

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

2° Congresso nazionale

**Le micotossine
nella filiera agro-alimentare**

**Istituto Superiore di Sanità
Roma, 16-18 ottobre 2006**

Atti a cura di
Marina Miraglia e Carlo Brera

Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e i Rischi Alimentari

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

07/37

Istituto Superiore di Sanità

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

Atti a cura di Marina Miraglia e Carlo Brera

2007, vii, 292 p. Rapporti ISTISAN 07/37

Il Congresso si propone di focalizzare i principali aspetti dell'analisi del rischio in Italia relativamente alla contaminazione da micotossine in Italia, sulla base di un principio di osmosi fra la valutazione e la gestione del rischio lungo tutta la filiera alimentare. L'iniziativa si rivolge pertanto a tutti gli operatori del sistema alimentare e mangimistico, invitandoli a portare il loro 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 e internazionale.

Parole chiave: Micotossine, Analisi del rischio, Alimenti

Istituto Superiore di Sanità

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

Proceedings edited by Marina Miraglia and Carlo Brera

2007, vii, 292 p. Rapporti ISTISAN 07/37 (in Italian)

The Conference is aimed at focusing on the main aspects of risk analysis in Italy relating to mycotoxin contamination, on the basis of the osmosis between the risk assessment and management throughout the food chain. Therefore, this initiative is addressed to all the stakeholders of the food and feed chain, and their contributions in the scientific, operating and managerial experiences that will create a scenario that is a complete representation of the mycotoxins problems 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 Valentina Minardi e Viviana Renzi per il lavoro svolto nell'organizzazione del Congresso.

Si ringrazia Viviana Renzi per la sua preziosa collaborazione nella revisione del presente volume.

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

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

Citare questo documento come segue:

Miraglia M, Brera C (Ed.). 2° Congresso nazionale. *Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 16-18 ottobre 2006.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/37).

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, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2007

INDICE

Premessa	v
----------------	---

RELAZIONE DI APERTURA

Criteria innovativi per la generazione di nuovi dati sulle micotossine <i>Marina Miraglia, Carlo Brera, Marzia De Giacomo, Emanuela Gregori</i>	3
---	---

PRIMA SESSIONE – I parte

Valutazione dell’impatto delle micotossine sulla salute dell’uomo e degli animali

Presenza di ocratossina A e tricoteceni in alimenti destinati ai bambini in età prescolare e scolare <i>Maria Letizia Fracchiolla, Francesco Arioli, Lisa Vallone, Ivan Dragoni, Giuseppe Pompa</i>	13
Valutazione della esposizione del consumatore alle micotossine: approccio deterministico e probabilistico <i>Carlo Brera, Valentina Minardi, Francesca Debegnach, Barbara De Santis, Marina Miraglia</i>	19
Effetti tossici e meccanismi di azione delle micotossine <i>Giorgio Cantelli Forti</i>	26

PRIMA SESSIONE – II parte

Esperienze del settore della produzione e della trasformazione

L’esperienza di Conserve Italia sul problema micotossine: prevenzione, monitoraggio e gestione <i>Renzo Boni, Mirka Dalla Bella, Monica Monti, Sonia Portillo</i>	33
Indagine pluriennale sulla diffusione delle micotossine nelle partite commerciali di mais <i>Giovanni Della Porta, Carla Corticelli, Elena Mattioli Valle, Barbara Silvi Antonimi, Alberto Verderio</i>	39
Prevenzione ocratossina A nel caffè Coop: procedure di campionamento Co.Ind in fase di pre-acquisto della materia prima <i>Claudio Mazzini, Davide Garbini, Susanna Tarozzi, Silvia Pezzoli, Marco Zucchelli</i>	45
Campionamento dei molini a mais italiani per la ricerca delle fumonisine nei prodotti della trasformazione industriale <i>Gruppo di Lavoro Micotossine: Amedeo Reyneri, Amedeo Pietri, Roberto Causin, Carlo Brera, Francesca Vanara, Enrico Costa</i>	51

SECONDA SESSIONE

Impatto delle micotossine sulla filiera agro-alimentare e mangimistica

Valutazione dell'efficacia di un prodotto sequestrante le micotossine (Atox®) utilizzato nell'alimentazione di bovine da latte <i>Alessandra Canever, Francesca Petrera, Andrea Borsari, Alice Falchi, Amedeo Pietri</i>	59
Ruolo del Ministero della Salute nella gestione del rischio da micotossine in alimenti e mangimi <i>Silvio Borrello</i>	64
Percorsi produttivi per il controllo della contaminazione da <i>Fusarium</i>-tossine <i>Amedeo Reyneri, Massimo Blandino, Francesca Vanara</i>	67
Aspetti sanzionatori e responsabilità degli operatori a seguito di non conformità <i>Gaetano Forte</i>	73
Impiego di dati meteorologici per la previsione del rischio di contaminazione con aflatoossina B₁ della granella di mais <i>Paola Battilani, Carlo Barbano, Gianfranco Piva</i>	77

TERZA SESSIONE

Metodologie innovative utilizzate nel settore diagnostico

Indagine sulla presenza di tossine T-2 e HT-2 in campioni di cereali e loro derivati provenienti dal Nord Italia <i>Roberto Causin, Carla Mastella, Valentina Mergoni, Gianfranco Pizzolato, Lucia Bailoni</i>	85
Sistema regionale di sorveglianza per la presenza di micotossine in alimenti e mangimi in Emilia Romagna <i>Cecilia Bergamini, Simonetta Menotta, Lucia Nocera, Marco Tamba, Laura Vicinelli</i>	94
Studio della popolazione fungina di <i>Aspergillus</i> sezione <i>Flavi</i> isolata su mais in Italia <i>Paola Giorni, Amedeo Pietri, Naresh Magan, Paola Battilani</i>	101
Valutazione agronomica dell'esposizione al rischio di accumulo di fumonisine nella granella di mais <i>Andrea Maiorano, Guido Maffioli, Cesare Ramponi, Amedeo Reyneri</i>	108
Valutazione della riduzione di ocratossina A dai vini rossi mediante utilizzo di coadiuvanti tecnologici <i>Gianfranco Panfili, Alessandra Fratianni, Luciano Cinquanta, Tiziana Di Criscio, Lucia Stoduto</i>	115
Monitoraggio, sperimentazione e disciplinare di produzione per un mais di qualità in Friuli-Venezia Giulia <i>Mariolino Snidaro, Giorgio Barbini, Marco Signor</i>	119
Contaminazione da ocratossina A e tricoteceni di prodotti a base di frumento <i>Silvia Rastelli, Terenzio Bertuzzi, Marco Zanetti, Amedeo Pietri</i>	126

Contaminazione da moniliformina nel mais prodotto in Nord Italia nel 2005 <i>Amedeo Pietri, Marco Zanetti, Silvia Rastelli, Terenzio Bertuzzi</i>	130
Indagine sulla presenza di aflatossina M₁ in latti, formaggi molli e yogurt prodotti nel periodo novembre 2003-aprile 2004 <i>Amedeo Pietri, Paola Fortunati, Maurizio Moschini, Silvia Rastelli, Terenzio Bertuzzi</i>	135
Indagine sulla presenza di aflatossine e ocratossina A in prodotti a base di liquirizia <i>Terenzio Bertuzzi, Alessia Gualla, Paola Fortunati, Amedeo Pietri</i>	139
Indagine sulla contaminazione da aflatossine e fumonisina B₁ in farine per polenta <i>Amedeo Pietri, Terenzio Bertuzzi, Paola Fortunati, Marco Zanetti, Alessia Gualla</i>	143
Nuovi dati sul decremento di patulina causato da un lievito di biocontrollo in mele infettate da <i>Penicillium expansum</i> <i>Raffaello Castoria, Luisa Mannina, Maiuro Lucia, Sobolev Anatoli, Alberto Ritieni, Rosalia Ferracane, Spina A.</i>	147
Un triennio di indagini sulla presenza di aflatossine nei mangimi <i>Franco Cinti, Carmine Torricella, Silvia Grandi, Mauro Vecchietini, Alessandra Canever, Andrea Borsari</i>	152
Indagine sulla presenza allo stoccaggio di micotossine in granella di mais ottenuta con diverse modalità di coltivazione <i>Roberta Piccaglia, Marco Bortolotti, Elia Sandrini, Viviana Babini, Mirco Casagranti, Giovanna Del Pupo, Silvia Felloni</i>	157
Effetto del trattamento antipiralide per il contenimento delle micotossine nella granella <i>Franco Cinti, Silvia Grandi, Fiorindo Gaspari, Viviana Babini, Mirco Casagranti, Giovanna Del Pupo, Silvia Felloni</i>	160
Miceti produttori di ocratossina A in campioni di uve destinate alla vinificazione <i>Cosimo Racco, Orazio Romeo, Giuseppe Criseo</i>	165
Valutazione di genotipi di mais per resistenza ad <i>Aspergillus flavus</i> <i>Carlotta Balconi, Nicola Berardo, Vincenza Pisacane, Matteo Ferrarese, Alda Ferrari, Francesca Fumagalli, Giovanni Della Porta, Alberto Verderio, Mario Motto</i>	172
Studio della filiera di produzione dal mangime al prodotto finito in un'azienda agricola con annesso laboratorio di caseificazione <i>Faustina Marcella Bertollo, Emiliano Dragoni, Matteo Galasso, Luca Gradassi, Serena Pancioni</i>	177
Screening del deossinivalenolo su frumento duro in coltura biologica <i>Gabriella Aureli, Maria Grazia D'Egidio, Fabrizio Quaranta, Andreina Belocchi, Cristina Pilo</i>	180
Ricadute della legislazione comunitaria sulle problematiche legate alla fase diagnostica nella determinazione delle micotossine <i>Carlo Brera, Barbara De Santis</i>	185

Messa a punto di un metodo in HPLC per la determinazione dell'aflatossina B₁ in campioni di mais e mangime <i>Carlo Brera, Francesca Debegnach, Valentina Minardi, Elena Pannunzi, Barbara De Santis, Marina Miraglia</i>	195
Studio preliminare sulla stabilità delle fumonisine in estratti di mais e frumento <i>Chiara Dall'Asta, Gianni Galaverna, Rosangela Marchelli, Gabriella Aureli, Maria Grazia D'Egidio</i>	201
Impiego di naso elettronico abbinato a modelli chemometrici per la determinazione della contaminazione da deossinivalenolo in <i>Triticum durum</i> <i>Vittorio Dell'Orto, Giovanni Savoini, Alessandro Nichilo, Anna Campagnoli, Federica Cheli</i>	207
Estrazione e determinazione simultanea di dieci <i>Fusarium</i>-tossine nei cereali: un nuovo approccio sperimentale mediante LC/MS/MS <i>Maria Carmela Somma, Rosalia Ferracane, Alberto Ritieni</i>	213
Studio di parametri che possono influire sulla performance di metodi immunochimici per il dosaggio di AFM₁ in matrici casearie <i>Tiziana M.P. Cattaneo, Elena V. Panarelli, Stefania Iametti, Amedeo Pietri, Lucia Monti</i>	218
Determinazione di patulina in cromatografia liquida/spettrometria di massa tandem in baby food, succhi e puree di frutta <i>Cecilia Bergamini, Manuela Di Giovanni, Barbara Romagnoli, Veronica Menna</i>	224
Determinazione dell'aflatossina M₁ nel latte: validazione del metodo e livelli di contaminazione in campioni dell'Italia del Sud <i>Pasquale Gallo, Antonio Salzillo, Carmela Rossini, Valeria Urbani, Luigi Serpe</i>	230
Determinazione delle micotossine: risultati dei proficiency test organizzati a livello nazionale dall'Associazione Italiana Allevatori <i>Laura Monaco, Anna M. Toscano, Alessia D'Achille, Ugo Paggi</i>	236
Rapporto aflatossina M₁/M₂ come indicatore di efficienza dell'analisi HPLC <i>Luca Sillari, Enzo Casarini, Alberto Zaniboni, Kalinka Grozeva</i>	243
Valutazione del contenuto di ocratossina A in campioni di vino siciliano <i>Crosta Lucia, Grippi Francesca, Curione Alice, Calderone Alessio, D'Amico Roberta, Aiello Gioacchino, Oliveri Francesca, Gebbia Nicola</i>	249
Naso elettronico come fit for purpose approach applicato alla determinazione di aflatossine nel mais <i>Federica Cheli, Giovanni Savoini, Anna Campagnoli, Vittorio Dell'Orto</i>	253
Spettroscopia NIR per la misura del contenuto in fumonisine nelle cariossidi e nelle farine di mais: estensione e conferme <i>Nicola Berardo, Gilles Camin, Raffaele Capitanio, Tommaso Lombardi, Adriano Marocco</i>	257
Stabilità delle aflatossine M₁ ed M₂ con derivatizzazione mediante acido trifluoro-acetico. Implicazioni sulla performance d'analisi in HPLC-FL <i>Pier Paolo Danieli, Andrea Sabatini, Bruno Ronchi</i>	261
Contaminazione da ocratossina A: il ruolo del vino <i>Loretta Gambelli, Aldo Bertone, Laura D'Addezio, Vittorio Vivanti, Michele Saponaro</i>	265

Aflatossine nel latte e nei mangimi: monitoraggio nelle regioni Piemonte e Valle d'Aosta nel triennio 2004-2006 <i>Jeanne Lai, Carlo Nachtmann, Monica Gramaglia, Monica Dalla Mutta, Marina Rastelli, Lucia Decastelli</i>	270
Metodo rapido per la determinazione di deossinivalenolo in frumento e derivati basato sulla polarizzazione di fluorescenza <i>Vincenzo Lippolis, Michelangelo Pascale, Roberto Ranieri, Marco Silvestri, Alessandro D'Alessandro, Angelo Visconti</i>	274
Ricadute della contaminazione da micotossine sul settore della trasformazione <i>Tullio Pandolfi</i>	279
Analisi del rapporto ematico sfinganina/sfingosina in bovini da carne esposti a fumonisine per via alimentare: note metodologiche e risultati preliminari di un caso studio <i>Andrea Sabatini, Pier Paolo Danieli, Bruno Ronchi</i>	282
Influenza dello stoccaggio dell'uva prima della vinificazione sulla contaminazione di ocratossina A <i>Michele Savino, Patrizio Limosani, Emilia Garcia Moruno</i>	288

PREMESSA

L'iniziativa di organizzare periodicamente un Congresso Nazionale sulle micotossine nella filiera agro-alimentare è nata con la prima edizione, avvenuta nel 2004, con l'intento di fornire un costante appuntamento in grado di apportare i necessari aggiornamenti ai molteplici aspetti che caratterizzano questa tipologia di contaminanti.

Ci eravamo ripromessi di mantenere questo impegno proprio per fornire un valido contributo conoscitivo sulle più recenti acquisizioni scientifiche e sulle innovazioni tecnologico-produttive, anche alla luce dei nuovi pacchetti normativi che in questi anni sono stati emanati sia a livello comunitario che nazionale.

È pertanto con particolare entusiasmo che possiamo testimoniare che anche nella seconda edizione si è registrata una nutrita e qualificata partecipazione sia delle più autorevoli Autorità governative sia dei gruppi di ricerca che svolgono meritoriamente a livello nazionale sia attività di controllo che di ricerca nel settore delle micotossine. Nell'ambito del Congresso sono stati trattati molteplici aspetti legati alla valutazione, alla gestione e alla comunicazione del rischio, così come quelli legati ai nuovi orientamenti diagnostici, alla valutazione degli impatti etici ed economici legati alla globalizzazione dei mercati, e ancora a quelli direttamente collegati con la salute del consumatore. Ci auguriamo che il contributo scientifico apportato dalla manifestazione sul tema delle micotossine sia in grado di contribuire a soddisfare le esigenze attualmente molto incalzanti del legislatore, del valutatore del rischio e di tutti gli stakeholders della filiera alimentare.

È inoltre nostro auspicio continuare a rappresentare nel futuro un punto di incontro sia per sollecitare lo scambio di esperienze tra ricercatori, sia per sostenere e incoraggiare la diffusione dei dati e delle informazioni acquisite, sia infine per rafforzare il concetto legato alla necessità di non disperdere le risorse umane operanti nel nostro Paese, ma anzi di riscoprire l'importanza di elementi aggreganti anche nell'ottica dello sviluppo di programmi di ricerca in sede comunitaria. A tutto ciò, inoltre, deve essere ricordata la fondamentale importanza legata alla tutela, possibilmente in modo più costruttivo ed efficace, delle produzioni italiane interessate in vario modo e grado al problema delle micotossine, come nel caso delle filiere cerealicole, lattiero-casearie, vitivinicole e mangimistiche.

Nel formularvi, pertanto, un sincero ringraziamento per l'interesse che avete dimostrato nel partecipare ai lavori del Congresso in modo estremamente qualificato e collaborativo, formuliamo a tutti voi un sincero augurio di buon lavoro, invitandovi fin d'ora alla terza edizione che si terrà nel 2008.

Nella presente pubblicazione è contenuta la maggior parte delle presentazioni tenute nel corso del Congresso.

Relazione di apertura

CRITERI INNOVATIVI PER LA GENERAZIONE DI NUOVI DATI SULLE MICOTOSSINE

Marina Miraglia, Carlo Brera, Marzia De Giacomo, Emanuela Gregori
Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità,
Roma

Introduzione

La conoscenza scientifica, a differenza di altre forme di conoscenza, consiste di asserzioni “vere” perché dimostrate attraverso una serie di deduzioni logiche a partire da osservazioni empiriche espresse come dati sperimentali; pertanto il dato rappresenta la base della conoscenza scientifica e solo un dato di buona qualità potrà portare a conclusioni affidabili in qualunque disciplina scientifica.

Nella scienza degli alimenti la disponibilità di dati di concentrazione affidabili per le varie categorie di analiti presenti nelle matrici alimentari rappresenta la base per qualunque valutazione di carattere sanitario, nutrizionale, legale e commerciale.

Il grado di affidabilità del dato dovrebbe tuttavia essere valutato analizzando il dato unitamente al suo metadato, cioè alla serie di informazioni accessorie che consentano di definire il limite del dato stesso, nel momento in cui tale dato venga utilizzato. Le tre componenti principali del metadato nella scienza degli alimenti, analogamente ad altre forme di scienza sono la genealogia (fonte, produttore, processo di acquisizione e motivo del dato), usabilità (uso applicativo del dato) e parametri di qualità (accuratezza, precisione).

Le considerazioni precedenti risultano quanto mai valide per i dati di concentrazione di micotossine, a causa di alcune importanti specificità di questo tipo di contaminazione; conseguentemente anche i dati attualmente disponibili e utilizzati necessiterebbero di una attenta analisi sia della effettiva disponibilità dei loro metadati, sia della loro compatibilità con lo scopo che sottende la generazione del dato, prima di poter trarre dal dato stesso valutazioni attendibili. Per contro, nella generazione di nuovi dati è necessaria una pianificazione preliminare alla generazione del dato stesso, in modo che i metadati soddisfino i requisiti necessari per una sua corretta utilizzazione.

Da quanto sopra descritto deriva la necessità che il dato di concentrazione sulle micotossine soddisfi ai requisiti di *fit for purpose* e di quello di “qualità integrata”, intendendo con questo ultimo concetto la necessità che tutti gli stadi che portano alla generazione del dato posseggano parametri di qualità fra loro comparabili.

Questo lavoro intende delineare i criteri su cui si dovrebbe basare l’affidabilità dei dati di concentrazione disponibili sulle micotossine e la generazione di nuovi dati su questa tipologia di contaminanti.

Necessità del dato *fit for purpose*

Analogamente ad altre categorie di contaminanti la necessità di dati *fit for purpose* sulle micotossine scaturisce dalle esigenze specifiche dei vari momenti che costituiscono l’analisi del rischio. Attualmente il concetto “ciclico” dell’analisi del rischio, sviluppato dal progetto

SAFEFOOD (<http://www.safefoods.nl/>) e in corso di presentazione all'EFSA (*European Food Safety Authority*), prevede lo sviluppo di una forte ciclicità di verifiche e di interazioni tra valutazione e gestione del rischio e una forte interattività globale con la comunicazione del rischio (Figura 1).



Figura 1. Ciclo del rischio (<http://www.safefoods.nl/>)

Ciascuna delle fasi citate si avvale per le sue valutazioni di dati di concentrazione; tuttavia l'affidabilità di tali valutazioni si dovrebbe basare su dati di concentrazione programmati e ottenuti secondo criteri differenziati e solo in alcuni casi i dati elaborati ad uno scopo possono essere correttamente applicati all'altro.

Pertanto nella generazione di nuovi dati questi dovrebbero essere ottenuti tenendo sempre presente l'obiettivo finale: è infatti tale obiettivo che detta i criteri da applicare nelle varie fasi della "filiera analitica integrata". Con tale termine si deve intendere l'insieme integrato delle seguenti 4 fasi:

- i) idonea scelta delle tipologie di campioni da prelevare per l'analisi (quali, dove, quando e perché prelevare i campioni);
- ii) prelievo del campione per l'analisi e sua preparazione ad hoc (campione rappresentativo della massa);
- iii) analisi tramite metodiche analitiche appropriate (idoneità del limite di rivelazione);
- iv) elaborazione dei dati.

Questa monografia non tratterà in dettaglio la qualità della fase di campionamento e quella dell'analisi che verranno discusse in dettaglio in altra parte di questo libro. Verrà data invece particolare enfasi ai criteri che dovrebbero informare l'effettuazione delle fasi i) e iv).

Concetto di "qualità integrata"

Al concetto del dato *fit for purpose* si affianca, complementandosi, quello di qualità integrata. La qualità integrata di un dato analitico implica la comparabilità della qualità dei singoli stadi che portano alla produzione del dato analitico finale e alla sua elaborazione.

Questo concetto, pur nella sua semplicità non è affatto scontato. L'analisi dei dati analitici disponibili sulle micotossine dimostra che le quattro fasi indicate nel paragrafo precedente non sono state finora effettuate e sviluppate con la medesima accuratezza, e la fase effettuata con un approccio più scientifico rispetto alle altre è sicuramente la fase analitica per la quale esistono una gran quantità di studi, metodologie standardizzate e precise indicazioni dei parametri necessari per l'assicurazione di qualità del dato stesso. Negli ultimi anni anche l'importanza della fase ii) relativa al campionamento ha ricevuto notevole attenzione, ma, nonostante siano state fornite indicazioni precise sulle modalità di campionamento, sia lo stato delle conoscenze che le difficoltà oggettive nell'ottenimento di un campione altamente rappresentativo hanno portato e tutt'ora portano ad un campionamento con caratteristiche di precisione e accuratezza inferiori a quelle che si ottengono nell'analisi.

La qualità della fase i) relativa alla scelta dei campioni da prelevare è finora stata ed è invece piuttosto scarsa, e i criteri statistici e le metodologie sono ancora tutti da definire.

Lo step iv) relativo alla elaborazione dei dati sta ricevendo una crescente attenzione tramite lo sviluppo di metodologie per la elaborazione probabilistica dei dati.

Puzzle dell'analisi del rischio per le micotossine

L'integrazione e la ciclicità della valutazione, gestione e comunicazione del rischio secondo il nuovo concetto di "ciclo del rischio", si sovrappone, ma non modifica le peculiarità e le specificità dei tre distinti momenti. Come detto ciascuno di questi momenti necessita di dati analitici ad hoc. Vengono di seguito estrinsecati i requisiti specifici di dato di concentrazione *fit for purpose* e di qualità integrata del dato stesso per i singoli elementi dell'analisi del rischio, con particolare riferimento alla valutazione e alla gestione del rischio.

Lo scopo ultimo della valutazione del rischio attribuibile alle micotossine è quello di dare una stima dell'impatto sulla salute del consumatore da parte di questa categoria di contaminanti al fine di fornire elementi scientifici per le successive azioni di gestione del rischio. Il dato di concentrazione contribuisce alla valutazione del rischio stimando l'entità della presenza di micotossine negli alimenti consumati dalla popolazione al fine di misurare l'entità dell'esposizione.

Per questo scopo è basilare che la scelta delle tipologie e del numero di prodotti da campionare per la successiva analisi posseda affidabilità paragonabile a quella con cui si esegue il campionamento dal lotto e la successiva analisi. I dati di concentrazione vanno successivamente interfacciati con i dati di consumo alimentare per valutare l'esposizione del consumatore o di gruppi di consumatori. Nel caso debba essere perseguita questa ultime finalità i dati di concentrazione dovranno essere rappresentativi degli alimenti consumati da quel gruppo di consumatori.

Una successiva specificità dei dati di concentrazione può aversi relativamente all'area geografica in esame: potranno essere effettuate valutazioni dell'esposizione a carattere regionale, nazionale o internazionale ciascuna delle quali necessiterà di dati di concentrazione riferiti agli alimenti commercializzati e/o maggiormente consumati nell'area geografica in esame. Viceversa dati di concentrazione ottenuti in un'area geografica ristretta non possono essere utilizzati per conclusioni su aree geografiche più generalizzate.

Un ulteriore criterio di *fit for purpose* per i dati di concentrazione è relativo alla metodologia che verrà successivamente impiegata per la valutazione dell'esposizione e precisamente:

- i) l'approccio che moltiplica il dato di concentrazione per quello relativo ai consumi alimentari. Uno dei requisiti prioritari è che i due sets di dati siano fra loro interfacciabili; tale condizione al momento attuale non sussiste in quanto le banche dati per i consumi

alimentari sono aspecifiche, mentre la contaminazione da micotossine è piuttosto settorializzata e richiederebbe specifici dati di consumi alimentari. Inoltre un buon dato di concentrazione, per essere correttamente impiegato nella valutazione dell'esposizione tramite questo approccio, dovrebbe essere relativo al prodotto pronto per il consumo, e non al prodotto da sottoporre a trattamenti successivi, che potrebbero far variare la concentrazione della tossina nella matrice. L'utilizzo di dati su materie prime o su intermedi necessita di fattori di conversione spesso non noti o poco affidabili o troppo generalizzati per le varie realtà industriali. Pertanto laddove questi dati sono stati utilizzati per la valutazione dell'esposizione sono necessariamente stati introdotti degli errori difficilmente quantificabili, ma sicuramente non trascurabili. Un ulteriore punto critico di questo approccio è che per micotossine quali l'ocratossina A, presenti in un largo spettro di matrici alimentari, è indispensabile disporre di dati per tutte le matrici alimentari passibili di contaminazione, e questa condizione non viene sempre rispettata.

Una larga parte dei requisiti per la qualità dei dati di concentrazione illustrati in questo paragrafo non sono stati rispettati nelle meritevoli, ma ormai datate, valutazioni dell'esposizione eseguite nell'ambito delle SCOOP (*Scientific Cooperation*) organizzate dall'UE (Scoop Task 3.2.7 2002, Scoop Task 3.2.8 2002, Scoop Task 3.2.10 2003).

- ii) la metodologia della dieta totale che costruisce diete tipo della popolazione o di gruppi di popolazione in esame. Sulla base dei dati di consumi alimentari, si ricava una lista di prodotti destinati al consumo diretto, che consente il prelievo di campioni statisticamente rappresentativi di quei prodotti, nell'area di interesse e direttamente dal commercio. Dalla massa riunita dei campioni della stessa tipologia si prelevano le porzioni che costituiscono i componenti delle diete tipo. Prima dell'analisi i prodotti che costituiscono le diete possono essere o meno preparati secondo le procedure di cottura domestica. Questa metodologia è considerata quella d'elezione per il dato di concentrazione *fit for purpose* per la valutazione dell'esposizione, ma non è esente da punti critici legati alla scelta dei prodotti da campionare; a tale proposito la scelta dei campioni da prelevare dovrà i) essere statisticamente rappresentativa delle quote di mercato per quella categoria di prodotto e rappresentativa del lotto individuato; ii) tener conto delle principali differenze regionali. Inoltre i dati di consumi dovranno essere in linea con lo studio di dieta totale che si vuole eseguire. Inoltre, pur nella sua affidabilità, questo approccio presenta l'inconveniente dell'"effetto diluizione" che si può verificare nell'analisi di una massa totale di tipologie di prodotti omogenei di diverse provenienze; tale effetto rischia di mimetizzare contaminazioni presenti solo in alcuni prodotti. Le valutazioni attualmente disponibili per le micotossine attraverso la metodologia della dieta totale sono quelle effettuate in Francia (The 1st French Total Diet Study, INRA 2004), Italia (Brera et al 2005).
- iii) La metodologia della dieta duplicata si basa sulla selezione di unità di popolazione dalle quali prelevare porzioni dei pasti consumati e sull'analisi delle micotossine presenti in tali porzioni. I punti critici in questa metodologia sono i) l'esiguità del numero di unità di popolazione che è solitamente possibile prendere in esame; ii) la reale rappresentatività del gruppo di individui preso in esame rispetto al gruppo di popolazione di cui si vuole valutare l'esposizione iii) la credibilità della collaborazione dei singoli individui che devono fornire informazioni precise su quantità e tipologie di alimenti consumati.

Le metodologie descritte si basano tutte su un approccio deterministico che moltiplica il la media dei dati di concentrazione per quello dei consumi alimentari. Attualmente l'orientamento per la valutazione dell'esposizione così come per l'intera valutazione del rischio è quello di elaborare statisticamente il complesso dei dati di concentrazione tramite modelli probabilistici.

Questo comporta differenze sostanziali per quanto riguarda le valutazioni secondo l'approccio di cui al punto i) a causa dell'elevato numero di dati di concentrazione di solito necessari secondo questo approccio. L'approccio di dieta totale e quello della dieta duplicata per sua natura non si prestano alla elaborazione probabilistica dei risultati in quanto i dati di concentrazione sono in numero molto più esiguo.

Dati di concentrazione nella gestione del rischio per le micotossine

Contrariamente a quanto si verifica per la valutazione del rischio, la gestione del rischio per le micotossine necessita di dati di concentrazione di natura estremamente diversificata fra loro, e ciò in conseguenza della polifunzionalità della gestione del rischio stessa. La necessità di acquisire dati sulle micotossine da parte del settore governativo e di quello produttivo si basa su presupposti diversi e diverse dovranno essere le metodologie per ottenere dati con un buon livello di qualità integrata.

Le Autorità competenti necessitano sia di dati di *survey* che di monitoraggio. Molto spesso questi due termini vengono ritenuti sovrapponibili, ma nella accezione anglosassone per *survey* spesso si intende la produzione di dati "mirati" per la successiva focalizzazione delle azioni di gestione del rischio. Si tratta di una indagine con carattere di specificità (es. ocratossina nei cereali o nel cacao o nella liquirizia, micotossine negli alimenti per l'infanzia) che servono ad individuare l'esistenza o meno del problema nel Paese. Lo scopo della *survey* è quello di valutare l'efficacia delle azioni preventive eventualmente intraprese, gli andamenti in termini di tipologia di prodotti contaminati e di individuare rischi emergenti o riemergenti. Il monitoraggio è l'insieme di dati ottenuti nell'ambito del controllo ufficiale al fine di vigilare sulla salute del consumatore tramite la verifica della implementazione delle normative. Dalla qualità dei dati per le due tipologie di attività dipende la corretta individuazione e l'efficacia delle azioni correttive della gestione del rischio. I dati delle *survey* dovranno pertanto riferirsi a campioni sia di produzione nazionale che estera, in numero proporzionale alle esigenze della *survey* e distribuite con criteri statistici tra le varie tipologie di prodotti, a seconda della tipologia di *survey*. Il monitoraggio dovrà invece derivare da campioni prelevati con criteri generali di proporzionalità con il rischio da micotossine negli specifici prodotti e con i volumi di produzione e di importazione. Dovrebbero inoltre essere osservati criteri specifici di selezione dei campioni, da scegliere di caso in caso, ivi inclusa, la stagionalità, l'andamento del clima, i cambiamenti di tendenze alimentari, il numero dei campioni grezzi rispetto ai prodotti finiti, ecc.

Inoltre una caratteristica specifica dei dati di monitoraggio risiede nella armonizzazione dei criteri di selezione dei lotti da campionare nelle diverse realtà regionali.

Per potere statisticamente rispettare i criteri di selezione dei campioni da prelevare è comunque necessario basarsi su dati di volumi di produzione agricola e di importazione, sulla tipologia e numero di industrie di trasformazione, di distribuzione geografica della produzione primaria e secondaria e di effetti dell'influenza dei processi tecnologici.

Ben diversa è la necessità di dati per l'autocontrollo da parte del settore produttivo. Anche in questo caso è valido l'approccio *fit for purpose* nella selezione dei siti, delle frequenze e dei momenti in cui ottenere i dati concentrazione.

