’adozione di procedure di coltivazione mirate e l’essiccamento-pulitura prima dello stoccaggio riescono a ridurre la contaminazione senza tuttavia eliminarla. Risulta pertanto evidente un ruolo determinante dell’ambiente nel definire il livello di contaminazione da aflatossine che le buone pratiche agronomiche e di pre-stoccaggio possono solo mitigare.

La contaminazione da fumonisine si è rivelata piuttosto elevata con modeste variazioni tra le realtà produttive e poco influenzata dalle tecniche di coltivazione e di essiccamento.

SELEZIONE DI GENOTIPI DI MAIS PER RESISTENZA AD *ASPERGILLUS FLAVUS*

Carlotta Balconi, Nicola Berardo, Vincenza Pisacane, Matteo Ferrarese, Alda Ferrari, Francesca Fumagalli, Giovanni Della Porta, Alberto Verderio, Mario Motto

Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA), Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Bergamo

Il fungo *Aspergillus flavus* è responsabile dell'accumulo nel mais (*Zea mays L.*) di aflatoxine, sostanze tossiche potenzialmente cancerogene. La resistenza all'infezione di *A. flavus* è influenzata dal genotipo, dalle pratiche agronomiche e dalle condizioni ambientali. Parametri morfo-fisiologici (copertura ed aderenza delle brattee, proprietà fisiche del pericarpo, tolleranza a siccità), sono fattori che contribuiscono alla riduzione dell'accumulo di aflatoxine. Un importante strumento nei programmi di miglioramento genetico volti ad aumentare la resistenza del mais all'infezione di *Aspergillus* consiste nella disponibilità di un metodo affidabile di selezione e valutazione dei vari genotipi. Lo scopo della ricerca è stato di valutare e confrontare 34 ibridi commerciali di mais per la resistenza ad *A. flavus* e per l'accumulo di aflatoxine. La sperimentazione di campo, replicata in due epoche di semina, ha previsto: i) spighe auto-impollinate non inoculate; ii) spighe auto-impollinate inoculate (*A. flavus*). In aggiunta sono state valutate spighe ad impollinazione libera non inoculate (in 10-20 differenti località italiane). All'impollinazione è stata misurata la lunghezza del canale delle setole (parte delle brattee che si estende dall'apice della spiga al punto di emissione delle setole). Un campione di dieci spighe primarie di ciascun genotipo, 7 giorni dopo l'impollinazione, è stato inoculato con sospensione di spore (mix 5 ceppi *A. flavus* isolati nord Italia), tramite tecnica di inoculo *non-wounding* SCIA (*Silk Channel Inoculation Assay*). Come controlli sono state considerate spighe auto-impollinate non inoculate o inoculate con acqua sterile. A maturità, è stato osservato il grado di copertura delle brattee, assegnando un punteggio variabile da 1 (brattee chiuse) a 5 (brattee aperte). Il grado di attacco da parte di *A. flavus* sulla spiga è stato valutato tramite scala di osservazione basata sulla percentuale di cariossidi con segni visibili di infezione: *Disease Severity Rating* (DSR) da 1 (0% no infezione) a 7 (76-100% cariosside/spiga con infezione visibile). I materiali inoculati hanno mostrato DSR superiore ai controlli, evidenziando che la tecnica di inoculo applicata è efficace. Inoltre, è stata notata variabilità della risposta tra i genotipi saggati. Dopo l'osservazione visiva le spighe sono state essiccate e sgranate. Al fine di valutare la contaminazione interna della cariosside, sono state prelevate 50 cariossidi *random* da ogni campione, sterilizzate superficialmente ed incubate su terreno agarizzato PCNB. Il contenuto di aflatoxina B₁ (valutato tramite metodo ELISA), è risultato variabile tra i genotipi saggati; inoltre esso risulta più elevato nelle spighe inoculate rispetto ai controlli ed ai campioni di spighe ad impollinazione libera. È in corso nella campagna maidicola 2006 la ripetizione dello stesso esperimento. L'analisi finale dei caratteri valutati sarà oggetto di successive indagini.

La ricerca è stata svolta nell'ambito del Progetto AFLARID.

STUDIO DELLA POPOLAZIONE FUNGINA DI *ASPERGILLUS* SEZIONE *FLAVI* ISOLATA SU MAIS IN ITALIA

Paola Giorni (a), Amedeo Pietri (b), Naresh Magan (c), Paola Battilani (a)

(a) *Istituto di Entomologia e Patologia Vegetale, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

(b) *Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

(c) *Applied Mycology Group, Cranfield Health, Cranfield University, Silsoe, Bedford*

Nel 2003 in Italia sono stati evidenziati, per la prima volta, problemi dovuti ad *Aspergillus* sezione *Flavi* in mais, per la presenza di aflatossina oltre i limiti di legge. Con lo scopo di aumentare la conoscenza su questi funghi, alcuni ceppi di *Aspergillus* sezione *Flavi* sono stati isolati da spighe di mais raccolte in 6 regioni del nord Italia. Gli isolati sono stati caratterizzati per la produzione di sclerozi, aflatossine e acido ciclopiazonico e per esigenze ecologiche. Il 73% degli isolati ha prodotto sclerozi, il 76% ha prodotto aflatossina e il 61% acido ciclopiazonico; il 36% dei ceppi ha prodotto entrambe le micotossine. Gli isolati considerati sono stati 70 ed includevano sia *A. flavus* (93%) che *A. parasiticus* (7%).

Gli studi preliminari sulle esigenze ecologiche dei ceppi hanno evidenziato che le condizioni ottimali per il loro sviluppo e la produzione di aflatossina sono 25-30°C e 0,99 aw. L'attività dei funghi è risultata possibile anche a livelli di aw più bassi, ma la capacità di produrre aflatossina è diminuita in modo consistente arrivando ad essere assente a 0,83 aw. A 30°C la crescita del fungo è stata maggiore rispetto a quella a 25°C, ma la produzione di aflatossina è risultata bassa e paragonabile a quella ottenuta a 15°C.

È stata simulata la disponibilità di acqua nel suolo e nei residui colturali in campo. I funghi hanno mostrato maggiore sensibilità alla disponibilità di acqua nel suolo rispetto a quella presente nei residui colturali, con limiti di crescita a 0,93 aw e 0,90 aw rispettivamente. Il massimo sviluppo fungino è stato ottenuto anche in questa prova a valori di aw molto alti (0,98 e 0,99 aw).

L'analisi dei cluster applicata ai dati delle prove ecologiche ha permesso di individuare 3 gruppi: il primo contenente gli isolati non produttori o in grado di produrre quantitativi di aflatossina bassi (<1,85 ng/g/giorno), il secondo contenente quelli alto produttori in tutte le condizioni testate (produzione media di 60 ng/g/giorno) ed il terzo contenente quelli medio-produttori o alti produttori ma solo ad alcune delle condizioni testate (produzione media di 10 ng/g/giorno).

I dati raccolti contribuiranno allo sviluppo un Sistema di Supporto alle Decisioni che sarà utilizzato allo scopo di prevedere il rischio di contaminazione da aflatossina sul mais e di ottimizzare il sistema colturale e di conservazione per ridurre la presenza.

Lavoro svolto nell'ambito del progetto AFLARID.

EFFETTO DEI TRATTAMENTI CONTRO OSTRINIA NUBILALIS E FUSARIUM VERTICILLIOIDES SUL CONTENUTO DI FUMONISINA IN MAIS

Andrea Scandolara (a), Piero Cravedi (a), Emanuele Mazzoni (a), Amedeo Pietri (b), Paola Sidoti (c), Paola Battilani (a)

(a) *Istituto di Entomologia e Patologia Vegetale, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

(b) *Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

(c) *Bayer CropScience, Milano*

Le fumonisine sono micotossine prodotte nel mais da *Fusarium verticillioides*. Sono incluse nel Regolamento Europeo 856/2005, che ne limita il contenuto per il mais non lavorato ad uso umano a 2.000 µg/kg. Questo limite è difficile da rispettare in Italia; infatti, il contenuto di fumonisina è normalmente almeno doppio. L'effetto delle tecniche colturali, in particolare il controllo della piralide (*Ostrinia nubilalis*) sembra avere effetto nel ridurre il contenuto nella granella. Il controllo diretto del fungo non è attualmente praticabile poiché non esistono fungicidi autorizzati. Obiettivo di questo studio è stato di: 1) verificare l'effetto del controllo della piralide e l'impiego di fungicidi attivi contro *Fusarium* sul contenuto di fumonisina nella granella di mais alla raccolta e 2) monitorare l'andamento dell'infezione fungina e dell'accumulo di fumonisina nelle diverse fasi di crescita della coltura. Negli anni 2004-2005 è stata condotta una prova in campo a Cremona. È stato utilizzato un insetticida a base di deltametrina per controllare le larve di seconda generazione di piralide e un fungicida triazolo distribuito ad inizio fioritura (F1), invecchiamento sete (F2) o inizio maturazione cerosa (F3) per il controllo di *F. verticillioides*. Le tesi considerate sono state: test, insetticida (I), F1, F2, F1+F2, F1+I, F2+I, F1+F2+I, F3. È stato organizzato un campionamento in campo per quantificare l'umidità della granella, l'incidenza di cariossidi infette da *F. verticillioides*, il contenuto di fumonisina B₁ (FB₁) e il numero di larve di piralide per spiga durante il ciclo di crescita del mais. Sono stati raccolti i dati meteorologici.

Le 2 annate sono state differenti per andamento meteorologico e con maggiori contaminazioni da fumonisina nel 2005. La tossina è stata rilevata nelle cariossidi dalla maturazione cerosa; l'accumulo è stato progressivo fino alle fasi finali di maturazione. L'elaborazione statistica dei dati ha mostrato un effetto significativo degli agrofarmaci distribuiti sull'incidenza di cariossidi infette da *F. verticillioides*, con valori minimi nelle tesi trattate con insetticida e fungicida nella fase di invecchiamento sete; risultati molto simili sono stati ottenuti per il contenuto di FB₁. Il numero di larve di piralide contate per spiga a maturazione cerosa, ridotto dal trattamento insetticida, eseguito da solo o in combinazione con il fungicida, è risultato correlato positivamente con il contenuto di fumonisina alla raccolta. L'impiego di agrofarmaci ha fornito un contributo nel contenimento di FB₁ nella granella di mais, con differenze di efficacia tra gli anni. I migliori risultati sono stati ottenuti combinando fungicida e insetticida distribuiti alla soglia consigliata per la piralide o ad invecchiamento sete.

Lavoro svolto con la collaborazione di Bayer CropScience.

MONITORAGGIO DELLE MICOTOSSINE NEL MAIS IN EMILIA ROMAGNA: SITUAZIONE E GESTIONE DEL RISCHIO IN CAMPO

Andrea Scandolaro (a), Adriano Marocco (b), Amedeo Pietri (c), Diego Scudellari (d), Paola Battilani (a)

(a) *Istituto di Entomologia e Patologia Vegetale, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

(b) *Istituto di Agronomia e Coltivazioni Erbacee, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

(c) *Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

(d) *Centro Ricerche Produzioni Vegetali (CRPV), Imola, Bologna*

Il mais ha causato preoccupazioni negli ultimi anni per la possibile contaminazione della granella da micotossine oltre i limiti di legge vigenti. Allo scopo di integrare informazioni raccolte in monitoraggi svolti in alcune regioni del nord Italia, dai quali emergeva la rilevanza di *F. verticillioides*, nel biennio 2004-2005 è stato eseguito un monitoraggio del mais prodotto in Emilia Romagna. In entrambi gli anni sono stati raccolti, in corrispondenza della trebbiatura, 80 campioni di granella da coltivazioni condotte secondo le usuali tecniche colturali della zona; in 5 località il campionamento è stato eseguito anche in corrispondenza della maturazione cerosa e fisiologica. Tutti i campioni sono stati analizzati per quantificare la presenza dei principali funghi micotossigeni e delle micotossine. Ciascun campione è stato accompagnato da una scheda colturale. *F. verticillioides* è stato il fungo tossigeno maggiormente presente nelle cariossidi, con valori medi di incidenza del 39,4 e del 43,5%, rispettivamente nel 2004 e 2005. La fumonisina B₁ è stata riscontrata nel 99% dei campioni, con valori medi pari a 6.303 e 6.910 ppb, rispettivamente nel 2004 e nel 2005. In media, il 16% dei campioni aveva un contenuto in fumonisina inferiore a 2.000 ppb, mentre nel 32,5% dei campioni il valore era compreso tra 2.000 e 5.000 ppb. L'isolamento di *A. flavus* è stato discontinuo ed i livelli di infezione sono stati bassi: solo il 9% dei campioni ha mostrato percentuali di infezione superiori al 30%. I valori medi sono risultati pari al 12,5 e 5,1% rispettivamente nel 2004 e nel 2005. Riguardo ad aflatossina B₁, l'82% dei campioni è rientrato nei limiti di legge (20 ppb per la destinazione zootecnica), con una media nei 2 anni di 3,6 ppb. La presenza di *F. graminearum* è risultata sempre bassa, con un valore medio di deossinivalenolo di 52,8 ppb. La dinamica di accumulo delle tossine è risultata crescente dalla maturazione cerosa alla raccolta, sia per fumonisina B₁ che per aflatossina B₁. I parametri colturali che hanno maggiormente influenzato il contenuto di micotossine sono stati: tessitura del terreno, concimazione azotata, periodo di raccolta e livello di attacco di piralide.

I risultati ottenuti confermano che la fumonisina è la tossina più presente nel mais in nord Italia, con presenza di aflatossina talvolta rilevante. La quantificazione del ruolo svolto da alcuni parametri colturali, inclusa in un modello di previsione della malattia, consentirà una gestione della coltura che minimizzi il rischio di contaminazione.

Attività finanziata dalla regione Emilia Romagna attraverso il CRPV (L.R. 28/98).

STUDIO DELLA FILIERA DI PRODUZIONE DAL MANGIME AL PRODOTTO FINITO IN UN AZIENDA AGRICOLA CON ANNESSO LABORATORIO DI CASEIFICAZIONE

Faustina Marcella Bertollo, Emiliano Dragoni, Matteo Galasso, Luca Gradassi, Serena Pancioni

Laboratorio CSA Srl, Arezzo

La presenza di aflatossine in mangimi di produzione aziendale per l'alimentazione di ovini da latte è di fondamentale importanza per la riuscita di un buon prodotto di caseificazione.

Lo studio è stato condotto in 5 azienda agricole con annesso laboratorio di caseificazione, prelevando campioni di mangime prodotto internamente all'azienda.

I campioni di mangime sono stati prelevati nei periodi di raccolta, stoccaggio, ogni campione globale del peso di 1 kg per ogni lotto presente (totale campioni analizzati 120) in tutti i campioni è stato determinato il tenore di aflatossine (B₁, B₂, G₁, G₂) l'aflatossina B₁ è stata quella maggiormente presente, ha raggiunto valori medi di 8,6 ppb, un limite tuttavia, nettamente inferiore a quello massimo consentito per i mangimi semplici. Sono stati sottoposti ad analisi anche il latte ed il formaggio di ogni singola azienda per un totale di 80 campioni, dove la determinazione della aflatossina M₁ è risultata sempre entro i limiti consentiti (< 0,05 ppb).

Il complesso delle osservazioni scaturite dallo studio dell'intera filiera di produzione "dal mangime al prodotto finito" testimonia un buon livello di attenzione da parte delle aziende, le quali si sono rilevate molto attente nello stoccaggio dei cereali e foraggi e nelle corrette procedure di lavorazione del latte.