I principi di HACCP (*Hazard Analysis Critical Control Point*) enunciati dalla direttiva 43/93/CEE (recepita in Italia con il DL.vo 26 maggio 1997 n. 155) male si applicavano alle micotossine, in quanto tale decreto non comprendeva il settore primario, mentre il nuovo

pacchetto igiene prescrive per questo settore l'impiego di pratiche di corretta prassi operativa. Per le micotossine il dato di concentrazione di maggiore interesse è quello relativo alla contaminazione della materia prima, in quanto, se immessa nel ciclo produttivo una materia prima non rispondente ai requisiti igienico-sanitari richiesti, non ci sarà possibilità di effettuare alcuna azione correttiva durante la produzione stessa.

Va inoltre rilevato che il dato di concentrazione della materia prima potrà garantire l'igienicità della filiera produttiva solo se ottenuto prima del suo ingresso nella filiera stessa, in quanto trasporto e stoccaggio possono incrementare la concentrazione delle tossine.

Per quanto riguarda il settore agricolo un dato di concentrazione interessante è quello ottenuto prima del raccolto, specialmente nei casi in cui si sospetta una contaminazione di rilievo, in modo da poter preventivamente informare il produttore sulla destinazione d'uso cui il prodotto può essere più correttamente indirizzato. In questo caso tuttavia le metodologie di campionamento pre raccolto non sono ancora ben codificate e sono oggetto di uno studio in corso da parte dell'ISS nell'ambito del progetto Aflarid finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali.

Conclusioni

Il concetto di qualità integrata di un dato analitico implica che gli errori commessi nelle singole fasi di generazione del dato siano fra loro commensurabili. Per quanto riguarda le micotossine è già ben noto che la fase di campionamento, inteso come il prelievo di un campione rappresentativo della partita di cui si deve ottenere il dato di concentrazione, contribuisce all'errore totale in misura maggiore alla fase analitica. Non è sufficientemente chiarito quanto l'errore commesso nella scelta sia dei siti da cui campionare che della tempistica del campionamento stesso influenzi l'attendibilità delle conclusioni da derivare sulla base dei dati di concentrazione ottenuti.

Dati ottenuti con i criteri delineati in questa monografia renderebbero l'utilizzo dei dati di concentrazione molto più attendibile e più vantaggioso in termini di costo efficacia e di costo beneficio. Si potrebbe ipotizzare a tal riguardo la realizzazione di software che sulla base di una banca dati relativa ai parametri che influenzano la scelta dei siti da campionare forniscano metodologie *ad hoc* per guidare tale scelta sulla base del criterio del *sampling fit for purpose*.

Bibliografia

- Brera C, Angelini S, Debegnach F, De Santis B, Turrini A, Miraglia M. Valutazione analitica dell'esposizione del consumatore alla fumonisina B1. In: Miraglia M, Brera C (Ed.). *1° Congresso nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 29-30 novembre 2004*. Roma. Istituto Superiore di Sanità; 2005. (Rapporti ISTISAN 05/42).
- Italia. Decreto Legislativo 26 maggio 1997, n. 155 "Attuazione delle direttive 93/43/CEE e 96/3/CE concernenti l'igiene dei prodotti alimentari". *Gazzetta Ufficiale* n. 136 del 13 giugno 1997 - Supplemento Ordinario n. 118.
- Miraglia M, Brera C (Ed.). *Task 3.2.7. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU Member States*. European Commission; 2002. Disponibile all'indirizzo: http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/3.2.7_en.pdf; ultima consultazione 22/10/07).
- Miraglia M, Brera C (Ed.). *Task 3.2.8. Assessment of dietary intake of patulin by the population of EU Member States*. European Commission; 2002. Disponibile all'indirizzo: http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/3.2.8_en.pdf, ultima consultazione 22/10/07).

Miraglia M, Brera C (Ed.). *Task 3.2.10. Collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States*. European Commission; 2003. Disponibile all'indirizzo <http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/task3210.pdf>; ultima consultazione 22/10/07.

PRIMA SESSIONE – I PARTE
Valutazione dell'impatto delle micotossine
sulla salute dell'uomo e degli animali

PRESENZA DI OCRATOSSINA A E TRICOTECENI IN ALIMENTI DESTINATI AI BAMBINI IN ETÀ 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 di Milano, Milano*

Introduzione

Le ocratossine e i tricoteceni sono micotossine considerate contaminanti tipici dei cereali nelle regioni a clima temperato. Le ocratossine sono prodotte da funghi del genere *Aspergillus* (*A. ochraceus* e *A. carbonarius*) e *Penicillium* (*P. verrucosum*) (1). Tra le diverse ocratossine (A, B, C) solo l'ocratossina A (OTA) ha un'importanza tossicologica (2). I tricoteceni (TCT) sono un diverso gruppo di micotossine, con struttura simile comune, prodotto da funghi del genere *Fusarium*. I tricoteceni più frequenti nei cereali sono la tossina T-2, L'HT-2, il Deossinivalenolo (DON) e il Nivalenolo (NIV) (3). A salvaguardia della salute pubblica, il Comitato Scientifico Europeo (*Scientific Committee on Food*, SCF) ha fissato una Dose Giornaliera Tollerata (*Tolerated Daily Intake*, TDI) di 0,005 µg/kg di peso corporeo (0,005µg/kg p.c.) per l'OTA (4) e di 1 µg/kg p.c. per il DON (5). Per altri tricoteceni sono stati fissati dei TDI provvisori di 0,7 µg/kg p.c. per il Nivalenolo (6) e di 0,06 µg/kg p.c. per la Tossina T-2 e HT-2 (7). Molti cereali destinati all'alimentazione umana sono contaminati da ocratossina A e tricoteceni e, pertanto, rappresentano un'importante via di esposizione a queste micotossine per l'uomo. Sotto il profilo del rischio sanitario, i bambini sono considerati la fascia di popolazione più "a rischio" sia perché hanno, in proporzione al peso corporeo, un consumo di cereali più elevato rispetto agli adulti, sia perché hanno una minore capacità di detossificazione dell'organismo. Nei paesi europei, i cereali sono tradizionalmente il primo alimento solido assunto dai bambini fin dalle prime fasi dello svezzamento. Per questo motivo, è stato stabilito un tenore massimo di 0,50 µg/kg di OTA negli alimenti a base di cereali destinati ai lattanti e alla prima infanzia (Regolamento CE n. 683/2004 e Regolamento CE n. 123/2005) (8, 9). Il rilevamento dell'entità di esposizione dei bambini a queste micotossine tramite gli alimenti a base di cereali rappresenta quindi un obiettivo di primaria importanza. Lo scopo del presente lavoro è stato quindi quello di caratterizzare il rischio da OTA e TCT nei bambini degli asili nido e delle scuole di Milano, rilevando la loro esposizione tramite i pasti preparati dai centri di cottura di "Milano Ristorazione", società pubblica del Comune di Milano.

Materiali e metodi

Allestimento dei campioni

Per l'allestimento dei campioni sono stati utilizzati i pasti giornalieri destinati ai bambini degli asili nido e delle scuole (dell'infanzia, primarie e secondarie di 1° grado) di Milano nel periodo primavera-estate 2004. Per l'asilo nido sono state considerate le grammature dei pasti offerti giornalmente ai bambini di età compresa tra 24-36 mesi mentre per le scuole abbiamo

ritenuto rappresentativo quello delle scuole primarie (6-10 anni di età). Gli ingredienti utilizzati per la preparazione dei pasti destinati ai bambini degli asili nido erano tutti di origine biologica, mentre quelli delle scuole primarie provenivano in parte da agricoltura biologica e in parte da agricoltura convenzionale. Giornalmente sono stati prelevati, da un centro di cottura della ristorazione collettiva, gli alimenti a base di cereali (pasta, riso, pizza, pane) offerti ai bambini degli asili nido e a quelli delle scuole primarie. Sono stati collezionati anche campioni di merende a base di cereali (cracker, biscotti, torte, focacce). Il campione giornaliero, così costituito, veniva pesato e conservato. Settimanalmente i campioni giornalieri venivano raggruppati in un pool che veniva omogeneizzato, liofilizzato e congelato fino al momento dell'analisi. La raccolta "giornaliera" si è protratta per 5 settimane. I pool settimanali (5 per gli asili nido e 5 per le scuole primarie) sono stati poi analizzati per la ricerca di OTA e TCT.

Analisi ocratossina A

Un'aliquota di 10 grammi di campione, precedentemente macinata, è stata addizionata con 10 mL di una miscela metanolo:soluzione di bicarbonato al 3% 50:50 e agitata per 15 minuti.

Dopo filtrazione su filtro di carta, 5 mL del filtrato sono stati diluiti con 50 mL di tampone fosfato PBS e purificati con colonnina ad immunoaffinità (Ochratest[®], VICAM). Dopo lavaggio della colonnina con 5 mL di PBS, l'OTA è stata eluita con 3 mL di acetonitrile. L'eluato è stato concentrato sotto azoto a 35°C e riportato ad 1 mL con miscela di acetonitrile:acqua 41:59.

Infine il campione è stato agitato su vortex e in bagno ad ultrasuoni, filtrato (Ø 0,4 mm) e analizzato in HPLC (Pompa Perkin Elmer, 200 Pump) con rilevatore fluorimetrico (LC 240 Perkin Elmer - lecc. 333 nm, λ_{em} 470 nm). È stata utilizzata una colonna Superspher (Merck) con fase mobile, utilizzata in isocratica, di acetonitrile:acqua 41:59 ad un flusso di 1 mL/min. Il limite di rilevabilità del metodo era di 0,020 µg/kg e quello di quantificazione di 0,050 µg/kg.

Le rese erano $92,3 \pm 2,7\%$.

Analisi tricoteceni

Una quota di 25 grammi di campione, precedentemente macinata con griglia da 1 mm, è stata estratta con 100 mL di una soluzione acetonitrile:acqua (84:16) e agitata per 90 minuti. Dopo filtrazione su filtro di carta, 10 mL dell'estratto sono stati purificati con il kit Mycosep 227. L'estratto purificato (2 mL) è stato poi trasferito in provetta ed evaporato in corrente d'azoto. Il residuo è stato derivatizzato con 0,2 mL di una miscela di trimetilsilimidazolo e trimetilclorosilano (1+0,2) per 15 minuti a temperatura ambiente e al buio. Dopo l'aggiunta di 0,8 mL di esano e 1 mL di acqua bidistillata, il campione è stato centrifugato per 3 minuti e analizzato in GC-MS (Thermoquest-Finnigan, modello Polaris Q) con rivelatore a trappola ionica, con tecnica SIM (*Selected Ion Monitor*). È stata utilizzata una colonna capillare DB-5 e un sistema di iniezione PTV *solvent split* con rapporto di splittaggio 1:30. I limiti di rilevabilità erano di 2 µg/kg per il DON, il 3-Acetil Deossinivalenolo (3-Ac. DON), il 15-Acetil Deossinivalenolo (15-Ac. DON) e il NIV, e di 10 µg/kg per la tossina T-2 e HT-2, mentre quelli di quantificazione erano di 10 µg/kg e 40 µg/kg, rispettivamente.

Risultati e discussione

Per il nostro studio abbiamo considerato solo i prodotti a base di cereali in quanto costituiscono la principale fonte di OTA e TCT per i bambini. Dai dati a nostra disposizione,

sulla composizione dei pasti preparati da Milano Ristorazione, è emerso che i cereali costituiscono il 42% del pasto totale offerto ai bambini degli asili nido e il 44% di quello a disposizione dei bambini delle scuole primarie, corrispondenti in termini quantitativi giornalieri rispettivamente a 0,237 kg e 0,302 kg di prodotto umido.

Ocratossina A

Dall'analisi dei risultati ottenuti, è emerso che l'OTA era presente nel 100% dei campioni sia dell'asilo nido che delle scuole primarie, come riportato nella Tabella 1.

Tabella 1. Risultati analitici asilo nido e scuole primarie (valori espressi in µg/kg umido)

Campione settimanale	Concentrazione OTA (µg/kg)	
	Asilo nido	Scuola primaria
1	0,052	0,061
2	0,050	0,075
3	0,042	0,284
4	0,038	0,295
5	0,056	0,089
Media	0,048	0,161
Deviazione Standard (DS)	0,007	0,118

La concentrazione media di OTA nei campioni dell'asilo nido era di 0,048 µg/kg e quella delle scuole primarie era di 0,161 µg/kg. L'OTA è stata rilevata nei campioni con un'elevata frequenza (100%). Le concentrazioni di OTA, da noi rilevate, sono inferiori sia al tenore massimo ammissibile per cereali e prodotti derivati stabilito in ambito europeo (3 µg/kg) (9), sia al tenore massimo ammesso nei cereali e negli alimenti a base di cereali destinati a lattanti e prima infanzia (0,5µg/kg) (8,9). Per quanto riguarda le concentrazioni di OTA rilevate nei campioni di alimenti offerti dagli asili nido, tutti di origine biologica (concentrazione media 0,048 ± DS 0,007) e quelli delle scuole primarie, in parte provenienti anche da agricoltura convenzionale (concentrazione media 0,161 ± DS 0,118), possiamo affermare che è emersa una differenza statisticamente significativa (t-Student test $p < 0,05$) nell'entità di contaminazione.

Utilizzando i dati di consumo a nostra disposizione (0,237 kg e 0,302 kg per l'asilo nido e per le scuole primarie) e le concentrazioni di OTA rilevate negli alimenti a base di cereali abbiamo calcolato la presunta esposizione giornaliera media (consumo x concentrazione / peso corporeo) dei bambini a questa micotossina durante le 5 settimane da noi considerate.

Il peso medio stimato dei bambini, per il calcolo dell'esposizione, era di 14 kg per l'asilo nido, corrispondente ad un'età intermedia di 24 mesi, e di 28 kg per quelli delle scuole primarie corrispondente ad un'età intermedia di 8 anni. I dati relativi sono riportati nella Tabella 2.

Dai nostri calcoli è emerso, quindi, che l'esposizione media giornaliera all'OTA era pari a 0,0008 µg/kg peso corporeo/giorno per i bambini dell'asilo nido e 0,0017 µg/kg peso corporeo/giorno per quelli delle scuole primarie.

L'esposizione pertanto non superava, in entrambi i casi, il valore di TDI (0,005 µg/kg peso corporeo/giorno) ma raggiungeva solo il 16% del valore tollerato per i bambini dell'asilo nido e il 35% per quelli delle scuole primarie.

Tabella 2. Calcolo dell'esposizione dei bambini negli asili nido e nelle scuole private ($\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporeo/giorno)

Campione settimanale	OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) Fresco	Pasto giornaliero offerto (kg)	OTA assunta ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Peso corporeo bambini (kg)	Esposizione giornaliera ($\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c.)
Asili nido					
1	0,052	0,237	0,0122	14	0,0009
2	0,05	0,237	0,0119	14	0,0008
3	0,042	0,237	0,01	14	0,0007
4	0,038	0,237	0,0091	14	0,0007
5	0,056	0,237	0,0132	14	0,0009
Media	0,048	0,237	0,0113	14	0,0008
Scuole primarie					
1	0,061	0,302	0,0184	28	0,0007
2	0,075	0,302	0,0227	28	0,0008
3	0,284	0,302	0,0858	28	0,0031
4	0,295	0,302	0,089	28	0,0032
5	0,089	0,302	0,027	28	0,0010
Media	0,161	0,302	0,0486	28	0,0017

Tricoteceni

Dall'esame dei risultati riportati nella Tabella 3 emerge che nel 100% dei campioni esaminati era presente il DON con una concentrazione media (peso umido) di $45 \mu\text{g}/\text{kg} \pm \text{DS } 6,05$ nei campioni degli asili nido e di $82 \mu\text{g}/\text{kg} \pm \text{DS } 15,78$ in quelli delle scuole primarie, mentre gli altri tricoteceni (NIV, tossina T-2, HT-2, 3- Ac-DON, 15- Ac-DON) non sono mai stati riscontrati.

Tabella 3. Risultati analitici dei pasti negli asili nido e nelle scuole private (valori espressi in $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso umido)

Campione settimanale	DON	NIV	TOSSINA T-2	TOSSINA HT-2	3-AC-DON	15-AC-DON
Asili nido						
1	46,8	ND	ND	ND	ND	ND
2	52,7	ND	ND	ND	ND	ND
3	38,1	ND	ND	ND	ND	ND
4	47,7	ND	ND	ND	ND	ND
5	39,6	ND	ND	ND	ND	ND
Media	45,0	ND	ND	ND	ND	ND
DS	6,05	ND	ND	ND	ND	ND
Scuole primarie						
1	70,0	ND	ND	ND	ND	ND
2	102,5	ND	ND	ND	ND	ND
3	87,9	ND	ND	ND	ND	ND
4	62,6	ND	ND	ND	ND	ND
5	86,6	ND	ND	ND	ND	ND
Media	82,0	ND	ND	ND	ND	ND
DS	15,78	ND	ND	ND	ND	ND

ND = non rilevato

Da quanto sopra riportato si può affermare che il DON è il tricotecene riscontrato con maggiore frequenza negli alimenti a base di cereali e che, quindi, l'esposizione continua a questa micotossina, derivante da un'assunzione assidua di cereali, potrebbe costituire un rischio sanitario.

La presunta esposizione dei bambini a questa micotossina è stata riportata nella Tabella 4.

Tabella 4. Calcolo dell'esposizione dei bambini negli asili nido e nelle scuole private ($\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporeo/giorno)

Campione settimanale	DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Pasto giornaliero offerto (kg)	DON assunto ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Peso corporeo bambini (kg)	Esposizione giornaliera ($\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c.)
Asili nido					
1	46,8	0,237	11,1	14	0,79
2	52,7	0,237	12,5	14	0,89
3	38,1	0,237	9,0	14	0,64
4	47,7	0,237	11,3	14	0,81
5	39,6	0,237	9,4	14	0,67
Media	45,0		10,7		0,76
Scuole primarie					
1	70,0	0,302	21,1	28	0,75
2	102,5	0,302	31,0	28	1,11
3	87,9	0,302	26,5	28	0,95
4	62,6	0,302	18,9	28	0,68
5	86,6	0,302	26,2	28	0,94
Media	82,0		24,8		0,89

Dai nostri calcoli è emerso, quindi, che l'esposizione giornaliera al DON era pari a 0,76 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c./giorno per i bambini dell'asilo nido e 0,89 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c./giorno per quelli delle scuole primarie.

L'esposizione pertanto non superava, in entrambi i casi, il valore di TDI (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c./giorno) ma rappresentava il 76% e l'89% dell'esposizione giornaliera tollerata, rispettivamente, per i bambini dell'asilo e per quelli delle scuole primarie.

Conclusioni

I dati ottenuti dalla nostra analisi sia per quel che riguarda l'OTA che per il DON sono rassicuranti, è importante tuttavia rilevare che essa si riferisce al solo pasto offerto dalla ristorazione collettiva (merenda compresa) e non tiene invece conto dei consumi domestici.

Bisogna, però considerare che non tutto il pasto offerto dalla ristorazione collettiva viene realmente consumato dai bambini (i residui sono stimati intorno al 30%).

Possiamo quindi affermare che, anche comprendendo i consumi domestici, l'esposizione giornaliera dei bambini non dovrebbe essere sostanzialmente differente da quella da noi calcolata e comunque non dovrebbe superare il TDI.

Rimane tuttavia da valutare l'esposizione della fascia di popolazione definita come "forti consumatori" ovvero degli individui che a parità di peso corporeo hanno costantemente consumi doppi o tripli rispetto alla media e quindi è maggiormente esposta all'assunzione di contaminanti per via alimentare

Sulla scorta dei nostri dati la percentuale di esposizione all'OTA con i cereali di questa fascia di consumatori infantili ammonterebbe rispettivamente al 32% e 70% del valore del TDI.

Mentre per il DON l'esposizione dei bambini "forti consumatori" supererebbe il valore di TDI (rispettivamente 152 e 178% del TDI).

Sulla base di queste ulteriori considerazioni possiamo affermare che l'esposizione all'OTA, della fascia di popolazione considerata, non desta particolari preoccupazioni di ordine sanitario, anche se la costante presenza di questa micotossina negli alimenti non è del tutto rassicurante.

Inoltre, è doveroso segnalare che vi sono altre fonti alimentari di OTA per i bambini che non sono state prese in considerazione in questo studio, quali ad esempio il cacao.

Sicuramente il DON, per la sua costante presenza negli alimenti a base di cereali e l'entità di esposizione calcolata per i consumatori normali (fino all'89% del TDI), è il Tricotecene su cui focalizzare maggiormente l'attenzione per salvaguardare la sicurezza alimentare.

Infatti, anche una marginale esposizione aggiuntiva (pasti domestici) potrebbe comportare il raggiungimento del valore soglia del TDI e che questa soglia potrebbe essere facilmente superata dalla fascia dei "forti consumatori".

Ciò suggerisce innanzitutto che la reale esposizione dei bambini a questa micotossina deve essere più attentamente definita considerando anche i consumi domestici ed estendendo gli studi anche a periodi più favorevoli allo sviluppo fungino (autunno-inverno).

In secondo luogo che è doveroso perseguire l'obiettivo di una riduzione dell'esposizione al DON in età infantile individuando i mezzi più validi e applicabili per il controllo del rischio.

Bibliografia

1. Bennet JW, Klich M Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 2003;16:497-516.
2. Petzinger E, Ziegler K Ochratoxin A from a toxicological perspective, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2000; 23: 91-98.
3. Sudakin DL Trichothecenes in the environment: relevance to human health, *Toxicology Letters* 2003; 143: 97-107.
4. European Commission DG XXIV Unit B3. *Opinion on ochratoxin A*. Scientific Committee for Food (SCF); September 1998.
5. Scientific Committee on Food. *Opinion on Fusarium Toxins part 1: DON*. Brussels: European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General; 1999. (SCF/CS/CNTM/MYC/19 Final). Disponibile all'indirizzo http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out44_en.pdf; ultima consultazione 22/10/07.
6. Scientific Committee on Food European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General. *Opinion on Fusarium Toxins part 4: nivalenol*. Brussels: European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General; 2000. (SCF/CS/CNTM/MYC/ 26 Final). Disponibile all'indirizzo http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out74_en.pdf; ultima consultazione 22/10/07.
7. Scientific Committee on Food. *Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium toxins. Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol*. Brussels: European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General; 2002. (SCF/CS/CNTM/MYC/27 Final). Disponibile all'indirizzo http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out123_en.pdf; ultima consultazione 22/10/07.
8. Regolamento (CE) n. 683/2004, 13 aprile 2004. *Gazzetta Ufficiale*, L 106/3, 15 aprile 2004.
9. Regolamento (CE) n. 123/2005, 26 gennaio 2005. *Gazzetta Ufficiale*, L 25/3, 28 gennaio 2005.

Questo lavoro è stato in parte finanziato con fondi FIRST 2005.

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

Introduzione

La valutazione del rischio (*risk assessment*) è il metodo che consente di esaminare, in modo sistematico, informazioni e dati scientifici disponibili per arrivare a valutare la probabilità con cui un dato pericolo si può manifestare. La valutazione dell'esposizione (*exposure assessment*) è parte integrante della valutazione del rischio (*risk analysis*) 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 (1). Considerata la pericolosità delle micotossine e la loro larga incidenza in una vasta gamma di alimenti correntemente consumati dalla popolazione, diventa sempre più centrale il considerarne l'assunzione umana e i possibili effetti sulla salute. In ambito internazionale, diversi sforzi sono stati elargiti in questa direzione nell'ambito di progetti di ricerca, che vedono collaborare stati nazionali, europei e non (Monte Carlo Project, SafeFoods). L'obiettivo di tali sforzi deve essere, come suggerito dell'EFSA (*European Food Safety Authority*), l'ottenimento di uno strumento armonizzato di valutazione dell'esposizione che tenga in debita considerazione il condizionamento dato da incertezze sul piano scientifico, definendone il contributo affinché i responsabili della gestione del rischio (*risk manager*) ne possano tenere conto. Nell'ambito della valutazione quantitativa dell'esposizione alle micotossine, si possono evidenziare due approcci, deterministico e probabilistico, i quali differiscono in base al modo in cui vengono descritti gli input o dati utilizzati. Entrambi si basano sulla stessa semplice funzione di calcolo della esposizione: quantità di alimento consumato per la concentrazione della micotossina trovata nell'alimento stesso, relativamente al peso corporeo.

Approccio deterministico

Il modello deterministico, o *point-estimate*, si basa su valori singoli quali medie o descrizione del *worst-case scenario*, ossia la prospettiva peggiore che ci si potrebbe attendere. Il risultato finale del *risk assessment*, quindi, è costituito da un valore singolo che definisce il rischio finale o *final risk estimate* (es. la probabilità che un consumatore possa sviluppare un evento avverso in seguito al consumo di uno o più alimenti che contengano il contaminante in una concentrazione superiore a quella valutata come innocua) (3). Questo approccio utilizza stime di incidenza delle micotossine nelle matrici alimentari e di consumi alimentari per comporre nel calcolo dell'esposizione; 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 95esimo

percentile del consumo alimentare e sul 90esimo percentile della concentrazione della tossina sotto osservazione.

L'approccio deterministico, essendosi sviluppato da più tempo, ha varie metodologie applicative che differiscono tra loro nella modalità di raccolta delle matrici alimentari ma non nel calcolo dell'esposizione. Le principali sono: la *Total Diet Study* (TDS) o *Market Basket Study* e la *Duplicate Diet Study*.

Total Diet Study

La *Total Diet* o *Market Basket Study* utilizza i dati di concentrazione di analiti chimici misurati negli alimenti pronti per essere consumati. Questo tipo di indagine consiste praticamente nell'acquisto al dettaglio degli alimenti comunemente utilizzati dalla popolazione, nella preparazione in laboratorio dei cibi seguendo le ricette abitualmente utilizzate e spesso combinando i diversi alimenti per ottenere i piatti composti e aggregati, nella omogeneizzazione del piatto così ottenuto e nella sua analisi per la ricerca delle micotossine. I cibi o i prodotti alimentari scelti durante l'acquisto devono essere rappresentativi di quelli comunemente consumati dalla popolazione di interesse.

La *Total Diet Study* ha lo scopo di misurare la media di concentrazione di ogni micotossina ingerita per gruppi di consumatori differenti per età o sesso su tutto il territorio nazionale. I risultati danno un'indicazione sulla possibilità o meno che un contaminante costituisca un rischio per la popolazione totale. Questo tipo di indagine può essere considerato uno strumento che permette ai *risk manager* di concentrare limitate risorse su quegli analiti che possono rappresentare un rischio per la salute pubblica. La spesa per condurre uno studio di Dieta Totale è stimata intorno ai 125,000 US\$ (3), avendo già le informazioni basilari sulle stime di consumo degli alimenti considerati. Questa spesa dovrebbe essere controbilanciata dai possibili guadagni legati alla possibilità di prevenire o scongiurare un eventuale esito negativo per la quota di popolazione più esposta al rischio e ai benefici economici derivanti dalla mancata distruzione di derrate alimentari contaminate.

Duplicate Diet Study

Questo tipo di indagine richiede che gli individui coinvolti preparino per ogni piatto o componente di pasto una porzione del tutto identica, da consegnare ai ricercatori. La frequenza della raccolta dei cibi avviene in base all'intervallo temporale osservato, giorno o occasione di consumo durante la giornata; dopodiché viene effettuata l'analisi per l'analita target. La *Duplicate Diet Study* è particolarmente utile perché riflette la varietà delle diverse modalità di preparazione dei cibi legati alle abitudini locali della popolazione di interesse; il principale svantaggio di tale approccio è legato al fatto che, essendo il pasto l'unità centrale della ricerca, non si può identificare il singolo contributo di ogni ingrediente all'esposizione totale.

Approccio probabilistico

I modelli probabilistici per la valutazione quantitativa del rischio integrando la tecnica matematica della simulazione Monte Carlo (nella quale i *point-estimate*, o valori singoli, sono

sostituiti da distribuzioni di probabilità) riescono a caratterizzare in modo più completo il rischio tenendo conto anche delle incertezze e della variabilità che costantemente influenzano i diversi parametri del modello oggetto di studio.

Con l'approccio stocastico o probabilistico-quantitativo, il sistema utilizza tutti i dati disponibili e impiega le distribuzioni di probabilità per descrivere gli intervalli di oscillazione dei valori che i parametri oggetto di analisi possono assumere di volta in volta. La probabilità che un soggetto vada incontro ad un determinato pericolo, quindi, assume l'aspetto di una distribuzione del rischio cui un individuo o una popolazione saranno esposti. Questo tipo di metodica, affiancata alla valutazione dell'effetto, consente 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.

Il modello usato per questo tipo di valutazione è basato sulla tecnica del Monte Carlo, che ha come obiettivo primario quello di presentare nel modo migliore la distribuzione completa delle esposizioni per la popolazione in studio, comprendendo nell'analisi sia la variabilità e l'incertezza individuale che la variabilità e l'incertezza delle fonti di informazione.

Esistono molte fonti di dati e una varietà di metodi che possono essere usati per determinare la distribuzione utilizzando le procedure di analisi del Monte Carlo. Senza considerare i metodi e i dati, tutte le procedure utilizzano la seguente equazione:

$$y_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^p x_{ijk} c_k}{w_i},$$

dove, nel caso delle micotossine, y_{ij} è l'assunzione della micotossina da parte del consumatore i nel giorno j (in microgrammi di tossina per chilo di peso corporeo), x_{ijk} è la porzione consumata dall'individuo i nel giorno j dell'alimento k (in grammi), c_k il valore di concentrazione della micotossina nell'alimento k (in mg/kg) e w_i è il peso corporeo del consumatore i (in kg).

I parametri utilizzati per lo studio sono costituiti non da valori singoli, ma da distribuzioni di probabilità proprio perché non si conosce a sufficienza il parametro (incertezza) o si ignorano le variazioni cui esso potrebbe andare incontro (variabilità) (6). A ciascun valore del parametro (input) è possibile associare una ben definita probabilità. Conducendo una simulazione Monte Carlo con i software disponibili (tra gli altri MCRA, *Monte Carlo Risk Assessment*), la valutazione del rischio relativa a diversi scenari è calcolata più volte fino a quando si raggiunge un numero determinato di ripetizioni (es. 10.000 *iteration*). Di solito, a ogni iteration un campione (valore del parametro) viene selezionato in modo random (utilizzando il processo matematico Monte Carlo), da ciascuna distribuzione di probabilità del valore stesso. I valori caratterizzati da un'alta probabilità sono campionati un numero di volte maggiore rispetto a quelli con bassa probabilità e alla fine il risultato della simulazione è una distribuzione di probabilità di tutti i possibili scenari che originano dalla combinazione di parametri e valori, di solito sotto forma di funzione di densità di probabilità. Ciascuna iteration costituisce, quindi, un potenziale evento "reale" della trasmissione dell'assunzione della micotossina.

L'analisi ulteriore del modello probabilistico (*sensitivity analysis*) fornisce poi tutte le informazioni sui processi chiave del processo di filiera (accuratezza, qualità della misura) che influenzano in maniera significativa il risultato finale della valutazione del rischio, offrendo al

contempo sia gli elementi per orientare la scelta degli interventi di riduzione (*risk management*) che le opportunità per la ricerca scientifica.

L'incertezza deriva dall'insufficiente conoscenza di specifici fattori, parametri o modelli. L'incertezza può riguardare: il parametro (errori di misurazione, di campionamento o sistematici); il modello (errata semplificazione dei processi "reali", cattivo uso del modello, uso inappropriato di variabili sostitutive); lo scenario (errori descrittivi, di aggregazione, di valutazione e giudizio, analisi incompleta). A tutto ciò si può ovviare, riducendo quindi il livello di incertezza con l'effettuazione di ulteriori studi e misurazioni.

La variabilità costituisce l'eterogeneità reale o diversità nella popolazione, la variazione naturale del sistema oggetto di studio o parametro di esposizione. Le cause della variabilità derivano, quindi, dal comportamento casuale dei processi per differenze genetiche o ambientali. Non è possibile ridurre la variabilità attraverso ulteriori misurazioni, ma è possibile, tuttavia, caratterizzarla meglio effettuando ulteriori studi e ridurre in questo modo la possibilità di valutazioni finali del rischio non appropriate o addirittura errate.

L'approccio del modello probabilistico permette di ottenere una valutazione più realistica della stima dell'esposizione e del rischio relativo attraverso l'utilizzo di distribuzioni complete di dati di esposizione rispetto al *worst-case* ottenibile incrociando il massimo valore di contaminazione con il consumo relativo dell'alimento. Non di meno, questo approccio necessita dell'utilizzo di appropriati dati e modelli. Tradizionalmente, la maggior parte delle valutazioni del rischio sono state condotte usando le valutazioni *point-estimate* che producono risultati praticamente improbabili e in molti casi diminuiscono la capacità dei legislatori, dell'industria e dei consumatori di individuare quali scenari possano rappresentare un rischio realistico.