INDAGINE SULLA CONTAMINAZIONE DA MICOTOSSINE DI ALCUNE PRODUZIONI DI MAIS BIOLOGICO: ANNATE 2004 E 2005

Alessandra Canever (a), Andrea Borsari (a), Giovanna Del Pupo (b), Alice Falchi (b),
Roberta Piccaglia (c), Carmine Torricella (c), Tiziano Orlandi (d)

(a) *Granarolo SpA, Bologna*

(b) *Agriok SpA, Bologna*

(c) *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-ambientali (DiSTA), Università degli Studi,
Bologna*

(d) *Progeo srl, Reggio Emilia*

Il mais da granella e, soprattutto, il trinciato integrale costituiscono un'importante fonte di energia e la base della razione per i bovini da latte, specialmente negli allevamenti della Pianura Padana. Anche nell'allevamento bovino biologico questo cereale rappresenta, nelle zone di pianura, una fonte energetica essenziale per l'alimentazione.

Questa coltura può essere soggetta, sia nella fase di campo che in quella di stoccaggio, ad attacchi e colonizzazioni da parte di funghi e muffe in grado non soltanto di alterare lo stato di conservazione ma anche di produrre micotossine.

Al fine di conoscere meglio la situazione relativa alla contaminazione della granella di mais da agricoltura biologica destinata all'alimentazione delle bovine da latte, si è attuata una indagine conoscitiva, durante le annate agrarie 2004 e 2005, su alcune aziende agricole certificate ai sensi del Reg. CEE 2092/91 dislocate prevalentemente nel nord Italia. In questi due anni sono state prese in considerazione rispettivamente 12 e 7 aziende agricole, per un totale di 31 campioni (per alcune aziende sono state oggetto di monitoraggio varietà diverse di mais) e la granella prelevata al momento della trebbiatura è stata analizzata per la ricerca di aflatossine, fumonisine e ocratossine mediante analisi HPLC.

Al fine di rendere i campioni rappresentativi dell'intera superficie agricola, sono state osservate le modalità di campionamento indicate nell'allegato 1 del Decreto del Ministero della Salute del 23/12/2000 e successive modifiche.

Tutti i campioni prelevati nel 2004 non hanno evidenziato una contaminazione da aflatossine B₁, B₂, G₁ e G₂ analiticamente rilevabile, mentre in tutti i campioni è stata rilevata la presenza di fumonisina B₁ con valori compresi tra 1,8 ppm e 6,2 ppm.

Il mais campionato nel 2005 ha confermato la costante presenza di fumonisine, con valori di B₁ compresi tra 1,12 ppm e 3,18 ppm. Per quanto riguarda le aflatossine, solo 4 campioni su 18 analizzati hanno evidenziato una contaminazione determinabile, con un *range* di valori relativi ad AFB₁ compresi tra 0,27 e 0,67 ppb.

Sia nel 2004 che nel 2005 tutte le analisi relative alla ricerca di ocratossine non hanno rilevato quantità determinabili di questo contaminante.

NUOVI DATI SUL DECREMENTO DI PATULINA CAUSATO DA UN LIEVITO DI BIOCONTROLLO IN MELE INFETTATE DA *PENICILLIUM EXPANSUM*

Raffaello Castoria (a), Luisa Mannina (b), Filippo De Curtis (a), Lucia Maiuro (b), Anatoli Sobolev (c), Alberto Ritieni (d), Rosalia Ferracane (d), Anna Maria Spina (a)

(a) *Dipartimento di Scienze Animali, Vegetali e dell'Ambiente, Università degli Studi del Molise, Campobasso*

(b) *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-alimentari, Ambientali e Microbiologiche, Università degli Studi del Molise, Campobasso*

(c) *Istituto di Metodologie Chimiche, Area della Ricerca di Roma 1, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Monterotondo, Roma*

(d) *Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Università degli Studi Federico II, Portici, Napoli*

Penicillium expansum attacca mele in conservazione causando così contaminazione con patulina dei prodotti a base di questi frutti. I livelli massimi tollerabili di questa micotossina sono stati stabiliti dall'UE (*Commission regulations (EC) No 1425/2003 and 455/2004 amending regulation (EC) No 466/2001 as regards patulin*).

Il ceppo di lievito di biocontrollo *Rhodotorula glutinis* LS11 previene gli attacchi di *P. expansum* su mele conservate e causa un significativo decremento dell'accumulo di Patulina nelle mele infettate (*in vivo*). Nostri recenti risultati mostrano che questo fenomeno è apparentemente dovuto ad un rallentamento, causato dal lievito, dello sviluppo del fungo nei frutti attaccati. *In vitro*, LS11 metabolizza la patulina e forma 2 composti principali. Ulteriori studi sono comunque necessari per chiarire il meccanismo/i del decremento di patulina determinato *in vivo* da LS11.

Nostri nuovi dati, basati su analisi NMR, hanno consentito la caratterizzazione strutturale e l'identificazione del più stabile dei 2 metaboliti prodotti da LS11, che è risultato essere un composto già precedentemente definito come non tossico. Osservazioni al S.E.M. (*Scanning Electron Microscopy*) di mele trattate con LS11 ma infettate da *P. expansum* mostrano che cellule del lievito sopravvivono nel tessuto marcescente, ma non seguono le ife fungine nella loro penetrazione profonda nel tessuto del frutto.

La più bassa tossicità del metabolita della patulina caratterizzato incoraggia ulteriori studi sul meccanismo/i della trasformazione della micotossina da parte di LS11. D'altra parte, la dimostrata assenza di penetrazione del lievito all'interno della mela marcescente, dove presumibilmente avviene la maggior parte della sintesi di patulina, suggerisce che *in vivo* non avvenga metabolizzazione della tossina da parte del lievito. Comunque, questo meccanismo non può ancora essere escluso, poiché è stato riportato che, dal tessuto di mela marcescente, avviene diffusione di patulina nel tessuto sano. La messa punto di metodi per la rilevazione *in vivo* del metabolita della patulina da noi caratterizzato è attualmente in corso.

VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI UN PRODOTTO SEQUESTRANTE LE MICOTOSSINE (ATOX[®]) UTILIZZATO NELL'ALIMENTAZIONE DI BOVINE DA LATTE

Alessandra Canever (a), Francesca Petrera (b), Andrea Borsari (a), Alice Falchi (c), Amedeo Pietri (d)

(a) *Granarolo SpA, Bologna*

(b) *Azienda Sperimentale Vittorio Tadini, Gariga di Podenzano, Piacenza*

(c) *Agriok SpA, Bologna*

(d) *Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

In commercio vengono proposti numerosi prodotti (additivi) da utilizzare per l'alimentazione animale, in particolare delle bovine da latte, al fine di ridurre l'assorbimento gastrointestinale delle aflatoxine presenti negli alimenti e, quindi, il livello di contaminazione del latte.

La sperimentazione in oggetto ha avuto lo scopo di testare l'efficacia del prodotto sequestrante ATOX[®] (bentonite magnesica) a diversi dosaggi d'impiego, per valutare la riduzione della percentuale di passaggio dell'AFB₁ nel latte sotto forma di AFM₁.

Per la prova sono state utilizzate 32 bovine da latte di razza Frisone italiana in fase intermedia di lattazione suddivise in 4 gruppi omogenei di 8 animali ciascuno. Le bovine sono state alimentate mediante tecnica *unifeed* con quattro razioni con un livello di contaminazione da AFB₁ nota e un diverso dosaggio di sequestrante: 0 g (Dieta A), 60 g (Dieta B), 120 g (Dieta C) e 180 g/capo/die (Dieta D). Il disegno sperimentale era quello di un quadrato latino, pertanto ogni dieta è stata somministrata a ciascun gruppo per 10 giorni.

Nel corso della sperimentazione sono stati prelevati campioni degli alimenti impiegati e sono stati monitorati, per ciascun animale, la produzione quantitativa di latte, l'ingestione alimentare ed il peso vivo. Al fine di valutare la possibile comparsa di effetti indesiderati nel latte, sono stati prelevati, il primo giorno di sperimentazione e l'ultimo giorno di ogni periodo di trattamento, campioni di latte di massa da ciascun gruppo e sono stati monitorati la composizione in grasso, proteine, lattosio, residuo secco magro e contenuto in cellule somatiche del latte, l'attitudine alla caseificazione tramite il profilo LDG, l'eventuale riduzione di alcune vitamine normalmente presenti ed il livello di contaminazione da parte di metalli pesanti.

Dai risultati ottenuti, si è verificata l'efficacia dell'attività sequestrante del prodotto impiegato relativamente all'escrezione di AFM₁ nel latte, che al dosaggio più alto (Dieta D) ha determinato una riduzione del livello di contaminazione compreso tra il 53% e il 75%, rispetto al controllo (Dieta A). Per quanto riguarda i parametri di composizione chimica e l'attitudine alla caseificazione del latte, le differenze riscontrate dopo un periodo di somministrazione di 10 giorni non sono attribuibili all'utilizzo del sequestrante. Non si sono, invece, rilevate variazioni significative riguardanti il contenuto di alcune vitamine e la presenza di metalli pesanti nel latte e nessuna differenza in termini di produzione quantitativa di latte, di ingestione alimentare e di peso vivo degli animali.

MICETI PRODUTTORI DI OCRATOSSINA A IN CAMPIONI DI UVE DESTINATE ALLA VINIFICAZIONE

Cosimo Racco, Orazio Romeo, Giuseppe Criseo
*Dipartimento di Scienze Microbiologiche, Genetiche e Molecolari, Università degli Studi,
Messina*

La presenza dell'ocratossina A negli alimenti è stata principalmente associata alla contaminazione di questi da parte di *Penicillium verrucosum* ed *Aspergillus ochraceus*, il primo più importante nelle zone geografiche a clima temperato-freddo isolato quasi esclusivamente dai cereali e derivati; il secondo più importante in aree geografiche più calde o tropicali, isolato da alimenti conservati di varia natura.

Un ruolo importante nella produzione della micotossina è svolto dalle specie appartenenti alla sezione Nigri, come *Aspergillus carbonarius* e *A. niger* in particolare nelle uve e prodotti derivati.

Lo scopo è stato quello di indagare sull'origine della contaminazione da ocratossine in alcuni vini italiani esaminando dal punto di vista micologico campioni di uve provenienti da alcune regioni Italiane, la cui lavorazione in alcuni casi aveva comportato la contaminazione del prodotto finito da ocratossina A, studiando dal punto di vista micotossicologico i ceppi isolati che potessero rappresentare i potenziali produttori della micotossina.

Sono stati esaminati 12 campioni di uve per vinificazione provenienti da tre diverse regioni italiane. L'esame micologico e quello micotossicologico sono stati eseguiti con metodiche standard.

La specie maggiormente presente nei campioni esaminati è stata *A. niger*, seguita da *Penicillium sp.*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus sp.*, *A. carbonarius*.

Tutti i ceppi potenzialmente produttori di ocratossina sono stati saggiati per la capacità di produrre tossina *in vitro* dopo coltura in YES-medium, successiva estrazione e messa in evidenza su lastre TLC ad autoallineamento (Merck). Tra questi soltanto tre ceppi di *A. carbonarius* isolati occasionalmente da tre differenti campioni si sono rivelati produttori della tossina.

Gli stessi ceppi saggiati mediante metodica immunoenzimatica competitiva (CD-ELISA Veratox, Neogen Corporation, USA/Canada) hanno dato invece risultati differenti. Infatti oltre ai tre ceppi di *A. carbonarius* sono risultati positivi 43 ceppi di *A. niger* su 61 saggiati (70,5%).

I dati ottenuti, in accordo anche con alcuni dati riportati in letteratura provenienti da aree geografiche a clima caldo-temperato, indicano che i più importanti miceti potenziali produttori di ocratossina nelle uve appartengono alle specie *A. niger* ed *A. carbonarius*. Nel nostro caso, la scarsa presenza di ceppi di *A. carbonarius*, non sembra poter giustificare da sola la contaminazione nei vini da ocratossina. Un ruolo rilevante è giocato probabilmente dai ceppi di *A. niger* che anche se più scarsi produttori di tossina sono invece molto più diffusi di *A. carbonarius*.

KLOECKERA APICULATA E SACCHAROMYCES CEREVISIAE POSSONO INIBIRE LA PRODUZIONE DI OCRATOSSINA A DA PARTE DI ASPERGILLUS CARBONARIUS

Loredana Cubaiu (a), Quirico Migheli (b), Giovanni Antonio Farris (a), Marilena Budroni (a)
(a) *Dipartimento di Scienze Ambientali Agrarie e Biotecnologie Agro-alimentari,
Università degli Studi, Sassari*
(b) *Dipartimento di Protezione delle Piante, Università degli Studi, Sassari*

Lo scopo di questo lavoro è quello di valutare la capacità inibente di alcuni ceppi di *Kloeckera apiculata* e *Saccharomyces cerevisiae* nei confronti di *Aspergillus carbonarius*, la specie fungina maggiormente responsabile della contaminazione da ocratossina A (OTA) delle uve e dei vini. In questo lavoro ceppi di lievito isolati da uva, mosto e vino sono stati identificati mediante PCR-RFLP della regione ITS1-ITS2. Questi lieviti nel corso di prove precedenti, avevano dimostrato la loro capacità di ridurre la concentrazione di OTA se fatti sviluppare in terreno sintetico (YNB) arricchito di micotossina. Pertanto è stata saggiata la loro attività antagonista nei confronti di *A. carbonarius* e *A. ochraceus* mediante uno screening su differenti terreni sintetici. La maggior parte dei ceppi quando inoculati alla concentrazione di 10⁶ CFU/ml hanno inibito la crescita fungina nei terreni sintetici CYA e YES. Inoltre, alcuni ceppi di lievito fatti crescere in co-coltura con i funghi tossigeni hanno inibito la produzione di OTA. Verranno condotte ulteriori indagini al fine di chiarire il meccanismo mediante il quale si attua questa riduzione.

AFLATOSSINE NEL LATTE E NEI MANGIMI: MONITORAGGIO NELLE REGIONI PIEMONTE E VALLE D'AOSTA NEL TRIENNIO 2004-2005-2006

Jeanne Lai, Carlo Nachtmann, Monica Gramaglia, Monica Dalla Mutta, Marina Rastelli,
Lucia Decastelli

Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

Le micotossine sono sostanze tossiche prodotte dal metabolismo di alcuni funghi (*Aspergillus*, *Stachybotris*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cephalosporium*, ecc.), caratterizzate da struttura chimica molto variabile. La loro presenza negli alimenti ad uso zootecnico, a causa della possibile contaminazione del latte prodotto da animali che si alimentano con derrate contaminate, può essere pericolosa per la salute del consumatore e richiede particolare attenzione visti gli sviluppi legislativi in materia di contaminanti ambientali (Raccomandazione 2004/163/CE).

La normativa riguardante le aflatossine nei mangimi pone infatti particolare attenzione alla aflatoxina B₁ (Decreto legislativo 149 del 10-05-04, recepimento delle direttive 2001/102/CE; 2002/32/CE; 2003/57/CE); per quanto riguarda il latte è in vigore il Regolamento 466/2001/CE.

In seguito all'emergenza aflatossine negli alimenti ad uso zootecnico e nel latte in Piemonte e Valle d'Aosta nell'anno 2003, sono stati istituiti piani di sorveglianza idonei per regione: l'analisi dei campioni previsti dai piani è stata effettuata con un primo screening in ELISA, successivamente i campioni che superavano i limiti di legge venivano analizzati in HPLC.

Nella regione Piemonte: nell'anno 2004 sono stati analizzati 876 campioni di latte crudo, 459 nell'anno 2005 e 74 nell'anno 2006. Il superamento dei limiti di legge nell'arco di questi anni ha subito una seria diminuzione: dai 44 campioni per l'anno 2004 si è passati ai 7 del 2005 per poi azzerarsi nel 2006. Sono stati inoltre analizzati nell'anno 2004, 729 alimenti ad uso zootecnico di cui 7 sono risultati oltre i limiti (0,96%); 570 nell'anno 2005 di cui uno solo è risultato fuori limite (0,17%); 150 nell'anno 2006 ad oggi con 1 solo campione oltre il limite. Per quanto riguarda la situazione nella regione Valle d'Aosta nell'anno 2004 sono stati analizzati n° 296 campioni di latte crudo bovino di cui 5 (1,7%), marcatamente situate nel primo semestre dell'anno, sono risultati oltre ai limiti alle analisi di conferma. Sono stati inoltre analizzati 541 campioni di mangime: 44 di questi sono risultati oltre i limiti alle analisi di conferma (8,1%), anche in questo caso evidenziati nel primo semestre dell'anno.

Per quanto riguarda l'anno 2005, sono stati analizzati 45 campioni di latte crudo e 75 campioni di mangime tutti nei limiti. Infine nell'anno 2006 sono stati analizzati 31 campioni di mangime e 3 di latte: un campione di latte ha superato il limite soglia.

In Piemonte e Valle d'Aosta quindi sia per i mangimi sia per il latte si è registrato un calo delle positività durante il triennio 2004-2005-2006: questo è sicuramente dovuto all'istituzione di adeguati Piani di Sorveglianza, che hanno permesso un costante ed efficace monitoraggio.

STUDIO PRELIMINARE SULLA PRESENZA DI FUMONISINE IN ALIMENTI PER USO ZOOTECNICO IN LIGURIA E VALLE D'AOSTA

Gianluca Ferro, Maria Ines Crescio, Elena Scaffardi, Andrea Loria, Daniela Marchis, Maria Cesarina Abete

CReAA, Centro di Referenza per la Sorveglianza ed il Controllo degli Alimenti per gli Animali, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

Le fumonisine costituiscono un gruppo di metaboliti tossici prodotto da funghi del genere *Fusarium*, frequentemente riscontrati nel mais e in alimenti e mangimi a base di mais. Il Piano Nazionale Alimentazione Animale prevede il campionamento casuale e l'analisi mangimi semplici, completi o complementari a base di mais per la determinazione del livello di contaminazione di fumonisina B₁, B₂ e B₃. Scopo di questo lavoro è di presentare i dati relativi alla contaminazione da fumonisime ottenuti dalle analisi svolte nell'ambito del PNAA 2005 nelle Regioni Liguria e Valle d'Aosta.

39 campioni, 23 dei quali provenienti dalla Liguria (9 mangimi complementari, 6 completi e 8 materie prime) e 16 dalla Valle d'Aosta (12 mangimi complementari e 4 materie prime) sono stati esaminati mediante un test ELISA (Kit Elisa Fumonisine, Tecna) previa estrazione e purificazione con colonne SPE (MultiStep 211 Fum, Romer labs).

Tra i campioni provenienti dalla Liguria il 26% (IC 95% 9 - 56,7%) sono risultati al di sotto del limite di rilevabilità del *kit* (0,84 ppm). In particolare risulta al di sotto della rilevabilità del *kit* il 25% (IC 95% 3 - 65%) delle materie prime analizzate, il 50% dei mangimi completi (IC 95% 11 - 88%) e l'11% (IC 95% 0,2 - 48%) dei mangimi composti. Inoltre il 63% (IC 95% 24 - 91%) delle materie prime analizzate era al di sotto delle 10 ppm, mentre il 37% (IC 95% 8 - 75%) era compreso tra 10 e 20 ppm, tra i mangimi complementari il 66% (IC 95% 29 - 92%) aveva valori inferiori alla 10 ppm ed il restante 33% (IC 95% 7 - 70%) aveva valori compresi tra 10 e 20 ppm. Tra i mangimi completi, invece, l'83% (IC 95% 35 - 99%) non superava le 10 ppm, il 17% (IC 0,4 - 64%), invece aveva valori compresi tra 20 e 30 ppm.

Tra i campioni provenienti dalla Valle d'Aosta, invece, non sono stati registrati valori inferiori al limite di rilevazione del *kit*. Tra i mangimi completi, l'84% (IC 95% 51 - 97%), sono risultati al di sotto delle 10 ppm, lo 0,8% (IC 95% 0,2 - 38%) era compreso tra 10 e 20 ppm, mentre il restante 0,8% (IC 95% 0,2 - 38%) aveva valori compresi tra 20 e 30 ppm. Tra le materie prime analizzate, l'80% (IC 95% 28 - 99%) risultavano al di sotto delle 10 ppm, mentre il restante 20% (IC 95% 0,5 - 71%) compresi tra 20 e 30 ppm.

I risultati ottenuti dovranno essere integrati con quelli del PNAA 2006 per avere un quadro più completo della contaminazione da fumonisine nelle Regioni considerate.

TRE ANNI DI INDAGINE NELLE MARCHE SULLO SVILUPPO DELLA FUSARIOSI DELLA SPIGA DI FRUMENTO DURO E ACCUMULO DELLE MICOTOSSINE CORRELATE NELLE CARIOSSIDI IN CAMPO

Lucio Flamini (a), Simona Talevi (a), Laura Pizzichini (a), Alberto Ritieni (b), Antonio Moretti (c)

(a) Agenzia Servizi Settore Agroalimentare Marche, Servizio Fitosanitario Regionale, Ancona

(b) Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Università degli Studi Federico II, Portici, Napoli

(c) Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA), Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari

La coltivazione di frumento duro nelle Marche rappresenta una delle colture più importanti per quanto riguarda la produzione agricola regionale con circa 120.000 ettari, per una produzione media di circa 4,5 tonnellate per ettaro. La fusariosi della spiga di frumento è causata da un complesso di specie fungine appartenenti al genere *Fusarium* in grado di produrre metaboliti tossici sia per le piante, sia per l'uomo e gli animali. Per tre anni, dalla stagione 2002 a quella 2004, sono stati monitorati 7 campi di frumento duro sparsi nella regione in zone caratterizzate da un'ampia gamma di condizioni pedoclimatiche. Per ogni campo il monitoraggio ha previsto: la raccolta di 300 spighe con campionamento randomizzato; l'osservazione dei sintomi della malattia allo stadio dell'infiorescenza; la presenza e la quantificazione di DNA appartenente alle diverse specie che causano la fusariosi all'infiorescenza, alla maturazione lattea e al raccolto; l'analisi delle micotossine presenti nelle cariossidi (deossinivalenolo, nivalenolo e altri tricoteceni, beauvericina ed enfiatine); la registrazione dei parametri climatici quali umidità relativa, temperatura e precipitazioni, dall'infiorescenza al raccolto. Dai dati di campo abbiamo ottenuto indicazioni sulla prevalenza e sulle interazioni delle diverse specie coinvolte nella fusariosi. Fra le indicazioni più importanti abbiamo individuato in *F. poae* la specie presente con maggiore frequenza nelle spighe, nei tre anni. *F. graminearum* è stata la specie più frequente nell'anno in cui le condizioni climatiche più fredde e piovose hanno determinato un aumento della fusariosi. *Fusarium culmorum* è stato raramente isolato, mentre *F. avenaceum* è stato caratterizzato da una presenza intermedia tra le specie risultate più frequenti e quelle più rare. La contaminazione da micotossine è stata molto alta nel 2002, molto rara nel 2003 e scarsa nel 2004. In particolare un campo nel 2002 ha mostrato una contaminazione molto elevata di deossinivalenolo, potente inibitore della sintesi proteica, giungendo fino a 3,5 mg/kg, valore ben al di sopra dei limiti massimi consentiti dalla Unione Europea. Infine, i dati ottenuti hanno indicato che il livello delle micotossine non è strettamente collegato all'incidenza della malattia e alla biomassa fungina (misurata come DNA fungino totale di ogni specie), fatto salvo per *F. graminearum*.

INDAGINE SULLA PRESENZA DI AFLATOSSINA M₁ IN LATTE, FORMAGGI MOLLI E YOGURT PRODOTTI NEL PERIODO NOVEMBRE 2003 - APRILE 2004

Paola Fortunati, Amedeo Pietri, Terenzio Bertuzzi, Silvia Rastelli, Gianfranco Piva
*Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Facoltà di Agraria, Università
Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

La elevata contaminazione da aflatossine del mais prodotto nell'estate 2003 in nord Italia, ha causato una diffusa e talvolta allarmante contaminazione da aflatossina M₁ (AFM₁) del latte di singole aziende, con valori superiori al limite legale di 0,05 µg/kg. In questo studio, è stato condotto un monitoraggio per valutare la presenza di AFM₁ in campioni di latte, formaggi molli e yogurt prelevati al dettaglio nel periodo novembre 2003-aprile 2004. Sono stati analizzati 67 campioni di latte fresco (di produzione italiana) e 28 campioni di latte UHT (prevalentemente di provenienza estera), 70 campioni di alcuni tipi di formaggi molli, e 30 campioni di yogurt. I campioni di latte sono stati centrifugati e filtrati per separare la frazione lipidica, quindi un'aliquota è stata purificata con colonna ad immunoaffinità; l'AFM₁ nei campioni di formaggio e yogurt è stata estratta con attacco enzimatico (pepsina in acido cloridrico) secondo il metodo proposto da Pietri *et al.* (Roma, 2004). L'analisi è stata effettuata mediante HPLC con rivelazione fluorimetrica. I metodi hanno fornito percentuali di recupero vicine al 95%, con buoni valori di ripetibilità. I limiti di rivelazione (LOD) e di quantificazione (LOQ) sono risultati di 0,001 e 0,002 µg/kg per il latte e 0,005 e 0,010 µg/kg per i formaggi e yogurt. Nei campioni di latte fresco l'AFM₁ è stata riscontrata in 63 (94%) campioni, con un valore medio di 0,021 ± 0,012 µg/kg, una mediana di 0,020 µg/kg e un valore massimo di 0,061 µg/kg. La maggior parte dei campioni (51%) ha evidenziato valori di AFM₁ compresi tra 0,020 e 0,050 µg/kg e solo in due campioni (3%) sono stati trovati valori superiori al limite di legge. Nell'indagine relativa al latte UHT, l'AFM₁ è stata rilevata in 24 campioni (86%), con un valore medio pari a 0,012 ± 0,009 µg/kg, una mediana <LOQ e un valore massimo di 0,034 µg/kg, evidenziando una contaminazione significativamente inferiore. La minore contaminazione riscontrata non è dovuta al processo UHT subito dal latte, ma alla provenienza in gran parte estera di questo tipo di latte. Nel monitoraggio dei formaggi molli, l'AFM₁ è stata riscontrata in 65 campioni (93%), con un valore medio di 0,068 ± 0,090 µg/kg, una mediana di 0,041 µg/kg e un valore massimo di 0,534 µg/kg. Solo 5 campioni (8%) hanno mostrato una concentrazione di AFM₁ superiore a 0,250 µg/kg. I risultati relativi alla presenza di AFM₁ negli yogurt hanno evidenziato bassi livelli di contaminazione, con un'incidenza pari al 70% di campioni positivi, un valore medio pari a 0,009 ± 0,008 µg/kg, una mediana <LOQ e un valore massimo di 0,024 µg/kg. Complessivamente, da questa indagine emerge che la contaminazione da AFM₁ del latte, dei formaggi molli e degli yogurt prodotti nel periodo critico successivo all'estate 2003 è stata contenuta e che quindi l'impatto sul consumatore è stato veramente minimo.

CONTAMINAZIONE DA OTA: IL RUOLO DEL VINO

Loretta Gambelli (a), Aldo Bertone (a), Laura D'Addezio (a), Vittorio Vivanti (a), Michele Saponaro (b)

(a) *Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (INRAN), Roma*

(b) *Ospedale di Barletta*

Nell'intento di fornire informazioni sempre più complete sulla sicurezza dei prodotti alimentari, negli ultimi anni l'attenzione è stata rivolta in maniera più approfondita allo studio delle micotossine, delle quali a tutt'ora non si ha una sufficiente conoscenza del loro destino metabolico e delle eventuali ripercussioni sulla salute.

Il nostro interesse in questo lavoro è rivolto allo studio di alcuni aspetti relativi all'ocratossina A, la quale può essere presente in molti prodotti alimentari.

Monitoraggi effettuati su vini prodotti in Italia hanno evidenziato la presenza, in alcune aree, di contaminazioni da OTA relativamente elevate.

In una di queste aree è stato effettuato il nostro studio su un gruppo di popolazione costituito da soggetti adulti sani di ambo i sessi, abituali consumatori di vino prodotto localmente. Questo studio ha previsto la determinazione delle ingestioni di OTA conseguenti al consumo di vino, delle escrezioni di questa tossina con le urine e delle esposizioni dei soggetti studiati.

La determinazione dell'OTA è stata eseguita su campioni di vino, urine e sangue, previa estrazione e concentrazione, con colonnine di immunoaffinità e successiva determinazione in HPLC con rivelazione fluorimetrica.

I risultati evidenziano che il vino non rappresenta l'alimento critico per l'ingestione di OTA nel gruppo di popolazione da noi studiato, in quanto non si è ottenuta alcuna correlazione tra i livelli di concentrazione nel sangue (esposizione), quelli determinati nei campioni di vino consumati (ingestione) e quelli delle relative urine (escrezione).

Dai valori di esposizione da OTA, si può dedurre che nell'area da noi studiata, è comunque presente una contaminazione dovuta a questa tossina, è quindi necessario approfondire la ricerca andando a valutare i livelli di OTA negli altri alimenti che costituiscono la dieta, in modo da poterne individuare fonti principali. Per quanto riguarda la mancata correlazione tra esposizione ed escrezione, è ipotizzabile che ciò sia dovuto ad una parziale metabolizzazione della tossina.

VALUTAZIONE DEL CONTENUTO DI OCRATOSSINA A IN CAMPIONI DI VINO SICILIANO

Lucia Crosta, Francesca Grippi, Alice Curione, Alessio Calderone, Roberta D'Amico, Gioacchino Aiello, Francesca Oliveri, Nicola Gebbia
Consorzio di Ricerca sul Rischio Biologico in Agricoltura (CoRiBiA), Palermo

L'ocratossina A (OTA) è una micotossina ad azione nefrotossica, teratogena, immunosoppressiva e carcinogenica negli animali e nell'uomo. Tale tossina è prodotta da funghi del genere *Penicillium* e *Aspergillus*, in particolare nelle aree con clima caldo-umido. La contaminazione da OTA si riscontra in differenti matrici alimentari quali cacao, caffè, cereali, birra, uve e derivati (mosto, vino e succo d'uva). La capacità patogena dell'ocratossina A è molto elevata, la sua azione si esplica a livello della sintesi proteica e secondariamente della sintesi di DNA e RNA. Per quanto riguarda la contaminazione su uva, i miceti si conservano nel terreno e sono presenti sui grappoli già nella fase fenologica dell'allegagione. Le condizioni ambientali, umidità ed alte temperature, giocano un ruolo di primaria importanza nel determinare la presenza di OTA in campo. Con riferimento al territorio italiano, il sud, proprio per il suo clima caldo-umido, è una zona a maggiore rischio di contaminazione da ocratossina A. L'Unione Europea a partire dal 26 gennaio 2005, con il Regolamento 123/2005, ha fissato in 2 ppb il tenore massimo ammissibile di OTA nel vino (rosso, bianco e rosé) e nel succo d'uva. Lo scopo del nostro lavoro è stato di valutare l'eventuale presenza di Ocratossina A nei vini siciliani disponibili nei principali punti vendita. Le ricerche hanno riguardato un numero considerevole di campioni provenienti da tutta la Regione siciliana; è stato effettuato un campionamento di 428 vini rossi e bianchi (prodotti commerciali), di varietà Nero d'Avola, Merlot, Nerello Mascalese, Perricone, Cabernet Sauvignon, Syrah, Chardonnay, Inzolia, Grillo, Grecanico, provenienti dalle vendemmie 2003, 2004 e 2005. È stato anche valutato, a scopo conoscitivo, il contenuto di OTA in 50 campioni di vino liquoroso siciliano tipo Passito di Pantelleria, Moscato di Pantelleria, Malvasia di Lipari. Le concentrazioni della tossina sono state confrontate in riferimento alle differenti varietà d'uva ed all'annata di produzione, in modo tale da fornire una base utilizzabile per la valutazione del rischio che può, infatti, variare molto in relazione alle differenti condizioni climatiche e di produzione di un determinato tipo di vino.