Il sistema Monte Carlo non è, ovviamente, scevro di svantaggi o imperfezioni, che si manifestano come conseguenza di specifiche situazioni, ad esempio la difficoltà di definire in modo preciso le distribuzioni di probabilità che caratterizzano l'incertezza e la variabilità di un determinato parametro. Comunque, si nota un crescente interesse nell'utilizzo di modelli probabilistici per la valutazione dell'esposizione ai contaminati alimentari. Il messaggio chiaro, che emerge costantemente, è quello che l'affidabilità dei risultati così ottenuti dipende fortemente dalla qualità del modello degli input, sia in termini di qualità che di quantità (4).

Monte Carlo Risk Assessment (MCRA)

Nell'ambito del progetto europeo SAFE FOODS (6° Programma Quadro), è stato implementato il software MCRA (<http://mcra.rikilt.wur.nl/mcra/mcra.html>) (7) basato su un modello probabilistico di calcolo dell'esposizione a vari contaminanti chimici, quali pesticidi, micotossine e tossine naturali. Utilizzando database nazionali di consumi alimentari individuali e di monitoraggio di incidenza delle micotossine, dei pesticidi e delle tossine naturali nelle varie matrici alimentari, il software MCRA simula le assunzioni giornaliere per la settimana. Per le micotossine si ottiene una stima di assunzione cronica su sette giorni. L'approccio MCRA produce l'intera distribuzione dell'esposizione (e non una stima puntuale come si ottiene dall'approccio deterministico) nel seguente modo: MCRA simula i consumi giornalieri campionando dal database dei consumi alimentari e combinandoli con un campione random preso dal database delle concentrazioni dell'analita (distribuzione empirica) o, se disponibile in alternativa, con la distribuzione parametrica. Il calcolo avviene considerando la variabilità tra i consumatori e, per lo stesso consumatore, tra i giorni di consumo. Il risultato è l'intera distribuzione dell'esposizione. I percentili della distribuzione possono essere utilizzati come soglia del rischio se messi in relazione a parametri di dose, come l'ADI (*Acceptable Daily Intake*). L'incertezza relativa alla stima dei percentili è valutata con la tecnica del *bootstrap* (8).

Inoltre, MCRA permette di inserire nel computo i fattori relativi al processamento cui sono sottoposti i cibi prima di essere consumati (effetto della filiera da materiale grezzo ad ingrediente ed effetto sull'analita del processo di preparazione dell'alimento) e quelli legati alla variabilità del misurando (spesso i valori sono ottenuti dalle analisi dei campioni come ingredienti, mentre i consumatori possono mangiare cibi complessi). Le stime che si possono ottenere sono sia a livello dell'intera popolazione che per sottopopolazioni di interesse (bambini, adulti, uomini, donne, consumers only). È prevista inoltre la valutazione dell'effetto di dati di incidenza sotto la soglia "zero" con il LOD/LOQ (*Limit of Detection/Limit of Quantification*)(9). I database dei consumi sono strutturati per alimento consumato con relativo peso della porzione e l'indicazione dell'occasione di consumo. Vengono prese in considerazione anche altre informazioni relative agli individui consumatori, come età e sesso. I dati di concentrazione sono indicati come l'ammontare di analita presente nel campione.

In Figura 1 e 2 sono riportati, come esempio, gli output del programma MCRA nel caso di calcolo di esposizione alla ocratossina A in campioni di alimenti a base di mais, cacao, vino e caffè.

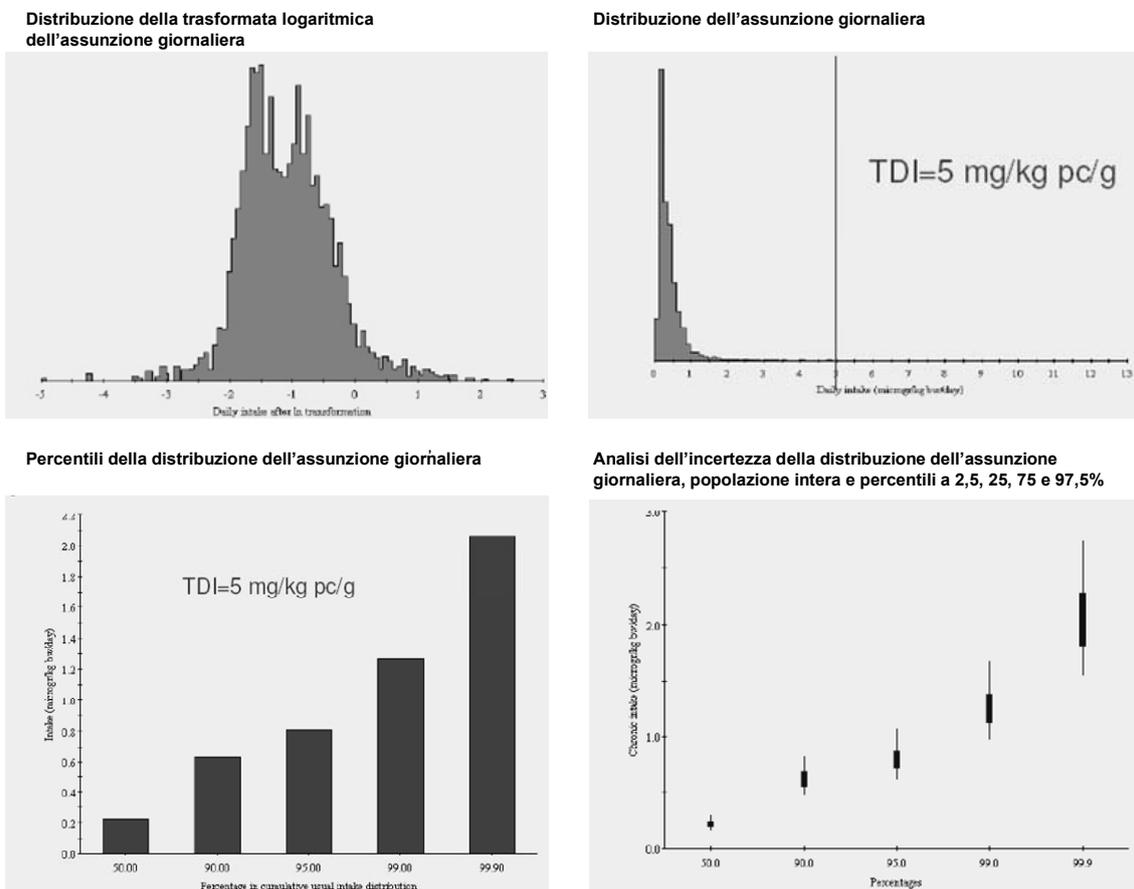


Figura 1. Ocratossina A: grafici (da destra verso sinistra) relativi alla distribuzione completa di assunzione, la upper tale distribution del 5% degli esposti al rischio, i percentili e le loro variabilità

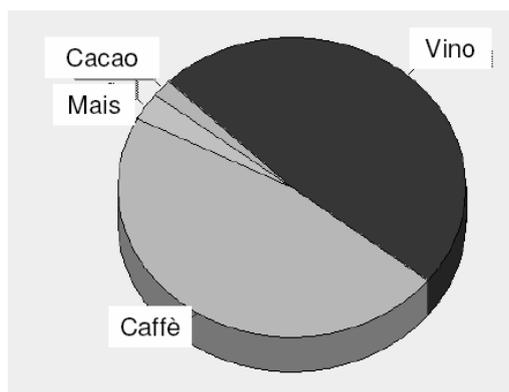


Figura 2. Ocratossina A: i quattro alimenti che maggiormente contribuiscono nel computo totale all'assunzione

Conclusioni

Valutando i pro e i contro associati ai due approcci teorici alla stima dell'esposizione, si può concludere che l'approccio deterministico appare sicuramente più semplice e immediato, ma viziato da una distorsione che porta a sovra- o sotto-stimare il fenomeno; inoltre, i risultati ottenuti mancano del tutto di informazioni relative alla variabilità e all'incertezza che tendono a influenzare molto il parametro in studio. Come è stato già detto, il *point-estimate* può fornire dati non utilizzabili dal *risk manager*, perché non generalizzabili e indicativi di scenari non realistici. La verosimiglianza è maggiormente assicurata dall'approccio probabilistico, il quale, però, presenta un limite non trascurabile: risultati attendibili dipendono, in misura maggiore rispetto all'approccio deterministico, da quantità e qualità dei dati introdotti nel modello, e di conseguenza nel calcolo. Inoltre, la metodica probabilistica è di per sé molto complicata, sia per operatività che per fruibilità da parte dei *risk manager*; tale svantaggio è superato dall'ottenimento con questo tipo di approccio di un utile indicatore pragmatico, come il MoE. Non meno importante è anche la capacità di valutare le incertezze e la variabilità delle fonti informative all'interno del modello probabilistico.

Idealmente si può immaginare come l'apporto informativo necessario per l'ottenimento di risultati più precisi e attendibili debba passare necessariamente oltre che attraverso una raccolta sistematica dei dati di consumo e di incidenza delle micotossine, anche dall'utilizzo di tecniche di stima matematicamente sofisticate.

Bibliografia

1. World Health Organization. *Risk management and food safety - FAO Food and Nutrition Paper 65. Risk Management and Food Safety*. Rome: Joint FAO/WHO Consultation; 1997. Disponibile sul sito: <http://www.fao.org/docrep/W4982E/w4982e00.htm>; ultima consultazione: 11/04/2007.
2. European Food Safety Authority. Linee guida del Comitato scientifico a fronte di una richiesta dell'EFSA sulle incertezze nella valutazione dell'esposizione alimentare. *The EFSA Journal*

- 2006;438:1-2. Disponibile al sito: http://www.efsa.eu/it/science/sc_committee/sc_opinions.html; ultima consultazione 11/04/2007.
3. United Nations Environment Programme International Labour Organisation; World Health Organization; International Programme on Chemical Safety. *Environmental Health Criteria 214. Human Exposure Assessment*. World Health Organization; 2000.
 4. Ferri M, Giaccone V. Il sistema Monte Carlo e la valutazione quantitativa del rischio microbiologico nell'igiene degli alimenti. *Il progresso veterinario* 2003;58:4.
 5. Petersen BJ. Probabilistic modelling: theory and practice. *Food Additives and Contaminants* 2000;17(7):591- 599.
 6. Vose D. *Risk Analysis. A quantitative guide*. John Wiley & Sons. 2000.
 7. de Boer WJ, van der Voet H. MCRA, Release 5 a web-based program for Monte Carlo Risk Assessment On line Manual. 2006. Disponibile sul sito: <http://mcra.rikilt.wur.nl/mcra/Manual.pdf>; ultima consultazione 11/04/2007.
 8. van der Voet H, de Boer WJ, Boon PE, van Donkersgoed G, van Klaveren JD. *MCRA a web-based program for Monte Carlo Risk Assessment. Release 3. Reference Guide*. 2004. Disponibile sul sito: <http://mcra.rikilt.wur.nl/mcra/ReferenceGuide3.pdf>; ultima consultazione 11/04/2007.
 9. World Health Organization. *Reliable evaluation of low-level contamination of food - workshop in the frame of GEMS/Food-EURO*. Kulmbach: GEMS/Food-EURO; 1995. Disponibile sul sito: http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/en/lowlevel_may1995.pdf, ultima consultazione 11/04/2007.

EFFETTI TOSSICI E MECCANISMI DI AZIONE DELLE MICOTOSSINE

Giorgio Cantelli Forti

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

Introduzione

Le micotossine sono un insieme complesso ed eterogeneo di composti chimici, a basso peso molecolare, prodotte dal metabolismo secondario di funghi a micelio filamentoso. Le micotossine si possono trovare negli alimenti di origine vegetale, e/o in prodotti provenienti da animali alimentati con mangimi contaminati (1).

A partire dagli anni '60 si è iniziato a comprendere che la contaminazione di muffe può essere responsabile di gravi problemi per la salute. Oggi, le ricerche scientifiche hanno dimostrato una significativa correlazione tra il consumo di alimenti contenenti micotossine e gravi effetti tossici per l'uomo. (2). La tematica dei rischi associati alla presenza di micotossine negli alimenti ha progressivamente assunto per le organizzazioni internazionali, l'Unione Europea e gli enti nazionali importanza crescente dimostrata dalle numerose normative e linee guida che sempre più frequentemente vengono emanate nel settore della sicurezza alimentare.

La tossicologia offre strategie di intervento per fronteggiare in tutti i suoi diversi aspetti il rischio correlato alle micotossine. Un aspetto fondamentale della ricerca tossicologica è indirizzato allo studio dei meccanismi d'azione responsabili della tossicità di uno xenobiotico. Queste informazioni sono fondamentali per la valutazione dei rischi associati all'esposizione dei composti chimici.

Oggi, per le principali micotossine che rappresentano un'emergenza socio-sanitaria, sono noti gli effetti tossici a carico di specifici organi e tessuti e la loro capacità di causare specifiche patologie nell'uomo.

Aflatossine

Le aflatossine sono prodotte essenzialmente da *Aspergillus parasiticus*, tipico delle aree tropicali e subtropicali, e *Aspergillus flavus* che ha una diffusione ubiquitaria. Gli alimenti che possono contenere micotossine sono i cereali, la frutta secca (arachidi, pistacchi, mandorle, noci), olii di semi. Il metabolita idrossilato dell'aflatossina B₁, l'aflatossina M₁, può essere presente nel latte di animali alimentati con mangimi contaminati.

La aflatossina B₁ è la aflatossina dotata di maggiore tossicità. Il meccanismo d'azione è riconducibile al suo processo di biotrasformazione che, mediante l'attivazione del complesso enzimatico del citocromo P450, porta alla formazione di residui epossidici (-eso-8,9-eossido) in grado di legarsi con le proteine, alterando la funzionalità cellulare, e/o gli acidi nucleici determinando danni genetici (3). Gli effetti genotossici delle aflatossine, e in particolare della B₁, sono stati osservati in sistemi sperimentali *in vitro* e *in vivo*, inoltre gli addotti aflatossinaB₁-N7guanina sono stati ritrovati sia nel sangue che nelle urine delle persone esposte a aflatossine.

Gli effetti cancerogeni delle aflatossine sono stati valutati in modelli sperimentali e in studi epidemiologici. Nelle prove *in vivo* la micotossina più attiva è l'aflatossina B₁, mentre più

moderata è l'attività delle altre aflatossine che viene stimata nel seguente ordine crescente: $B_1 > M_1 > G_1 > B_2 > G_2$. Il tumore del fegato rappresenta la principale neoplasia indotta dalla aflatossina B_1 nei diversi modelli animali (ratto, topo, scimmia). L'aflatoxina può causare anche tumori in altri organi come, colon, retto, stomaco, pancreas e polmoni. (3). Gli studi epidemiologici hanno indicato una significativa correlazione tra l'incidenza dei tumori del fegato (epatocarcinoma) e l'ingestione di alimenti contenenti aflatossine nelle popolazioni che vivono nelle aree geografiche in cui le condizioni climatiche e igieniche promuovono la contaminazione alimentare da *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus flavus*. Sulla base dei risultati ottenuti dagli studi epidemiologici e di cancerogenesi la *International Agency for Research on Cancer* (IARC) ha inserito l'aflatoxina B_1 nel Gruppo 1 (sostanze sicuramente cancerogene per l'uomo). Per quanto riguarda il metabolita, aflatoxina M_1 , gli effetti cancerogeni sono stati dimostrati soltanto in alcuni modelli animali (ratto e trota), e di conseguenza la IARC ha classificato questa micotossina nel gruppo 2B, che comprende le sostanze possibili cancerogene per l'uomo (Tabella 1) (4).

Tabella 1. Classificazione di cancerogenicità secondo la IARC

Gruppo 1	Cancerogeno accertato per l'uomo: vi è evidenza di cancerogenicità per l'uomo in studi epidemiologici adeguati che escludono il ruolo del caso, del confondimento e della distorsione dello studio
Gruppo 2A	Probabile cancerogeno per l'uomo sulla base di evidenza limitata in studi epidemiologici e di evidenza sufficiente nei piccoli roditori
Gruppo 2B	Possibile cancerogeno per l'uomo sulla base di evidenza limitata nell'uomo e di evidenza non sufficiente nell'animale oppure di evidenza inadeguata nell'uomo
Gruppo 3	Non classificabile (evidenza inadeguata)
Gruppo 4	Probabile non cancerogeno per l'uomo sulla base di evidenza che suggerisce l'assenza di cancerogenicità nel roditore e nell'uomo e, in certi casi, sulla base dell'evidenza che suggerisce l'assenza di cancerogenicità nel roditore e l'inadeguatezza o la mancanza del dato sull'uomo, in presenza di altri dati rilevanti

L'esposizione alle aflatossine può concorrere anche allo sviluppo di alcune patologie degenerative dell'infanzia tipiche delle aree tropicali e subtropicali dell'Asia e Africa, come la cirrosi infantile dell'India e l'epatopatia infantile dell'Africa. L'indicazione che le aflatossine siano una causa eziologica per queste malattie è riconducibile alla presenza di elevate concentrazioni di aflatossine nel siero e nelle urine nei bambini affetti da queste epatopatie e al ritrovamento di residui di aflatoxina B_1 in biopsie epatiche di bambini e ragazzi deceduti per queste patologie (5, 3).

Negli ultimi anni alcuni studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che le aflatossine alterano l'attività dei macrofagi e delle cellule *natural killer*, e inibiscono la produzione delle interleuchine. L'attività immunosoppressiva delle aflatossine potrebbe concorrere all'aumento di malattie respiratorie letali nelle popolazioni che consumano alimenti contaminati da queste micotossine. La comprensione del ruolo delle aflatossine nelle patologie immunosoppressive nell'uomo è attualmente oggetto di studi sperimentali ed epidemiologici (6).

Gli studi di tossicità dello sviluppo hanno dimostrato che l'aflatoxina B_1 causa nella progenie del ratto riduzione dell'attività motoria e degenerazione della massa encefalica, riduzione di peso corporeo e malformazione di organi esterni e interni. Malformazioni fetali osservabili a carico del diaframma e dei reni sono state riportate anche per l'aflatoxina G_1 .

Ocratossine

Le ocratossine sono prodotte da specie di *Aspergillus*, e *Penicillium*. L'ocratossina A è la micotossina principale e può essere presente sia in alimenti di origine vegetale (cereali, legumi, caffè, uva e vino) che di origine animale. L'organo bersaglio della tossicità dell'ocratossina A è il rene; l'esposizione cronica causa nell'uomo la Nefropatia endemica dei balcani, una malattia caratterizzata da degenerazione dei tubuli prossimali, atrofia dell'epitelio tubulare e da fibrosi interstiziale. (2). L'attività tossica è dovuta alla capacità di questa micotossina di inibire la sintesi proteica, soprattutto nelle cellule renali (7). Sperimentazioni condotte con diversi modelli animali (roditori, suini, scimmia) hanno dimostrato che in relazione alla dose e alla specie animale, l'ocratossina A può causare effetti immunotossici ed epatotossici. Gli studi di cancerogenesi hanno indicato che questa micotossina provoca l'aumento dell'incidenza di adenomi e carcinomi renali nel ratto e nel topo, e di tumori epatici nel topo, di conseguenza la IARC ha inserito l'ocratossina A tra le sostanze del gruppo 2B, possibile cancerogeni per l'uomo (vedi Tabella 1) (4). Gli studi *in vivo*, condotti su diversi animali (roditori, pulcini, scimmia) hanno dimostrato che l'ocratossina A può indurre effetti teratogeni e fetotossici.

Fumonisine

Le fumonisine sono prodotte da funghi tra cui il *Fusarium Verticillioides* e il *Fusarium proliferatum* che possono infettare il mais. La fumonisina B₁ è il metabolita più tossico di questo gruppo di micotossine e si ritrova frequentemente negli alimenti e nei mangimi a base di mais (8).

La tossicità della fumonisina B₁ è dovuta alla sua capacità di inibire la sintesi degli sngingolipidi della membrana cellulare, che determina determina un'alterazione del ciclo cellulare, stress ossidativo nonché apoptosi e necrosi (9).

La fumonisina B₁ rappresenta un problema nel settore zootecnico, poiché è la causa eziologia di patologie specie-specifiche, quali la Leucoencefalomalacia equina, una sindrome neurodegenerativa letale, e L'edema polmonare nei suini (2).

Recentemente le fumonisine sembrano rappresentare un rischio emergente per la salute umana. Infatti, alcune indagini epidemiologiche hanno evidenziato un'elevata incidenza di questa neoplasia nelle popolazioni che abitano nelle aree geografiche in cui si verificano frequenti episodi di fusariosi del mais. Di conseguenza, sono necessari approfonditi studi di popolazione per definire il rischio cancerogeno associato all'esposizione alimentare a fumonisine.

Tricoteceni

I tricoteceni sono prodotti da diversi generi di funghi, tra cui *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichoderma* e *Cephalosporium* che si sviluppano soprattutto nei cereali. Al gruppo dei tricoteceni appartengono la tossina T2 e il deossinivalenolo i cui aspetti tossicologici rappresentano una emergenza attuale.

L'ingestione di alimenti contenenti tossina T2 può provocare la leucopenia tossica alimentare dell'uomo, una micotossicosi caratterizzata da sintomi progressivi, quali nausea, vomito, emorragie gastrointestinali, laringiti e faringiti necrotiche, infezioni sistemiche, ed

elevata mortalità (80% dei pazienti). Inoltre, la tossina T2 può alterare la funzionalità delle gonadi maschili e femminili, e causare dermatiti, stomatiti, fragilità capillare ed emorragie negli organi interni. La tossicità di questa micotossina è dovuta al suo complesso meccanismo d'azione: la tossina T2, inibisce la sintesi proteica e degli acidi nucleici e altera la funzionalità della membrana cellulare. L'insieme di questi effetti citotossici interferisce con la funzionalità dei tessuti in attiva proliferazione e in particolare con quelli ematopoietici e linfopoietici con conseguente eritropenia, leucopenia, discrasie ematiche e immunosoppressione.

Il deossinivalenolo può provocare la sindrome emetica che si manifesta con intensa emesi e rifiuto di assumere alimenti; parallelamente può anche indurre lesioni cutanee, leucopenia e immunosoppressione, effetti che comunque si verificano con una gravità inferiore rispetto a quelli determinati dalla tossina T2.

I potenziali effetti cancerogeni indotti dai tricoteceni non sono stati ancora completamente definiti, e di conseguenza la Commissione IARC ha incluso questa classe di composti nel gruppo 3 (vedi Tabella 1) (4).

Bibliografia

1. Wu F Mycotoxin risk assessment for the purpose of setting international regulatory standards. *Environmental Sci & Technology* 2004;38:4049-55.
2. Fung F, Clark RF. Health effects of mycotoxins: a toxicological overview. *J Toxicol* 2004;42:217-34.
3. Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1106-22.
4. <http://www.iarc.fr>.
5. Bottalico A. Micotossine. In: Cabras P, Martelli A (Ed.). *Chimica degli alimenti*. Padova: Piccin; 2004. p. 649-86.
6. Wild CP, Turner PC. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis* 2002;17:471-81.
7. Creppy EE, Chiarappa P, Baudrimont I, Borracci P, Moukha S, Carratù MR. Synergistic effects of fumonisin B₁ and ochratoxin A: are *in vitro* cytotoxicity data predictive of *in vivo* acute toxicity? *Toxicology* 2004;201:115-23.
8. <http://www.efsa.eu.int>.
9. Cetin Y, Bullerman LB. Cytotoxicity of *Fusarium* mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay. *Food Chem Toxicol* 2005;43:755-64.

PRIMA SESSIONE – II PARTE
Esperienze del settore
della produzione e della trasformazione

L'ESPERIENZA DI CONSERVE ITALIA SUL PROBLEMA MICOTOSSINE: PREVENZIONE, MONITORAGGIO E GESTIONE

Renzo Boni, Mirka Dalla Bella, Monica Monti, Sonia Portillo
Laboratorio Centrale Analisi, Conserve Italia, Bologna

Introduzione

La missione di Conserve Italia, azienda leader in Europa nel settore delle conserve di frutta, vegetali e pomodoro, ha come missione il consolidamento e il potenziamento della propria quota di mercato in Europa e la valorizzazione dei prodotti ortofrutticoli conferiti dalle cooperative socie.

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 e attivarsi adeguatamente puntando su prevenzione, monitoraggio e gestione.

Conserve Italia, società cooperativa agricola presente sul mercato con i principali marchi (Valfrutta, Yoga, Derby, Cirio), da anni ha intrapreso la strada dello "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.

È evidente che questa situazione, se da un lato risulta anomala nell'ambito delle multinazionali alimentari, dall'altro permette la gestione puntuale di tutta la filiera dal campo alla trasformazione, con conseguenze positive non solo per il controllo delle micotossine, ma anche per i residui di fitofarmaci e gli OGM. Il sistema qualità Conserve Italia governa attivamente tutte le fasi della filiera, dal socio produttore al consumatore, in tutti i punti indicati nel flusso della Figura 1.

All'interno del sistema qualità è attivo il laboratorio centrale analisi Conserve Italia, accreditato SINAL con n.363 dal 2001, che con uno staff di 9 persone altamente qualificate, produce circa 800.000 dati/anno, di cui circa 2/3 legati alla sicurezza. Sulla base della Tabella 1 il laboratorio ha validato i metodi di analisi per le micotossine, escludendo la M₁ in quanto il latte non è matrice di interesse e le T2 e HT2 che verranno validate il prossimo anno.

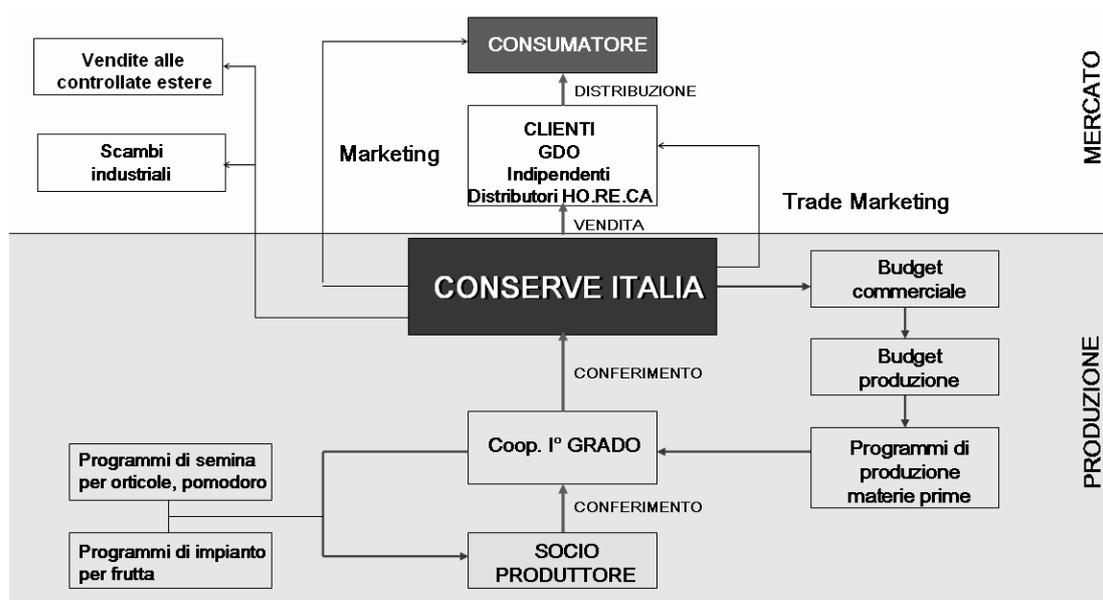


Figura 1. La filiera di Conserve Italia

Tabella 1. Principali micotossine e alimenti maggiormente interessati dalla loro contaminazione

Micotossina	Alimenti
Aflatossine B ₁ , G ₁ , B ₂ , G ₂	Cereali, semi oleaginosi, spezie, frutta fresca e secca
Aflatossina M ₁	Latte e derivati
Ocratossina A	Cereali, spezie, cacao, caffè, vino, birra
Zearalenone, fumonisine	Mais
<i>Fusarium</i> -tossine, deossinivalenolo, T2, HT2	Grano
Patulina	Succhi di mele, pere

Sistema qualità di Conserve Italia

Per il problema micotossine vengono individuate due matrici potenzialmente a rischio e indicate le relative attività che partono dal campo. Altre matrici in conferimento vengono gestite partendo dal fornitore:

– *Mais dolce*

Partendo dal concetto ovvio che più la pianta è in salute e più è ridotto il rischio micotossine, la prevenzione in campo viene effettuata seguendo i seguenti criteri:

- adeguate pratiche agronomiche,
- utilizzo di seme trattato con fungicidi,
- seme con alta germinabilità,
- genetica dotata di tolleranza ai funghi dei generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*,
- lotta alle infestanti,
- fertilizzazione adeguata,

- controllo insetti (piralide),
- mantenimento della coltura in condizioni di non stress attraverso irrigazioni mirate.

Per la raccolta, trasporto e trasformazione questi sono i punti di forza:

- i processi di insediamento dei funghi su carioidi danneggiate difficilmente hanno luogo su mais dolce in quanto la raccolta riguarda la spiga protetta dalle brattee,
- le carioidi selezionate dalle mufte manifestano cambiamenti di colore che le rendono facilmente individuabili dalle selezionatrici ottiche,
- le diverse micotossine hanno differenti gradi di solubilità e/o sensibilità alle alte temperature e il processing a cui è sottoposto il mais dolce in alcuni casi ne limita i problemi.

Il monitoraggio viene effettuato sulla granella e sul prodotto finito ricercando aflatoossine, ocratossina, fumonisine, zearalenone e DON. La gestione del prodotto in questo caso è molto semplice in quanto in caso di problemi riscontrati in campo, questo non viene raccolto; la parte analitica è solo una conferma della corretta gestione della filiera. Se comunque dovesse presentarsi una non conformità, il prodotto è ancora in stabilimento e viene bloccato.

– *Mela e pera*

Anche per la frutta vale il principio della salute della pianta mediante:

- coltivazioni dedicate alla trasformazione industriale
- programma di interventi fitosanitari secondo i principi della lotta integrata

La prevenzione continua inoltre nella raccolta e trasformazione mediante:

- raccolta effettuata al giusto grado di maturazione
- stoccaggio della frutta a 0°C
- cernita manuale della frutta con eliminazione dei frutti marci o ammuffiti
- pastorizzazione e stoccaggio della purea in asettico.

Il monitoraggio avviene sulla purea con la ricerca di patulina e aflatoossine.

Anche in questo caso il controllo analitico è solo una conferma della corretta gestione della frutta che, se evidenzia problemi in campo, non viene raccolta.

Se comunque il monitoraggio dovesse presentare delle non conformità, la purea è ancora in stabilimento e viene bloccata.

Per gli altri prodotti in conferimento che potenzialmente presentano il rischio micotossine, come ad esempio legumi secchi, spezie, frutta secca, farine, il sistema qualità agisce secondo i seguenti punti:

- prevenzione del problema mediante una attenta valutazione e qualificazione del fornitore
- monitoraggio delle partite in arrivo con analisi mirate
- rifiuto della merce in caso di non conformità

Sistema qualità del laboratorio

L'attività di monitoraggio effettuata dal laboratorio deve basarsi su rigorosi criteri di qualità del dato. È per questo motivo che il laboratorio dal 2001 ha raggiunto l'accreditamento SINAL, ora UNI CEI EN ISO/IEC 17025, inserendo tra le prove anche quelle relative ad aflatoossine e patulina. Le metodiche utilizzate prevedono per la patulina un'estrazione liquido/liquido con acetato di etile e rivelazione in HPLC/UV in fase inversa (metodo della *Association of Official Analytical Chemists, AOAC*) (1), per aflatoossine, zearalenone, ocratossina, fumonisine e DON un'estrazione con solvente e purificazione con colonnine di immunoaffinità, rivelazione in

HPLC/UV/FL in fase inversa con derivatizzazione pre-colonna con OPA per fumonisine (2), post-colonna con cella Kobracell per aflatossine (3). I criteri di rendimento dei metodi devono corrispondere a quanto indicato nel Reg. (CE) n.401/2006 del 23/02/06 (4) di cui si riportano gli estremi nella Tabella 2.

Tabella 2. Criteri di rendimento Reg. (CE) n. 401/2006 del 23/02/2006

Micotossina	Intervallo di concentrazione (µg/kg)	CV%	Recupero (%)
Aflatossine, ocratossina	< 1	40	50-120
Fumonisine	> 500	20	70-110

Si riportano i dati di controllo qualità dei metodi nelle Tabelle 3, 4 e 5. I calcoli sono stati effettuati su almeno 10 prove, e i risultati rientrano nelle specifiche richieste, tranne il dato del recupero sull'aglio che, collegato con un ottimo CV, è stato considerato conforme.