LA PROTEINA B32 DI MAIS: INGEGNERIZZAZIONE PER LA PROTEZIONE DEL MAIS CONTRO I FUNGHI PATOGENI MICOTOSSIGENICI

Chiara Lanzanova (a), Carlotta Balconi (a), Cristina Baro (b), Sabrina Orrù (b), Maria Gabriella Giuffrida (b), Fabio Forlani (c), Elisabetta Lupotto (a), Mario Motto (a)

(a) *Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA), Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Bergamo*

(b) *Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA), Consiglio Nazionale delle Ricerche, Torino*

(c) *Dipartimento di Scienze Molecolari Agro-alimentari, Università degli Studi, Milano*

L'ottenimento di nuovi genotipi di mais con crescente resistenza ai patogeni fungini è essere uno tra i più importanti obiettivi nello sviluppo di nuove strategie di miglioramento genetico. *Fusarium verticillioides*. In mais marciumi dello stocco, radice e spiga con conseguente produzione di micotossine (fumonisine) la cui presenza negli alimenti è spesso associata a rischi per la salute umana e animale. La proteina B32 del mais è un'albumina citosolica, monometrica, con peso molecolare apparente di 32 KDa, sintetizzata e immagazzinata nell'endosperma. Sebbene il ruolo di tale proteina nell'endosperma di mais non sia ancora del tutto chiaro, la B32 ha un'elevata omologia con numerose proteine che inattivano i ribosomi (RIP) e possiede attività antifungina, come dimostrato da indagini sia *in vivo* che *in vitro*.

L'obiettivo di questa ricerca mira a valutare in piante di mais che esprimono costitutivamente la B32 il grado di resistenza all'attacco di patogeni fungini, rispetto a piante che esprimono tale proteina solo a livello dell'endosperma. Sei linee omozigoti dominanti (PCR e western positive per B32) ed i relativi controlli recessivi (PCR B32 positive e western negative) sono state campionate allo stadio di fioritura per l'analisi dell'espressione della proteina B32 nel tessuto fogliare e per esperimenti di patogenicità.

Inoltre sulle stesse linee eseguito un profilo di espressione proteica.

Le mappe proteiche bidimensionali mostrano chiaramente la presenza di spot addizionali nelle progenie dominanti PCR e western positive, in confronto alle progenie recessive senza alterazioni ulteriori del profilo proteico. Gli spot aggiuntivi relativi alla proteina b32 e al gene per la resistenza all'erbicida sono stati identificati mediante MALDI-TOF. Il livello differenziale di espressione della proteina B32 in foglia osservato nelle diverse linee è stato utilizzato per selezionare genotipi utili nell'ambito di esperimenti di patogenicità al fine di valutare un'eventuale risposta differenziale all'attacco da parte di *Fusarium*. La linea recessiva utilizzata come controllo negativo risulta più suscettibile all'attacco di *Fusarium* rispetto alle linee dominanti esprimenti la B32. Esperimenti sono in corso per valutare la specificità del ruolo difensivo di questa proteina contro l'attacco da parte di altri patogeni (i.e. *Aspergillus*, *Penicillium*).

RIDUZIONE DEL CONTENUTO DI OCRATOSSINA A IN VINI ROSSI DURANTE LA FERMENTAZIONE MALO-LATTICA

Roberto Luneia (a), Alberto Marini (b), Daniele Zangelmi (b), Giovanna Fioroni (a), Maria Grazia Silvestrini (a), Riccardo Cannoli (a)

(a) *ANALYSIS srl, Neutron Group, Todi, Perugia*

(b) *ENOSTUDIO ss, Voghera, Pavia*

È sempre più evidente che tra le varie caratteristiche qualitative dei prodotti alimentari la sicurezza alimentare stia assumendo sempre più importanza, in quanto il consumatore vuole essere sempre più rassicurato su ciò che mangia e conoscere tutto ciò che accade “dal campo al piatto”. Uno degli argomenti dove la Comunità Europea è stata più attiva per garantire la sicurezza alimentare è stato proprio quello delle micotossine. Nel settore vitivinicolo la presenza di micotossine in particolare ocratossina A (OTA) in un elevato numero di vini e la recente emanazione del regolamento 123/2005 che stabilisce in 2 µg/kg il limite massimo di OTA nei vini, ha creato tra gli operatori notevole interesse nei confronti dei mezzi adatti a ridurne il contenuto. Vari autori hanno effettuato una serie di studi volti alla riduzione del contenuto di OTA, con vari mezzi e tra tutti il migliore è risultato essere il carbone attivo. Questo trattamento enologico oltre a non essere ammesso nei vini rossi, ne danneggia il colore e soprattutto il profilo aromatico, determinando la necessità di trovare procedimenti alternativi. In questo ambito si inserisce il nostro lavoro in cui la Fermentazione Malo-Lattica (FML), un comune processo di stabilizzazione dei vini rossi, è stata utilizzata per cercare di ridurre la presenza di OTA nel vino. In particolare è stato valutato l'effetto di un ceppo di batteri lattici selezionati (*oenococcus oeni*), in condizioni di pH e di temperatura controllati, con e senza l'aggiunta di materiali adsorbenti (Lievito Secco Reidratato - LSA), su due vini prodotti a partire da due uve Sagrantino di Montefalco che al momento della raccolta si trovavano in condizioni sanitarie completamente diverse una sana ed una molto danneggiata. Dai risultati ottenuti si evidenzia che la principale variabile responsabile della riduzione di OTA è risultata essere la durata della FML e quindi il tempo di contatto del vino con i batteri. In particolare nei campioni in cui le FML sono risultate essere le più rapide (25°C, pH 3,7) il contenuto di OTA si è ridotto al massimo del 39%, mentre nel caso delle FML lente (18°C, pH 3,3) dove il tempo di contatto ha sempre superato i 40 giorni si sono avute delle riduzioni anche superiori al 90%. Tra i due vini quello ottenuto da uve più danneggiate e quindi con una quantità di composti fenolici minori ha ottenuto delle riduzioni di OTA maggiori. Inoltre in tutti i casi testati l'aggiunta di LSA ha migliorato le performance di riduzione dell'OTA.

EMERGENZA AFLATOSSINE 2003: CONTROLLO DEI FORMAGGI A LUNGA STAGIONATURA PRODOTTI IN EMILIA ROMAGNA

Simonetta Menotta (a), Giorgio Fedrizzi (a), Mariantonietta Masselli (a), Lucia Nocera (b), Lorella Taus (b), Ivano Massirio (c)

(a) Reparto Merceologia Alimenti Origine Animale, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Bologna

(b) Servizio Veterinario Igiene Alimenti, Regione Emilia Romagna, Bologna

(c) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia

Nel 2003 il particolare andamento della stagione agronomica ha causato una forte contaminazione da aflatossine nelle granaglie destinate all'uso umano e all'alimentazione zootecnica: ciò ha inevitabilmente portato ad un innalzamento dei residui di aflatossina M₁ nel latte causando una situazione di emergenza per la tutela della salute dei consumatori. Per affrontare tale emergenza la Regione Emilia Romagna ha impostato un piano di controllo di tutte le aziende produttrici di latte e suoi derivati al fine di individuare situazioni a rischio. Nella Regione oltre il 70% del latte è destinato alla caseificazione e l'Autorità Sanitaria pur permettendo la trasformazione del latte prodotto nei giorni successivi al riscontro di una positività, aveva posto in vincolo cautelativo i corrispondenti lotti di formaggio. In tal modo, in attesa di disposizioni, erano state sequestrate negli stabilimenti circa 8.000 forme di formaggio a pasta dura in stagionatura, prodotte nel periodo compreso fra novembre 2003 e dicembre 2004. L'assenza di disposizioni legislative riguardanti il limite massimo di residuo (LMR), le modalità di campionamento e di analisi di questi prodotti, nonché l'assenza di una metodica analitica ufficiale adeguata, aveva creato non pochi problemi nelle fasi iniziali dell'emergenza. Nell'agosto 2004 il Ministero della Salute emanava una nota che stabiliva un limite provvisorio di 0,45 µg/kg per i formaggi a pasta dura a lunga stagionatura e che elencava punti salienti del metodo analitico consigliato e delle modalità di campionamento. In tal modo si è potuto procedere alle fasi successive: per ogni unità produttiva posta in vincolo sono stati prelevati 3 campioni da sottoporre ad analisi secondo criteri stabiliti dai servizi veterinari della Regione. Il personale addetto è stato formato e adeguatamente addestrato al fine di effettuare prelievi non distruttivi del formaggio: una volta stabilita la distribuzione pressoché omogenea dell'aflatossina M₁ all'interno della forma di formaggio si è utilizzata la tecnica della "scodellatura" seguita da una omogeneizzazione del campione per la formazione delle aliquote di legge. La procedura analitica prevedeva un'estrazione in solvente, seguita da una purificazione con colonnine di immunoaffinità. L'analisi era condotta in cromatografia liquida con rivelatore di massa a triplo quadrupolo. Nel periodo compreso tra dicembre 2004 e febbraio 2005 sono stati analizzati 378 campioni appartenenti a 144 lotti. Il 4,8% dei campioni risultava superiore ai limiti provvisori previsti; il 9,3% presentava una concentrazione compresa tra 0,30 e 0,45 µg/kg, il 49,2% tra 0,1 e 0,3 µg/kg e il 36,8% inferiore a 0,1 µg/kg.

EFFETTO DELLA TECNOLOGIA DI PRODUZIONE SULLA RIPARTIZIONE DI AFLATOSSINA M₁ IN MOZZARELLA CITRICA E LATTICA

Lucia Monti, Elena Veronica Panarelli, Salvatore Francolino, Roberto Giangiacomo
*Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, Istituto Sperimentale Lattiero
Caseario, Lodi*

A causa della sua elevata tossicità sia acuta che cronica, il contenuto massimo di aflatoossina M₁ (AFM₁) nel latte è stato fissato per legge a 0,05 µg/kg. Tale limite viene applicato anche a prodotti derivati tenendo conto dell'effetto di concentrazione che si verifica nel corso del processo di trasformazione. Soprattutto nei formaggi, il legame preferenziale della tossina con la caseina determina un arricchimento nella cagliata.

Il Ministero della Salute, in una nota del 2003 (N. 609/1774/388), indica il contenuto massimo di tossina nei formaggi come il prodotto della concentrazione massima ammissibile di AFM₁ nella materia prima per il coefficiente di trasformazione in equivalenti latte (riportati nel D.M. 31/7/2003 del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali) caratteristico per ciascun formaggio. Questa normativa non tiene però in considerazione la ripartizione della tossina tra cagliata e siero che si verifica nel corso della caseificazione e che risulta influenzata dalle caratteristiche tecnologiche peculiari per i diversi formaggi.

Scopo del presente lavoro è stato verificare l'influenza della tecnologia di produzione sulla ripartizione dell'AFM₁ in mozzarella prodotta mediante acidificazione con acido citrico e con fermenti, utilizzando *batch* di latte naturalmente contaminato a 100 e 200 ppt e un controllo negativo. Particolare interesse è stato posto alla diversa procedura di acidificazione nelle due produzioni ed all'operazione di filatura, caratteristica per questo tipo di prodotto.

Le analisi del latte, della cagliata, del siero di lavorazione e dell'acqua di filatura sono state effettuate mediante dosaggio immunochimico ELISA utilizzando dei kit commerciali. Le matrici liquide sono state analizzate tal quali, mentre il formaggio è stato sottoposto ad estrazione per liberare la tossina dal reticolo caseinico. Una prima estrazione con solvente, come riportato nelle istruzioni allegate al kit, ha determinato una sottostima della percentuale di recupero dell'AFM₁ nella cagliata. Si è quindi tentata una digestione del campione con pepsina, procedura normalmente utilizzata per i formaggi stagionati a pasta dura, con un netto incremento nel recupero. In base a questi risultati, nella mozzarella prodotta con acido citrico circa il 40% della tossina viene trattenuta nella cagliata, con un fattore di concentrazione pari a 3,1, mentre in quella prodotta con i fermenti la percentuale sale al 45% e il fattore di concentrazione a 4. La differente acidificazione nei due prodotti sembra quindi influire sui legami che l'AFM₁ instaura con la caseina e quindi sulla sua ripartizione. L'operazione di filatura determina infine una perdita di tossina in media del 3,5%.

INFLUENZA DELLO STOCCAGGIO DELL'UVA PRIMA DELLA VINIFICAZIONE SULLA CONTAMINAZIONE DI OCRATOSSINA A

Michele Savino (a), Patrizio Limosani (a), Emilia Garcia Moruno (b)

(a) *Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA), Istituto Sperimentale per l'Enologia, SOP, Barletta, Bari*

(b) *Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA), Istituto Sperimentale per l'Enologia, Asti*

La specie fungina ritenuta responsabile dell'accumulo di ocratossina A (OTA) nelle uve è l'*Aspergillus carbonarius*. Nelle regioni viticole meridionali, dove possono registrarsi proliferazioni di questo fungo tossigeno, è prassi durante la vendemmia conferire le uve alle cantine mediante autocassoni di grande portata. L'uva raccolta non sempre viene trasformata nell'arco delle 24 ore, sia per i tempi necessari alla raccolta di alcune centinaia di quintali di prodotto, sia per intasamenti sui piazzali di conferimento. Inoltre l'uva non vinificata in zona viene venduta ad operatori vinicoli di altre regioni potendo arrivare a destinazione non prima di 48 ore dalla raccolta. Lo stoccaggio dell'uva, seppure tenuta in cassette, potrebbe pertanto contribuire ad aumentare il tasso di contaminazione, dove già presente.

Con l'obiettivo di verificare l'influenza delle condizioni dello stoccaggio sulla contaminazione di OTA nell'uva, è stata realizzata un'esperienza utilizzando uve Trebbiano, Negroamaro e Merlot, conservate per alcuni giorni in cassetta in due condizioni ambientali diverse: all'aperto a temperatura ambiente e in cella frigo a 10°C. A diversi tempi (0, 1, 2, 3 e 4 giorni di sosta) l'uva delle diverse tesi è stata prelevata e pigiata e, dopo rimescolamento standardizzato del mosto con le parti solide dell'uva, è stato prelevato un campione di mosto per l'analisi dell'OTA.

Paradossalmente, poiché la temperatura ottimale di crescita di *Aspergillus carbonarius* è di 28°C, i risultati ottenuti hanno mostrato quantità maggiori di OTA quando le uve sono state conservate in cella frigo a bassa temperatura. Questi risultati sono probabilmente dovuti all'aumento di umidità, a causa della condensa di vapore acqueo all'interno della cella frigo.

VALUTAZIONE DELLA RIDUZIONE DI OCRATOSSINA A DAI VINI ROSSI MEDIANTE UTILIZZO DI COADIUVANTI TECNOLOGICI

Gianfranco Panfilì, Alessandra Fratianni, Luciano Cinquanta, Tiziana Di Criscio, Lucia Stoduto

*Dipartimento di Scienze e Tecnologia Agro-alimentari e Microbiologiche (DiSTAAM),
Università degli Studi del Molise, Campobasso*

Alla luce del crescente interesse per la problematica delle micotossine negli alimenti, ed in particolare la recente normativa sui limiti di OTA nei vini, lo studio di metodi adatti alla loro rimozione assume particolare importanza nella riduzione di assunzione di OTA con gli alimenti.

Al di là delle fondamentali strategie di prevenzione volte a minimizzarne la presenza, tra le quali in questo settore soprattutto quelle agronomiche, lo sviluppo di tecniche di decontaminazione in fase di trasformazione può risultare di notevole utilità, soprattutto se i metodi utilizzati non apportano variazioni significative alle caratteristiche organolettiche e chimico-nutrizionali degli alimenti e non determinano sostanziali cambiamenti ai processi tecnologici di produzione.

In relazione alla contaminazione di ocratossina A nel vino, alcuni agenti tecnologici di chiarificazione si sono dimostrati utili a ridurre i livelli di questa micotossina durante le pratiche ordinarie di vinificazione.

In questo lavoro è stata testata, mediante tecniche HPLC, l'efficacia di alcuni agenti chiarificanti, comunemente utilizzati in campo enologico, quali bentonite, gelatina e caseinato di potassio, sulla rimozione di OTA dal vino, valutando anche la loro influenza sui componenti responsabili del colore e della struttura dei vini rossi.

I risultati hanno dimostrato che, nelle condizioni sperimentali adottate, gli agenti enologici di chiarificazione testati si sono dimostrati in grado di rimuovere sostanziali quantità di OTA dal vino, senza apportare, ad eccezione di un solo agente chiarificante, variazioni significative alle componenti del colore.

PRESENZA DI OCRATOSSINA A IN FEGATI DI GALLINE OVAIOLE IN UMBRIA

Ivan Pecorelli (a), Rita Bibi (a), Stefania Pelli (a), Veronica Lattanzio (b), Michele Solfrizzo (b), Luciano Sonaglia (c), Telemaco Cenci (a)

(a) *Area Sicurezza Alimentare, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia*

(b) *Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA), Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari*

(c) *Servizio Veterinario, ASL3 Umbria, Foligno, Perugia*

Le micotossine sono metaboliti secondari di funghi microscopici note per la loro tossicità per l'uomo e gli animali. Tra le più conosciute ricordiamo l'ocratossina A (OTA) prodotta da varie specie di funghi quali *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus* e *A. carbonarius*. L'OTA è in grado di contaminare molte derrate alimentari quali cereali e derivati (birra), uve e derivati (mosto, vino), frutta secca e caffè. A causa delle sue riconosciute proprietà cancerogene, nefrotossiche, teratogene, immunotossiche e probabilmente neurotossiche i tenori massimi di questa micotossina nelle derrate alimentari sono fissati dal Regolamento (CE) 123/2005 che modifica il Regolamento (CE) 466/2001.

Al fine di tutelare la salute degli animali e, al contempo, garantire la salubrità degli alimenti attraverso tutta la filiera produttiva sono stati proposti a livello comunitario livelli massimi di OTA negli alimenti ad uso zootecnico. Nel frattempo, anche in relazione ai recenti casi di importazione di ingenti quantità di cereali contaminate con la suddetta micotossina, il legislatore nazionale ha provveduto a normare i livelli di OTA nei mangimi mediante il Decreto del Ministero della Salute del 15 maggio 2006 che fissa a 50 µg/kg il tenore massimo di OTA nei mangimi per pollame e suini. Nonostante sia noto dalla letteratura che l'OTA possa contaminare i tessuti di animali monogastrici, quali suini e pollame, alimentati con mangimi contenenti la micotossina, non esistono dati esaustivi sulla sua diffusione e sul suo metabolismo. Questo lavoro descrive i risultati di un campionamento effettuato in un allevamento di galline ovaiole umbro nel quale erano stati somministrati mangimi contaminati con OTA.

I fegati di quattro galline sono stati analizzati con un metodo analitico specifico che prevede la purificazione degli estratti su colonne ad immunoaffinità e la determinazione di OTA mediante HPLC con rivelatore a fluorescenza (FLD) utilizzando una colonna RP C18 *Phenomenex* Luna (250 x 3 mm, 5 µm). Tutti i campioni di fegato sono risultati contaminati da OTA a livelli compresi tra 74 e 685 ng/kg (ppt). Per la conferma dei risultati ottenuti, i fegati sono stati riestratti, purificati ed analizzati sia mediante HPLC/FLD che HPLC-MS/MS con interfaccia ESI operante in ioni negativi. Per le analisi HPLC-MS/MS è stata utilizzata una colonna RP C18 *Phenomenex Synergy Hydro* (150 x 2,0 mm, 4 µm) ed un triplo quadrupolo. L'OTA è stata determinata monitorando le transizioni dello ione molecolare [OTA-H]⁻ (m/z 402,0) che genera tre ioni figli con m/z 358,1, 211,1 e 167,1 (MRM). La presenza di OTA è stata confermata in tutti e quattro gli estratti di fegato. Dall'indagine in HPLC/FLD e HPLC-MS/MS risulta, inoltre, la presenza, nei quattro campioni analizzati, di ocratossina α un metabolita prodotto dall'idrolisi enzimatica dell'OTA.

INDAGINE SULLA CONTAMINAZIONE DA AFLATOSSINE E FUMONISINA B₁ DI FARINE PER POLENTA

Amedeo Pietri, Terenzio Bertuzzi, Paola Fortunati, Marco Zanetti, Alessia Gualla
*Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Facoltà di Agraria, Università
Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

Le indagini sulla qualità micotossicologica del mais prodotto in nord Italia hanno evidenziato che la fumonisina è di gran lunga la micotossina più frequente e abbondante. Quando il clima è particolarmente caldo e siccitoso, come nell'estate 2003, la contaminazione da aflatossine può diventare rilevante.

È stata pertanto condotta un'indagine per valutare la presenza di aflatossine (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂) e fumonisina B₁ (FB₁) in farine di mais per polenta; nei periodi novembre 2003-giugno 2004 e novembre 2004-giugno 2005 sono stati prelevati al dettaglio rispettivamente 77 e 60 campioni di farine fioretto e bramata, sia derivanti da agricoltura biologica che convenzionale. Dopo macinazione dei campioni con griglia da 1 mm, estrazione e purificazione con colonna ad immunoaffinità, l'analisi è stata effettuata mediante HPLC con rivelazione fluorimetrica. Per l'analisi delle aflatossine è stata utilizzata una colonna RP-18 *Superspher* (Merck) e come fase mobile una miscela H₂O:CH₃OH:CH₃CN=64:23:13; la rivelazione fluorimetrica è stata effettuata dopo derivatizzazione post colonna con *Pyridinium Bromide Perbromide* (PBPB). La FB₁, dopo derivatizzazione con o-ftalaldeide (OPA), è stata separata con colonna Luna Phenyl-Hexyl (*Phenomenex*), utilizzando come fase mobile un gradiente H₂O (2% CH₃COOH):CH₃CN. I limiti di rivelazione e di quantificazione sono risultati rispettivamente di 0,02 e 0,05 µg/kg per le aflatossine e di 30 e 60 µg/kg per la FB₁. I metodi hanno fornito percentuali di recupero dell'ordine del 95%, con una buona ripetibilità. Nei campioni relativi al 2003 è stata riscontrata una diffusa (un solo campione negativo) e non trascurabile contaminazione da aflatossine, con un valore medio di AFB₁ di 2,11 ± 4,67 µg/kg, una mediana di 0,95 µg/kg e un valore massimo di 30,7 µg/kg. Il 25% dei campioni è risultato avere un livello di AFB₁ superiore al limite di legge (2 µg/kg). L'indagine relativa ai campioni del 2004 ha evidenziato una minore contaminazione, con un valore medio di AFB₁ pari a 0,67 ± 0,99 µg/kg, una mediana di 0,30 e un valore massimo di 5,3 µg/kg; in 4 campioni (6,7%) è stata rilevata AFB₁ ad una concentrazione superiore a 2 µg/kg. La contaminazione da FB₁ ha evidenziato un andamento simile nei due anni, con valori medi di 1561 ± 1932 e 1820 ± 1.206 µg/kg, rispettivamente nel 2003 e 2004. Il valore massimo, pari a 9.887 µg/kg, è stato riscontrato in un campione prelevato nel 2003. I livelli di aflatossine e FB₁ sono risultati superiori nei campioni di farine biologiche rispetto alle convenzionali, anche se non è stata riscontrata alcuna differenza statisticamente significativa, dato l'esiguo numero di farine biologiche disponibili.

MONITORAGGIO DELLE AFLATOSSINE IN SEMI OLEAGINOSI E FRUTTA SECCA IMPORTATI IN ITALIA ATTRAVERSO IL PORTO DI SALERNO

Attilio Veneziano (a), Francesco De Simone (a), Laura Gallo (a), Antonio Prudente (b), Luca Rastelli (a)

(a) *Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Salerno, Fisciano*

(b) *Uffici di Sanità Marittima (USMA), Salerno*

Il rischio chimico associato ai prodotti alimentari deriva dalla presenza di fattori di rischio quali, sostanze tossiche naturali, allergeni, contaminanti naturali, ambientali o indotti da processo, inclusi i residui. Il laboratorio di Chimica degli Alimenti (LICA) del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Salerno, similmente ad altri soggetti, opera a livello territoriale per gli accertamenti analitici di laboratorio con responsabilità nel controllo ufficiale degli alimenti. Il controllo ufficiale degli alimenti e delle bevande ha la finalità di verificare e garantire la conformità dei prodotti in questione alle disposizioni dirette a prevenire i rischi per la salute pubblica, a proteggere gli interessi dei consumatori e ad assicurare la lealtà delle transazioni. In particolare vengono indagati campioni di alimenti inviati dai Carabinieri del Nucleo Antisofisticazione, dagli Uffici di Sanità Marittima ed Aerea del Ministero della Sanità. Lo scopo delle indagini è quello di valutare non solo la salubrità dei prodotti ma anche la qualità del processo produttivo cui l'alimento è stato sottoposto.

Le micotossine (aflatossine, ocratossina A, zearalenone, fumonisine, etc.) sono prodotti naturali altamente tossici del metabolismo secondario di alcune specie di funghi parassiti che possono svilupparsi su di una grande varietà di derrate alimentari; questi composti sono stabili e resistenti ai lunghi periodi di conservazione ed ai comuni trattamenti industriali e casalinghi di preparazione dei cibi.

Le aflatossine sono un gruppo di micotossine prodotte da ceppi di *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Le AFs che vengono riscontrate negli alimenti di origine vegetale sono quattro: B₁, B₂, G₁, G₂; le B sono prodotte sia da *A. flavus* che da *A. parasiticus*, mentre le G sono prodotte solo dal secondo.

Nella maggior parte dei casi, la AFB₁ è quella presente in maggior quantità e sulla quale è stato focalizzato l'interesse dei ricercatori per via della sua elevata tossicità acuta e cronica e per l'attività cancerogena che esplica sugli animali, oltre che per i potenziali effetti sull'uomo.

In collaborazione con l'Ufficio di Sanità Marittima di Salerno, vengono riportati i dati delle analisi chimiche sulla presenza di aflatossine in prodotti alimentari quali semi oleaginosi e frutta secca in importazione nel Porto di Salerno nel biennio 2004-2005. Sono stati analizzati con metodiche *Ridascreen® Fast Aflatoxin - R-biopharm* conferma in HPLC con rilevatore a fluorescenza, 667 campioni suddivisi in pistacchi, arachidi, nocciole, noci, fichi secchi, mandorle, anacardi. I campioni provenivano da Egitto, Turchia, Iran, Israele, USA, Argentina, Brasile, Cile, Bolivia. Sono riportati i risultati del monitoraggio.

CONTAMINAZIONE DA OCRATOSSINA A E TRICOTECENI DI PRODOTTI A BASE DI FRUMENTO

Silvia Rastelli, Terenzio Bertuzzi, Marco Zanetti, Gianfranco Piva, Amedeo Pietri
*Istituto di Scienze dell'Alimentazione e della Nutrizione, Università Cattolica del Sacro
Cuore, Piacenza*

Nella UE, per l'ocratossina A (OTA) è stato fissato un limite di 3 µg/kg per i prodotti derivati dai cereali; per il deossinivalenolo (DON) sono in vigore dal 1 luglio 2006 valori massimi di 750, 500 e 200 µg/kg, rispettivamente per pasta, prodotti da forno e cereali da colazione, e alimenti per l'infanzia. In questo studio è stato effettuato un monitoraggio sulla presenza di OTA e tricoteceni (TCT) in diverse tipologie di prodotti a base di frumento, confrontando per ogni tipo prodotti convenzionali, integrali e biologici. L'indagine è stata condotta su campioni di pasta (16), cereali da colazione (27) e prodotti da forno, quali pane (90), *crackers* (16), fette biscottate (16) e biscotti (16), acquistati in diversi punti vendita durante gli anni 2003-2004. Dopo estrazione, l'OTA è stata purificata con colonna ad immunoaffinità, mentre i TCT con colonna *Mycosep*. L'analisi per determinare l'OTA è stata effettuata mediante HPLC con rivelazione fluorimetrica, per i TCT in GC-MS (trappola ionica) con tecnica SIM. I metodi hanno dato percentuali di recupero superiori al 90% con buoni valori di ripetibilità. I limiti di rivelazione e di quantificazione sono risultati di 0,01 e 0,02 µg/kg per l'OTA e di 1 e 2 µg/kg per il DON. Per i campioni di pasta, normale e integrale, la contaminazione da OTA è risultata molto limitata con media e mediana inferiori a 0,10 µg/kg; per il DON, il valore medio e la mediana sono risultati compresi fra 80 e 200 µg/kg, il valore massimo è stato di 705 µg/kg (integrale). Nei cereali da colazione l'OTA è stata rilevata con un'incidenza del 70%, con un valore medio di 0,26 ± 0,39 µg/kg e una mediana di 0,13 µg/kg. Il valore massimo è risultato pari a 1,46 µg/kg (convenzionale). Dei TCT, il DON è risultato presente in tutti i campioni, con un valore medio pari a 233 ± 201 µg/kg, una mediana di 182 e un valore massimo di 837 µg/kg; in 3 campioni (11%) la contaminazione era superiore al limite di legge di 500 µg/kg. Per i prodotti da forno, la contaminazione da OTA in tutti i tipi di prodotto considerati è risultata piuttosto bassa, con valori inferiori a 0,5 µg/kg, tranne in un campione integrale (1,57 µg/kg); i valori medi e le mediane sono risultate inferiori rispettivamente a 0,30 e 0,15 µg/kg. Per quanto riguarda la contaminazione da DON, un solo campione ha evidenziato un valore maggiore di 500 µg/kg (569 µg/kg, integrale), mentre i valori medi e le mediane erano compresi fra 99 e 170 µg/kg. La contaminazione nei campioni di pane è risultata la più diffusa. In tutti i tipi di pane considerati, il valore medio e la mediana per l'OTA sono stati inferiori a 0,50 µg/kg, ma alcuni campioni (5%) hanno mostrato valori superiori a 1,00 µg/kg (valore massimo 1,63 µg/kg). Il DON, presente in tutti i campioni, è risultato superiore a 500 µg/kg in 6 campioni (7,5%); i valori medi e le mediane erano inferiori a 300 µg/kg. È stata rilevata una tendenza alla significatività statistica per una maggiore contaminazione da OTA della pasta integrale e da DON per il pane integrale, rispetto ai campioni convenzionali.

PERCORSI PRODUTTIVI PER IL CONTROLLO DELLA CONTAMINAZIONE DA *FUSARIUM*-TOSSINE

Amedeo Reyneri, Massimo Blandino, Francesca Vanara
Dipartimento di Agronomia, Selvicoltura e Gestione del Territorio, Università degli Studi di Torino, Grugliasco

La cerealicoltura italiana negli ultimi anni sente sempre di più l'esigenza di differenziare le sue produzioni, selezionando e destinando a specifiche destinazioni d'uso (alimentare, zootecnico, ...) le partite in funzione di aspetti qualitativi e del livello di contaminazione da micotossine.

Nella maiscoltura la selezione delle partite e la messa a punto di processi produttivi dedicati non è ancora diffusa, ma l'entrata in vigore del Reg CE 586/2005 impone una decisa accelerazione. Per arrivare alla produzione di partite caratterizzate è necessario un grande sforzo da parte di tutti i soggetti della filiera, partendo soprattutto dalla produzione primaria in campo, seguita dalla fase di stoccaggio per gli aspetti organizzativi della gestione della formazione dei silos di stoccaggio.