Tabella 3. Dati di controllo di qualità sulla aflatossine nelle diverse matrici

Matrice micotossina	Xm (µg/kg)	DS (µg/kg)	U(y) (µg/kg)	CV%	REC% medio	DL (µg/kg)
Mais						
G2	0,41	0,060	0,049	14,6	66,8	0,2
G1	2,19	0,270	0,217	12,3	71,7	0,3
B2	1,47	0,185	0,156	12,6	74,8	0,2
B1	5,14	0,785	0,592	15,3	81,2	0,3
Aflatossine totali	9,01	1,193	0,943	13,2	72,5	1
Legumi secchi						
G2	0,37	0,035	0,037	9,3	62,3	0,2
G1	1,29	0,069	0,091	5,4	65,3	0,3
B2	0,36	0,027	0,031	7,5	64,9	0,2
B1	1,39	0,074	0,098	5,3	65,0	0,3
Pera						
G2	0,35	0,008	0,020	2,3	59,6	0,2
G1	1,31	0,028	0,072	2,1	67,1	0,3
B2	0,36	0,010	0,020	2,7	64,7	0,2
B1	1,40	0,034	0,079	2,4	66,5	0,3

Tabella 4. Dati di controllo di qualità su patulina e ocratossina a diversi livelli di concentrazione

Matrice	Xm (µg/kg)	DS (µg/kg)	U(y) (µg/kg)	CV%	Rec% medio	DL (µg/kg)
Determinazione di patulina						
Mela	30,2	2,81	3,0	9,3	61,3	10
Mela	84,8	7,08	7,3	8,4	85,0	10
Pera	29,7	5,18	5,4	17,4	61,4	10
Pera	214,3	12,77	15,9	6,0	71,5	10
Determinazione di ocratossina						
Mais	3,97	0,079	0,218	2,0	79,7	1,5
Farina 5 cereali	5,91	0,425	0,488	7,2	116,2	1,5
Borlotti	8,39	0,982	0,981	11,7	102,9	1,5
Aglio	7,54	0,400	0,530	5,3	148,7	1,5

Tabella 5. Dati di controllo di qualità di zearalenone, DON, fumonisina a diversi livelli di concentrazione

Matrice	Xm (µg/kg)	dev std (µg/kg)	U(y) (µg/kg)	CV%	Rec% medio	DL (µg/kg)
Determinazione di zearalenone						
Mais	39,6	3,9	4,1	9,9	79,6	20
Mais	87,9	6,6	7,4	7,5	83,6	20
Determinazione di DON						
Mais	308,4	59,16	51,99	19,2	78,2	200
Determinazione di fumonisina						
Mais	165,4	17,36	17,74	10,5	68,6	200

La verifica continua del rendimento analitico viene effettuata con la partecipazione a ring-test, prove di recupero e ripetibilità. Nella Tabella 6 viene riportato il piano di monitoraggio dal 2002 a settembre 2006 nel quale si evidenzia l'attenzione di Conserve Italia per il controllo delle micotossine. Si ricorda che il campionamento dei materiali viene sempre effettuato in conformità al Reg. (CE) n. 401/2006 (4).

Tabella 6. Numero di analisi effettuate su micotossine

Tossina	Matrice	2002	2003	2004	2005	2006*
Aflatossine	<i>legumi secchi mais e orzo farine frutta secca puree di frutta</i>	–	–	213	166	179
Patulina	<i>nettari di frutta concentrati di frutta puree di frutta</i>	128	74	160	128	82
Ocratossina	<i>legumi secchi grano e farine mais</i>	–	–	–	36	41
Zearalenone	<i>mais</i>	–	–	–	13	18
Fumonisinina	<i>mais, legumi secchi</i>	–	–	–	–	17
Don	<i>mais, legumi secchi</i>	–	–	–	–	17

* per il 2006 fino a settembre

Risultati e conclusioni

I risultati delle analisi effettuati ad oggi ci confermano che il Sistema Qualità ha ottenuto quanto fortemente voluto, e cioè una situazione di non rilevabilità per tutte le analisi effettuate. Fa eccezione un'unica purea di mela in conferimento che presentava 20 ppb di patulina, inferiore comunque ai 50 ppb di legge. Questa è la dimostrazione che l'industria alimentare può e deve gestire al meglio il problema micotossine mediante un Sistema Qualità attivo e

strutturato, supportato da un controllo analitico governato da un robusto sistema di garanzia della qualità del dato.

Bibliografia

1. Patulin in apple juice. Liquid chromatographic method. Official Method 995.10. In: Horwitz W, Latimer GW (Ed.). *Official methods of analysis of AOAC International*. 18th edition. Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists International; 2005.
2. *Fumoniprep. Colonne di immunoaffinità per la fumonisina B1, B2 & B3. R-Biopharm RHÔNE*. Limidi di Soliera (Modena): Or.Sell Srl. Disponibile all'indirizzo: <http://www.orsell.it/public/FUMONIPREP.pdf>; ultima consultazione 22/10/07
3. *Aflaprep. Colonne di immunoaffinità. R-Biopharm RHÔNE*. Limidi di Soliera (Modena): Or.Sell Srl. Disponibile all'indirizzo: <http://www.orsell.it/public/AFLAPREP.pdf>; ultima consultazione 22/10/07.
4. Comunità europea. Regolamento (CE) n. 401/2006 della Commissione del 23/02/2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 70/12, 9.3.2006.

INDAGINE PLURIENNALE SULLA DIFFUSIONE DELLE MICOTOSSINE NELLE PARTITE COMMERCIALI DI MAIS

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

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

(b) *Associazione Interprofessionale Cerealicola, Bologna*

Introduzione

A partire dalla campagna di produzione 1999 la Regione Lombardia, come integrazione dell'attività Sic (Sperimentazione interregionale cereali), ha promosso con la Sezione di Bergamo del CRA (Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura) - Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura e successivamente con ASSINCER (Associazione Intersettoriale Cereali e altri seminativi) un'indagine conoscitiva sulla qualità delle partite commerciali (granella di mais condizionata e stoccata), con lo scopo di qualificare le partite *commodities* e di individuare criteri e specifiche per "comporre" anche in Italia partite a valore aggiunto (VEC, *Value Enhanced Corn*) riconosciute come *supercommodities* o *specialties* o *identity preserved*.

Nell'ambito di tale indagine sono stati misurati in termini di valori medi e di distribuzione di frequenza caratteri fisico-meccanici correlabili a conservabilità, integrità, omogeneità e valore d'uso delle partite, caratteri nutrizionali e caratteri di salubrità dei prodotti (presenza di antimetaboliti e micotossine). L'attività è proseguita, su richiesta dei settori produttivi, con una più precisa focalizzazione sull'aspetto micotossine attraverso i progetti Cerealomb e Pro.cla.ma, finanziati nell'ambito dei piani della ricerca 2003, 2004 e 2005 della Regione Lombardia. Tutto il lavoro è stato orientato sulle istanze dei produttori e realizzato con un forte sostegno operativo (in termini di campionamenti, analisi, interpretazione e utilizzazione dei risultati) da parte dei settori della filiera mais: associazioni dei produttori, società sementiere, AIRES (Associazione Italiana Raccoglitori, Essiccatori e Stocicatori di cereali e semi oleosi), consorzi agrari, UNIMA (Unione Nazionale Imprese di Meccanizzazione Agricola), CONFAI (Confederazione Agromeccanici), organizzazioni cooperative, associazioni granarie, molini a mais e utilizzatori finali. Si sono inoltre attivate sinergie con le iniziative interregionali collegate al Progetto SIC (reti di sperimentazione *on farm* sostenute dalla Regione Piemonte, da Veneto agricoltura e dall'Ente Regionale per i Servizi all'Agricoltura e alle Foreste - ERSAF Lombardia, con il progetto "Grandi colture") e con realtà regionali come il Servizio di Assistenza Tecnica agli Allevamenti (SATA) gestito dall'ARAL (Associazione Regionale Allevatori della Lombardia) della Regione Lombardia.

Scopi della ricerca

La scoperta dei metaboliti tossici dei funghi e l'indicazione di limiti cogenti o delle soglie di attenzione sono avvenute in corrispondenza del progresso scientifico e tecnologico; è atteso che

questi limiti possano considerarsi “revisionabili” di pari passo con il procedere delle conoscenze e i progressi delle tecnologie atte a valutare, controllare e contrastare la diffusione o l’effetto delle micotossine.

Gli effetti sulla salute attengono a valutazioni di tipo tossicologico-epidemiologico di competenza dell’autorità sanitaria; a monte, a livello della produzione e dell’autorità agricola, viene richiesto *in primis* la misura della reale diffusione delle tossine nelle derrate agricole, quindi criteri di previsione e metodi di prevenzione-contrasto in fase di coltivazione, stoccaggio e trasformazione e infine procedure di gestione delle micotossine come attività ordinaria e permanente in grado di separare e indirizzare le produzioni verso gli impieghi più vantaggiosi, salvaguardando gli utilizzatori, i produttori e l’economia generale.

Dal momento che i dati e le indicazioni da parte della produzione agricola italiana ed europea in generale erano frammentari e complessivamente sovvalenti nell’“istruttoria” del processo di valutazione rischi-benefici per l’adozione dei valori limite, lo scopo primario della ricerca è stato quindi l’ottenimento di dati complessivi circa la reale diffusione delle varie classi di micotossine nelle scorte di mais (partite commerciali di granella condizionata e stoccata) nazionale immesse sul mercato e ottenere alcune associazioni dei livelli di micotossine riscontrate con l’andamento stagionale e con alcuni determinanti climatico-ambientali delle macroaree di coltivazione padane. Di seguito vengono illustrati i risultati riguardanti la diffusione delle diverse micotossine nelle partite commerciali di mais.

Campionamento

Al fine di ottenere risultati il più possibile aderenti alla realtà della produzione maidicola italiana si è scelto preliminarmente di utilizzare gli impianti di essiccazione-stoccaggio quale sorgente dei campioni da analizzare. Si è creata quindi una rete di 50-70 impianti, stabile negli anni dell’indagine, individuati sulla base di: *i*) posizione geografica, per ottenere una distribuzione omogenea dei bacini di raccolta entro gli areali di produzione di Piemonte, Lombardia, Veneto, Friuli-Venezia Giulia, Emilia-Romagna; *ii*) dimensione, per includere nell’indagine impianti con diversa capacità di essiccazione giornaliera e di stoccaggio finale; *iii*) caratteristiche tecniche degli equipaggiamenti di ricevimento, condizionamento, movimentazione, screening e conservazione; *iv*) interesse all’indagine e capacità di collaborazione.

La quantità di prodotto complessivamente contenuta dalla rete degli impianti era di 8-900.000 t, pari a circa il 9% della produzione nazionale. Le produzioni di ogni impianto sono state virtualmente ripartite in lotti, che generalmente coincidevano con le unità di contenimento (silos e platee) e, in aggiunta, con partite variamente differenziabili attraverso i flussi produttivi (raccolte di inizio-fine stagione, rilocazione da altri impianti), con prodotti volontariamente segregati per caratteristiche “native” o con prodotti a destinazione predefinita. Dai lotti così individuati sono stati ricavati i campioni per le analisi utilizzando metodi di campionamento dinamico: da prodotto in movimento, durante le operazioni di carico degli autotreni in uscita o in occasione delle movimentazioni interne (dall’essiccatoio ai silos, dai silos alle platee, ecc.), è stato derivato un campione globale di 8-20 kg da cui, con metodi di *sample sorting*, è stato ottenuto un campione di 1,5-2 kg per il laboratorio di analisi. Da ciascun centro di stoccaggio sono stati prelevati mediamente 8-12 campioni contrassegnati con un codice identificativo anche dell’anno e della zona agraria di provenienza.

Campioni e le analisi

Sono stati mediamente sottoposti ad analisi 2-8 campioni semplici o coacervati provenienti da ciascuno dei 60 impianti della rete per un totale di 320-350 campioni per anno e di 1700 campioni nel quinquennio.

Ogni serie di campioni è stata analizzata per il contenuto di aflatoossina B₁, fumonisina B₁ e Deossinivalenolo (DON) e inoltre per il contenuto di zearalenone (156 campioni coacervo della produzione 1999) e di ocratossina A (252 campioni della produzione 2003 e 332 campioni della produzione 2005).

Le analisi sono delle serie 1999, 2000 e 2003 sono state condotte con metodi ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) presso i laboratori accreditati di società sementiere (serie 1999-2000) e dell'AGER (Associazione Granaria Emiliana Romagnola) di Bologna e dell'ARAL di Crema (serie 2003).

Le analisi del contenuto in DON e ocratossina delle serie 2004 e 2005 sono state effettuate con metodo ELISA rispettivamente presso i laboratori AGER di Bologna e dell'Associazione Granaria di Milano. Infine, le analisi per il contenuto in fumonisina B₁ e aflatoossina B₁ delle serie 2004 e 2005 sono state realizzate con metodo fluorimetrico dal laboratorio dell'Associazione Granaria di Milano.

Una quota variabile dal 7 al 10% dei campioni di ogni serie è stata utilizzata per procedure di *ring-test* effettuati con metodi HPLC presso gli stessi laboratori e presso laboratori terzi.

Nel corso dell'intera indagine sono state effettuate 5434 analisi utili; in Tabella 1 viene presentato il prospetto di campioni-analisi-anni.

Tabella 1. Numero di campioni e analisi effettuate nei 5 anni di indagine

Micotossina	1999	2000	2003	2004	2005	5 anni
Aflatoossina B ₁	323	360	310+131 ²	344	332	1359
Fumonisina B ₁	323	360	310+131 ²	344	332	1359
Deossinivalenolo (DON)	-	360	104	344	332	1140
Zearalenone (ZEA)	156	-	-	-	-	156
Ocratossina A	-	-	121 ¹ +131 ²	(344) ³	332	676
totale analisi						5434

1= campioni coacervo ottenuti riunendo campioni di più partite

2= campioni coacervo da campo, derivati dalla rete di sperimentazione *on farm* e ottenuti raggruppando 393 parcelloni elementari provenienti da 44 siti di sperimentazione

3= i risultati delle analisi sono stati scartati per incongruenze

Risultati

I valori di concentrazione per le diverse micotossine dei campioni di ogni serie sono stati raggruppati entro intervalli "notevoli" individuati anche sulla base dei valori limite indicati per le varie utilizzazioni; per ogni intervallo è stata quindi determinata la percentuale di campioni inclusi sul totale della serie.

I risultati vengono quindi presentati con istogrammi della distribuzione di frequenza per concentrazioni crescenti della tossina.

Aflatossina B₁

Nella Figura 1 vengono riportate la distribuzione media di frequenza per i diversi valori di concentrazione della tossina osservati in media nei 5 anni del monitoraggio (1999, 2000, 2003, 2004 e 2005). In tutti e cinque gli anni è stata registrata un'alta frequenza di campioni con concentrazioni nulle o basse (≤ 2 ppb, entro i limiti cogenti per la destinazione *food*): 87% nel 1999, 49% nel 2000, 72% nel 2003, 80% nel 2004 e 88% nel 2005. Diversa invece la distribuzione dei campioni con valori critici o molto critici di contaminazione (>20 ppb, limite cogente per l'alimentazione animale, e >50 ppb): praticamente assenti nel 1999 e 2000, costituivano l'11% dei campioni nel 2003 e poco meno del 6% dei campioni nel 2004, mentre nel 2005 erano pari al 2,7%. Particolare la distribuzione di frequenza osservata nel 2000, con una quota notevole di prodotto (circa il 50%) compreso tra 2 e 5 ppb.

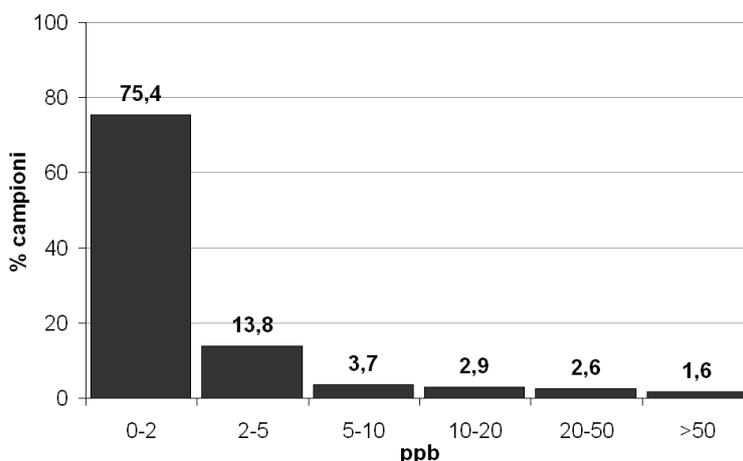


Figura 1. Aflatossina B₁ (1700 campioni, 5 anni di indagine): distribuzione di frequenza dei campioni per diversi livelli di contaminazione

Fumonisin B₁

La fumonisin, prodotta da *Fusarium verticillioides* (sinonimo di *F. moniliforme*), appare come la tossina più diffusa nelle nostre partite commerciali (Figura 2).

Pochissimi campioni tra i circa 1.700 raccolti sono risultati negativi all'analisi; nei cinque anni dell'indagine solo il 43% delle partite presentava concentrazioni inferiori al valore di 2000 ppb, proposto in sede europea come limite per l'utilizzo alimentare del mais grezzo. Anche considerando una concentrazione di 4.000 ppb, indicato come limite di attenzione negli Usa per la destinazione *food*, in media circa il 20% presentava concentrazioni di fumonisine superiori a tale limite. In anni particolarmente favorevoli allo sviluppo del fungo (2003) la quota di campioni con concentrazioni di fumonisin elevate, superiori a 4-6000 ppb, era pari a oltre il 50% dei campioni.

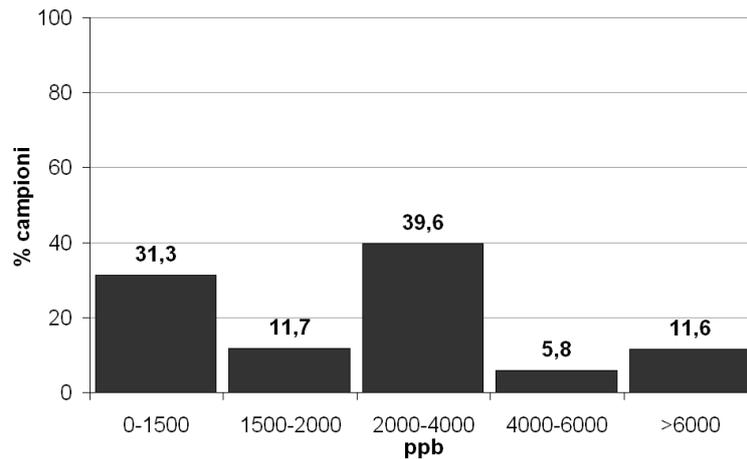


Figura 2. Fumonisin B1 (1700 campioni, 5 anni di indagine): distribuzione di frequenza dei campioni per diversi livelli di contaminazione

Deossinivalenolo (DON) e zearalenone (ZEA)

DON e ZEA sono micotossine prodotte da funghi appartenenti al genere *Fusarium* (principalmente *F. graminearum* e *F. culmorum*), ubiquitari nei nostri ambienti. Lo sviluppo di tali tossine avviene generalmente nelle aree di coltivazione più fresche, in corrispondenza di andamenti autunnali freddo-umidi, su colture che permangono a lungo in campo con elevata umidità della granella. ZEA è stato monitorato nel 1999, annata fondamentale favorevole alla coltura, con semine precoci, fioritura anticipata, periodo di accumulo lungo e raccolte effettuate in stagione: i livelli di tossina riscontrati (Figura 3) sono rimasti entro la concentrazione di 100 ppb (limite per cereali e derivati a destinazione food) nell'82% dei campioni esaminati.

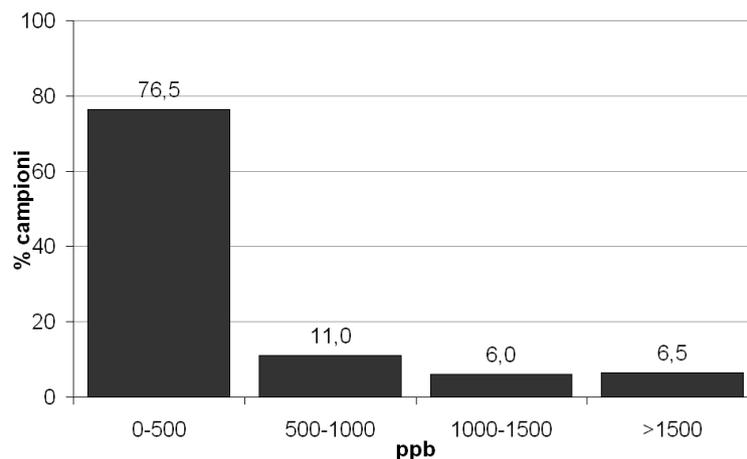


Figura 3. Deossinivalenolo (1140 campioni, 4 anni di indagine): distribuzione di frequenza dei campioni per diversi livelli di contaminazione

Il DON (Figura 3) è stato controllato in 4 anni: 2000, 2003, 2004 e 2005: in media, nei 4 anni di indagine, oltre il 75% dei campioni ha presentato concentrazioni della tossina ridotte (<500 ppb) e nel 94% dei campioni sono state registrate concentrazioni della tossina al di sotto del valore di 1.500 ppb, discusso dalle commissioni UE come limite per la destinazione *food*; la quota dei campioni oltre tale soglia è stata praticamente nulla nel 2000 e nel 2003, ridotta nel 2004 (6%) ed elevata nel 2005 (19%).

Ocratossina

L'ocratossina A è stata misurata nelle produzioni 2003 e 2005. In entrambe le annate, che sono state rispettivamente l'annata più calda e quella più fresca tra le cinque interessate dall'indagine, si è mantenuta nei limiti di 1 ppb in oltre il 70% delle partite campionate e nell'intervallo tra 1 e 5 ppb in un altro 21% dei campioni. Valori eccedenti la concentrazione di 5 ppm (limite europeo per i cereali non lavorati) non sono stati riscontrati nel 2005 e nel 2003 hanno interessato solamente il 4% nella produzione nel 2003. Tali dati indicano come tale tossina non desti particolare preoccupazione per la maiscoltura italiana.

Bibliografia

- Battilani P, Scandolaro A, Barbano C, Pietri A, Bertuzzi T, Marocco A, Berardo N, Vannozzi GP, Baldini M, Miele S, Salera E, Maggiore T. Monitoraggio della contaminazione da micotossine in mais. *L'informatore agrario* 2005;61(6):47-9.
- Pietri A, Bertuzzi T, Pallaroni L, Piva G. Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in Northern Italy. *Food Additives and Contaminants* 2004;21:479-87.
- Tanzi F. Funghi e micotossine su mais - Indagine Europea di Syngenta Seeds. In: *Atti della "Giornata del mais 2005"*, Bergamo, 26 gennaio 2005.
- Verderio A, Della Porta G, Valoti P, Corticelli C, Brugna E, *et al.* La diffusione delle micotossine nelle produzioni italiane di mais. *L'Informatore Agrario* 2005;10:47-51.

PREVENZIONE OCRATOSSINA A NEL CAFFÈ 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, Casalecchio di Reno (Bologna)*
(b) *Co.Ind, Castel Maggiore (Bologna)*

Introduzione

Il presente lavoro vuole portare un esempio pratico di gestione e prevenzione nei confronti del rischio di contaminazione da micotossine nei prodotti a marchio Coop. Dopo quanto illustrato nel I convegno del 2004 circa l'approccio di filiera adottato sui cereali, questa volta è l'occasione di prendere in considerazione i "coloniali" (nello specifico il caffè).

La contaminazione da ocratoossina A (da ora in poi OTA) negli alimenti è un problema che si presenta molto comune negli alimenti, causa il possibile sviluppo di muffe di genere *Aspergillus* e *Penicillium*. Tra le varie derrate soggette a potenziale contaminazione vi sono caffè e cacao.

La OTA è attualmente classificata dalla IARC (*International Agency for Research on Cancer*) come 2B (possibile cancerogeno per gli esseri umani). Inoltre, il profilo tossicologico include anche la teratogenesi, la nefrotossicità e l'immunotossicità (1).

Politica di Coop Italia di prevenzione

Coop è una delle maggiori società di distribuzione italiana di prodotti di consumo, strutturata in forma di associazione di consumatori, con vendite per 11300 milioni di euro/anno. È costituita da una rete di circa 175 cooperative locali sparse sul territorio italiano, per un totale di circa 6 milioni di soci, 1300 punti vendita e 55700 lavoratori dipendenti.

La "mission" di Coop è, a mezzo del profitto, la protezione e la convenienza per i consumatori.

Nel contesto della rete cooperativa, la Coop Italia rappresenta la centrale del marketing, operando sia nell'ambito dell'acquisto prodotti che della supervisione della qualità e della sicurezza (del proprio prodotto a marchio), facendo sì che vengano soddisfatti i cosiddetti "Valori Coop": buono, etico, sicuro, no OGM, ambientalmente sostenibile (2).

In fatto di gestione del rischio micotossine nei prodotti a marchio, vengono attualmente applicate le seguenti 2 condizioni di base *sine qua non*:

- 1) capitolati fornitori fissati al massimo del 50% dei limiti di legge per le micotossine;
- 2) approccio globale di filiera, dal campo allo stoccaggio.

Su alcune filiere, specialmente quelle che si snodano da paesi extra-EU (come cacao e caffè), sono emerse maggiori difficoltà di gestione, il che ha indotto a prendere contatti direttamente sul territorio d'origine, individuando aziende interessate ad un discorso collaborativo e cercando di sensibilizzarle sul tema.

L'attività di divulgazione (dell'impegno attivo in fatto di prevenzione micotossine) è un *must* per Coop, condotta per tutto il 2005 e il 2006, sia tramite partecipazione a convegni, sia

attraverso il mezzo stampa (3-6). La rivista "Consumatori" è l'organo di informazione ufficiale Coop, che viene inviata a tutti i soci ogni mese, e tramite questa è possibile tenere informati i consumatori sulle varie attività. Nel numero di novembre 2005 vi è comparso un esaustivo articolo divulgativo riguardo al controllo micotossine.

L'impegno di Co.Ind di prevenzione OTA

Co.Ind è produttore (7, 8) per svariate tipologie di prodotti a marchio Coop ed è attualmente caratterizzata dai seguenti requisiti:

- opera secondo sistema qualità certificato UNI EN ISO 9001:2000;
- è in fase di accreditamento sulle norme ISO 22000;
- è sublicenzataria Fair Trade;
- è certificata per produzione e commercializzazione di prodotti "bio";
- tratta prodotti certificati, secondo il disciplinare INEI (Istituto Nazionale Espresso Italiano);

L'impegno di Co.Ind in fatto di controllo della problematica ocratossina A sui propri prodotti, inizia già nel 1996, quando venne commissionata all'Università di Bologna un'indagine sul problema OTA nel caffè: vennero presi in considerazione vari parametri (attività dell'acqua, muffe, origine, dimensioni, chicchi danneggiati). Le conclusioni furono che i caffè dall'Africa erano maggiormente inquinati rispetto a quelli Sud Americani e che la criticità dipendeva dalla presenza di chicchi danneggiati, in quanto fungenti da "focolaio" di infezione, oltre che da specie.

Raffrontandosi con la legislazione specifica attualmente vigente, è significativo il fatto che la politica di miglioramento continuo, portata avanti in questi ultimi 10 anni da Coop Italia e Co.Ind, abbia trovato concrete conferme nelle recenti novità legislative 2005/2006:

- Reg.CE 123/2005
su tenori massimi ammissibili di OTA in alcuni alimenti;
- DM 20 aprile 2006 (Dir.2005/5/CE)
su campionamento e controllo OTA in alcuni alimenti (9).

Attualmente, le merceologie alimentari trattate da Co.Ind sono: caffè, infusi, cacao, e cioccolato. Dal punto di vista legislativo, queste 4 categorie sono normate in maniera differente. Nel 1999, l'introduzione in Italia della Circ. Min. San. 09.06.99 n. 10 ebbe, come conseguenza, la fissazione dei valori guida per le varie micotossine (inclusa la OTA), cosa che dette luogo ad un "giro di vite" in fatto di sicurezza.

Al presente, per i limiti max tollerabili di OTA sui "coloniali" vigono le seguenti limitazioni:

- per il cioccolato e caffè verde risulta ancora vigente la Circ. Min. San. 09.06.99 n. 10;
- per il caffè tostato e orzo vale il Reg. CE 123/2005;
- per il cacao vale la Circ. Min. San. 28.11.03 n. 6 (valida solo per l'Italia);
- per le piante infusionali (tipo liquirizia) non esistono normative specifiche, salvo le linee-guida EHIA (*European Herbal Infusions Association*), che rappresentano l'unico strumento attualmente disponibile per gestirne la sicurezza (10).

Caratteristiche del prodotto caffè e rischio OTA

La pianta del caffè appartiene alla famiglia delle Rubinacee, genere “Coffea” e predilige i climi caldi umidi (tropicali). Esiste sottoforma di 2 specie:

- *Arabica*
è la più diffusa, esiste nelle varietà Typica e Bourbon e costituisce il 75% dell’intera produzione mondiale di caffè. Cresce in montagna, è maggiormente soggetta a rischio malattie e possiede un aroma più delicato. Viene coltivata principalmente in Brasile e Centro-America;
- *Robusta*
cresce a bassa quota, è tendenzialmente meno soggetta a malattie e possiede un aroma più spostato verso l’amaro. Viene coltivata principalmente in Vietnam e Africa.

Tuttavia, in termini di contaminazione, in generale vale che la Robusta è mediamente più contaminata in OTA dell’Arabica e che gli Africani sono più contaminati degli Asiatici che a loro volta sono più contaminati dei Sud Americani.

In fatto di consumo nel mondo, è significativo tenere presente che il caffè occupa il secondo posto nel volume di scambi internazionali, ed è sotto la supervisione della ICO (*International Coffee Organization*). Il maggior consumo di caffè avviene in Europa, specialmente nei paesi nord-europei. Il consumo medio in Finlandia/persona è pari a circa 12 kg, contro il dato italiano fermo a circa 4,9 kg. Le importazioni vedono per l’Italia un ammontare di circa 324.000 t/anno (ma molto caffè viene esportato dopo la tostatura), contro quello per esempio della Francia che si attesta intorno alle 184.000 t/anno. Le preferenze differiscono da paese a paese. Qualche esempio: in Svezia viene decisamente gradita l’Arabica con tostatura *light* (bionda), mentre in Italia si registra una maggiore preferenza, seppur di poco, per la Robusta con tostatura più spinta (scura). In Francia prevale il discorso economico di promuovere in ogni caso la Robusta tramite detassazioni, causa produzione nelle ex-colonie. Le preferenze vanno anche riferite alle differenti modalità di preparazione della bevanda. Per esempio, mentre in Svezia è diffuso il metodo per percolazione/infusione (tipo caffè all’americana), in Italia esistono alcune varianti (espresso, moka, napoletana).

La lavorazione del caffè viene effettuata attraverso le seguenti varie fasi (11):

1) Fase di raccolta

risulta possibile secondo 2 modalità:

- *picking*: consiste nello staccare dalla pianta uno ad uno solo i frutti maturi, richiede molta manodopera ma risparmia i frutti non ancora maturi e semplifica le operazioni successive;
- *stripping*: significa scorrere sui rametti strappando i frutti senza selezionarli, diminuendo il costo della manodopera ma a cui devono seguire operazioni più laboriose;

2) Fase di depulpazione

può avvenire secondo 2 maniere:

- a secco (si parla di caffè naturali): usata soprattutto dopo lo *stripping*, prevede lo scorticamento della drupa, a cui poi seguono varie operazioni di eliminazione dei corpi estranei e la selezione dei chicchi in base alle dimensioni;
- a umido (si parla di caffè lavati): usata soprattutto dopo il *picking*, prevede dopo la decorticazione della drupa un passaggio di fermentazione di 2-3 gg in vascone d’acqua;

- 3) *Fase di essiccazione*
viene effettuata per esposizione al sole oppure in essiccatore;
- 4) *Fase di stoccaggio in silos*
prevede una ideale umidità relativa ambientale <50%;
Il prodotto finito che si ottiene è il cosiddetto “caffè verde”, che si presenta con un ideale contenuto di acqua pari a circa l’11-12%, e viene conservato in sacchi di iuta.
Il caffè lavato si distingue dal secco per il colore più intenso, tendente all’azzurro.
- 5) *Fase di tostatura*
rappresenta il processo finale, che avviene all’interno di tostatori (a tamburo od a letto fluido) a 200-240°C, ed è durante questo step che vengono indotte le decomposizioni di quelle molecole che danno luogo al tipico profilo aromatico del caffè.

Strategie di prevenzione: campionamento e analisi

A riguardo del rischio OTA su caffè e cacao, fin dal 1999 Co.Ind scelto la strategia di operare in termini di “valutazione preventiva” tramite il controllo sistematico di tutte le forniture in entrata: simile tipologia di contaminazione fungina, presenta una distribuzione cosiddetta “macchia di leopardo”, per la quale sorge la necessità di poter disporre di campioni rappresentativi della massa totale. Per tal motivo, Co.Ind ha messo a punto opportuni piani di campionamento, basati sul concetto di sotto-partita. Il controllo analitico è stato (ed è tuttora) affidato a laboratori chimici italiani validati, sottoposti a monitoraggio delle prestazioni tramite *ring-test* ufficiali e campioni civetta.

Nel 2001, si è arrivati all’ottimizzazione delle forniture, stabilendo accordi con i fornitori di materie prime secondo cui si richiede la preventiva prova di conformità come condizione di acquisto: il campionamento viene eseguito direttamente nei luoghi di arrivo della merce, a cui segue l’analisi e solo in caso di conformità della partita si procede all’acquisto.

In tal maniera è stato possibile eseguire una selezione e una qualifica dei fornitori e grazie a questa procedura le analisi sul prodotto finito si riducono a sole poche decine/anno. È attualmente in corso un’acquisizione di una mole di dati tale che, per il futuro, si prevede di riuscire a diminuire il numero dei campioni analizzati, passando a ragionare su base statistica per decidere l’accettazione delle partite.

In sintesi (12), la procedura di campionamento Co.Ind prevede le seguenti modalità di esecuzione:

- 1) a) per caffè in sacchi:
 - Suddividere il lotto di caffè in sub-partite da 300-320 sacchi;
 - Campionare il 20% dei sacchi da ogni bancale da cui sono costituite le sub-partite;
- b) per caffè in silos:
 - Impostare il campionatore automatico in modo da ottenere 1 kg di campione ogni 10000 kg di caffè trasferito;
 - oppure provvedere a fare manualmente il prelievo a cadenze definite;

Le operazioni successive sono poi le stesse in ambedue i casi:

- 2) Il caffè prelevato secondo le modalità sopra riportate, deve essere prima omogeneizzato, poi suddiviso in 3 aliquote (1 per Co.Ind, 1 per il fornitore, ed 1 da inviare al laboratorio analisi);
- 3) Co.Ind provvede ad inviare il campione al laboratorio;

- 4) Il controllo di qualità, dopo avere ricevuto il rapporto di prova del laboratorio, comunica all'ufficio acquisti se la partita è o no è idonea all'acquisto;
- 5) La procedura viene sottoposta a revisione almeno ogni 5 anni.

In totale, fra caffè e cacao (sia materie prime e sia prodotti finiti), il numero di controlli in OTA effettuati si aggira intorno ai 1000/anno circa (di cui circa 2/3 su caffè ed 1/3 su cacao)

Studio di Coop-Co.Ind sul caffè del Vietnam e il Progetto FAO TCP/VIE/2903

È opinione ormai ampiamente condivisa che la migliore prevenzione per il controllo dello sviluppo di micotossine sia l'”approccio di filiera”, e ciò vale naturalmente anche per la OTA.

In questo contesto, Coop persegue il fine ultimo di stilare un'apposita linea guida sul caffè per la prevenzione OTA. La base di fondo è costituita dall'esperienza acquisita da Co.Ind nel 2002 e dal successivo progetto FAO del 2003.

Infatti, nel 2002, Co.Ind ha avviato un'indagine conoscitiva sulla distribuzione della OTA nel caffè robusta vietnamita, analizzando campioni provenienti da produttori diversi e in momenti differenti rispetto alla raccolta. I risultati dimostrano che il punto critico è rappresentato dalla fase di lavorazione e di essiccazione del caffè verde.

Nell'anno successivo, è seguito in Vietnam anche il project TCP/VIE/2903 (13), finanziato dalla FAO, che praticamente persegue gli stessi fini del discorso avviato precedentemente da Co.Ind, e che si delinea nei seguenti 2 aspetti basilari, ovvero:

- Formazione degli operatori;
- Controllo analitico;

I primi risultati per la OTA, ricavati da analisi sulle piantagioni coinvolte nel progetto FAO TCP/VIE/2903, sono stati comunicati dalla FAO nel gennaio 2006, e si riferiscono al consuntivo di aprile 2005. Le indagini condotte si riferiscono a campioni estrapolati sia dal campo che dal magazzino, così da tenere sotto controllo la contaminazione dall'inizio alla fine della filiera. In sintesi (14):

a) *Fase 1*

⇒ analizzati 120 campioni lavorati a secco:

42 (cioè il 35% del totale) sono stati trovati positivi in un range 1-6 ppb di OTA;

b) *Fase 2*

⇒ analizzati 60 campioni, di cui 30 lavorati a secco e 30 lavorati a umido:

6/30 campioni processati a secco sono stati trovati ad 1 ppb almeno;

10/30 campioni processati a umido sono stati trovati ad 1 ppb almeno.

I dati disponibili “indicherebbero” (il condizionale è d'obbligo) quindi che la lavorazione ad umido presenta un maggior numero di campioni contaminati rispetto a quelli lavorati a secco, e che il caffè del Vietnam sia soggetto ad una contaminazione presente su circa il 30% del prodotto, in un range di 2-3 ppb.

Azioni da intraprendere nel futuro

Al presente, i dati dei controlli analitici aggiornati ad aprile 2006 non sono ancora stati resi noti. Inoltre, nonostante esplicita richiesta da parte di Coop-Co.Ind alle parti interessate, a tutt'oggi non sono ancora state rese note nemmeno le procedure scritte delle pratiche agricole adottate in Vietnam.

In conclusione, se fosse stato possibile disporre delle procedure attualmente in uso, si sarebbe già potuto procedere con una collaborazione alla ricerca delle soluzioni più opportune, che Coop intende comunque definire nel prossimo futuro.

Seguirà sperimentazione e verifica dei miglioramenti conseguiti dall'applicazione di linee-guida alle coltivazioni.

Bibliografia

1. Petzinger E, Ziegler K. Ochratoxin A from a toxicological perspective, *J Vet Pharmacol Therap* 2000; 23: 91-98.
2. Zucchi M. *Linea guida per la prevenzione del rischio micotossine*. Casalecchio di Reno: Coop Italia; 2005. Disponibile all'indirizzo: <http://www.e-coop.it/CoopRepository/COOP/CoopItalia/file/fil00000032619.pdf>; ultima consultazione 7/11/07.
3. Faenza C, Zucchi M, Casagrandi M. Prevenire il rischio micotossine nella filiera agroalimentare. *L'informatore Agrario* 2005;61(12):21-4.
4. Mazzini C. Stiamo lavorando per valorizzare il prodotto italiano. *Terra e Vita* 2005;14.
5. Zucchi M. Lotta alle micotossine dal campo alla tavola *Terra e vita* 2005;27.
6. Mazzini C, Casagrandi M. Grano duro: un progetto di filiera. *Terra e vita* 2006;6.
7. Battilani P. *Co.Ind: un successo costruito sulla diversità* Bologna: Il Mulino; 2001.
8. Rosa M. *Il caso Coop Industria*, Bologna: Istoa; 1986
9. Italia Decreto Ministeriale del 20 aprile 2006. Recepimento della direttiva 2005/5/CE della Commissione del 26 gennaio 2005, che modifica la direttiva 2002/26/CE della Commissione del 13 marzo 2002, relativa ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale del tenore di ocratossina A in taluni prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale*. n. 181, del 5 agosto 2006.
10. Kabelitz L, Sievers H. Contaminants of medicinal and food herbs with a view to EU regulations, *Innovations in food technology* 2004(nov):25-28. Disponibile all'indirizzo: http://www.phytolab.de/media/Phy_INFT.pdf#search=%22guidelines%20liquorice%20EHIA%22; ultima consultazione 13/10/06.
11. Odello L, Odello C. Espresso Italiano Tasting, *L'Assaggio* 2004;8.
12. Istruzione operativa interna Co.Ind 90IOR02 per il campionamento del caffè crudo, attiva dal 16 marzo 2006;
13. FAO. Improvement of Coffee Quality and Prevention of Mould Formation and Ochratoxin A: Contamination of Coffee in Vietnam” (FAO project TCP/VIE/2903). Disponibile all'indirizzo: <http://www.fao.org.vn/ShowE.aspx?ID=27>; ultima consultazione 7/11/07.
14. Nguyen Van Thuong, Tran Kim Loang, Phan Thanh Binh, Ha Thi Mao, Ho Thi Phuoc, and staff of WASI, Le Anh Tuan, Bach Than Tuan, Go Nuc Bin, Pham Van Tam and staff of CAFECONTROL. *Special R&D report on the FAO-Vietnam Coffee Project TCP/VIE/2903 (A)*. Bangkok: FAO Regional Office for Asia and the Pacific; 2006. Disponibile all'indirizzo <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/ag093e/ag093e00.pdf>; ultima consultazione 7/11/07.

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

Gruppo di Lavoro Micotossine:

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

(a) Dipartimento di Agronomia, Selvicoltura e Gestione del territorio, Università di Torino, Grugliasco (TO)

(b) Istituto di Scienze degli alimenti e della nutrizione, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza

(c) Dipartimento Territorio e Sistemi Agroforestali, Università di Padova

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

(e) AIREA (Associazione Italiana Raccoglitori Essiccatori Stocicatori), Treviso

Introduzione

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 del 6 giugno 2005), relative alla contaminazione da fumonisine dalla granella ai diversi prodotti derivati ad uso alimentare.

Oltre alle numerose indagini che forniscono un quadro della diffusione mondiale e locale della contaminazione della granella di mais da fumonisine, alcuni studi sono stati condotti per avere dati relativi al contenuto di tossine che si ritrova nei prodotti a seguito della lavorazione industriale (1-3). Questi lavori sono in grado di fornire alcune indicazioni su come agisce la lavorazione nel ripartire le tossine tra i prodotti e i sottoprodotti, ma la grande variabilità di lavorazioni possibili e conseguentemente la grande variabilità di prodotti finiti, rende necessarie ulteriori indagini sugli impianti di trasformazione presenti sul territorio nazionale. Ulteriore elemento da considerare con attenzione è la variabilità relativa alla metodica di campionamento adottata nel corso delle singole indagini.

In generale, il Reg. CE 856/2005 definisce tenori massimi ammissibili per le principali *Fusarium*-tossine nelle derrate alimentari a base di cereali. La normativa, secondo quanto indicato nel considerando 2, nasce anche dall'esigenza di garantire l'unicità del mercato. Alcuni stati membri hanno infatti fissato prima dell'entrata in vigore del regolamento comunitario, tenori massimi di queste tossine in taluni alimenti. Si è avuta quindi una situazione di disparità tra i tenori massimi autorizzati negli Stati membri, con relativo rischio di distorsione della concorrenza. 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 ripartizione 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.

Questa ricerca ha quindi come obiettivi principali: 1) la verifica di come le fumonisine si ripartiscono nei prodotti e sottoprodotti del mais ottenuti a seguito di trasformazione industriale; 2) l'ottenimento di dati rappresentativi ottenuti da diversi impianti di macinazione ma seguendo

una metodica unica rispondente alla normativa sul campionamento delle micotossine (Reg. 401/2006 del 23 febbraio 2006).

Materiali e metodi

Hanno partecipato al progetto 15 impianti con processi di trasformazione rappresentativi delle principali modalità di trasformazione ad uso alimentare. Gli areali di origine della materia prima sono stati Veneto, Friuli, Lombardia, Piemonte e alcuni areali maidicoli esteri. La quantità lavorata dagli impianti presi in esame è pari a circa 0,4 milioni di tonnellate annui, pari a circa il 90% del mais ad uso alimentare umano, fatta esclusione per la quota utilizzata dalle amidierie.

La metodica di campionamento, unica per tutti gli impianti e coordinata da un responsabile presente al momento del prelievo, ha previsto 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.

In generale, i prodotti campionati e la misura in cui ciascun sottoprodotto contribuisce alla composizione della cariosside sono le seguenti. Il germe, primo elemento separato dopo la rottura della granella, costituisce circa il 10% della cariosside; la resa in spezzati e/o grits e/o farine è di circa il 50-55%, mentre il restante 30-35% è costituito dalla farinetta, frazione che unisce il pericarpo della cariosside e la parte di endosperma che non è rientrata nella composizione delle farine ad uso umano.

La procedura seguita presso ciascun impianto ha previsto: 1) definizione dei prodotti da campionare e dei punti di campionamento; 2) valutazione degli intervalli per il prelievo dei campioni elementari in base al flusso di lavorazione e alla dimensione del lotto da campionare, sulla base dei quantitativi riportati nel Reg. 401/2006; 3) calcolo dei momenti di attesa per ogni punto di prelievo a partire dal momento zero, primo prelievo di granella non pulita, al fine di avere la migliore corrispondenza possibile tra la granella e le frazioni derivanti; 4) chiusura ed etichettatura del campione globale da consegnare al laboratorio di analisi; 5) creazione di un registro con i dati relativi al lotto campionato (denominazione impianto, data campionamento, elenco prodotti codificati, provenienza granella, resa di macinazione).

I campioni globali così prelevati sono stati consegnati al laboratorio di analisi dell'ISAN (Istituto di Scienza degli Alimenti e della Nutrizione) dell'Università di Piacenza. La procedura per ogni campione ha previsto la macinazione, necessaria per rendere uniforme la granulometria di tutti i prodotti, l'omogeneizzazione e l'analisi con metodica HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

Per esigenze di sperimentazione la scelta dei lotti non è stata casuale, ma sono stati scelti sia lotti ad alta sia lotti a bassa contaminazione da fumonisine. Di conseguenza, le contaminazioni medie riscontrate non si possono ritenere rappresentative delle produzioni 2005. Proprio per questa grande variabilità delle concentrazioni iniziali dei lotti, il confronto tra i dati è stato realizzato per mezzo dell'elaborazione di valori indice calcolati rispetto alla granella non pulita di ogni singolo lotto.

Gli impianti sono stati suddivisi secondo la tipologia dei prodotti finiti principali, individuando 3 categorie così definite e con i seguenti prodotti riportati secondo un ordine di granulometria decrescente:

- *spezzati*: spezzati grossi, medi o fini, farine fioretto e fumetto;
- *grits*: grits e fioretto;
- *bramate*: farine bramate, fioretto e fumetto.

Ciascun prodotto è caratterizzato da una precisa composizione granulometrica, descritta nelle Tabelle con i dati della contaminazione da fumonisine.

Risultati

L'analisi del processo di trasformazione è iniziata dalla prima fase della lavorazione, la pulitura. I risultati di questo insieme di operazioni, a cui è sottoposta la granella per arrivare ad ottenere la "granella pulita" che sarà poi oggetto di macinazione, sono riportati in Figura 1. Nel complesso, le cariossidi pulite hanno presentato una riduzione del contenuto in fumonisine pari a circa il 40%. Applicando questo tasso a granella contaminata con diversi livelli di fumonisine, al termine della fase di pulizia risulta una riduzione in valore assoluto consistente quando si parte da elevate contaminazioni, mentre se il processo inizia con bassi contenuti in fumonisine si riesce ad allontanare una quota minore di contaminante.

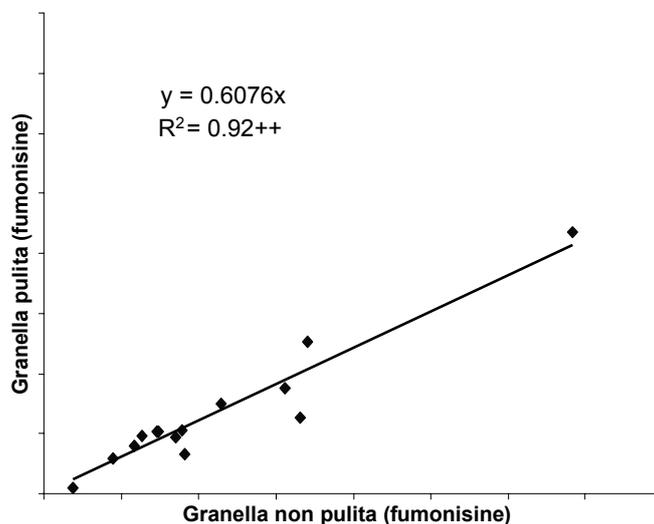


Figura 1. Correlazione tra la contaminazione da fumonisine della granella non pulita e della granella pulita

I dati di contaminazione da fumonisine sono stati utilizzati principalmente per definire coefficienti di ripartizione della tossina nei prodotti finiti in funzione del livello di contaminazione iniziale del mais.

Nel caso di impianti che commercializzano spezzati i risultati sono riportati in Tabella 1. Partendo dai due sottoprodotti, comuni a tutte le tipologie di impianti, il germe presenta un contenuto di fumonisine apprezzabile, pari al 71% del valore della granella intera non pulita. La farinetta risulta invece altamente contaminata, con valori che raddoppiano rispetto a quelli rilevati su mais. Questo prodotto è quindi quello che raccoglie le frazioni a maggiore contaminazione, quali pericarpo e parti farinose dell'endosperma. La separazione delle farinette,

e quindi delle porzioni della cariosside più contaminate, rappresenta quindi un vantaggio per gli altri prodotti ad uso alimentare in quanto le farine risultano decurtate di queste componenti ad alta contaminazione, e il loro livello di sanità migliora rispetto al prodotto di origine della trasformazione. Gli spezzati grossi e medi presentano infatti un contenuto di tossina pari al 10-12% di quella totale presente nella granella di origine, e lo spezzato fine, da cui poi derivano fioretto e fumetto, una contaminazione del 48%.

Nella stessa Tabella 1 sono riportati i valori indice della contaminazione calcolati rispetto alla granella pulita. In questo caso sono stati omessi i valori relativi alla farinetta, in quanto questa frazione contiene anche le frazioni che derivano dalla pulitura e quindi non può essere confrontata con la granella pulita.

Tabella 1. Contaminazione da fumonisine dei prodotti e sottoprodotti della lavorazione nel processo di produzione degli spezzati

Prodotto	Granulometria (micron)	Fumonisine B ₁ +B ₂ (%)	
Granella non pulita		100*	
Granella pulita		64	100**
Spezzato grosso	> 4000	12	19
Spezzato medio	2000-4000	10	16
Spezzato fine	1000-2000	48	75
Fioretto	350-500	37	58
Fumetto	< 350	90	141
Germe		71	111
Farinetta		219	

* Valore indice: granella non pulita=100

** Valore indice: granella pulita=100

Le considerazioni su germe e farinetta sono analoghe per gli impianti che producono grits (Tabella 2). In generale, i prodotti ad uso alimentare umano diretto hanno bassi contenuti in fumonisine rispetto al mais, ma soprattutto nelle frazioni a minore granulometria (200-400 micron) si rileva una presenza non trascurabile del contaminante (45%).

Tabella 2. Contaminazione da fumonisine dei prodotti e sottoprodotti della lavorazione nel processo di produzione dei grits

Prodotto	Granulometria (micron)	Fumonisine B ₁ +B ₂ * (%)	
Granella non pulita		100*	
Granella pulita		67	100**
Grits	250-1400	23	34
Fioretto	200-400	45	67
Germe		54	80
Farinetta		193	

* Valore indice: granella non pulita=100

** Valore indice: granella pulita=100

Considerando gli impianti produttori di bramate (Tabella 3), appare sempre più evidente la relazione esistente tra granulometria e contenuto in tossine. Nella frazione a minore granulometria, il fumetto, si rilevano i maggiori contenuti di fumonisine (61% rispetto la

contaminazione della granella). Al crescere della dimensione della frazione prodotta nel corso della macinazione si osserva invece un aumento della sanità. Le contaminazioni risultano infatti del 15, 22 e 61% rispettivamente nelle bramate, nel fioretto e nel fumetto.

Tabella 3. Contaminazione da fumonisine dei prodotti e sottoprodotti della lavorazione nel processo di produzione delle bramate

Prodotto	Granulometria (micron)	Fumonisine B ₁ +B ₂ * (%)	
Granella non pulita		100*	
Granella pulita		48	100**
Bramata	500-800	15	31
Fioretto	350-500	22	46
Fumetto	< 350	61	127
Germe		48	100
Farinetta		187	

* Valore indice: granella non pulita=100

** Valore indice: granella pulita=100

Discussione e conclusioni

Prendendo in considerazione le informazioni ottenute da questa indagine sulla ripartizione delle fumonisine nei prodotti e sottoprodotti, associate ai dati sulle rese relative alle singole tipologie di processo, si possono dedurre delle indicazioni sulla distribuzione delle fumonisine nella cariosside. In generale, circa la metà delle fumonisine presenti nella cariosside si trovano nelle frazioni esterne, con una quota rilevante anche nell'endosperma farinoso (Tabella 4). La frazione meno toccata dalla contaminazione risulta essere l'endosperma vitreo, che costituisce quasi la metà della cariosside nella maggior parte dei lotti esaminati.

Tabella 4. Bilancio di massa della contaminazione indice da fumonisine considerando le componenti della cariosside

Componenti della cariosside	Resa media (%)	Fumonisine B ₁ +B ₂ * (%)
Granella non pulita	100	
Germe	10	6-8
Pericarpo	9-10	46-50
Endosperma farinoso	30-36	31-42
Endosperma vitreo	39-47	6-11

* Bilancio di massa partendo dal valore indice: granella=100

I dati ottenuti trovano conferma in lavori condotti sempre a scala industriale da altri autori. In particolare, un'indagine condotta in Argentina da Broggi *et al.* (4) conferma sia la concentrazione delle fumonisine nel germe e nella crusca, sia la riduzione della tossina nelle farine secondo un gradiente legato alla granulometria. Lo stesso trend è stato rilevato da Brera *et al.* (5) in una prova condotta presso un impianto italiano utilizzando la metodica di campionamento prevista dal regolamento comunitario.

Questa ricerca si può considerare come il primo esame completo della produzione molitoria nazionale eseguito secondo le regole del campionamento ufficiale, applicate in tutti gli impianti da cui sono stati prelevati i campioni.

Al termine di questa prima fase della ricerca, si prospettano alcune azioni da intraprendere nel futuro: a) per approfondire la relazione tra il livello iniziale di contaminazione e la ripartizione delle fumonisine; b) per valutare interventi mirati sulle singole fasi del processo in grado di influenzare la stessa ripartizione. L'obiettivo principale di questi approfondimenti è quindi quello di ottimizzare il processo produttivo proprio in direzione di un aumento della qualità igienico-sanitaria dei prodotti ad uso alimentare umano diretto.

La ripartizione delle fumonisine nei prodotti, a conferma di quanto già presente in letteratura, è favorevole alla sanità dei prodotti ad uso alimentare umano quali farine per polenta o spezzati e grits usati per successive trasformazioni. Risultano invece svantaggiate le farinette ad uso zootecnico, la cui contaminazione è circa doppia rispetto al valore della granella di partenza trasformata. Gli stessi dati di ripartizione, letti come indici della posizione delle fumonisine nella cariosside, confermano la dominanza della tossina nelle porzioni superficiali (circa 60% nel e sul pericarpo) e la scarsa presenza nelle porzioni più interne e resistenti quali l'endosperma vitreo.

Bibliografia

1. FDA. *Background paper in support of fumonisin levels in corn and corn products intended for human consumption*. Rockville: U.S. Food and Drug Administration; 2001.
2. Katta SK, Cagampang AE, Jackson LS, Bullerman LB. Distribution of *Fusarium* molds and fumonisins in Dry-milled corn fractions. *Cereal Chemistry* 1997;74(6):858-63.
3. Reyneri A, Vanara F, Peila U, Bertetto L. Ripartizione delle micotossine (*Fusarium*-tossine) nei prodotti e sottoprodotti della lavorazione industriale del mais. *Tecnica Molitoria* 2004;10:957-66.
4. Broggi LE, Resnik SL, Pacin AM, Gonzalez HHL, Cano G, Taglieri D. Distribution of fumonisins in dry-milled corn fractions in Argentina. *Food Additives and Contaminants*, 2002;19(5):465-9.
5. Brera C, Debegnach F, Grossi S, Miraglia M. Effect of industrial processing on the distribution of fumonisin B₁ in dry milling corn fractions. *Journal of Food Protection* 2004;67(6):1261-6.

SECONDA SESSIONE
Impatto delle micotossine sulla filiera
agro-alimentare e mangimistica

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, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

Introduzione

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 aflatossine presenti negli alimenti e, quindi, il livello di contaminazione del latte.

Al fine di testare l'efficacia di un prodotto sequestrante e valutare, quindi, il grado di riduzione di conversione della aflatossina B₁ presente negli alimenti costituenti la razione in aflatossina M₁ nel latte bovino, è stata condotta una sperimentazione coordinata dall'Azienda Sperimentale Vittorio Tadini e dall'ISAN (Istituto di Scienza degli Alimenti e della Nutrizione).

Attraverso una prova di campo, svolta presso l'allevamento di bovine da latte dell'Azienda Agricola "Vittorio Tadini", è stata verificata l'efficacia di 3 diversi livelli di impiego del sequestrante Atox® (bentonite magnesica) per contenere la contaminazione da AFM₁ del latte, appositamente indotta attraverso l'impiego nella razione di mais farina naturalmente contaminato da AFB₁ (1).

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di poter fornire agli operatori tecnici del settore un mezzo efficace per contenere la contaminazione del latte, migliorare le produzioni quali-quantitative di latte e la qualità dei prodotti lattiero-caseari, rispettare i limiti di legge, garantire il rispetto della salute pubblica ed, infine, il benessere delle bovine da latte.

Materiali e metodi

È stata ricercata sul mercato una partita di mais granella contenente un determinato livello di micotossine, è stato prelevato un campione e poi analizzato per verificare il valore di aflatossina B₁ presente.

Per la prova di campo sono state selezionate 32 bovine da latte di razza Frisona Italiana in fase intermedia di lattazione, che sono state suddivise in 4 gruppi di 8 animali ciascuno, omogenei per numero di parti, peso vivo e produzione di latte.

Le vacche sono state allevate in due box contigui all'interno di una stalla a stabulazione libera, di tipo aperto ad ala semplice, con zona di riposo a cuccette.

Gli animali sono stati alimentati mediante tecnica *unifeed*, distribuita una volta al giorno all'interno di 24 mangiatoie individuali munite di un sistema computerizzato che consente

l'identificazione dell'animale (riconoscimento mediante *trasponder*) e permette di registrare, per ciascuna bovina, i valori di ingestione di alimento (g) nel corso delle 24 ore.

Le bovine sono state munte due volte al giorno in un impianto di mungitura dotato di sistema per il rilievo della quantità di latte prodotto dai singoli animali ad ogni mungitura. Grazie poi alla presenza, all'uscita della sala di mungitura, di una pesa elettronica con accesso a cancelli pneumatici e riconoscimento mediante *trasponder*, è stato registrato il peso vivo degli animali ad ogni mungitura.

Prima di iniziare la sperimentazione sono stati prelevati campioni di tutti gli alimenti impiegati nella formulazione della razione e sono stati analizzati presso i laboratori dell'ISAN al fine di determinare il contenuto in aflatossina B₁ in ciascuno di essi. Sulla base dei risultati è stata stabilita la quantità di mais contaminato da inserire nella razione.

Le 4 diete da testare sono state quindi formulate affinché venisse somministrato a ciascun animale, giornalmente, 2 kg di mais contaminato e 0 g (Dieta A), 60 g (Dieta B), 120 g (Dieta C) o 180 g (Dieta D) di Atox. Poiché l'efficacia del prodotto sequestrante è direttamente collegata alla possibilità di contatto con la tossina, prima di iniziare la sperimentazione, sono state accuratamente preparate 4 miscele tra mais e sequestrante (4 dosaggi).

Il disegno sperimentale era quello del quadrato latino, pertanto i 4 gruppi sono stati alimentati con ciascuna dieta per 10 gg.

La Tabella 1 mostra come sono state ruotate le diete nei 4 gruppi.

Tabella 1. Disegno sperimentale

Gruppo	I periodo 22/3/06-2/4/06	II periodo 3/4/06 – 12/4/06	III periodo 13/4/06 – 23/4/06	IV periodo 24/4/06 – 3/5/06
1	Dieta D (180 g Atox/capo/die)	Dieta A (Controllo)	Dieta B (60 g Atox/capo/die)	Dieta C (120 g Atox/capo/die)
2	Dieta C (120 g Atox/capo/die)	Dieta B (60 g Atox/capo/die)	Dieta A (Controllo)	Dieta D (180 g Atox/capo/die)
3	Dieta B (60 g Atox/capo/die)	Dieta C (120 g Atox/capo/die)	Dieta D (180 g Atox/capo/die)	Dieta A (Controllo)
4	Dieta A (Controllo)	Dieta D (180 g Atox/capo/die)	Dieta C (120 g Atox/capo/die)	Dieta B (60 g Atox/capo/die)

Nel corso di ciascun periodo sperimentale sono stati prelevati campioni rappresentativi di *unifeed* delle 4 diete che sono stati poi analizzati per determinare i valori di umidità e i contenuti in AFB₁.

Giornalmente sono stati monitorati per ciascun animale la produzione quantitativa di latte, l'ingestione alimentare e il peso vivo. Al fine, poi, di valutare la possibile comparsa di effetti indesiderati nel latte, sono stati effettuati prelievi di latte di massa da ciascun gruppo una settimana prima dell'inizio della sperimentazione (prelievo preliminare), il primo giorno di sperimentazione e l'ultimo giorno di ogni periodo di trattamento.

Tali campioni sono stati analizzati per determinare la composizione in grasso, proteine, lattosio, residuo secco magro, carica batterica totale, contenuto in cellule somatiche del latte, attitudine alla caseificazione (tramite il profilo LDG), contenuto di alcune vitamine (vitamina A, vitamina B12, vitamina E) e livello di contaminazione da parte di alcuni metalli pesanti, e precisamente di arsenico, cadmio, cromo, mercurio, nichel e piombo.

Risultati

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) (Tabella 2).

Tabella 2. Riduzione percentuale del contenuto in AFM₁ nel latte dei 4 gruppi sperimentali (%)

Gruppo	Dieta A Ctr	Dieta B 60 g Atox	Dieta C 120 g Atox	Dieta D 180 g Atox
1	0	22,8	71,9	77,2
2	0	5,9	35,3	70,6
3	0	22,5	40	60
4	0	10,2	53,8	43,6

Il passaggio di AFB₁ presente nella razione nel latte prodotto dalle bovine dei 4 gruppi in prova sotto forma di AFM₁ è variato notevolmente a seconda del gruppo di animali (Tabella 3).

Tabella 3. Contenuto in AFM₁ nel latte dei 4 gruppi sperimentali (mg/kg)

Gruppo	t=0	Dieta A (Ctr)
1	7	50
2	7	34
3	8	40
4	10	39

Occorre precisare, però, che si è scelto di testare il prodotto sequestrante con razioni contenenti un livello di contaminazione non molto elevato al fine di avere nel latte valori di AFM₁ che rientrassero nei limiti di legge stabiliti di valore massimo 0,5 ppb (2).

Le differenze nei valori di AFM₁ riscontrati nel latte prodotto dalle bovine dei 4 gruppi in risposta alla somministrazione della stessa dieta dipenderebbe dalla elevata variabilità individuale tra gli animali (3). La quantità di AFM₁ che può essere rinvenuta nel latte vaccino, in rapporto alla quantità di AFB₁ ingerita con l'alimento, presenta variazioni medie dallo 0.17 al 3%, con punte del 6% in funzione dei seguenti fattori: stadio di lattazione, livello produttivo, ingestione alimentare, entità del metabolismo, presenza di infezioni della mammella, livello di detossificazione a livello ruminale ed epatico, stato sanitario dell'animale.

La somministrazione a rotazione delle diverse diete alle bovine dei 4 gruppi non ha fatto registrare, invece, differenze degne di nota in termini di produzione quantitativa di latte (Tabella 4), d'ingestione alimentare (Tabella 5) e di peso vivo (Tabella 6). Tale risultato dipende dal fatto che il livello di contaminazione con aflatossine della razione non era così elevato da poter influenzare tali parametri produttivi.

Per quanto riguarda i parametri di composizione chimica, le differenze riscontrate dopo un periodo di somministrazione di 10 giorni non sono attribuibili all'utilizzo del sequestrante. Il tempo di coagulazione è risultato variare nei diversi gruppi in maniera indipendente dal tipo di dieta somministrata.