Il presente lavoro si pone come obiettivo quello di sintetizzare numerose esperienze maturate negli ultimi anni per la messa a punto di percorsi produttivi e della organizzazione della filiera maidicola italiana.

L'adeguamento dei percorsi produttivi alla destinazione d'uso della granella può essere condotto prevedendo diversi livelli di attenzione alle pratiche agricole e di post raccolta che influenzano la sanità del prodotto finito. In sintesi si possono ipotizzare 3 livelli, identificabili come livello "minimo", "intermedio" e "massimo". Nel primo caso è richiesta un'epoca di raccolta tempestiva con brevi tempi di prestoccaggio, ed eventualmente il trattamento contro i fitofagi. Al livello intermedio si aggiungono agli elementi precedenti la classe di precocità dell'ibrido, il momento della semina e il trattamento insetticida. Il livello massimo richiede, oltre a quanto detto prima, la specifica dell'ibrido il livello limite di umidità alla maturazione, un'attenzione maggiore in fase di raccolta essiccazione e conservazione.

Per la gestione di queste partite è necessaria una fase di verifica del prodotto verde al momento della consegna. L'analisi immediata delle impurità e del contenuto in micotossine consente la separazione necessaria per la formazione di silos di categorie diversificate.

La scelta della procedura varierà quindi in funzione dell'esigenze del mercato che è stato prestabilito. L'introduzione dei diversi livelli potrebbe essere graduale, con misurazione dei progressi conseguiti nel corso dell'introduzione di progressivi livelli di controllo. L'esame combinato dei numerosi casi di studio consente una prima valutazione dell'efficacia dei diversi interventi adottati e un approccio più critico alla qualità e alla sanità nella moderna.

VIGILANZA SANITARIA ALL'IMPORTAZIONE E CRITICITÀ NELLA APPLICAZIONE DEL REGOLAMENTO (CE) N. 401/2006

Antonio Ruggirello (a), Giuseppe Giugno (a), Mauro Dionisio (b)

(a) *Ufficio Sanità Marittima Aerea e di Frontiera (USMAF) di Palermo, Unità Territoriale, Trapani*

(b) *Ufficio Sanità Marittima Aerea e di Frontiera (USMAF), Palermo*

Il Regolamento Comunitario (CE) 401/2006, pur mantenendo evidenti elementi di continuità con la corposa normativa preesistente, introduce una sostanziale novità: esplicita l'approccio metodologico ed organizzativo con cui i controlli ufficiali ad opera delle autorità competenti dovranno essere eseguiti. Si avvia così la "metamorfose" normativa, in parte anticipata da precedenti direttive comunitarie: da un sistema di "comando e controllo" si passa quindi ad un sistema di "responsabilizzazione ed autoregolazione" con contenuti tecnici che, nella complessa azione di vigilanza sanitaria delle merci in importazione, implica la valutazione e la gestione dei rischi nella fase di campionamento delle diverse matrici alimentari per la ricerca delle micotossine. L'Autorità Sanitaria di confine U.S.M.A.F. Palermo annualmente effettua campionamenti, ai fini degli accertamenti analitici per la ricerca delle micotossine, su partite alimentari presentate all'importazione da Paesi Terzi con flussi più o meno intensi, costituiti in gran parte da caffè, legumi, frutta secca, spezie e vino. Tali campionamenti rivestono sempre carattere di urgenza e di stagionalità.

Il recepimento di tale normativa per i controlli sanitari in merci di importazione provenienti da paesi terzi implica aspetti di criticità derivanti da molteplici fattori tra i quali:

- la mancata distribuzione capillare sul territorio di laboratori ufficiali accreditati per le analisi delle micotossine, dotati di apparecchiature per la macinatura e l'omogeneizzazione di campioni del peso di 10-30 kg, per far sì che i campioni possano essere trasportati ed analizzati in tempi brevi;
- difficoltà ad applicare una corretta prassi igienica durante le fasi di campionamento, considerate le difficili condizioni ambientali nelle aree portuali non attrezzate con spazi ed aree idonee;
- l'impossibilità di operare all'interno di un luogo protetto per eseguire le operazioni di scarico e di prelievo dei campioni al punto di entrata;
- assenza di locali e/o magazzini in cui detenere le partite sottoposte ad analisi in attesa di esito;
- carente formazione del personale che esegue i controlli ufficiali.

Anche se l'Amministrazione sta svolgendo un importante sforzo per adeguare il sistema informatizzato dei controlli, rimangono molte criticità: la mancata sinergia tra le azioni di campionamento e la non presenza di laboratori accreditati sul territorio, le condizioni ambientali in cui si opera, la formazione del personale addetto ai controlli e la carenza di altre figure professionali responsabilmente impegnate presso i punti d'ingresso, nonché la mancata diffusione di adeguata cultura specifica per gli operatori del settore.

ANALISI DEL RAPPORTO EMATICO SFINGANINA/SFINGOSINA (SA/SO) IN BOVINI DA CARNE ESPOSTI A FUMONISINE PER VIA ALIMENTARE. NOTE METODOLOGICHE E RISULTATI PRELIMINARI DI UN CASO STUDIO

Andrea Sabatini, Pier Paolo Danieli, Bruno Ronchi
Dipartimento di Produzioni Animali, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo

Negli organi e tessuti animali il rapporto sfinganina/sfingosina (Sa/So) risulta alterato in presenza della fumonisina B₁ (FB₁), che inibendo l'attività dell'enzima cellulare ceramide sintetasi, porta alla riduzione nella sintesi della sfingosina e ad un incremento della sfinganina. Pertanto l'analisi del rapporto Sa/So costituisce un metodo diagnostico per indicare l'esposizione cronica a fumonisine (FBs).

Diversi metodi sono stati messi a punto per la determinazione in HPLC del rapporto Sa/So in campioni di sangue e urine in studi condotti principalmente sull'uomo. Al fine di ottenere informazioni sugli effetti dell'esposizione a FB₁ sul rapporto Sa/So nel bovino da carne sono state testate diverse condizioni di lavoro in RP-HPLC con autocampionatore termostato per ottimizzare il protocollo di analisi.

Nella prima fase sperimentale sono state applicate condizioni di analisi modificate rispetto a quelle suggerite da Castegnaro et al., 1998. I risultati ottenuti in prove ripetute hanno sempre dato esito positivo e costante per i due OPA-addotti con tempi di ritenzione di 6,8 minuti per la sfingosina (OPA-So) e 8,3 minuti per la sfinganina (OPA-Sa). Per valutare la stabilità della derivatizzazione pre-colonna con OPA, è stata eseguita un'analisi del decadimento OPA-Sa e OPA-So mediante autocampionatore termostato a 4°C. Il decadimento percentuale dopo 240 minuti dalla derivatizzazione è risultato pari a: 4 per SO e 6 per SA rispetto al segnale degli addotti al tempo zero.

Per testare la metodica di estrazione delle basi sfingoidi sono state eseguite alcune analisi di recupero su campioni fortificati di sangue di bovino (4 ng/ml, 2 ng/ml e 1 ng/ml di Sa e So). I recuperi medi ottenuti per ciascuna base sono risultati soddisfacenti, in particolare per il livello più basso. Infine la metodica di analisi è stata applicata su campioni di sangue di bovino da carne al fine di testare la sensibilità e i limiti di determinazione del rapporto Sa/So. Il metodo messo a punto ha consentito di migliorare la stabilità del segnale alla temperatura di 4°C, una buona capacità di estrazione del metodo di estrazione soprattutto a concentrazioni di 1 ng/ml, suggerendo un suo possibile impiego in bovini sottoposti ad una esposizione cronica da FBs.

Il lavoro è stato eseguito nell'ambito del progetto Standbeef-MiPAF.

MONITORAGGIO, SPERIMENTAZIONE E DISCIPLINARI DI PRODUZIONE PER UN MAIS DI QUALITÀ IN FRIULI VENEZIA GIULIA

Mariolino Snidaro, Giorgio Barbini, Marco Signor
*Servizio Ricerca e Sperimentazione, Agenzia Regionale per lo Sviluppo Rurale (ERSA),
Pozzuolo del Friuli, Udine*

È proseguito il monitoraggio iniziato nel 1996 sulla presenza di micotossine nella granella di mais stoccato in dieci essiccatoi della regione Friuli Venezia Giulia. I risultati del monitoraggio hanno evidenziato che il 95% dei campioni era contaminato da fumonisine con valori compresi tra 1.500 e 19.100 ppb. L'ocratossina è stata rilevata solo nel 2001 su mais raccolto tardi. L'aflatossina è stata rilevata soprattutto sui mais che avevano subito un forte stress da siccità nel 2003. Zearalenone e vomitossina sono stati rilevati soprattutto in annate umide e nelle raccolte tardive con valori tra 4 e 185 ppb per lo Zearalenone e tra 1 e 700 per la vomitossina.

È proseguita anche la sperimentazione dell'ERSA finalizzata all'individuazione della migliore agrotecnica per ridurre la presenza di micotossine nella granella di mais in Friuli. Anche con le ultime sperimentazioni è stato possibile evidenziare che il contenimento della piralide e la raccolta anticipata risultano essere di fondamentale importanza nella riduzione della presenza soprattutto di fumonisine.

Nel 2004 è stato avviato, presso uno dei più importanti essiccatoi della regione, un progetto pilota, della durata di cinque anni, per la produzione annuale di 1.200 t di granella di mais con un basso contenuto in micotossine. Al progetto partecipano 30 soci ai quali è stato imposto di: effettuare la coltivazione solo nelle aree irrigue, utilizzare un solo ibrido, effettuare il trattamento contro la piralide e raccogliere la granella del mais ad un'umidità non inferiore al 25%. Nel 2004 il 52% dei soci è riuscito a produrre un mais con micotossine a livello zero mentre nel 2005 nessun socio è riuscito. Nel 2004 la fumonisina è stata la sola micotossina rilevata con valori medi di 2.500 ppb. Nel 2005 è stata invece rilevata, come media dei diversi conferitori, la presenza di 6.400 ppb di fumonisine, 110 ppb di vomitossina e 101 ppb di zearalenone. Per l'aflatossina e l'ocratossina i valori erano pari a zero.

Le condizioni climatiche sono state la causa principale della diversità dei risultati conseguiti nei due anni. Nel 2004 tutte le operazioni colturali sono state effettuate nelle migliori condizioni climatiche. Nel 2005 le frequenti piogge hanno fatto slittare di qualche giorno l'intervento contro la piralide e l'epoca di raccolta. Nonostante la diversità dei risultati conseguiti nei due anni le partite presentavano dei livelli di micotossine molto contenuti e quindi idonee all'uso zootecnico. Per l'uso umano l'unico parametro oltre i limiti è quello della fumonisina per la quale è necessario effettuare ulteriori sperimentazioni per non superare la soglia dei 2000 ppb.

GLUCONOBACTER OXYDANS, UN BATTERIO CHE DEGRADA LA PATULINA NEI SUCCHI DI MELA

Michele Solfrizzo (a), Alessandra Ricelli (a), Federico Baruzzi (a), Francesco Paolo Fanizzi (b), Veronica Lattanzio (a), Maria Morea (a)

(a) *Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA), Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari*

(b) *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali, Università degli Studi di Lecce, Consortium CARSO Cancer Research Center, Bari*

La presenza di patulina nei succhi di frutta a concentrazioni superiori ai limiti massimi ammissibili in Europa è il risultato di una inadeguata selezione della materia prima. Il controllo della patulina nei frutti prima della loro trasformazione in succhi/puree e lo sviluppo di procedure e metodi di decontaminazione sono necessari per ridurre l'esposizione umana a questa micotossina soprattutto nei bambini che consumano elevate quantità di questi prodotti.

Mele con sintomi di marciume causati da *Penicillium expansum* e naturalmente contaminate da patulina sono state utilizzate per isolare microrganismi in grado sia di resistere all'azione antibiotica della patulina che di degradarla. Gli otto isolati batterici ottenuti, testati su PDB addizionato con 10 µg/ml di patulina, hanno ridotto dell'84-96% la concentrazione di questa micotossina. In concomitanza con la diminuzione della patulina è stata osservata la comparsa di due picchi nel profilo cromatografico (HPLC-UV/DAD) delle colture batteriche incubate in presenza di patulina. Gli isolati batterici sono stati identificati mediante sequenziamento dell'rDNA 16S come *Gluconobacter oxydans*.

Per la produzione e isolamento dei prodotti di degradazione il ceppo batterico con la più elevata capacità di degradare la micotossina è stato incubato in YPM con 400µg/ml di patulina. La purificazione dei prodotti di degradazione è stata eseguita utilizzando colonne OASIS e TLC semipreparative. Questi composti sono stati identificati come E-ascladiolo e Z-ascladiolo tramite HPLC-UV/DAD, LC-MS/MS, 1HNMR e 13CNMR. La trasformazione quantitativa della patulina in ascladiolo da parte di *G. oxydans* è stata accertata sia in substrati sintetici liquidi (PDB, YPM) che in succo di mela commerciale addizionati con patulina fino a 800 µg/ml anche ad elevate concentrazioni (fino a 400-800 µg/ml). Gli esperimenti di *time-course* hanno evidenziato che l'ascladiolo si forma dopo 12 ore e raggiunge la concentrazione massima dopo 72 ore di incubazione di *G. oxydans* con patulina sia su YPM che su succo di mela commerciale. *G. oxydans* è noto per la sua capacità di ossidare parzialmente molti substrati tra cui zuccheri e alcoli mentre in questo caso il batterio ha catalizzato un processo di riduzione che ha comportato l'apertura del ciclo piranico della patulina, con conseguente formazione di ascladiolo. Questa è la prima segnalazione di degradazione della patulina da parte di batteri e la specie batterica responsabile non sembra presentare rischi per la salute umana ed è già impiegata in alcuni processi industriali per la sintesi di prodotti destinati al consumo umano (vitamina C). Se gli studi tossicologici sugli ascladioli confermeranno la bassa tossicità di questi composti, *G. oxydans* potrebbe costituire una nuova opportunità per l'elaborazione di strategie di detossificazione biologica di prodotti alimentari contaminati da patulina.

UN TRIENNIO DI INDAGINI SULLA PRESENZA DI AFLATOSSINE NEI MANGIMI

Franco Cinti (a), Carmine Torricella (a), Silvia Grandi (a), Mauro Vecchietini (a), Alessandra Canever (b), Andrea Borsari (b)

(a) Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-ambientali (DiSTA), Università degli Studi, Bologna

(b) Granarolo SpA, Bologna

La presenza di aflatossine nelle razioni alimentari per le bovine da latte è quasi sempre la conseguenza dell'impiego di alimenti contaminati tra i quali la granella di mais e i mangimi sono quelli più a rischio.

La nostra indagine, in campo nazionale, riguarda il triennio 2003-2005 (i dati del primo anno sono stati presentati al Congresso ISS 2004) durante il quale sono stati presi in considerazione 17 mangimifici nel 2003, 20 nel 2004 e 37 nel 2005. Nella maggior parte dei mangimifici sono state effettuate più ispezioni in tempi successivi per un totale di 238 campioni.

I risultati dell'indagine pongono in evidenza un basso livello di contaminazione dei mangimi con valori di aflatossine inferiori nella quasi totalità dei casi al limite di 5 ppb.

Il confronto tra le annate tenderebbe ad escludere una diretta ricaduta di eventuali andamenti climatici favorevoli alla contaminazione della granella di mais sul livello di contaminazione dei mangimi che la contengono. Ciò starebbe ad indicare un sempre attento comportamento delle aziende nella scelta delle "partite" di mais da utilizzare nella preparazione dei mangimi.