Tabella 4. Produzione quantitativa di latte (media \pm DS) dei 4 gruppi nei diversi periodi sperimentali (kg)

Gruppo	t=0	Dieta A Ctr	Dieta B 60 g Atox	Dieta C 120 g Atox	Dieta D 180 g Atox
1	29,3	28,43 \pm 1,52	28,31 \pm 1,46	27,62 \pm 1,66	28,85 \pm 2,21
2	29,5	29,73 \pm 1,56	29,81 \pm 1,82	30,41 \pm 1,91	29,47 \pm 1,49
3	29	27,63 \pm 1,08	28,83 \pm 1,53	28,58 \pm 1,57	28,08 \pm 1,67
4	28,3	28,45 \pm 1,84	26,81 \pm 1,73	25,42 \pm 1,72	26,54 \pm 1,41

Tabella 5. Ingestione alimentare media (media \pm DS) dei 4 gruppi nei diversi periodi sperimentali (kg di *unifeed* tal quale).

Gruppo	t=0	Dieta A Ctr	Dieta B 60 g Atox	Dieta C 120 g Atox	Dieta D 180 g Atox
1	43,12	48,95 \pm 5,73	50,53 \pm 6,09	49,84 \pm 5,95	47,29 \pm 10,08
2	45,15	46,63 \pm 8,54	49,58 \pm 5,92	46,09 \pm 9,17	46,95 \pm 6,48
3	38,97	46,91 \pm 5,21	43,20 \pm 9,31	45,36 \pm 4,96	43,47 \pm 10,51
4	42,64	44,14 \pm 10,62	47,56 \pm 7,07	46,54 \pm 8,63	48,32 \pm 6,27

Tabella 6. Peso vivo medio dei 4 gruppi nei diversi periodi sperimentali (media \pm DS)

Gruppo	t=0	Dieta A Ctr	Dieta B 60 g Atox	Dieta C 120 g Atox	Dieta D 180 g Atox
1	715,6	722,9 \pm 7,5	722,6 \pm 9,3	729,7 \pm 7,0	719,5 \pm 8,0
2	698	719,9 \pm 6,9	708,1 \pm 6,6	705,8 \pm 1,9	713,7 \pm 7,2
3	738	754,6 \pm 8,8	746,6 \pm 8,4	752,7 \pm 6,3	755,1 \pm 9,7
4	689,5	697,0 \pm 7,4	702,3 \pm 9,4	704,2 \pm 12,4	703,3 \pm 6,4

L'aggiunta del diverso dosaggio di sequestrante alla razione non ha determinato la riduzione di alcune vitamine normalmente presenti nel latte quali la vitamina A, la vitamina B12 e la vitamina E, e non sono stati influenzati nemmeno i livelli di contaminazione con alcuni metalli pesanti quali arsenico, cadmio, cromo, mercurio, nichel e piombo.

Conclusioni

I risultati mostrano una ottima efficacia dell'attività sequestrante del prodotto testato e l'assenza di effetti negativi sulle performances produttive e sulla qualità del latte degli animali trattati rispetto al gruppo di controllo.

Bibliografia

Gaspari F, Piccaglia R, Borsari A, Tampieri A. Influenza del sequestrante "ATOX-bentonite" sulla riduzione di aflatossina M₁ nel latte. In: *I Congresso Nazionale "Le Micotossine nella filiera Agro-alimentare"*. Roma, 29-30 novembre 2004.

Regolamento (CE) n. 1525 del 1998 della Commissione del 16 luglio 1998 che modifica il regolamento (CE) n° 194/97 che stabilisce tenori massimi ammissibili per alcuni contaminanti presenti in prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale Comunità Europea* n. L201, 17 luglio 1998.

Veldman VA, Meijs JAC, Borggreve GJ, Heeres van der Tol JJ Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. *Anim Prod* 1992;55:163-8.

RUOLO DEL MINISTERO DELLA SALUTE NELLA GESTIONE DEL RISCHIO DA MICOTOSSINE IN ALIMENTI E MANGIMI

Silvio Borrello

Direttore Generale della Sicurezza degli Alimenti e della Nutrizione, Ministero della Salute, Roma, Italia

La normativa comunitaria in tema di igiene di alimenti e sicurezza alimentare, più comunemente nota come “Pacchetto Igiene”, stabilisce il cosiddetto approccio “dai campi alla tavola” perseguendo l’obiettivo dell’istituzione di un sistema di sorveglianza sull’intera catena alimentare a garanzia di un efficace tutela sanitaria del consumatore. Esso sancisce, in particolare, il controllo di filiera sulle fasi critiche sia del processo produttivo sia delle attività successive, ritenuto di maggiore efficacia rispetto alle preesistenti modalità di controllo sanitario.

Nel rimodulare il precedente approccio, la nuova legislazione alimentare, da un lato, introduce stabilmente il principio dell’analisi del rischio, processo costituito da un insieme di attività (valutazione, gestione e comunicazione) e finalizzato all’acquisizione di elementi e dati obiettivi che, sulla base dell’assioma che il “rischio zero non esiste”, permettano l’adozione di decisioni il più possibile ponderate. Dall’altro, distingue chiaramente i compiti e i ruoli dei diversi protagonisti nella filiera alimentare, in cui alla responsabilità primaria degli operatori del settore corrisponde un’analoga responsabilità delle Autorità di controllo, essenzialmente orientata alla verifica del rispetto della legislazione alimentare da parte dei primi.

Il Ministero della Salute è garante dell’applicazione uniforme dei principi comunitari su tutto il territorio nazionale e funge da anello di congiunzione tra le Regioni e la Comunità Europea ottemperando ai compiti della gestione del rischio affidategli dal legislatore comunitario.

Il controllo della contaminazione di alimenti e mangimi da contaminanti ambientali tra cui le micotossine è svolto dal Ministero della Salute mediante l’implementazione di Piani di controllo ufficiali e sistemi di allerta.

Annualmente il Ministero della Salute predispone ai sensi delle Direttive comunitarie 96/22/CE e 96/23/CE, di concerto con le Regioni e Province Autonome, con il Laboratorio Nazionale di Riferimento per i residui e gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali, il Piano nazionale residui che è un programma di sorveglianza e di monitoraggio della presenza, negli animali e negli alimenti di origine animale, di residui di sostanze chimiche che potrebbero essere dannose per la salute pubblica. Il PNR viene effettuato mediante l’analisi di campioni prelevati in fase di produzione primaria e interessa diversi settori produttivi: bovini, suini, ovicaprini, equini, volatili da cortile, conigli, acquacoltura, selvaggina, latte e uova e miele. I campionamenti vengono effettuati a livello di allevamento e negli stabilimenti di prima trasformazione, come macelli e centri di raccolta del latte. Le molecole da ricercare sono distinte in due grandi categorie: A – sostanze ad effetto anabolizzante e sostanze non autorizzate e B – medicinali veterinari e agenti contaminanti. Le micotossine rientrano quindi nella categoria B e in particolare tra queste vengono ricercate la aflatoxina M₁ nel latte e l’aflatoxina B₁ nei mangimi destinati all’alimentazione animale. Dai risultati dei campionamenti di latte ottenuti dal PNR nell’anno 2004 sono state riscontrate 172 non conformità per aflatoxine M₁, pari al 4,2% dei campioni esaminati e nel 2005 ben 346 non conformità.

Il vasto numero di campioni non conformi emerso ha indotto il Ministero della Salute di concerto con le Regioni e Province autonome di Trento e Bolzano ad elaborare le Linee guida

per la predisposizione di Piani di prevenzione delle aflatossine nei mangimi, nel latte vaccino, bufalino e ovicaprino e nei prodotti a base di latte. L'obiettivo ultimo delle linee guida è un approccio diretto alla prevenzione più che alla repressione con l'attribuzione all'operatore del ruolo della sicurezza dei mangimi e alimenti. I piani di prevenzione dovranno essere basati sulla programmazione e il controllo ufficiale, ai sensi del Reg 882/2004, art 3 volte alla verifica dell'applicazione e dei risultati dell'autocontrollo.

In particolare i controlli ufficiali dovranno riguardare il settore dei mangimi (mangimifici, impianti di lavorazione e deposito dei cereali, di granella e farine), il settore lattiero-caseario (latte vaccino, ovi-caprino, bufalino: aziende di produzione, centri di raccolta, stabilimenti di trattamento e di trasformazione).

Nel corso dei controlli ufficiali dovrà essere posta particolare attenzione alla verifica del rispetto da parte degli operatori dei seguenti riferimenti normativi:

- Reg. 178/2002, art. 18: rintracciabilità di alimenti e mangimi in ingresso e in uscita;
- Reg. 178/2002, art. 19: ritiro/ricambio dell'alimento ritenuto non conforme ai requisiti di sicurezza e informazione delle autorità competenti;
- Reg. 852/2004, art. 4 e allegato I, parte A - produzione primaria: rispetto delle disposizioni legislative relative al controllo dei rischi nella produzione primaria, comprese, tra l'altro, le contaminazioni derivanti dai mangimi; le registrazioni di natura e origine degli alimenti somministrati agli animali e delle misure adottate per il controllo dei pericoli;
- Reg. 852/2004, art. 5 - produzione post-primaria: analisi dei pericoli e punti critici di controllo - procedure HACCP;
- Reg. 183/2005, art.5: settore dei mangimi - obblighi specifici per gli operatori;
- Reg. 183/2005, art. 6: settore dei mangimi - produzione post-primaria - procedure HACCP.

Analogamente al PNR anche nel settore dell'alimentazione animale il controllo delle micotossine viene svolto nell'ambito del Piano di vigilanza e controllo sanitario implementato su scala nazionale con l'obiettivo di garantire la salute umana, degli animali e delle piante in ottemperanza a quanto previsto dal D.Lgs 17 giugno 2003, n° 233 "Attuazione delle direttive 200/77/CE e 2001/46/Ce relative all'organizzazione dei controlli ufficiali nel settore della alimentazione animale" e dal Reg. (CE) 882/2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti.

In particolare vengono seguite per il controllo delle concentrazioni di micotossine nei mangimi le indicazioni stabilite dalla Raccomandazione 2005/925/CE la quale prevede che gli Stati membri debbano attuare un programma di controllo mirato a verificare le concentrazioni di micotossine e nella fattispecie l'aflatossina B₁, ocratossina A (OTA), zearalenone, Deossinivalenolo (DON), fumosine, tossine T-2 e HT. Il piano di sorveglianza prevede due criteri di campionamento uno casuale finalizzato alla valutazione della situazione epidemiologica, in impianti di produzione (impianti per mangimi a scopo commerciale, depositi e commercio all'ingrosso, di granaglie e mangimi, essiccatoi, importatori) e uno mirato sulle materie prime per mangimi in cui si ritiene possibile la presenza di elevate concentrazioni di micotossine.

Un livello alto di attenzione nei confronti delle contaminazioni da micotossine negli alimenti viene rivolto anche alle importazioni. I prodotti vegetali di importazione provenienti da Paesi extra-comunitari, infatti devono rispondere ai requisiti igienico-sanitari previsti nel territorio nazionale e comunitario. Il Ministero della Salute svolge il ruolo di indirizzo per gli aspetti tecnici e per la sicurezza di prodotti di origine vegetale e coordinamento della attività di controllo. La normativa sulla base di una analisi dei rischi, stabilisce dei limiti massimi per la presenza di numerosi contaminanti negli alimenti e detta le modalità per il campionamento e

l'analisi del prodotto. In particolare per le micotossine, tali modalità rivestono importanza sostanziale ai fini della significatività del risultato.

Gli Uffici periferici del Ministero della Salute esercitano un controllo all'importazione su tutte le partite di prodotti di origine animale e vegetale destinati alla alimentazione umana.

Il controllo, può essere di tipo documentale, di identità e o analitico a secondo della tipologia di merce, della provenienza e delle disposizione vigenti.

Il controllo è intensificato a seguito di segnalazioni specifiche di allerta circa una determinata contaminazione o situazione di pericolo. Il sistema di allerta comunitario è stato infatti istituito per notificare in tempo reale i rischi diretti o indiretti per la salute pubblica connessi al consumo di alimenti o mangimi. Il sistema è sotto forma di rete e vede la partecipazione della Commissione Europea e gli Stati membri dell'Unione. Le notifiche vengono quindi comunicate e condivise tra gli Stati Membri via rete, in tempo reale. La Direzione Generale della Sicurezza Alimentare e della Nutrizione del Ministero della Salute è il punto di contatto italiano per il sistema di allerta. L'attività del sistema di allerta prevede il ritiro di prodotti pericolosi per la salute umana o animale. Nel caso di rischio grave e immediato oltre al sequestro dei prodotti tramite l'intervento del Comando Carabinieri della Sanità e degli Assessorati Regionali, la procedura di emergenza può essere integrata con comunicati stampa. In questo modo vengono informati i cittadini sul rischio legato al consumo di un determinato prodotto.

Dall'analisi dei dati del primo Trimestre 2006 ottenuti tramite il sistema di allerta è emerso che i principali contaminanti chimici riguardano la presenza di micotossine (47,3%), e che tra le maggiori matrici coinvolte troviamo soprattutto la frutta secca (nocciole, fichi secchi, pistacchi, arachidi).

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 di Torino, Torino

Introduzione

La cerealicoltura avanzata, e tra questa, quella italiana ha recentemente conosciuto una rapida evoluzione che ha determinato una forte trasformazione dei sistemi produttivi, di quelli organizzativi e di mercato. Riassumendo si possono distinguere 3 diverse fasi: la prima è quella “produttiva”, dominante fino a tutti gli anni '80 quando il principale aspetto che contraddistingueva questa filiera era quello meramente produttivo, complice anche, in ambito UE, le regole interne di mercato che privilegiavano le rese; la seconda fase è quella definibile “agro-ambientale” che ha contraddistinto gli anni '90 e quelli immediatamente successivi, caratterizzata da un forte accento alle misure di mitigazione delle pratiche colturali ai fini del rispetto delle norme ambientali imposte in ambito comunitario; la terza e ultima fase è quella attuale definibile come “della qualità e sanità”. Non che prima di questo decennio le normative igienico-sanitarie non fossero presenti, ma tre condizioni sono divenute più pressanti ed hanno contribuito ad accentuare l'attenzione su questi aspetti: il sovvenire di emergenze sanitarie critiche e di rilevante impatto sui mercati agro-alimentari comunitari accomunato da una maggiore attenzione dei mercati e dei consumatori nei confronti della qualità dei prodotti alimentari; l'espansione del commercio internazionale e la necessità di dettare regole anche e soprattutto sulle caratteristiche dei prodotti commercializzati, ivi comprese quelle sanitarie; infine, la continua crescita di evidenze scientifiche che individuano e circoscrivono fattori di rischio che debbono essere controllati e ridotti.

I cereali, indipendentemente dalla coltura, sono stati sempre considerati delle commodities, ovvero delle materie prime indistinte soggette a differenziarsi soprattutto a seguito delle trasformazioni e degli impieghi alimentari. A seguito di questa rapida evoluzione, si è assistito ad un processo di canalizzazione delle produzioni attraverso filiere o sottofilieri separate, ovvero *identity preserved* con lo scopo rispondere a standard qualitativi e commerciali e, nel contempo, garantendo al minimo le commistioni.

In questo nuovo scenario, il settore agro-industriale, ha dovuto fare fronte rivedendo in modo anche profondo le modalità produttive e organizzative e imponendo sistemi di controllo e qualità prima impensabili per dettaglio, capillarità di azione e reattività nei confronti delle non conformità. Questa revisione della produzione e dell'organizzazione è tutt'ora in corso e, per certi settori e alcune filiere cerealicole, si può dire sia appena iniziata. Le difficoltà incontrate sono di assoluto rilievo perché sconvolgono tradizionali sistemi produttivi, perché impongono modificazioni delle pratiche anche profonde e di immediata rilevanza economica; inoltre, in molte circostanze l'adozione di standard qualitativi più elevati e stringenti comporta una notevole incertezza relativamente ai modi migliori con cui devono essere impostati i sistemi produttivi e organizzativi.

È questo il caso dell'introduzione delle norme igienico-sanitarie relative alla contaminazione da micotossine nei cereali, attinenti alle aflatossine (Reg. 466/2001) e alla *Fusarium*-tossine negli alimenti (Reg. 856/2005) e nei prodotti zootecnici (Racc. 576/2006). L'introduzione di limiti a questi contaminanti naturali ha comportato e comporterà un significativo aggiornamento

delle filiere sia quelle derivate dai cereali vernini (frumento tenero e duro, orzo), sia dei cereali estivi (mais e sorgo), mentre presenta un impatto minore sulla filiera risicola.

Lo scopo di questo lavoro è quello di individuare e tracciare i percorsi produttivi per il controllo della contaminazione da *Fusarium*-tossine nelle filiere maidicole destinate alla produzione di mais a fini alimentari o per il settore zootecnico, e di evidenziarne le criticità e le numerose difficoltà che si sono incontrate, nonché di mettere in luce i numerosi problemi ancora irrisolti.

Contaminazioni e problemi normativi

L'entità del problema da affrontare può essere espresso dalla distanza che separa la situazione attuale da quella obiettivo. Nel caso delle *Fusarium*-tossine, la gravità della situazione e le misure da adottare sono ben inquadrabili esaminando la percentuale di campioni di granella di mais che presentano una concentrazione di fumonisine superiore a quelle obiettivo.

Utilizzando le informazioni derivate dalle ricerche e dalle indagini fino ad ora impostate in Italia su questo aspetto e pur considerando le disparità dei metodi impiegati per la raccolta e l'analisi dei campioni tra le diverse indagini, emerge un quadro di notevole gravità (Tabella 1). Infatti, da queste indagini emerge come in media solo il 40% circa dei campioni di granella di mais si colloca al di sotto del valore massimo (2000 ppb) ammesso a tutt'oggi dalla normativa relativa alle fumonisine e che questo valore oscilla a seconda delle annate dal 26 al 72%. Considerando però una soglia prudenziale, più sicura per l'operatore (1500 ppb), la percentuale di campioni in grado di collocarsi al di sotto scende al 30%.

Tabella 1. Fumonisine: grado di contaminazione del mais da granella nazionale riscontrato in alcune indagini

Soglia	Fumonisina	Media campioni %	Fonte
< 1000 ppb	B ₁	30,1 (16,1 - 45,2)	In 3: Pietri <i>et al.</i> (2004)
< 1000 ppb	B ₁	26,0 (20,4 - 31,5)	In 4: Battilani <i>et al.</i> (2005)
< 1500 ppb	B ₁	35,9 (15,8 - 55,6)	In 5: AA.VV. (2005)
< 2000 ppb	B ₁	48,1 (21,3 - 74,3)	In 5: AA.VV. (2005)
< 1500 ppb	B ₁	54,9 (22,0 - 78,1)	In 6: AA.VV. (2004)
< 2000 ppb	B ₁	66,4 (33,3 - 90,6)	In 6: AA.VV. (2004)
< 1500 ppb	B ₁ + B ₂	26,5 (9,5 - 60,0)	In. 7: Tanzi (2005)

Anche se la normativa comunitaria entrerà in vigore nel 2007, altri stati comunitari e non, ad esempio la Germania, hanno già posto soglie per le *Fusarium*-tossine anche più severe, vincolando così l'esportazione dei nostri lavorati e dei prodotti finiti.

È quindi evidente che i percorsi colturali che portano alla produzione della granella di mais, sono già oggi inadeguati, di fronte a condizioni ambientali assai favorevoli alle fusariosi della spiga (1). Infatti, negli areali maidicoli italiani le condizioni climatiche sono particolarmente

favorevoli allo sviluppo del marciume rosato causato principalmente da *Fusarium verticillioides* produttore delle fumonisine (2).

Guidare il processo produttivo di filiera

Per arrivare alla produzione di granella conforme è quindi necessario un grande sforzo da parte di tutti i soggetti della filiera perché si attui la filiera del mais alimentare distinta da quella di base, ovvero orientata a produzioni eminentemente destinate alla zootecnia.

La costruzione di una filiera dedicata richiede particolare attenzione alla produzione primaria in campo, seguita dalla fase di concentrazione e stoccaggio per gli aspetti organizzativi della gestione della formazione di partite omogenee e caratterizzate.

Le considerazioni sui percorsi produttivi in campo derivano dalle ricerche svolte nel periodo 1996-2006 su campioni di granella di mais raccolte alla consegna presso il centro di essiccazione o l'industria molitoria. Sono sintetizzati i dati derivati dalle raccolte presso 12 centri di essiccazione in 6 province (AL, CN, CR, PN, TO, VE), e presso 4 mulini; sono stati considerati i risultati ottenuti a seguito dell'adozione di 6 diversi disciplinari di produzione.

In campo

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 di attenzione "basso", "intermedio" e "alto", a cui si possono aggiungere ancora una serie intermedia di livelli a seconda delle circostanze (8). Al livello basso di attenzione, il processo produttivo in campo si differenzia marginalmente da quello ordinario per le produzioni zootecniche (Tabella 2): infatti, il solo requisito richiesto è l'epoca di raccolta della granella che deve essere tempestiva con granella a umidità superiore al 22-24%.

Tabella 2. Percorsi produttivi in campo per il mais da granella alimentare: criteri per livelli progressivi di attenzione

Criterio	basso	Livello di attenzione			
		si/no	si	si	alto
Contratto di coltivazione	no	si/no	si	si	si
Fase di coltivazione					
- Epoca di raccolta	X	X	X		
- Tipologia di ibrido			X	X	
- Ibrido					X
- Trattamento piralide		X	X	X	XX
- Epoca di semina			X	X	X
- Modalità di semina				X	X
- Separazione capezzagne				X	X
- Umidità alla raccolta				X	XX
- Macchina di raccolta					X

Al livello immediatamente superiore di attenzione si inserisce il controllo della piralide del mais (*Ostrinia nubilalis*) che con la produzione di rosure aumenta la suscettibilità al marciume rosato (9). In questo caso lo sforzo organizzativo cresce implicando una separazione di

produzioni che giungono contemporaneamente alla maturazione e, sovente, la predisposizione di contratti preventivi. Al livello intermedio di attenzione si inserisce la tipologia dell'ibrido, intesa per i 2 aspetti della precocità del ciclo e della compattezza della granella, e della definizione di una data entro la quale le semine debbono completarsi; la definizione dei 2 aspetti non può essere disgiunta dal momento che semine inopportune vanificano i vantaggi ottenuti con un ibrido dal ciclo equilibrato.

I successivi livelli più alti di attenzione definiscono in modo puntuale l'ibrido, l'investimento alla semina e, infine, l'umidità minima della granella alla raccolta; proprio quest'ultimo aspetto e il trattamento insetticida possono essere più strettamente definiti nelle loro applicazioni per creare le condizioni più sfavorevoli alla proliferazione del marciume (10).

Nel post-raccolta

La cura del processo di produzione in campo deve essere necessariamente seguita nella fase di post-raccolta, ovvero dal trasporto al centro di essiccazione allo stoccaggio di lungo termine. L'attenzione nel pre stoccaggio si incontra al livello inferiore di attenzione (Tabella 3); infatti, la riduzione della permanenza in cumulo del mais verde (limitata a 24-36 h) prima dell'essiccazione è il primo intervento per evitare il prolungamento delle condizioni favorevoli alla crescita delle muffe. La doppia pulitura e il controllo delle condizioni ambientali e della massa durante lo stoccaggio sono gli ulteriori elementi di attenzione (11).

Tabella 3. Percorsi produttivi in post-raccolta per il mais da granella alimentare: criteri per livelli progressivi di attenzione

Criterio	Livello di attenzione			
	basso	intermedio		alto
Fase di post raccolta				
- Pre stoccaggio	X	X	X	XX
- Pulitura ripetuta		X	X	XX
- Stoccaggio controllato			X	X
Selezione				
- in campo				X
- alla consegna			X	X
- allo stoccaggio				X

L'attenzione prestata al processo produttivo in campo e successivamente nel post-raccolta non è di per se una garanzia che assicuri bassi valori di contaminazione rispondenti agli obiettivi normativi.

Infatti, le condizioni meteorologiche, l'applicazione spesso imperfetta delle tecniche colturali, l'eterogeneità dei suoli e degli ambienti, danno luogo ad una contaminazione finale con notevoli margini di variabilità e incertezza. Pertanto, nell'ottica di una filiera controllata, assume un fondamentale significato il controllo e la selezione delle partite, al fine di isolare quelle comunque più contaminate, separandole dalle migliori.

Per la selezione di queste partite è necessaria una fase di verifica del prodotto verde al momento della consegna al centro di raccolta prima dell'essiccazione. Questa analisi immediata delle impurità e del contenuto in micotossine consente la separazione immediata e la formazione di silos di categorie diversificate. Ulteriori momenti per la selezione possono attuarsi in campo a

partire dalla maturazione cerosa fino a quella fisiologica quando è possibile un controllo visivo sugli ammuffimenti, l'attacco di piralide e l'entità di altri stress. Infine, un controllo finale è possibile e opportuno sul prodotto immagazzinato al riempimento del silo, alla movimentazione della granella o al desolamento, sempre attuando campionature dinamiche. Quest'ultimo momento consente di verificare e confermare l'efficacia dell'attività selettiva prestata a monte dello stoccaggio e permette di ottenere dei dati di contaminazione impiegabili in sede di commercializzazione delle partite.

Discussione e conclusioni

Nei nostri ambienti, per la produzione di granella di mais alimentare i percorsi produttivi devono essere distinti da quelli del mais ad impiego zootecnico. Questa considerazione è ora evidente in base alle contaminazioni da *Fusarium*-tossine più frequentemente riscontrate in assenza di specifiche misure. Con un processo già in atto, le aziende agricole, i centri di raccolta e stoccaggio e l'industria molitoria devono predisporre e seguire processi produttivi dedicati. Tutto ciò comporta:

- la predisposizione di disciplinari per la produzione agricola ovvero codici di buone pratiche agricole (o GAP: good agricultural practices) e di gestione (o GMP: good management practices) da sottoscrivere in contratti che li riportano in dettaglio;
- il controllo e la verifica della loro corretta applicazione;
- il monitoraggio delle contaminazioni per selezionare le partite e per acquisire quelle informazioni necessarie a far crescere l'efficacia delle misure attuate e a correggere i percorsi produttivi quando gli esiti siano insoddisfacenti;
- la predisposizione di contratti che riconoscano la qualità del prodotto trasformandola in un premium price adeguato a stimolare gli attori della filiera.

Tralasciando l'industria dell'amido, quella molitoria tratta annualmente 715.000 t originate da circa 60.000 ha di mais da granella (12). Attualmente una superficie compresa tra 11.000 e 13.000 ha pari quindi a 20% di quella potenziale è soggetta a contratti specifici, mentre è molto superiore quella orientata, ovvero sottoposta a misure non ancora vincolanti. È difficile stabilire l'evoluzione futura, ma quello che appare certo è la sicura crescita della superficie a contratto. Questo andamento conferma il processo di canalizzazione delle produzioni in filiere identity preserved e dello sforzo di rispondere a standard più elevati, ma tale processo non è senza problemi e molto deve essere ancora compiuto. Infatti, i risultati ottenuti non sono sempre in linea con quelli attesi per cui è opportuno ricordare che i percorsi produttivi dedicati hanno come obiettivo quello di ridurre la probabilità di incorrere in inaccettabili livelli di contaminazione. Più precisamente, per aumentare la probabilità di ottenere risultati in linea con le attese, occorre considerare che:

- la scelta dei percorsi produttivi deve essere in relazione alla natura delle produzioni obiettivo (*hominy grits*, *grits*, farine) e delle loro destinazioni;
- l'introduzione dei diversi livelli richiede gradualità, con la misurazione dei progressi conseguiti nel corso dell'introduzione di progressivi livelli di controllo;
- le diverse condizioni pedo-climatiche e dei sistemi colturali privilegiano interventi differenti e l'evoluzione climatica stagionale può imporre strategie mirate che richiedono una certa flessibilità.

Lo sforzo di tutti gli attori deve intensificarsi per raggiungere un livello qualitativo superiore e in particolare una maggiore garanzia sanitaria; ma è possibile affermare che ancora una volta

un problema, quale quello creato dalle *Fusarium*-tossine, ha determinato una positiva capacità di reazione che lascia immaginare nel futuro un deciso passo avanti della filiera.

Bibliografia

1. Bottalico A. *Fusarium* diseases of cereals: Species complex and related mycotoxins profiles in Europe. *Journal of Plant Pathology* 1998;80:85-103.
2. Charpentier B, Tanzi F. Indagine europea di Syngenta Seeds sulla presenza di funghi e micotossine su mais negli ultimi anni. In: *Le micotossine nella filiera agro-alimentare*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2004. (ISTISAN Congressi 04/C5). p. 68.
3. Pietri A, Bertuzzi T, Pallaroni L, Piva G. Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in Northern Italy. *Food Additives and Contaminants* 2004;21(5):479-87.
4. Battilani P, Scandolaro A, Barbano C, Pietri A, Bertuzzi T, Marocco A, Berardo N, Vanozzi GP, Baldini M, Miele S, Salera E, Maggiore T. Monitoraggio della contaminazione da micotossine nel mais. *L'Informatore Agrario* 2005;61 (6):47-9.
5. AA.VV. La diffusione delle micotossine nelle produzioni italiane di mais. *L'Informatore Agrario* 2005;61(10):47-51.
6. AA.VV. Impiego di tecniche agronomiche per contenere le micotossine nella granella di mais. *L'Informatore Agrario* 2004;6:45-50.
7. Tanzi F. Funghi e micotossine su mais – Indagine europea di Syngenta Seeds. In: *Atti della "Giornata mais 2005"*, Bergamo, Italia.
8. Munkvold G. Mycotoxins in corn: occurrence, impact and management. In: White P, Johnson L (Ed.). *Corn: chemistry and technology*. AACC Inc., 2003. p. 5-71.
9. Blandino M, Carnaroglio F, Reyneri A, Vanara F, Pascale M, Haidukowski M, Saporiti M. Impiego di insetticidi piretroidi contro la piralide del mais. *L'Informatore Agrario* 2006;24:68-72.
10. Reyneri A, Blandino M, Maiorano A, Vanara F. Controllo della contaminazione da micotossine nella filiera del mais. In: Miraglia M, Brera C (Ed.). *1° Congresso nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare*. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 29-30 novembre 2004. Roma. Istituto Superiore di Sanità; 2005. (Rapporti ISTISAN 05/42). p. 235-41.
11. Blandino M, Reyneri A, Vanara F, Ferrero C. Control of mycotoxins in corn from the harvest to processing operations. In: *International Quality Grains Conference*. Indianapolis, Indiana, 19-22 luglio 2004
12. Aires. Italian Mycotoxin Work Group. Monitoring of *Fusarium*-toxins in cereals and cereal products intended for animal feeding. In: *Meeting UE "Undesirable substances in animal feed"*. Bruxelles, 20 luglio 2006.

ASPETTI SANZIONATORI E RESPONSABILITÀ DEGLI OPERATORI A SEGUITO DI NON CONFORMITÀ

Gaetano Forte
Studio Legale Forte, Ferrara

Le norme che regolano la materia alimentare sono poste a tutela di due beni fondamentali: la salute pubblica e la buona fede del consumatore.

La tutela dei due beni fondamentali appena richiamati viene garantita dal sistema attraverso sanzioni di tipo strettamente penale nonché da sanzioni di natura amministrativa pecuniaria.

In caso di presenza in un alimento di una micotossina non ammessa ovvero al di là del limite consentito, sono astrattamente ipotizzabili, quindi, diverse contestazioni, in relazione alla presunta gravità della lesione del bene tutelato dalle norme.

A tutela della salute del consumatore, il codice penale prevede diverse fattispecie di delitti, rubricati nel Libro II, Titolo VI (dei delitti contro l'incolumità pubblica), Capo II (dei delitti di comune pericolo mediante frode).

Tali ipotesi di reato sono punibili sia a titolo di dolo (ossia se vengono commessi attraverso un'azione volontaria e consapevole), sia a titolo di colpa (ossia attraverso negligenza, imprudenza e imperizia, anche non consapevole).

L'art. 439 c.p. punisce l'avvelenamento di sostanze alimentari prima che siano distribuite per il consumo. La sanzione è la reclusione non inferiore a 15 anni. Si tratta di un reato di pericolo presunto, per cui non occorre dimostrare che la sostanza abbia concretamente causato un danno ad un consumatore, ma è sufficiente la messa in pericolo del bene tutelato.

L'art. 440 c.p. riguarda l'adulterazione o la contraffazione di sostanze alimentari sempre prima della loro distribuzione, pericolosa per la salute pubblica. La sanzione è la reclusione da tre a dieci anni.

Abbiamo infine la norma di cui all'art. 444 c.p., che punisce chiunque detiene per il commercio, pone in commercio ovvero distribuisce per il consumo sostanze destinate all'alimentazione, non contraffatte nè adulterate, ma pericolose alla salute pubblica.

La sanzione è la reclusione da sei mesi a tre anni.

Tale reato è ipotesi molto utilizzata dagli organi di controllo, poiché non è necessaria la prova della contraffazione e adulterazione, ma è sufficiente provare la concreta pericolosità della sostanza alimentare.

Il legislatore, considerando l'importanza dei beni tutelati dalle normative appena richiamate, ha ritenuto di aggiungere pene accessorie rispetto a quelle previste dalle singole fattispecie di reato, che consistono nella pubblicazione della sentenza (rendendo quindi pubblico il comportamento ritenuto lesivo, con conseguente danno d'immagine), nonché (unicamente per i reati più gravi di cui all'art. 439 e 440 c.p.) l'interdizione da cinque a dieci anni dalla professione, arte, industria, commercio o mestiere nonché l'interdizione dagli uffici direttivi delle persone giuridiche e delle imprese, per il medesimo periodo di tempo.

Tutte le tipologie di reato appena descritto possono essere punite non solo a titolo di dolo (quindi con coscienza e volontà del fatto), ma anche a titolo di colpa (ossia se vengono commesse per negligenza, imprudenza e imperizia) e in questo secondo caso, le pene risultano mitigate, con riduzioni fino ad un terzo della pena prevista per la fattispecie dolosa.

Astrattamente sono poi configurabili i delitti contro l'industria e il commercio di cui al Capo II del Titolo VIII del Codice Penale.

L'art. 515 c.p. prevede che

chiunque, nell'esercizio di un'attività commerciale, ovvero in uno spaccio aperto al pubblico, consegna all'acquirente una cosa mobile per un'altra, ovvero una cosa mobile per origine, provenienza, qualità o quantità, diversa da quella dichiarata o pattuita, è punita, qualora il fatto non costituisca un più grave delitto, con la reclusione fino a due anni o con la multa fino a euro 2.065,00.

La norma citata punisce anche per il settore alimentare la frode nell'esercizio del commercio.

Al fine dell'integrazione del reato, sarà quindi necessaria la prova o della consegna di aliud pro alio, ovvero di una cosa diversa per origine (inteso come luogo di produzione o di fabbricazione), provenienza (relativa alla riconduzione del prodotto ad uno specifico produttore), qualità (relativa alla differenza essenziale che permette di distinguere il prodotto da altri simili), e infine quantità (relativa alla differenza di peso, misura o numero).

Il delitto di frode nell'esercizio del commercio può essere punito non solo quando il prodotto è già stato immesso sul mercato, ma anche in un momento antecedente.

La norma ammette infatti la sussistenza del tentativo di frode in commercio ex art. 56 c.p., ossia se vengono compiuti atti idonei, diretti in modo non equivoco, a commettere il delitto.

Dalla lettera della legge, si comprende come non sia chiaro il discrimine fra quando gli atti siano da considerarsi idonei e quando invece non lo siano.

In particolare, si rende necessaria una valutazione caso per caso, da rapportarsi anche al luogo in cui viene trovata la merce e all'inizio della contrattazione con il consumatore.

L'art. 516 c.p., che segue il precedente, punisce, con la reclusione fino a sei mesi o con la multa fino a euro 1.032,00, la vendita di sostanze alimentari non genuine come genuine.

La non genuinità può essere materiale (dovuta alla commistione con sostanze estranee alla composizione naturale del prodotto) ovvero formale (relativa alla mancanza dei requisiti formali stabiliti dalla legge o utilizzo di sostanze vietate).

In questo secondo caso non è ammesso, diversamente rispetto alla frode nell'esercizio del commercio, il tentativo ex art. 56 c.p.

Nel caso specifico di presenza di micotossina non consentita e quindi nei casi particolarmente gravi in cui il consumatore subisca una vera e propria lesione personale a seguito dell'ingestione della sostanza contaminata, è poi possibile configurare anche l'ipotesi di reato di lesioni personali ex art 582 -590 c.p.

Tali norme puniscono chiunque cagiona ad altri una lesione personale colposa dalla quale deriva una malattia nel corpo e nella mente con la reclusione fino a tre mesi e la multa fino ad euro 309,00.

Le pene aumentano chiaramente se la violazione è grave o gravissima.

Le norme dettate dal codice penale risultano poi integrate da disposizioni dettate dalle leggi speciali.

In particolare, l'art. 5 della Legge 283/1962 prevede che:

È vietato impiegare nella preparazione di alimenti o bevande, vendere, detenere per vendere o somministrare come mercede ai propri dipendenti, o comunque distribuire per il consumo, sostanze alimentari:

- a) private anche in parte dei propri elementi nutritivi o mescolate a sostanze di qualità inferiore o comunque trattate in modo da variarne la composizione naturale, salvo quanto disposto da leggi o regolamenti speciali;
- b) in cattivo stato di conservazione;
- c) con cariche microbiche superiori ai limiti che saranno stabiliti dal regolamento di esecuzione o da ordinanze ministeriali;

- d) insudiciate, invase da parassiti, in stato di alterazione o comunque nocive, ovvero sottoposte a lavorazioni o trattamenti diretti a mascherare un preesistente stato di alterazione;
- e) [soppressa];
- f) [soppressa];
- g) con aggiunta di additivi chimici di qualsiasi natura non autorizzati con decreto del Ministero per la sanità o, nel caso che siano stati autorizzati, senza la osservanza delle norme prescritte per il loro impiego;
- h) che contengano residui di prodotti, usati in agricoltura per la protezione delle piante e a difesa delle sostanze alimentari immagazzinate, tossici per l'uomo.

Nel caso di presenza di micotossina, viene contestata l'ipotesi residuale prevista dall'art. 5 lettera d), ossia la nocività del prodotto.

Trattasi di reato colposo di pericolo concreto, per la cui punizione è quindi necessario l'accertamento della concreta nocività del prodotto.

In quanto contravvenzione, non è comunque necessario l'accertamento del dolo del soggetto che commette il fatto, ma è sufficiente che venga accertata la colpa.

La sanzione è l'arresto fino ad un anno o l'ammenda da Euro 309,00 a Euro 30.987,00.

Soggetti responsabili: le deleghe di funzioni

Il novero dei soggetti potenzialmente responsabili di reati alimentari è decisamente ampio.

Occorre anzitutto distinguere tra la responsabilità verso l'esterno, che quindi coinvolge i diversi soggetti della filiera, dalla responsabilità interna, relativa alla concreta individuazione del soggetto responsabile nel caso di delega di funzione.

Iniziando l'analisi dalla responsabilità esterna, va rilevato che esistono violazioni formali (come, ad esempio, le contestazioni in materia di etichettatura ovvero la frode in commercio per consegna di merce di quantità diversa dal dichiarato) e violazioni sostanziali, relative alle non conformità igienico-sanitarie del prodotto.

Delle prime verrà chiamato a rispondere solitamente il soggetto che ha utilizzato il proprio nome nell'etichettatura (si pensi, in ipotesi, ai prodotti a marchio), mentre nel caso di eventuali non conformità igienico-sanitarie sono potenzialmente responsabili tutti gli operatori della filiera, poiché tutti i soggetti hanno un onere di controllo sul prodotto.

I reati sono pertanto astrattamente contestabili al produttore, al confezionatore, al grossista, al trasformatore, al somministratore e al venditore, salvo poi verificare le singole condotte dei soggetti coinvolti, al fine di graduare o addirittura escludere la responsabilità.

Il problema dell'individuazione del soggetto responsabile si pone poi verso l'interno dell'azienda.

In particolare, all'interno dell'azienda viene naturale individuare il responsabile nel legale rappresentante, titolare della condotta che dà origine all'illecito.

In questo caso, risulta fondamentale la dimensione dell'azienda, poiché appare chiaro che l'organigramma societario di una ditta individuale non possa essere nemmeno paragonabile all'organigramma di una alla società di capitali di grandi dimensioni.

Nell'ambito della ditta individuale è facile prevedere la responsabilità astratta del titolare, mentre nel caso della società di grandi dimensioni occorrerà verificare i compiti svolti dai singoli soggetti, al fine di verificare eventuali deleghe (implicite o esplicite) sul controllo.

Il legale rappresentante infatti spesso non si occupa della produzione ovvero delle scelte di marketing che portano all'adozione di determinate indicazioni di etichettatura.

Per risolvere eventuali problemi di duplicazioni di responsabilità (per esempio, in caso di incertezza, la sottoposizione del legale rappresentante dell'azienda a procedimento penale unitamente ai responsabili dei diversi reparti che hanno contribuito alla produzione), sarà quindi necessario dotare l'azienda di un adeguato sistema di deleghe.

La giurisprudenza richiede che la delega di funzioni venga conferita con un atto espresso, non equivoco e diretto a persona tecnicamente capace, dotata dei relativi poteri decisionali e conseguentemente di spesa.

La delega non richiede la necessaria forma scritta, anche se sarebbe auspicabile formalizzare la delega per iscritto al fine di evitare incertezze e comunque per non dover ricorrere a prova testimoniale sull'esistenza della delega stessa.

Risarcimento del danno di natura civilistica

In caso di non conformità, si pone poi il problema di gestire il danno di natura civilistica.

La nostra legislazione prevede che, in caso di materia prima non conforme, i vizi debbano essere denunciati al venditore entro il termine di 8 giorni dalla scoperta (art. 1495 c.c.), salvi accordi diversi intervenuti con il fornitore.

L'azione si prescrive in ogni caso in un anno dalla consegna.

Occorre pertanto inviare immediatamente una comunicazione della non conformità riscontrata al venditore e soprattutto verificare che le merci vengano controllate e utilizzate almeno entro un anno dalla consegna, per evitare che il venditore possa "tirarsi fuori" richiamando la sopra citata prescrizione del diritto.

Il vizio riscontrato può portare ulteriormente anche alla risoluzione del contratto per inadempimento, poiché l'art. 1497 c.c. prevede che "quando la cosa venduta non ha le qualità promesse ovvero quelle essenziali per l'uso a cui è destinata, il compratore ha diritto ad ottenere la risoluzione del contratto secondo le disposizioni generali sulla risoluzione per inadempimento, purché il difetto di qualità ecceda i limiti di tolleranza stabiliti dagli usi".

Tuttavia anche la risoluzione per inadempimento è legata alla decadenza (8 giorni) e prescrizione (1 anno dalla consegna) dettate dall'articolo sopra richiamato.

IMPIEGO DI DATI METEOROLOGICI PER LA PREVISIONE DEL RISCHIO DI CONTAMINAZIONE CON AFLATOSSINA B₁ DELLA GRANELLA DI MAIS

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

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

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

Introduzione

Nel 2003 è stata riscontrata, per la prima volta nelle regioni del Nord Italia, la presenza diffusa di granella di mais contaminata da aflatossina B₁ (AFB₁) oltre i limiti di legge. Il mais, utilizzato per l'alimentazione delle vacche, ha creato notevoli problemi di contaminazione nella filiera del latte (Piva *et al.*, 2006).

Allo scopo di comprendere il ruolo dei parametri meteorologici sullo sviluppo di *Aspergillus flavus*, fungo responsabile della produzione di questa tossina, e sull'accumulo di AFB₁ nella granella di mais nel corso della stagione vegetativa, sono stati avviati studi finalizzati alla caratterizzazione climatologica degli areali di produzione maidicola ed è stata valutata la possibilità di prevedere la contaminazione da AFB₁ nella granella sulla base dei dati meteorologici.

Materiali e metodi

Monitoraggio di AFB₁ nel Nord Italia e raccolta dati meteorologici

Negli anni 2002-2004, sono stati prelevati alla raccolta complessivamente 280 campioni di granella di mais 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 (*High Performance Liquid Chromatography*). 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 (Figura 1).

Con i dati di temperatura media e sommatoria delle precipitazioni per decade sono stati costruiti i climatogrammi (Weltzien, 1978) relativi al periodo 1 giugno-30 settembre. Nei climatogrammi è stata confrontata la curva della temperatura media con quella delle precipitazioni, costruite con i dati decapali, al fine di calcolare l'indice di aridità dell'ambiente di coltivazione. I climatogrammi sono stati costruiti considerando le curve della temperatura e della pioggia in modo che la scala associata a quest'ultima fosse il doppio di quella associata alla temperatura; ad esempio, al valore 40 sulla scala della pioggia ha corrisposto il valore 20 su quella della temperatura.

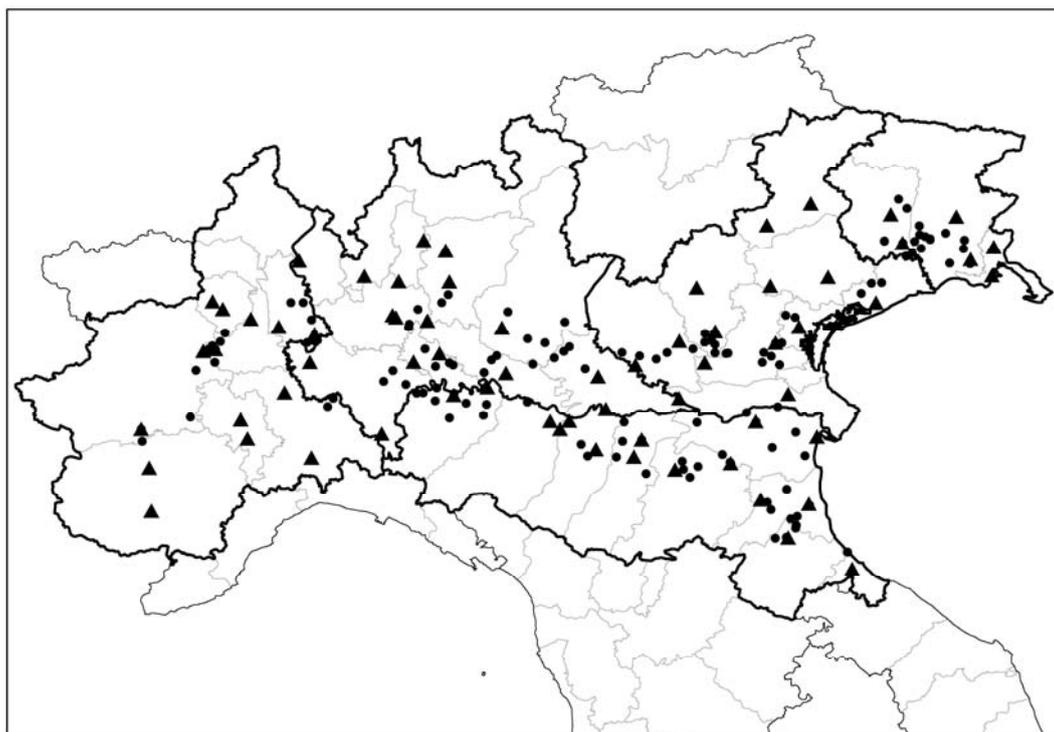


Figura 1. Campi monitorati (•) nel corso degli anni 2002-2004 e stazioni meteorologiche (▲) censite negli anni 1996-2005

Successivamente è stata stimata l'area di sovrapposizione delle curve nel periodo 1 giugno-30 settembre, come differenza tra l'area sottesa alla curva delle precipitazioni e della temperatura. La stima dell'area sottesa alla curva delle precipitazioni (ACP) è stata operata utilizzando la seguente formula:

$$ACP = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{x_i + x_{i+1}}{2} \right)$$

La stima dell'area sottesa alla curva della temperatura media (ACT) è stata operata utilizzando la seguente formula:

$$ACT = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right)$$

dove n = numero di decadi considerate; x_i = valore della pioggia, y_i = valore della temperatura nella decade i, x_{i+1} e y_{i+1} sono i medesimi valori relativi alla decade successiva.

L'Indice di Aridità (IA) è stato infine così calcolato:

$$IA = ACP - ACT$$

I valori di IA inferiori a zero sono associati a condizioni di aridità dell'ambiente di coltivazione.

I dati raccolti nel corso dell'attività di monitoraggio unitamente ai dati meteorologici e alle loro elaborazioni sono stati archiviati in un database relazionale. I dati sono stati georeferenziati, quindi ogni valore è stato associato con le coordinate geografiche (latitudine e longitudine) dei comuni di ubicazione dei campi di mais. La georeferenziazione è stata realizzata mediante il software GIS Arc View 8.2 (2002) di ESRI (*Environmental System Research Institute*).

Analisi geostatistica

Al fine di caratterizzare dal punto di vista meteorologico l'area monitorata in tutti gli anni considerati, è stata eseguita l'analisi geostatistica della somma degli IA dalla prima decade di giugno alla seconda di settembre (Meritt *et al.*, 1999). Per eseguire l'analisi è stato impiegato il modulo di analisi geostatistica di ArcView (2002) ed è stato applicato il metodo Kriging ordinario (Isaaks & Srivastava, 1989).

I risultati dell'analisi geostatistica sono stati poi rappresentati mediante mappe raster con base cartografica costituita dai confini amministrativi delle regioni e delle province italiane; utilizzando un modello digitale del terreno, sono state rappresentate solo quelle aree poste ad una altitudine inferiore a 600 m, effettivamente interessate dalla coltivazione del mais.

A partire dalle mappe dei singoli anni, è stata infine ottenuta una mappa media della somma di IA per il periodo giugno-settembre.

Analisi statistica dei dati

I valori di contenuto di AFB₁ nella granella sono stati trasformati secondo la funzione logaritmo naturale prima di essere sottoposti alle successive elaborazioni statistiche (Fowler & Cohen, 1990).

È stato calcolato il coefficiente di correlazione di Pearson tra il valore di contaminazione della granella con AFB₁ ed l'IA calcolato nella stazione meteorologica di riferimento nelle diverse decadi del periodo giugno-settembre, utilizzando il software SPSS (2002).

È stata impiegata una tecnica di analisi multivariata definita analisi della regressione logistica che permette di stimare la probabilità che un evento accada (Agresti, 2002). Possono essere inserite diverse variabili indipendenti (variabili stimatore) tra le quali vengono scelte quelle più rilevanti con un algoritmo stepwise. La variabile dipendente è dicotomica, quindi prevede solo una risposta si/no. In particolare, al fine di stimare la presenza/assenza di contaminazione nella granella di mais con AFB₁ alla raccolta sono state considerate come variabili indipendenti i valori di IA delle decadi risultate significativamente correlate con i livelli di contaminazione della granella di mais alla raccolta secondo Pearson.

La funzione logistica è rappresentata da una funzione sigmoide la cui equazione è:

$$Y = (1 + e^{-Z})^{-1}$$

dove Y = probabilità che l'evento accada e cioè "campione contaminato"

$$Z = B_0 + B_1X_1 + \dots + B_iX_i$$

dove B₀, B₁, ..., B_i sono i coefficienti stimati mediante la procedura di analisi sulla base delle variabili indipendenti impiegate X₁, ..., X_i. La probabilità dell'evento contrario e cioè "campione non contaminato" è pari a Y' = 1 - Y.

Validazione

È stata eseguita una validazione del modello di regressione logistica impiegando dati diversi da quelli utilizzati nell'analisi; in particolare, sono stati utilizzati dati di contenuto di AFB₁ in campioni di granella di mais raccolti nel corso degli anni 2004-2006. Sono stati considerati 69 campioni nel 2004, 237 nel 2005 e 48 nel 2006, per un totale 354 campioni, provenienti dai territori di produzione maidicola del Nord Italia. I campioni con un livello di contaminazione inferiore a 1,6 µg kg⁻¹ sono stati considerati come non contaminati e quelli con un livello di contaminazione superiore a 1,6 µg kg⁻¹ ritenuti campioni contaminati. A ciascuno di essi, sulla base delle loro coordinate geografiche, è stata assegnata una stazione meteorologica di riferimento, la più vicina al punto di campionamento. Con i dati di pioggia e temperatura per decadi sono stati calcolati i valori di IA delle decadi ritenute cruciali e, sulla base della funzione di regressione logistica trovata, è stato calcolato il rischio di contaminazione da AFB₁ della granella.

Risultati e discussione

La mappa media della somma di IA per le decadi del periodo giugno-settembre attesta che in tutti gli areali di produzione non si verificano condizioni di aridità dell'ambiente di coltivazione nel periodo in cui la coltura del mais compie la sua stagione vegetativa in campo. Il valore di IA medio è stato sempre maggiore di 0. Al contrario, se si considerano le mappe dei singoli anni, si possono individuare alcuni anni e specifici areali con condizioni di aridità dell'ambiente di coltivazione in questo periodo dell'anno.

L'analisi del coefficiente di correlazione di Pearson ha dimostrato che esiste una correlazione altamente significativa ($P \leq 0,01$) tra la contaminazione della granella di mais con AFB₁ e l'IA registrato, nei tre anni di campionamento, a partire dall'ultima decade di giugno fino all'ultima di agosto. Ciò conferma che la contaminazione della granella di mais con AFB₁ dipende dal verificarsi di condizioni di aridità nel periodo fine giugno-fine agosto (Tabella 1).

Tabella 1. Coefficienti di correlazione di Pearson tra il contenuto di AFB₁ (in µg/kg) in campioni di mais alla raccolta e gli IA calcolati per tutte le decadi del periodo giugno-settembre

Mese	Prima decade	Seconda decade	Terza decade
Giugno	0,019*	-0,094*	-0,406**
Luglio	-0,346**	-0,334**	-0,270**
Agosto	-0,306**	-0,299**	-0,281**
Settembre	-0,041*	-0,040*	-

* non significativo

** significativo ($P \leq 0,01$)

La successiva analisi della regressione logistica ha permesso di individuare le decadi che influiscono maggiormente sul processo di accumulo della tossina nelle cariossidi di mais nel corso della stagione vegetativa e di definire un modello in grado di descriverne la probabilità di presenza.

Le tre decadi scelte per la costruzione del modello sono state: l'ultima di giugno, la prima di agosto e l'ultima di agosto. I coefficienti dell'equazione del modello, calcolati per ciascuna delle tre decadi, sono risultati significativamente diversi da 0 e hanno mostrato che la

probabilità di riscontrare campioni contaminati alla raccolta aumenta al verificarsi di ripetute condizioni di aridità dell'ambiente di coltivazione.

I risultati della verifica del metodo e della sua validazione sono riassunti in Tabella 2.

La verifica delle stime effettuate impiegando il set di dati utilizzato nell'analisi mostra che le stime del modello sono corrette nell'89% dei casi considerati (0 sia stimato che osservato e >0 sia stimato che osservato, caselle grigie); non sono mai state riscontrate sottostime (stimato 0 e osservato >0) e l'11% di casi classificati non correttamente è stato sempre relativo a falsi allarmi (sovrastime, stimato >0 e osservato 0).

Tabella 2. Risultati della verifica delle stime effettuate con la funzione di regressione logistica con il set di dati utilizzato nell'analisi (A) e validazione con i dati non utilizzati nell'analisi (B)

		Stimati				Stimati	
		0	> 0			0	> 0
Osservati	0	35%	11%	Osservati	0	48%	23%
	> 0	0%	54%		> 0	13%	16%

Gli errori delle stime aumentano invece nel caso delle validazioni effettuate con dati non impiegati per generare la funzione di regressione logistica: le stime corrette si riducono al 64% e si registra anche un 13% di sottostime, cioè di casi in cui non si stima la presenza AFB₁ della granella che è stata ossevata.

Conclusioni

Il territorio del Nord Italia, principale area di produzione maidicola nazionale, non può essere definito ad alto rischio per la contaminazione della granella di mais con AFB₁, sulla base dei dati meteorologici di 67 stazioni riferiti agli ultimi dieci anni. Sono stati evidenziati però anni e areali in cui le condizioni meteorologiche risultano particolarmente favorevoli allo sviluppo in campo di *A. flavus* e alla produzione da parte di questi funghi di AFB₁. Pertanto risulta indispensabile, al fine di prevenire situazioni di emergenza come quella verificatasi nel 2003, monitorare le condizioni meteorologiche nel corso della stagione vegetativa in modo da poter stabilire prima della raccolta l'eventuale rischio di presenza di AFB₁ nella granella e poter gestire al meglio la fase di impiego e stoccaggio del prodotto.

La regressione logistica presentata in questo lavoro può essere un utile strumento di supporto per la stima del rischio di contaminazione da AFB₁ della granella di mais. Come dimostrato dalle prime validazioni, esiste un margine di errore, ma l'approccio ha un interesse pratico soprattutto se impiegato per la descrizione di un'area geografica, come il nord Italia.

I risultati di questo approccio hanno valore indicativo, essendo ottenuti solo sulla base di dati meteorologici, senza considerare altri fattori, in particolare quelli colturali, riconosciuti come rilevanti per lo sviluppo di *A. flavus* e l'accumulo di AFB₁ nella granella di mais.

Le informazioni disponibili non consentono di elaborare un modello previsionale preciso, ma sono in corso di studio tutti gli aspetti di ecologia di *A. flavus* (Giorni *et al.*, 2006) e di effetto delle tecniche colturali che consentiranno in un prossimo futuro di affiancare a questo approccio previsionale molto semplice uno più complesso e più preciso.

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

Si ringrazia AgriOK per aver messo a disposizione parte dei dati utilizzati per la validazione.

Bibliografia

- Agresti A. *Categorical data analysis*. 2nd Edition. Hoboken, NJ USA: Wiley & Sons, Inc.; 2002.
- ArcView Ver. 8.2. Redlands, CA: ESRI; 2002.
- Fowler J, Cohen L. *Practical statistics for field biology*. Milton Keynes: Open University Press; 1990.
- Giorni P, Magan N, Pietri A, Bertuzzi T, Battilani P. Studies on *Aspergillus* Section Flavi isolated from maize in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology* 2007;113(3):330-8.
- Isaaks EH, Srivastava RM. *An introduction to applied geostatistics*. New York, NY: Oxford University Press; 1989.
- Meritt RN, Orum TV, Jaime-Garcia R, Nadeem A. Applications of Geographic Information Systems and geostatistics in plant disease epidemiology and management. *Plant Disease* 1999;83:308-19.
- Piva G, Battilani P, Pietri A. Emerging issues in Southern Europe: aflatoxins in Italy. In: Barug D, Bhatnagar D, van Egmond HP, van der Kamp JW, van Osenbruggen WA, Visconti A (Ed.). *The mycotoxin factbook*. The Netherlands: Wageningen Academic Publisher; 2006. p. 139-53.
- SPSS (Statistical Package for Social Science) ver. 11.5.1. Chicago, IL: SPSS Inc.; 2002
- Weltzien HC. Geophytopathology. In: *Plant disease. An advanced treatise Vol. II. How disease develops in populations*. New York, NY: Academic Press, Inc.; 1978. p. 339-60.

TERZA SESSIONE
Metodologie innovative utilizzate
nel settore diagnostico

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 (c)

(a) Dipartimento Territorio e Sistemi Agro-Forestali, Università di Padova, Padova

(b) Dipartimento Scienze Animali, Università di Padova, Padova

(c) Or Sell, Limidi di Soliera (MO)

(d) Associazione Italiana Raccoglitori, Essiccatori e Stocicatori di cereali e semi oleosi, Canaro (RO)

Introduzione

Le tossine T-2 e HT-2 appartengono al gruppo dei tricoteceni di tipo A: sono molecole con struttura di tipo sesquiterpenoide a cui si attribuiscono effetti negativi sulla salute dell'uomo e degli animali. Possono contaminare le granelle di frumento, orzo, avena, riso, mais, soia e fagiolo come pure i prodotti a base di cereali. Queste micotossine sono prodotte da funghi appartenenti al genere *Fusarium* e in modo particolare dalle specie *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. equiseti* ed *F. acuminatum*. Tra le specie citate, la più importante è ritenuta essere *F. sporotrichioides*, che normalmente si comporta come saprofita o debole parassita e pertanto difficilmente si rinviene sulle granelle al momento della raccolta; vi si può, invece, trovare nel caso di ritardo delle trebbiature, con lunghe permanenze in campo in condizioni climatiche fredde e piovose, oppure quando situazioni analoghe (freddo e bagnatura) si verificano nel post-raccolta, durante la conservazione. *F. sporotrichioides*, infatti, esige condizioni di elevata umidità ($A_w > 0,88$), vive in un intervallo di temperatura compreso tra -2 e 35°C, con optimum generalmente attorno ai 22,5°C e può produrre micotossine tra 8 e 25°C, con optimum tra 12 e 20°C e A_w compresa tra 0,95 e 0,97; a 30°C, pur sopravvivendo, cessa la sua attività tossigenica (Ramakrishna *et al.*, 1996; Bottalico, 1998; JECFA, 2001; Maurice *et al.*, 2004).

Si ritiene che la prima documentata e importante manifestazione della tossicità di T-2 ed HT-2 possa essere fatta risalire all'epoca della seconda guerra mondiale, negli anni 1931–1947, quando in Siberia, nel distretto di Orenburg, la popolazione di un villaggio fu praticamente azzerata dalle centinaia di morti causate da una malattia denominata Aleukia Tossica Alimentare (ATA). I sintomi principali dell'ATA comprendono febbre, vomito, infiammazioni acute delle vie alimentari con emorragie e necrosi (cavo orale, esofago, stomaco), dolori addominali, diarrea, anomalie del sangue (leucopenia) e atrofia del midollo spinale (Nelson *et al.* 1994). Ovviamente, i mezzi d'indagine disponibili all'epoca in cui si verificò l'evento non consentirono di individuarne la causa nell'ingestione delle tossine T-2 e HT-2, ma si accertò che questa dovesse essere sicuramente di origine alimentare e più precisamente legata al consumo di cereali o prodotti da essi derivati, provenienti da scorte poste in conservazione. Successivi studi svolti sulla popolazione fungina che si sviluppa sui cereali in conservazione, sui metaboliti tossici da essi prodotti e sull'effetto da questi provocato in alcuni animali (Joffe and Yagen 1977) portarono alla ragionevole ipotesi che l'ATA osservata in Siberia nella prima metà del secolo scorso fosse verosimilmente dovuta ad intossicazione da T-2 e HT-2 (IARC, 1993).

Oggi non si sa molto di più sugli effetti acuti prodotti da queste tossine sull'uomo mentre ne è stata ben documentata l'azione di inibizione esercitata sulla sintesi proteica e il funzionamento dei mitocondri nonché l'effetto citotossico e immunosoppressivo (JECFA, 2001; CAST, 2003).

Come già accennato, anche il benessere e la salute degli animali risentono negativamente dell'assunzione di questi contaminanti. Gli studi in questo settore sono in atto da lungo tempo, dato che la tossina T-2 fu uno dei primi tricoteceni ad essere scoperti ed hanno permesso di accertare che l'ingestione di queste sostanze provoca rifiuto del cibo, perdita di peso, calo della produttività e della fertilità (Hsu *et al.* 1972; FAO, 2001), maggiore suscettibilità alle malattie. Oltre a questo, si osservano manifestazioni sintomatologiche simili a quelle già descritte per l'uomo, con qualche particolarità in relazione alla specie, come avviene, ad esempio, nei polli dove appare particolarmente accentuato il fenomeno delle lesioni orali e l'effetto neurotossico (FAO, 2001; CAST, 2003).

Gli studi tossicologici finora condotti non hanno permesso di distinguere con chiarezza se T-2 ed HT-2 abbiano effetti diversi, questo perché *in vivo*, nell'intestino, la tossina T-2 viene rapidamente convertita in HT-2 e quindi gli effetti osservati dopo la somministrazione di T-2 si devono attribuire ad entrambe le molecole in questione; oltre a ciò, sono troppo poche le informazioni disponibili sulla tossicità della sola HT-2. I pochi studi comparativi finora eseguiti *in vitro* e *in vivo* indicano, comunque, che da un punto di vista tossicologico T-2 ed HT-2 possono essere considerate alla stessa stregua (JECFA, 2001).

Sulla base di queste considerazioni il *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA), tenendo conto anche del fatto che le micotossine in questione risultano essere le più tossiche finora conosciute tra i tricoteceni, ha stabilito una Dose Giornaliera Accettabile Provvisoria (*Provisional Maximum Tolerable Daily Intake: PMTDI*) di 60ng/kg di peso corporeo al giorno per T-2 ed HT-2 da sole o per la loro somma. Questo valore viene definito "provvisorio" in quanto il Comitato si è dovuto basare sui risultati di studi di breve termine condotti sui piccioni, dato che era disponibile un solo studio di lungo termine e questo non era utilizzabile per stabilire il livello accettabile di ingestione (JECFA, 2001).