CONTAMINAZIONE DA MONILIFORMINA DEL MAIS PRODOTTO IN NORD ITALIA NEL 2005

Marco Zanetti, Silvia Rastelli, Terenzio Bertuzzi, Amedeo Pietri
*Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Facoltà di Agraria, Università
Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

La moniliformina (MON) è una micotossina prodotta da differenti specie di *Fusarium*, tra le quali sono incluse *F. avenaceum*, *F. subglutinans* e *F. proliferatum*, ed è presente come sale di sodio o potassio. Da studi condotti su alcune specie animali, non è risultata, cancerogena; tuttavia causa immunosoppressione e problemi intestinali, oltre a degenerazione e necrosi del miocardio. Nell'uomo, la MON è sospetta essere causa della malattia degenerativa del miocardio (*Keshan disease*), osservata in certe zone della Cina e del Sud-Africa. La presenza di MON nei prodotti cerealicoli è stata riportata in diverse indagini; nel mais e nei suoi derivati sono state trovate le maggiori contaminazioni. In questo lavoro è stato effettuato un monitoraggio sulla presenza di alcune fusariotossine, (moniliformina, fumonisine, tricoteceni e zearalenone), in 85 campioni di mais prodotto in alcune regioni del nord Italia (Emilia Romagna e Piemonte) nel 2005. Dopo macinazione dei campioni con griglia da 1mm e miscelazione, la MON, estratta con acetone/acqua (84:16), è stata purificata su colonna SAX ed determinata mediante HPLC con rivelatore UV a 227 e 258 nm. Il metodo ha fornito una percentuale media di recupero superiore al 90% con buoni valori di ripetibilità. I limiti di rivelazione e di quantificazione (LOQ) sono risultati di 0,015 e 0,030 mg/kg. La MON è risultata presente in quasi tutti i campioni (92%); dall'analisi dei dati è stato calcolato un valore medio di $0,764 \pm 0,782$ mg/kg e una mediana pari a 0,629 mg/kg. Valori superiori a 1 mg/kg sono stati riscontrati in 20 campioni (23%) con un valore massimo di 5,465 mg/kg. Non è stata rilevata una differenza statisticamente significativa tra i campioni provenienti dalle due regioni del nord Italia. È stato infine valutato se vi fosse un'eventuale correlazione tra la presenza di MON con quella di fumonisin B₁ (FB₁) e deossinivalenolo (DON). Per il DON la correlazione non è risultata significativa (R=0,15), mentre per FB₁ è stata riscontrata una correlazione altamente significativa (R=0,43, P<0,001); tale risultato è probabilmente conseguenza del fatto che i principali produttori di DON (*F. graminearum* e *F. culmorum*) non producono FB₁, mentre un importante produttore di FB₁ (*F. proliferatum*) produce anche MON.

STUDIO PRELIMINARE SULLA STABILITÀ DELLE FUMONISINE IN ESTRATTI DI MAIS E FRUMENTO

Chiara Dall'Asta (a), Gianni Galaverna (a), Rosangela Marchelli (a), Gabriella Aureli (b),
Maria Grazia D'Egidio (b)

(a) *Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università degli Studi, Parma*

(b) *Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA), Sezione
Merceologia dei Prodotti, Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Roma*

Le fumonisine comprendono una famiglia di micotossine, strutturalmente simili, prodotte dal metabolismo secondario di alcuni funghi del genere *Fusarium*, in particolare *F. verticillioides* e *F. proliferatum*, che sono largamente diffusi come contaminanti dei cereali, soprattutto del mais.

L'assunzione di alimenti contaminati da fumonisine è causa di numerose patologie negli animali, mentre per quanto riguarda i rischi per la salute umana tale assunzione è stata associata all'incidenza di cancro esofageo ed a difetti del tubo neurale in popolazioni molto esposte. La fumonisina B₁ è stata classificata come 2B (IARC), ossia come possibile cancerogeno per l'uomo.

Nella valutazione complessiva del rischio di esposizione alle fumonisine attraverso gli alimenti occorre non escludere l'eventuale tossicità attribuibile sia ai prodotti di degradazione delle stesse sia alle micotossine legate ad alcuni componenti della matrice.

Sono riportati i risultati preliminari relativi alle analisi cromatografica (LC-MS/MS) ed immunoenzimatica (ELISA) delle fumonisine in estratti di mais naturalmente contaminato, in presenza ed in assenza di α -amilasi addizionata agli stessi. Inoltre, vengono riportati i risultati del test ELISA su estratti di sfarinato di frumento artificialmente contaminato da FB₁. I dati ottenuti si riferiscono alle analisi ripetute ad intervalli di tempo stabiliti sui campioni mantenuti a diverse temperature. Il diverso andamento nel tempo della concentrazione delle fumonisine negli estratti relativi ai due tipi di matrice ha posto l'attenzione sulla maggiore complessità ed eterogeneità derivante dalla contaminazione naturale del substrato. Inoltre, i dati preliminari ottenuti hanno permesso una prima valutazione dell'effetto della temperatura e dell'azione dell' α -amilasi.

SPETTROSCOPIA NIR PER LA MISURA DEL CONTENUTO IN FUMONISINE NELLE CARIOSSIDI E NELLE FARINE DI MAIS: ESTENSIONE E CONFERME

Nicola Berardo (a), Gilles Camin (b), Raffaele Capitanio (c), Tommaso Lombardi (c),
Adriano Marocco (d)

(a) *Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA), Istituto
Sperimentale per la Cerealcoltura, Bergamo*

(b) *Syngenta Seeds SAS, Saint-Sauver*

(c) *Syngenta Seeds SAS, Casalmorano, Cremona*

(d) *Istituto di Agronomia Generale e Coltivazioni Erbacee, Università Cattolica del Sacro
Cuore, Piacenza*

La spettroscopia nel vicino infrarosso (*Near Infrared Spectroscopy*, NIR) è una procedura non distruttiva, accurata, rapida, largamente utilizzata per misurare il contenuto in proteine, grassi, umidità, ceneri e composti minori nei prodotti agro-alimentari. Inoltre, è stata applicata per stimare il contenuto in ergosterolo e in micotossine nella granella dei cereali. In un precedente lavoro, abbiamo valutato l'applicabilità della spettroscopia NIR per quantificare i funghi micotossigeni ed i loro metaboliti, ergosterolo e fumonisina B₁, presenti nella granella e nella farina di mais in seguito a infezioni naturali e artificiali con *Fusarium verticillioides*. Questo lavoro estende e conferma i dati ottenuti in precedenza attraverso l'analisi di 728 campioni di linee pure di mais allevate in Italia nel 2005. Le linee impiegate rappresentano un campione significativo dei diversi tipi di granella di mais: 393 linee appartengono al *breeding group* "Stiff Stalk" e 335 al gruppo "non Stiff Stalk". Le spighe sono state infettate artificialmente con isolati di *F. verticillioides*, attraverso la tecnica *pin-bar*. Sui campioni raccolti è stato valutato il grado di infezione fungina ed i valori sono stati riferiti ad una scala percentuale di infezione. L'analisi del contenuto in fumonisina B₁, B₂ e B₃ è stato eseguito mediante cromatografia liquida HPLC. I contenuti in fumonisine sono risultati compresi fra 3,6 - 514,6 mg/kg per la fumosina B₁, 1,0 - 196,1 mg/kg per B₂ e 0,2 - 37,3 mg/kg per B₃. I risultati ottenuti confermano che la tecnica NIR è in grado di predire accuratamente la quantità delle fumonisine nella granella e nella farina di mais. Nella granella il valore di r² è risultato significativo per le tre fumonisine misurate e, in media, pari a 0,70. La miglior capacità di predizione del contenuto in fumonisine è stata ottenuta con un modello di calibrazione per le farine (r²=0,80, 0,78 e 0,71, rispettivamente per le fumonisine B₁, B₂ e B₃).

NASO ELETTRONICO COME *FIT-FOR PURPOSE* APPROACH APPLICATO ALLA DETERMINAZIONE DI AFLATOSSINE NEL MAIS

Federica Cheli, Giovanni Savoini, Anna Campagnoli, Vittorio Dell'Orto
VSA, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare, Università degli Studi, Milano

Le attuali tecnologie rendono disponibile una vasta scelta di metodiche applicabile alle analisi di aflatoSSine nei cereali. Un concetto che può guidare nella scelta e che stimola la continua ricerca e sviluppo di nuovi approcci analitici riguarda il fatto che la metodica dovrebbe essere *fit-for purpose* ovvero commisurata allo scopo. Questi aspetti rivestono particolare importanza quando vengano richieste metodiche non distruttive, semplice preparazione del campione e flessibilità. Tali necessità sono frequenti nelle realtà di campo, ad esempio nel controllo di *screening* delle materie prime. Ulteriore importanza di metodiche caratterizzate dalla possibilità di analizzare un elevato numero di campioni in tempi brevi ed a basso costo per singola determinazione risiede nella possibilità di ridurre l'effetto degli errori di campionamento, aspetto particolarmente importante nelle situazioni come quelle della presenza di micotossine nei cereali, che si manifesta frequentemente come contaminazione a *spot*.

Sulla scorta dell'esperienza del VSA, relativa alla determinazione di deossinivalenolo nel frumento, è stato valutato l'impiego del naso elettronico alla verifica della presenza di aflatoSSine nel mais. A tale scopo, un approccio preliminare è stato impostato impiegando una selezione di 15 campioni di mais (*Zea Mais*) nazionale naturalmente contaminati da aflatoSSine. Ciascun campione è stato suddiviso in aliquote e i derivanti subcampioni, chiusi ermeticamente in *vials* da 12 ml, sono stati sottoposti ad adsorbimento/desorbimento termici tramite arricchitore/desorbitore EDU2 (*Air sense Analytics GmbH*, Sherwin, Germania). Successivamente lo spazio di testa delle *vials* è stato inviato ai 10 sensori MOS (Semiconduttori ad Ossidi di Metallo) del naso elettronico adottando diversi schemi di impostazione analitica (tempi e temperature di adsorbimento/desorbimento e di analisi). I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi chemometrica utilizzando il software SAS (SAS, 2001).

Attraverso l'applicazione di modelli multivariati si è proceduto alla valutazione dei diversi protocolli adottati al fine di definire le impronte olfattive meglio caratterizzanti matrice e micotossina con l'intento di valutare la capacità discriminativa tra campioni positivi e negativi.

STABILITÀ DELLE AFLATOSSINE M₁ ED M₂ CON DERIVATIZZAZIONE MEDIANTE ACIDO TRIFLUORO-ACETICO (TFA). IMPLICAZIONI SULLE PERFORMANCES D'ANALISI IN HPLC-FL

Pier Paolo Danieli, Andrea Sabatini, Bruno Ronchi
Dipartimento di Produzioni Animali, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo

Le aflatossine (AFs) rappresentano una delle classi di micotossine a più alta pericolosità per la salute dell'uomo e degli animali. Chimicamente sono derivati di-idro e tetra-idro furanici dell'anello cumarinico e la loro sintesi si deve a ceppi tossigeni in particolare di miceti quali *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Nella specie bufalina, L'AFM₁ e l'AFM₂, forme idrossilate rispettivamente delle AFB₁ ed AFB₂, sono prodotte dalla detossificazione dell'animale e vengono escrete con il latte. Allo stato attuale la normativa europea prevede il limite soltanto per il contenuto nel latte di AFM₁. I limiti di rilevabilità strumentale conformi ai requisiti di legge sono raggiunti mediante analisi HPLC con rilevazione fluorimetrica. Le aflatossine del gruppo 1 tuttavia presentano una bassa risposta in fluorescenza rispetto a quelle del gruppo 2. Pertanto l'impiego del detector fluorimetrico per la rivelazione e la quantificazione di queste aflatossine ne richiede la modificazione in forme chimiche maggiormente fluorescenti. Nel presente contributo viene valutata la derivatizzazione pre-colonna con acido trifluoro-acetico (TFA), per la cui esecuzione non sono richiesti in laboratorio particolari dispositivi e implementazioni del sistema HPLC. È stata verificata la stabilità del derivatizzato dell'AFM₁ con TFA in presenza di AFM₂ ai fini dell'applicazione di questa procedura per l'analisi delle contaminazioni nel latte bufalino. Il metodo HPLC ottimizzato per l'analisi di campioni derivatizzati ha consentito l'eluizione delle due tossine adeguatamente risolte nell'arco di 7 min' ($t_{AFM1} = 2,35 \pm 0,10$ min', $t_{AFM2} = 5,18 \pm 0,13$ min'). In prove ripetute sulle due tossine in purezza è stata osservata una buona riproducibilità per oltre un'ora dalla derivatizzazione con i campioni mantenuti a 0°C (CV < 2,1%). Rispetto all'AFM₁ nativa, il derivatizzato (AFM_{1a}) ha presentato un tempo di ritenzione nettamente inferiore ed un segnale di intensità quasi doppia (194%). Il metodo sviluppato consente di essere utilizzato per l'analisi di campioni di latte di bufala in tempi ridotti e con limiti di rilevabilità e quantificazione per l'AFM₁ e l'AFM₂ relativamente bassi (LOD=0,001 µg/kg, LOQ 0,003 µg/kg).

DETERMINAZIONE DELLE FUMONISINE B₁, B₂ E B₃ IN PRODOTTI DIETETICI A BASE DI MAIS MEDIANTE LC/MS/MS

Chiara Dall'Asta, Gianni Galaverna, Stefano Sforza, Rosangela Marchelli
Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università degli Studi, Parma

Le fumonisine sono micotossine prodotte in campo sui cereali e soprattutto sul mais da *Fusarium verticillioides* e *F. proliferatum*.

Nonostante tali sostanze siano state definite dalla IARC possibili cancerogeni per l'uomo (gruppo 2B), le attuali linee guida ne consentono livelli abbastanza elevati negli alimenti, se paragonati a quelli definiti per micotossine di pari tossicità come l'ocratossina. In particolare, entro il 2007 entreranno in vigore i limiti stabiliti dall'Unione Europea per il livello di fumonisine totali. Tali limiti sono fissati a 400 µg/kg per i prodotti derivati dal mais destinati al consumo umano e a 200 µg/kg per gli alimenti destinati all'infanzia. Questi valori sono stati valutati sulla base del consumo medio previsto di mais, che nell'Unione Europea è generalmente contenuto. Purtroppo, però, le persone affette da patologie come il morbo celiaco o da intolleranze alle proteine del frumento sono spesso costrette ad un maggior consumo di prodotti a base di mais e, quindi, sono più esposti alle fumonisine. Per tale ragione, un controllo più severo degli alimenti dietetici dovrebbe essere auspicabile così come l'emanazione di una specifica legislazione.

Il presente studio riguarda uno screening preliminare effettuato tra novembre 2005 e marzo 2006 su oltre 50 prodotti a base di mais, destinati all'alimentazione di soggetti con particolari esigenze dietetiche, reperiti sul commercio nazionale. In particolare, lo screening è stato effettuato applicando un metodo LC/MS/MS recentemente sviluppato dal nostro gruppo che prevede un trattamento del campione semplificato: tale metodo coniuga un'elevata sensibilità (LOD: 10 ppb) alla possibilità di determinare simultaneamente le fumonisine B₁, B₂ e B₃ e i loro derivati idrolizzati.

Il metodo, inoltre, è stato applicato anche all'analisi di circa 30 prodotti a base di mais per alimentazione umana, ma prevalentemente destinati al consumo da parte di bambini.

In entrambi gli screening i dati raccolti mostrano come la contaminazione da fumonisine sia estremamente diffusa anche a livelli di molto superiori a quelli che verranno fissati per legge. Tali dati destano preoccupazione e ancora una volta mostrano la necessità di potenziare i metodi di prevenzione e controllo, soprattutto in relazione alle categorie di consumatori più a rischio.

DETERMINAZIONE DELL'AFLATOSSINA M₁ NEL LATTE: VALIDAZIONE DEL METODO E LIVELLI DI CONTAMINAZIONE IN CAMPIONI DELL'ITALIA DEL SUD

Pasquale Gallo, Antonio Salzillo, Carmela Rossini, Valeria Urbani, Luigi Serpe
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici, Napoli

L'aflatossina M₁ nel latte e nei prodotti lattiero-caseari rappresenta un serio problema per la sicurezza alimentare, e i laboratori preposti al controllo ufficiale devono utilizzare metodi di prova affidabili. Sia la validazione del metodo di analisi che la partecipazione a studi inter-laboratorio sono requisiti indispensabili per dimostrare un'adeguata competenza tecnica del laboratorio. In questo lavoro è descritto il procedimento di validazione di un metodo HPLC per la determinazione dell'aflatossina M₁ (AFM₁) nel latte di massa e nel latte trattato termicamente, sia mediante uno studio intra-laboratorio che la partecipazione a circuiti inter-laboratorio, come richiesto dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025. Inoltre, sono riportati i livelli di contaminazione da AFM₁ nel latte di massa e termicamente trattato proveniente dalle regioni Campania e Calabria nel periodo 2002-2005. Sono stati analizzati 552 campioni di latte bovino, bufalino ed ovi-caprino; la AFM₁ è risultata presente in 248 campioni (44,9%), ed in tutti i tipi di latte. Nella maggior parte dei campioni sono stati determinati livelli di AFM₁ inferiori al limite massimo di residuo (MRL); il latte bovino è risultato il più contaminato. Inoltre, per la prima volta sono descritti e discussi i dati di un monitoraggio circa la contaminazione nel latte di bufala. I campioni di latte non conformi sono stati solo 33 (6,0%); i livelli di contaminazione più elevati sono stati riscontrati nel 2003 e nel 2005.

RAPPORTO AFLATOSSINA M₁/M₂ COME INDICATORE DI EFFICIENZA PER L'ANALISI HPLC

Luca Sillari, Enzo Casarini, Alberto Zaniboni, Kalinka Grozeva
Controllo Qualità Newlat srl, Stabilimento Giglio, Reggio Emilia

Scopo di questa ricerca è valutare il rapporto aflatossina M₁/M₂ utilizzando i dati raccolti con analisi in HPLC.

Si vuole individuare un valore, se esiste, al di là del quale si evidenziano problemi di tipo strumentale.

Il rapporto M₁/M₂ viene calcolato come rapporto tra le aree dei picchi sul cromatogramma, e perciò non è legato ai valori delle due curve di calibrazione, che sono ricalibrate periodicamente ed indipendentemente.

Questo permette di apprezzare eventuali errori legati allo strumento o all'operatore (es. perdite di efficienza della colonna, errori manuali, malfunzionamenti) indipendenti dalla taratura.

La ricerca utilizza le analisi di routine condotte dall'autunno 2003 alla primavera del 2006 su campioni di latte crudo e pastorizzato.

Lo strumento ha subito nel corso di questo periodo la sostituzione della colonna e del fluorimetro; sono state utilizzate due tipi di colonnine ad immunospecificità (Vicam e Rhone) per l'estrazione delle micotossine dal latte.

Alla luce dei dati raccolti si possono fare alcune osservazioni, ed individuare alcuni valori di riferimento.

Calcolando il coefficiente di correlazione r (M₁/M₂) tra le due variabili M₁ ed M₂, si vede che assume valori sempre compresi tra 0 e +1; questo indica che le due micotossine sono legate da una relazione di tipo lineare crescente, cioè al crescere di una cresce anche l'altra secondo una relazione approssimabile a $y=ax+b$.

Inoltre il valore del coefficiente di correlazione pari a 0,75 si considera un limite: valori inferiori, si è visto, corrispondono ad una colonna vecchia con scarsa capacità di separazione. Non si evidenziano invece variazioni legate al tipo di strumento.

La media (M₁/M₂) è pari a 3,49 punti e la deviazione standard 1,24.

Il coefficiente di variazione del rapporto v (M₁/M₂) (espresso come rapporto fra la dev. standard e la media) è pari a 0,355; essendo questo valore compreso tra 0 e + 0,5, indica che la media è un indicatore corretto per descrivere la distribuzione.

Considerando il valore del rapporto M₁/M₂ nell'intervallo media (M₁/M₂) + 2 dev. standard, si vede che il 75% delle osservazioni cade in questo intervallo, che quindi si assume come *range* di valori accettabili per una buona analisi.

Tali risultati sono al momento indicativi trattandosi di un'indagine preliminare; tuttavia sono incoraggianti e tale metodo può rappresentare, dopo ulteriori verifiche, un pratico sussidio per individuare con un semplice calcolo problemi strumentali magari difficilmente evidenziabili.

DETERMINAZIONE DELL'AFLATOSSINA B₁ NEL MAIS: VALUTAZIONE DEI PUNTI CRITICI DELLA METODICA

Francesca Capolongo (a), Sandro Tenti (b), Elisa Lazzarotto (c), Rita Dal Prà (c), Gioia Bonato (c), Severino Segato (b), Stefania Balzan (a), Roberta Merlanti (a), Enrico Novelli (a), Emma Tealdo (c)

(a) Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Università degli Studi di Padova, Legnaro, Padova

(b) Dipartimento di Scienze Animali, Università degli Studi di Padova, Legnaro, Padova

(c) Veneto Agricoltura, Istituto per la Qualità e le Tecnologie Agro-alimentari, Tione, Vicenza

Obiettivo principale del presente studio è stato valutare l'effetto, sulle performance del metodo analitico per la quantificazione di aflatoossina B₁ in HPLC (ISO 16050, 2003), delle seguenti variabili: a) aliquota della presa campione (25 vs 50 g); b) composizione miscela binaria di solventi da utilizzare per la procedura di estrazione [metanolo-acqua (80:20) vs acetone-acqua (60:40)], c) procedure di purificazione proposte dalle due diverse ditte fornitrici di colonnine di immunoaffinità prese in considerazione. A tale scopo, dapprima sono stati analizzati due materiali di riferimento certificati FAPAS T0470 (11,8±5,2 µg/kg), CRM P64-A12 (15,3±5,6 µg/kg), rispettivamente, dei quali però sono state usate solo aliquote di 25 g; successivamente l'approccio completo, sopra riportato, è stato applicato a 3 campioni di mais con contenuto diverso di aflatoossina B₁ (< 0,5 - 30 µg/kg). I risultati ottenuti con 25 g di entrambi i materiali di riferimento non hanno evidenziato differenze statisticamente significative tra le colonnine di immunoaffinità impiegate. L'utilizzo della miscela estraente costituita da acetone: acqua ha evidenziato un recupero maggiore (circa 120%) rispetto a quello ottenuto con la miscela metanolo:acqua (circa 75%) con entrambi i materiali di riferimento. Tale differenza è risultata statisticamente significativa (p<0,01) ed è indipendente dalle procedure di purificazione. Questi risultati confermano quanto messo in evidenza nel 2004 da Möller e Nyberg, e cioè che il valore del recupero risente in maniera non trascurabile del tipo di miscela estraente, in particolare si evidenzia la maggior efficienza della miscela acetone:acqua che tuttavia non risulta essere quella impiegata più frequentemente nelle procedure di analisi della matrice mais. Inoltre è importante sottolineare che i valori dei recuperi medi ottenuti con la miscela metanolo:acqua sono in linea con i valori riportati in letteratura che si attestano attorno al 70%. I risultati ottenuti con i campioni reali oltre che confermare quanto evidenziato con i materiali di riferimento mostrano che la quantità della presa campione non comporta differenze significative sui recuperi permettendo, inoltre, l'utilizzo di quantità minori di solventi. Infine l'impiego delle due miscele estraenti su un campione di mais negativo non ha evidenziato differenze statisticamente significative, il che suggerisce che il metodo di estrazione con acetone è confrontabile con quello con metanolo in termini di specificità mentre è superiore in termini di efficienza.

INDICE DEGLI AUTORI

Abete M.C.; 69
Aiello G.; 73
Arioli F.; 7
Arletti E.; 42
Aureli G.; 55; 91
Babini V.; 56; 57
Bailoni L.; 32
Balconi C.; 58; 74
Balzan S.; 98
Barbano C.; 35
Barbini G.; 87
Baro C.; 74
Baruzzi F.; 88
Battilani P.; 28; 35; 59; 60; 61
Belocchi A.; 55
Berardo N.; 58; 92
Bergamini C.; 30; 50
Bertollo F.M.; 62
Bertone A.; 72
Bertuzzi T.; 11; 71; 81; 83; 90
Berzaghi P.; 51
Bibi R.; 80
Blandino M.; 26; 84
Bonato G.; 98
Boni R.; 17
Borsari A.; 9; 63; 65; 89
Bortolotti M.; 57
Brera C.; 10; 20; 40; 41
Budroni M.; 67
Calderone A.; 73
Camin G.; 92
Campagnoli A.; 44; 93
Canever A.; 9; 63; 65; 89
Cannoli R.; 75
Cantelli Forti G.; 13
Capitano R.; 92
Capolongo F.; 98
Casagranda M.; 56; 57
Casarini E.; 97
Castoria R.; 64
Cattaneo T.M.P.; 8; 47
Causin R.; 20; 32
Cenci T.; 80
Cheli F.; 44; 93
Cinquanta L.; 79
Cinti F.; 56; 89
Corticelli C.; 18
Costa E.; 20
Cravedi P.; 60
Crescio M.I.; 69
Criseo G.; 66
Crosta L.; 73
Cubaiu L.; 67
Curione A.; 73
D'Achille A.; 52
D'Addezio L.; 72
D'Alessandro A.; 45
D'Amico R.; 73
D'Egidio M.G.; 55; 91
Dal Prà R.; 98
Dall'Asta C.; 43; 48; 91; 95
Dalla Bella M.; 17
Dalla Mutta M.; 68
Danieli P.P.; 86; 94
De Curtis F.; 64
De Santis B.; 10; 40; 41
De Simone F.; 82
Debegnach F.; 10; 40; 41
Decastelli L.; 68
Del Pupo G.; 56; 57; 63
Dell'Orto V.; 44; 93
Della Porta G.; 18; 58
Di Criscio T.; 79
Di Giovanni M.; 50
Dionisio M.; 85
Dossena A.; 43
Dragoni E.; 62
Dragoni I.; 7
Fabbri A.A.; 29
Falchi A.; 56; 57; 63; 65
Fanelli C.; 29
Fanizzi F.P.; 88
Farris G.A.; 67
Fedrizzi G.; 34; 76

Ferracane R.; 46; 64
 Ferrarese M.; 58
 Ferrari A.; 58
 Ferro G.; 69
 Fioroni G.; 75
 Flamini L.; 70
 Forlani F.; 74
 Forte G.; 27
 Fortunati P.; 11; 71; 81
 Fracchiolla M.L.; 7
 Francolino S.; 77
 Fratianni A.; 79
 Fumagalli F.; 58
 Galasso M.; 62
 Galaverna G.; 43; 48; 91; 95
 Gallo L.; 82
 Gallo P.; 96
 Gambelli L.; 72
 Gangini F.; 17
 Garbini D.; 19
 Garcia Moruno E.; 78
 Gaspari F.; 56
 Gebbia N.; 73
 Giangiacomo R.; 8; 77
 Giorni P.; 59
 Giuffrida M.G.; 74
 Giugno G.; 85
 Gorreri M.; 34
 Gradassi L.; 62
 Gramaglia M.; 68
 Grandi S.; 56; 89
 Grippi F.; 73
 Grozeva K.; 97
 Gualla A.; 11; 81
 Iametti S.; 47
 Kuiper-Goodman T.; 12
 Lai J.; 68
 Lanzanova C.; 74
 Lattanzio V.; 80; 88
 Lazzarotto E.; 98
 Limosani P.; 78
 Lippolis V.; 45
 Lombardi T.; 92
 Loria A.; 69
 Luneia R.; 75
 Lupotto E.; 74
 Luppi M.; 51
 Maffioli G.; 31
 Magan N.; 59
 Maiorano A.; 31
 Maiuro L.; 64
 Mangia M.; 43
 Mannina L.; 64
 Marchelli R.; 43; 48; 91; 95
 Marchis D.; 69
 Marini A.; 75
 Marocco A.; 61; 92
 Masselli M.; 34; 76
 Massirio I.; 76
 Mastella C.; 32
 Mattioli Valle E.; 18
 Mazzini C.; 19
 Mazzoni E.; 60
 Menna V.; 50
 Menotta S.; 30; 34; 76
 Mergoni V.; 32
 Merlanti R.; 98
 Micheli L.; 49
 Migheli Q.; 67
 Minardi V.; 10; 41
 Miraglia M.; 4; 10; 40; 41
 Monaco L.; 52
 Monti L.; 47; 77
 Monti M.; 17
 Morea M.; 88
 Moretti A.; 25; 70
 Moscone D.; 49
 Moseriti A.; 48
 Motto M.; 58; 74
 Mule G.; 25
 Nachtmann C.; 68
 Nichilo A.; 44
 Nocera L.; 30; 34; 76
 Novelli E.; 98
 Oliveri F.; 73
 Orlandi T.; 63
 Orrù S.; 74
 Paggi U.; 52
 Palleschi G.; 49
 Panarelli E.V.; 47; 77
 Pancioni S.; 62
 Panfilì G.; 79

Pannunzi E.; 40; 41
 Panzarini G.; 33
 Pascale M.; 45
 Pecorelli I.; 80
 Pelli S.; 80
 Petrera F.; 65
 Pezzoli S.; 19
 Piccaglia R.; 57; 63
 Piermarini S.; 49
 Pietri A.; 11; 20; 28; 47; 59; 60; 61; 65;
 71; 81; 83; 90
 Pilo C.; 55
 Pisacane V.; 58
 Piva G.; 3; 35; 71; 83
 Pizzichini L.; 70
 Pizzolato G.; 32
 Pompa G.; 7
 Portillo S.; 17
 Prudente A.; 82
 Punelli F.; 29
 Quaranta F.; 55
 Racco C.; 66
 Ramponi C.; 31
 Ranieri R.; 45
 Rastelli L.; 82
 Rastelli M.; 68
 Rastelli S.; 71; 83; 90
 Reverberi M.; 29
 Reyneri A.; 20; 26; 31; 84
 Ricelli A.; 29; 88
 Ritieni A.; 25; 46; 64; 70
 Romagnoli B.; 50
 Romeo O.; 66
 Ronchi B.; 86; 94
 Rossini C.; 96
 Ruggirello A.; 85
 Sabatini A.; 86; 94
 Salzillo A.; 96
 Sandrini E.; 57
 Saponaro M.; 72
 Savino M.; 78
 Savoini G.; 44; 93
 Scaffardi E.; 69
 Scandolara A.; 60; 61
 Scudellari D.; 61
 Segato S.; 51; 98
 Serpe L.; 96
 Serraino A.; 9
 Sforza S.; 43; 48; 95
 Sidoti P.; 60
 Signor M.; 87
 Sillari L.; 97
 Silvestri M.; 45
 Silvestrini M.G.; 75
 Silvi Antonini B.; 18
 Snidaro M.; 87
 Sobolev A.; 64
 Solfrizzo M.; 33; 80; 88
 Somma M.C.; 46
 Sonaglia L.; 80
 Spina A.M.; 64
 Stoduto L.; 79
 Susca A.; 25
 Talevi S.; 70
 Tamba M.; 30
 Tarozzi S.; 19
 Taus L.; 76
 Tealdo E.; 98
 Tenti S.; 51; 98
 Torricella C.; 63; 89
 Toscano A.M.; 52
 Trevisani M.; 9
 Ungari D.; 34
 Urbani V.; 96
 Vallone L.; 7
 Vanara F.; 20; 26; 84
 Vecchietini M.; 89
 Veneziano A.; 82
 Verderio A.; 18; 58
 Vicinelli L.; 30
 Visconti A.; 33; 39; 45
 Vivanti V.; 72
 Zanetti M.; 81; 83; 90
 Zangelmi D.; 75
 Zaniboni A.; 97
 Zarenghi L.; 34
 Zjalic S.; 29
 Zucchelli M.; 19

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
a stampa o online deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

Roma, settembre 2006 (n.3) 4° Suppl.