Utilizzando la soglia di 60ng/kg p.c./d, in successive indagini, realizzate a cura della Unione Europea (UE) per determinare la contaminazione da *Fusarium*-tossine degli alimenti destinati all'uso umano, è stato stimato il rischio per la popolazione derivante dall'ingestione di T-2 ed HT-2. I risultati ottenuti hanno dimostrato chiaramente che vi è un rischio concreto per la salute dei consumatori europei e in particolare per quelli Italiani che abitualmente utilizzano alimenti a base di cereali; questi ultimi, infatti, superano la PMTDI per una proporzione variabile dal 73% all'83% (DG-SANCO, 2003). Ciononostante la normativa corrente non ha ancora fissato per T-2 ed HT-2 dei limiti precisi nei cereali e la decisione viene rimandata, "se dal caso" a luglio 2007 (Reg. CE n° 856/2005). Questo perché i dati sull'ingestione di queste tossine sono stati notevolmente influenzati dal limite di rilevazione e dalla limitata frequenza di campioni di alimento contaminati. I problemi analitici sono stati in parte risolti da Visconti *et al.* (2005) con la recente messa a punto di un protocollo per l'analisi in HPLC di T-2 ed HT-2 nei cereali; permangono invece le difficoltà derivanti dalla scarsa disponibilità di dati sul livello di contaminazione degli alimenti (JECFA, 2001; DG-SANCO, 2003; Reg. CE n° 856/2005).

Col presente lavoro, di carattere preliminare, ci si propone di contribuire ad aumentare le conoscenze sulla contaminazione da parte della tossina T-2 in grano, orzo, mais, provenienti da aree di coltivazione del Nord Italia attraverso prove di campo e saggi analitici su campioni prelevati in centri di stoccaggio, molini e mangimifici.

Materiale e metodi

Prove di campo

Allo scopo di valutare la produzione in campo delle tossine T-2 e HT-2 sulla granella di mais, in due località situate una nel Nord-Est (Provincia di Venezia: VE) e l'altra nel Sud (Provincia di Rovigo: RO) della Regione Veneto, sono stati seminati 68 ibridi diversi, comprensivi di tutte le classi di maturazione, da quella precoce FAO 300 a quella tardiva FAO 700 e precisamente: 6 di Classe 300; 5 di Classe 400; 17 di Classe 500; 29 di Classe 600; 11 di Classe 700.

Per ciascun ibrido sono state realizzate 4 replicazioni, ciascuna costituita da una parcella di 20 m², contenente 4 file lunghe m 6,66, con un investimento finale di 7,2 piante/m². Il tutto è stato organizzato secondo uno schema a blocchi randomizzati.

La raccolta è stata effettuata a mano nel mese di settembre, in tempi diversi, in funzione delle classi di maturazione. Per evitare gli effetti di bordo sono state considerate solo le due file interne (10 m²) di ogni parcella. La spighe, raccolte separatamente per ogni ripetizione, sono state sgranate a mano e la granella ottenuta è stata essiccata al 12% di umidità e conservata in magazzino fresco e asciutto. Al momento dell'utilizzo da ciascun quantitativo sono stati prodotti sottocampioni di 500 g sui quali è stata determinata la concentrazione della tossina T-2 con metodo ELISA. I dati ottenuti sono stati mediati per ripetizione e suddivisi in classi di frequenza secondo gli intervalli di concentrazione 0-10; 11-40; 41-70; 71-100; 101-130 ppb di T-2.

Prelievo di campioni di cereali

Durante il mese di agosto 2006, sono stati prelevati i campioni da sottoporre alla analisi del contenuto di micotossine T-2 e HT-2. Complessivamente sono stati prelevati 71 campioni così suddivisi:

- frumento: 21 campioni;
- orzo: 17 campioni;
- mais: 32 campioni;
- avena: 1 campione.

Il prelievo è stato effettuato da personale esperto ed è avvenuto con le modalità previste dal campionamento dinamico. Per ciascun campione sono stati raccolti circa 500 g di prodotto (in granella o farina), trasferiti immediatamente al Laboratorio del Dipartimento di Scienze Animali presso il quale sono stati conservati fino al momento dell'analisi.

I campioni provenivano tutti da aree di coltivazione del Nord Italia (soprattutto dalle regioni Emilia Romagna e Veneto). Il prelievo è stato effettuato sia presso centri di stoccaggio, molini, mangimifici e consorzi che presso singole aziende agrarie.

Metodi analitici di determinazione della T-2 e HT-2

Le analisi del contenuto di T-2 e HT-2 sono state condotte su tutti i campioni utilizzando due diverse metodologie: la tecnica ELISA e il metodo di estrazione e successiva lettura in HPLC.

Metodo ELISA

Il metodo ELISA utilizzato ha previsto l'utilizzazione del kit EZ Quant T-2® (Diagnostix) fornito dalla Orsell e ha consentito di determinare il contenuto della T-2 e del 38% della HT-2

nei diversi cereali. L'intervallo di determinazione, dichiarato dalla ditta fornitrice, era pari a 0,025-0,5 mg/kg.

Poiché in molti campioni i dati di concentrazione della T-2 ottenuti con questa procedura hanno evidenziato valori inferiori a 0,025 mg/kg, adottando i metodi utilizzati in indagini già citate (DG-SANCO, 2003), i dati al di sotto di questo limite sono stati divisi per 6.

Metodo HPLC

Per la determinazione della tossina T-2 e HT-2 mediante cromatografia liquida (HPLC) è stato seguito il metodo indicato da Visconti *et al.* (2005). Il *Limit Of Detection* (LOD) del metodo viene indicato in 5 µg/kg per T-2 e 3 µg/kg per HT-2.

La fase preparativa ha previsto le seguenti fasi :

- 50 g di campione dei diversi cereali, finemente macinato è stato pesato e sottoposto ad estrazione della micotossine utilizzando 250 mL (non 100 mL come indicato dal metodo) di una soluzione acquosa di metanolo (90% metanolo)
- il campione è stato quindi miscelato e centrifugato
- gli estratti sono stati sottoposti a *clean-up* su colonne di immunoaffinità contenenti anticorpi monoclonali T-2 e HT-2 (Easy- Extract T-2 & HT-2, Rhone LTD), fornite dalla Or Sell)
- la procedura di derivatizzazione è stata effettuata utilizzando una soluzione di DMAP seguita da 1-AN in toluene)
- il campione a secco è stato ripreso con 1 mL di soluzione acetonitrile/ acqua 70/30.

La determinazione del contenuto di micotossine in HPLC è avvenuta utilizzando lo strumento HPLC (Thermo Phinningar) dotato di campionatore automatico termostato e rivelatore spettrofluorimetrico. Le condizioni cromatografiche adottate sono descritte di seguito:

- è stata utilizzata una colonna: Gemini 5m C6 – Phenyl 110 A (150 X 4.6 mm)
- la fase mobile era costituita da: gradiente binario di acqua – acetonitrile con una composizione iniziale del 70% di acetonitrile
- la temperatura della colonna era pari a 40°C
- il flusso era pari a 1 mL al minuto
- il volume iniettato era di 75 µL
- le lunghezze d'onda adottate erano per la fase di eccitazione: pari a 381 nm mentre per l'emissione nm 470

Sui campioni di granella ridotti in farina è stata anche ricercata la presenza di *F. sporotrichioides* col metodo delle diluizioni, utilizzandone una serie in base 10: da 10⁻² a 10⁻⁹. Le semine sono avvenute su capsule Pietri (Ø 13 cm) contenenti PDA, allestendo 5 capsule per diluizione e ripetendo ciascun saggio 5 volte. La presenza di *F. sporotrichioides* è stata determinata come frequenza relativa rispetto alle altre specie di Fusaria.

Risultati

La contaminazione da T2 della granella di mais prodotta in provincia di Venezia appare leggermente inferiore a quella proveniente da Rovigo; si tratta comunque di valori molto bassi e, in entrambi i campi sperimentali, la maggior parte dei campioni si situa nell'intervallo 0-10 ppb (Tabella 1 e Figura 1).

Un risultato molto simile emerge anche dalle analisi effettuate col metodo ELISA sulle granelle provenienti dall'attività di campionamento di essiccatoi, mulini e mangimifici (Figura 2).

Tabella 1. Contaminazione media da T-2 della granella di mais proveniente dai due campi sperimentali

Provenienza	T- 2 (ppb)
Campo sperimentale in provincia di Venezia (VE)	18,42
Campo sperimentale in provincia di Rovigo (RO)	13,48
VE+RO	15,87

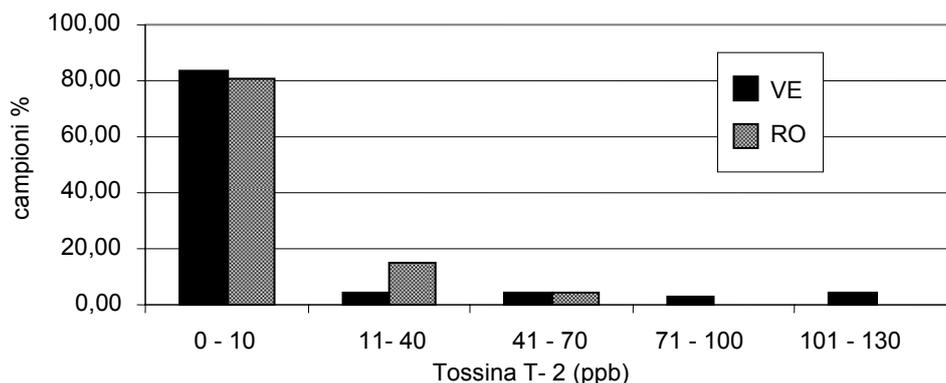


Figura1. Contaminazione da T-2 nel mais proveniente dai due campi sperimentali (VE, provincia di Venezia; RO, provincia di Rovigo). Metodo ELISA

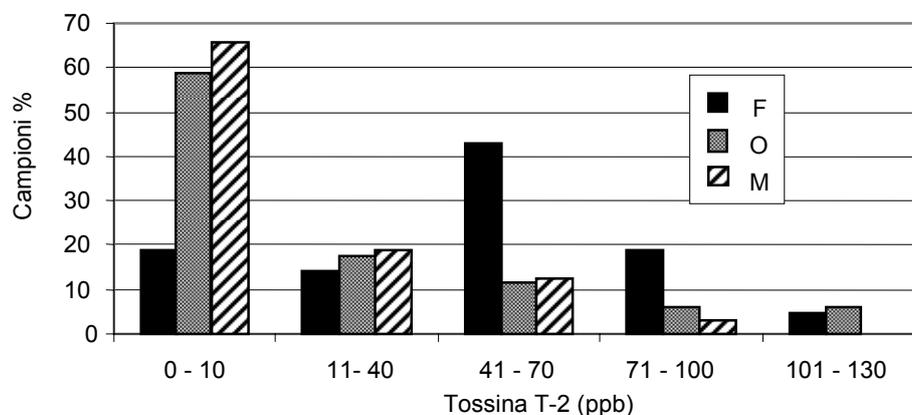


Figura 2 Contaminazioni da T-2 nei campioni di frumento (F), orzo (O) e mais (M). Metodo ELISA

Si confermano i livelli molto bassi di T-2 rilevati e l'affollamento dei campioni nelle classi di concentrazione meno elevata. Sono, però, emerse anche alcune interessanti differenze tra i tre cereali. Per il mais si conferma sostanzialmente quanto già visto nella prova di campo, mentre per il frumento si rileva una più elevata presenza della tossina T-2, testimoniata dallo spostamento delle frequenze dei campioni positivi verso le classi intermedie di contaminazione.

La situazione dell'orzo, pur essendo molto simile a quella del mais, si differenzia da questa per la presenza di una piccola percentuale di campioni nella classe di contaminazione più elevata.

Le stesse analisi ripetute in HPLC (esempi di cromatogramma nelle Figure 2 e 3, rispettivamente per standard e un campione), riferite ai soli valori > LOD, hanno dato per il frumento il 10% e 15% di positività, rispettivamente per T-2 e HT-2; il 18% e 47% di positività per l'orzo e il 26% e 19% per il mais.

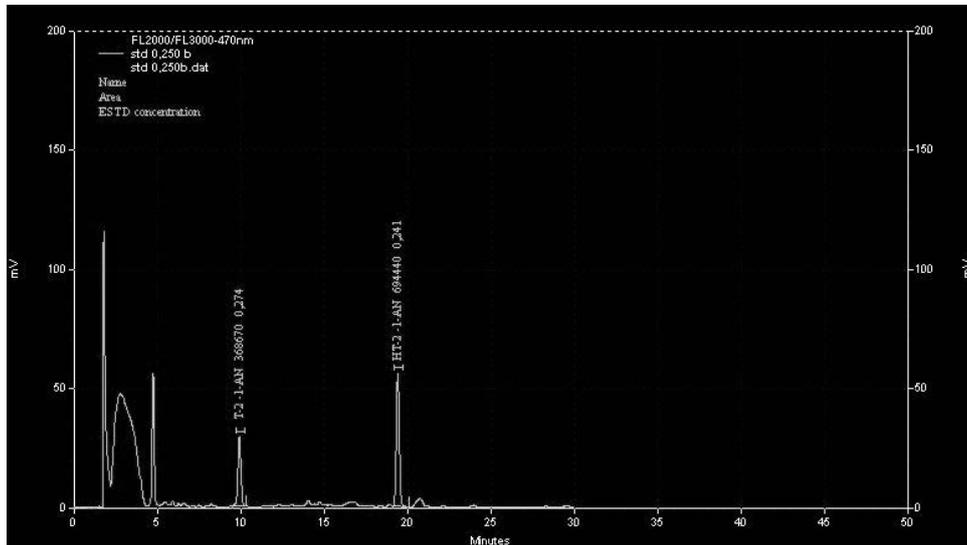


Figura 2. Cromatogramma relativo agli standard

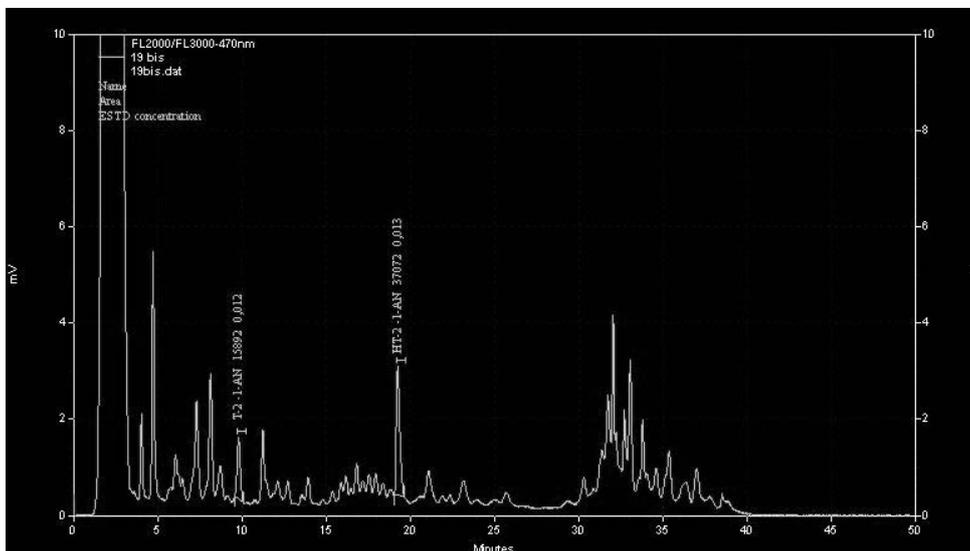


Figura 3. Cromatogramma relativo ad un campione

Le prove di recupero in HPLC sono state effettuate sui campioni di frumento, orzo e mais, mediante l'aggiunta di quantità crescenti di T-2 e HT-2 ai campioni partendo da livelli di 0,05 µg/kg fino a 0,8 µg/kg. I risultati ottenuti da queste prove sono riportati nella Tabella 2 e dimostrano una buona percentuale di recupero per entrambe le micotossine.

Tabella 2 Risultati ottenuti dalle prove di recupero delle tossine T-2 e HT-2 nei diversi cereali

Cereale	Recupero T-2 (%)	Recupero HT-2 (%)
Frumento	67,27	97,05
Mais	93,58	96,94
Orzo	67,23	84,70

I tassi di contaminazione rilevati con i diversi metodi analitici sulla granella di mais proveniente dalla prova di campo e su quella dei 3 cereali campionati in essiccatoi, mulini e mangimifici, confrontati con quelli rilevati in Italia sugli stessi cereali e riportati nel già citato Final Report della SCOOP Task 3.2.10 (DG-SANCO, 2003), confermano sia i bassi livelli di presenza della tossina T-2 sia la diversità tra i tre cereali considerati tra cui il frumento appare essere quello più contaminato (Tabella 3).

Tabella 3. Contaminazione media da T-2 e HT-2* (ppb) della granella dei vari cereali. Confronto tra le diverse fonti di dati

Cereale	Campionamento (ELISA)	Campionamento (HPLC)	SCOOP Task (ELISA)	Prova di campo (ELISA)
Frumento	46,25	50,68	40,4	---
Orzo	25,37	30,02	---	---
Mais	16,59	17,03	12,9	15,87

* I valori di HT-2 sono sommati a quelli di T-2 solo nelle analisi HPLC

L'indagine micologica condotta per quantificare la presenza di *F. sporotrichioides* sulle granelle campionate in essiccatoi, mulini e mangimifici, ha dato luogo a percentuali di isolamento ampiamente inferiori all'1% su frumento e orzo mentre non ha dato alcun esito su mais, dove invece, a tutte le diluizioni saggiate, si è sviluppato in grande quantità solo *F. verticillioides* come unica specie di *Fusarium*.

Discussione e conclusioni

I metodi ELISA ed HPLC impiegati nel corso del presente lavoro per l'analisi delle tossine T-2 ed HT-2, hanno fornito risultati sostanzialmente concordanti tra loro e con quelli pubblicati nel Final report della SCOOP Task 3.2.10 (DG-SANCO, 2003). Si nota solo una tendenza a valori leggermente maggiori per i saggi eseguiti in HPLC il che farebbe supporre una tendenza del metodo ELISA a sottostimare. Bisogna ricordare, però, che il kit ELISA usato consente di evidenziare solo il 38% di HT-2 e quindi una certa sottostima era attesa; l'entità della stessa, però, non sembra essere eccessiva, pertanto si ritiene che questo metodo, economico, facile e veloce, possa rappresentare un utile strumento per un primo screening di conoscenza sulla presenza dei tricoteceni in questione.

Un problema analitico di difficoltà non indifferente è legato al LOD. Molto è stato fatto in questo campo con la recente messa a punto del protocollo HPLC adottato nel presente lavoro (Visconti *et al.*, 2005). Tuttavia il PMTDI di 60 ng/kg p.c./gg costringe a considerare quantitativi di T-2 ed HT-2 veramente bassi e, come si dirà più avanti, la contaminazione nei cereali è in genere così contenuta che per conoscerla con la precisione necessaria ad un corretto calcolo delle ingestioni, sarà necessario uno sforzo ulteriore per arrivare per T-2 ed HT-2 a livelli di determinazione paragonabili a quelli oggi possibili per le aflatossine.

I dati rilevati sul mais nella prova di campo e quelli derivanti dal campionamento di frumento, orzo mais in essiccatoi, mulini e mangimifici del Nord-Est Italia, sono in sintonia con quanto riportato nel Final report della SCOOP Task 3.2.10 (DG-SANCO, 2003) e indicano che i cereali esaminati sono contaminati dalle tossine T-2 ed HT-2 poco frequentemente e ad un livello molto più contenuto rispetto alle altre *Fusarium*-tossine. Questo fatto trova conferma nei risultati dei saggi d'isolamento di *F. sporotrichioides* che evidenziano, nei cereali indagati, una sporadica presenza di questo fungo, ritenuto il maggior produttore di T-2 ed HT-2 (FAO, 2001). Tale fatto era stato rilevato su mais coltivato nel Veneto nel anche corso di lavori condotti nel periodo 2000-2006; in quella occasione si notò che *F. sporotrichioides* veniva isolato con basse frequenze, in media <1% e con valore massimo del 3,6%, ma in casi non rari esso risultava del tutto assente; il fungo, inoltre, risultava più facilmente individuabile nei primi momenti del ciclo vegetativo del mais, in presenza di polline e infiorescenze femminili (sete) e il successo degli isolamenti era influenzato dalla località ed dall'andamento stagionale (Causin, dati non pubblicati). La scarsa presenza di *F. sporotrichioides* nei paesi del Sud Europa e in particolare in Italia, già notata da altri autori (Bottalico *et al.*, 1989; Logrieco *et al.*, 1995; Bottalico, 1998), è probabilmente dovuta alla psicrofilia e idrofilia della specie che predilige climi più freschi e umidi di quelli che caratterizzano il nostro Paese (Ramakrishna *et al.*, 1996; Bottalico, 1998; JECFA, 2001; Maurice *et al.*, 2004). Una piccola e parziale conferma dell'influenza delle condizioni climatiche sulla presenza di questi tricoteceni, si può trarre anche dai risultati della prova di campo che suggeriscono una tendenza a una maggiore contaminazione da T-2 nel mais coltivato in provincia di Venezia, area, seppur di poco ma certamente, più piovosa e fresca del territorio in provincia di Rovigo, dove si trovava l'altro campo sperimentale.

In accordo con quanto riportato nel Final Report della SCOOP Task 3.2.10 (DG-SANCO, 2003), il mais risulta meno contaminato del frumento e quindi sembra chiara anche una diversa suscettibilità del tipo di cereale all'accumulo delle tossine T-2 ed HT-2. Ciò appare molto verosimile e i dati qui riportati lo confermano, visto che provengono dallo stesso areale geografico. Tuttavia, alla luce di quanto finora discusso e vista l'ampiezza del territorio preso in considerazione nella presente indagine, è possibile che anche variazioni ambientali non molto pronunciate possano influenzare lo sviluppo delle micotossine in questione; pertanto, prima di considerare definitivamente acquisito il risultato, sarebbe opportuna una verifica di campo su frumento e mais coltivati nelle medesime condizioni pedo-climatiche.

Seppure con le necessarie cautele, dovute alle piccole dimensioni del campione esaminato, si può, quindi, ritenere che le contaminazioni da T-2 ed H-2 dei principali cereali coltivati nel Nord Italia siano in generale contenute. Il mais, che rappresenta la coltura più diffusa, sembra manifestare i problemi minori mentre orzo, ma soprattutto frumento, risultano più contaminati; l'importanza di questo fatto non deve essere sottovalutata dato che questo cereale rappresenta la maggior fonte di ingestione di T-2 ed HT-2 (DG-SANCO, 2003) e che in questo ultimo biennio nell'Italia Settentrionale si osserva una tendenza all'aumento delle superfici coltivate a cereali a paglia.

Infine, visto che ad oggi ancora non sono state fissate le massime concentrazioni tollerabili per queste micotossine negli alimenti per uso umano, bisogna ricordare che qualsiasi considerazione sull'entità delle contaminazioni da T-2 ed HT-2 deve essere considerata

puramente speculativa e passibile di diversa considerazione e giudizio, quando i suddetti limiti verranno determinati.

Bibliografia

1. Bottalico A, Logrieco A, Visconti A. *Fusarium* species and their mycotoxins in infected corn in Italy. *Mycopathologia* 1989;107(2-3):85-92.
2. Bottalico A. *Fusarium* diseases in cereals: species complex and related mycotoxin profiles in Europe. *Journal of Plant Pathology* 1998;80(2):85-103.
3. CAST. *Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems*. Ames, Iowa: Council for Agricultural Science and Technology; 2003. (Task force report, no. 139)
4. Directorate-General Health and Consumer Protection (DG-SANCO) - UE. *Collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of eu member states*. 2003. (Final Report SCOOP Task 3.2.10)
5. FAO. *Manual on the application of the HACCP System in mycotoxin prevention and control*. Roma: FAO; 2001. (Food And Nutrition Paper 73). Disponibile all'indirizzo: <http://www.fao.org/docrep/005/y1390e/y1390e00.HTM>; ultima consultazione 2/10/07.
6. Hsu I-C, Smalley EB, Strong FM, Ribelin WE. Identification of T-2 toxin in moldy corn associated with a lethal toxicosis in dairy cattle. *Appl Microbiol* 1972;24:684-90.
7. International Agency for Research on Cancer (). Toxins derived from *Fusarium sporotrichioides*: T-2 toxin. pp 467-488. In: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, (Volume 56). Lyon, France: IARC; 1993.
8. JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). *Evaluation of certain mycotoxins in food: fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. Geneva: WHO; 2001. (WHO technical report series; 906).
9. Joffe AZ, Yagen B. Comparative study of the yield of T-2 toxin produced by *Fusarium poae*, *F. sporotrichioides* and *F. sporotrichioides* var. *tricinctum* strains from different sources. *Mycopathologia* 1977;60:93-8.
10. Logrieco A, Moretti A, Ritieni A, Bottalico A, Corda P. Occurrence and toxigenicity of *Fusarium proliferatum* from preharvest maize ear rot, and associated mycotoxins, in Italy. *Plant Disease* 1995;79(7):727-31.
11. Moss MO, Thrane U. *Fusarium* taxonomy with relation to trichothecene formation. *Toxicology Letters* 2004;153:23-8.
12. Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:479-504.
13. Ramakrishna N, Lacey J, Smith JE. The effects of fungal competition on colonization of barley grain by *Fusarium*). *Food Additives and Contaminants* 1996;13(8):939-48.
14. Visconti A, Lattanzio VMT, Pascale M, Haidukowski M. Analysis of T-2 and HT-2 toxins in cereal grains by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 2005;1075:151-8.

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 Protezione Ambiente, Emilia Romagna, Bologna*

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Bologna*

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

Nel 2003, il particolare andamento della stagione agronomica in Italia ha causato una forte contaminazione da aflatossine nelle granaglie destinate all'alimentazione zootecnica, con il conseguente innalzamento dei residui di aflatossina M₁ nel latte. Si è venuta così a creare una situazione di emergenza ed è stato necessario mettere in atto un piano per prevenire e ridurre il rischio di contaminazione da aflatossine lungo le diverse fasi che contraddistinguono la filiera del latte.

Il rilevamento della presenza non usuale di micotossine nei prodotti alimentari ha imposto la necessità dell'adozione di modalità e criteri di controllo armonizzati in tutto l'ambito territoriale della Regione Emilia-Romagna, al fine di individuare situazioni di rischio per i consumatori e di mettere in atto le necessarie misure correttive prima di raggiungere livelli di contaminazione del latte prossimi ai limiti di legge.

Gli organi regionali competenti hanno predisposto un apposito piano di controllo che ha coinvolto tutte le aziende produttrici di latte e suoi derivati dell'intero territorio regionale.

Superata la fase di emergenza, sono stati ampliati i controlli predisponendo, a partire dal 2004, un piano coordinato per tenere monitorato il livello di contaminazione da micotossine, oltre che nella filiera del latte, anche in altri settori alimentari: granelle e farine di cereali destinati all'alimentazione umana e zootecnica, mangimi per gli animali, produzioni lattiero casearie e prodotti di origine vegetale destinati all'alimentazione umana (spezie, succhi di frutta, farine, cereali, vino, caffè, cacao).

I controlli sono stati condotti dai Servizi Veterinari e Servizi Igiene Alimenti Nutrizione (SIAN) dei Dipartimenti di Sanità Pubblica delle Aziende USL, che si sono avvalsi dei laboratori dell'Agenzia Regionale Prevenzione Ambiente dell'Emilia Romagna (ARPA) per i campioni di alimenti vegetali destinati al consumo umano, e dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) della Lombardia ed Emilia-Romagna per gli alimenti zootecnici, il latte e i derivati del latte.

Il sistema regionale di sorveglianza messo in atto a partire dal 2004, modificato in corso d'opera secondo le esigenze legate alla stagionalità e ai risultati del monitoraggio, è tuttora attivo e proseguirà per tutto il 2007, secondo i criteri indicati nel 2006.

Sistema di sorveglianza: strutturazione e fasi operative

A partire dal 2003, tutto il tessuto produttivo del sistema agro-alimentare è stato sottoposto ad un sistema di sorveglianza che si articola su tre fasi:

- Prima fase di emergenza (novembre 2003-marzo 2004);
- Seconda fase di post emergenza (aprile-dicembre 2004);
- Terza fase di sorveglianza (anni 2005/2006).

Fase 1: emergenza (novembre 2003 - marzo 2004)

Dai dati analitici rilevati con il Piano Nazionale Residui, nel periodo 2002 –2003 è emersa una preoccupante tendenza all'aumento delle positività da aflatossina M₁ in concomitanza con l'aumento di contaminazione di aflatossina B₁ nei foraggi prodotti nell'estate 2003, nonché del conseguente aumento di aflatossina M₁ nel latte prodotto a partire dal secondo semestre dello stesso anno. Nell'ottobre del 2003, gli organi regionali competenti pubblicano una nota¹ con la quale si interviene in modo mirato su:

- Tutti gli stabilimenti di lavorazione del latte, mediante prelievo di campioni ufficiali, affiancati da verifiche in autocontrollo con cadenza settimanale/quindicinale/mensile in ragione della capacità produttiva e dello stato dell'azienda.
- I mangimifici, con campioni ufficiali e in autocontrollo su tutti i lotti di granella di mais e altre materie prime
- Tutti gli allevamenti di bovini da latte della Regione, mediante il prelievo conoscitivo di latte in ciascuna azienda, considerando come soglia di attenzione per l'aflatossina M₁ il valore di 40 ppt in stalla riscontrato con il metodo ELISA. Nel caso di individuazione di situazioni a rischio, venivano eliminate le partite di mais sospette con il contemporaneo utilizzo di adsorbenti nell'alimentazione animale. A questa operazione faceva seguito un ulteriore controllo dopo 7 giorni mediante prelievo ufficiale, e sospensione dell'utilizzo del latte a scopo alimentare in caso superamento del valore-soglia (54 ppt).

Fase 2: post emergenza (aprile-dicembre 2004)

Nell'aprile del 2004 la Regione decide di procedere pubblicando un'ulteriore nota² con cui sottopone a controllo:

- Depositi di granaglie e mangimifici, mediante le verifiche dei piani di autocontrollo, della rintracciabilità della merce, nonché con prelievi in autocontrollo di tutti i lotti di granella di mais, affiancati da campioni ufficiali nei mangimifici;
- Allevamenti, mediante prelievi conoscitivi secondo un piano di monitoraggio mensile di 292 aziende di bovine da latte, scelte in base alla presenza di fattori di rischio (pregressa positività allo screening, numero di capi in lattazione, utilizzo di alimenti di produzione aziendale, scorte di mangimi in eccesso rispetto al fabbisogno e conservati inadeguatamente). In caso di positività era prevista la medesima procedura individuata in fase di emergenza, seguita dopo almeno 3 giorni da un prelievo del latte in autocontrollo e da un immediato controllo ufficiale, con sospensione dell'utilizzo del latte a scopo alimentare in caso di positività;
- Stabilimenti di lavorazione del latte, mediante autocontrollo su tutte le cisterne in entrata, controllo della rintracciabilità e prelievi ufficiali a cadenza mensile;
- Caseifici, con prelievi in autocontrollo su tutte le cisterne in entrata nei caseifici di produzione di formaggio fresco, prelievi in autocontrollo su tutte le caldaie con cadenza mensile o trimestrale (secondo l'entità produttiva) negli impianti produttori di formaggi stagionati, affiancati dal controllo ufficiale su almeno 1 caldaia ogni 2/3 mesi per piccoli impianti e su 2 caldaie ogni 2/3 mesi per stabilimenti di grandi dimensioni;

- Vegetali e derivati per alimentazione umana (arachidi, pistacchi, cacao, spezie), mediante piano di campionamento con prelievi ufficiali alla produzione e al commercio.

Per un migliore controllo sulle contaminazioni in tutta la filiera alimentare, l'Assessorato alle Politiche per la Salute e l'Assessorato all'Agricoltura hanno pubblicato linee guida, finalizzate alla predisposizione di manuali di buona pratica di lavorazione e autocontrollo per i produttori e stoccatore di mais e alla definizione di misure preventive per l'acquisto di materie prime e mangimi rivolte per gli allevatori.

Fase 3: sorveglianza (anni 2005 e 2006)

A partire dal 2005, gli organi regionali emettono un'ulteriore nota che consolida il sistema dei controlli mediante l'impostazione della fase di sorveglianza. Questa prevede in tutti i punti della filiera attività di controllo per mezzo di prelievi di carattere ufficiale, sempre comunque affiancati dagli adempimenti in autocontrollo in capo alle aziende produttive secondo le vigenti normative.

Sulla base dei risultati ottenuti nel 2004, è stato ridotto a 100 il numero dei campioni effettuati nelle aziende di bovini da latte, consentendo tuttavia di rilevare le irregolarità e apportare le opportune azioni correttive (Figura 1).

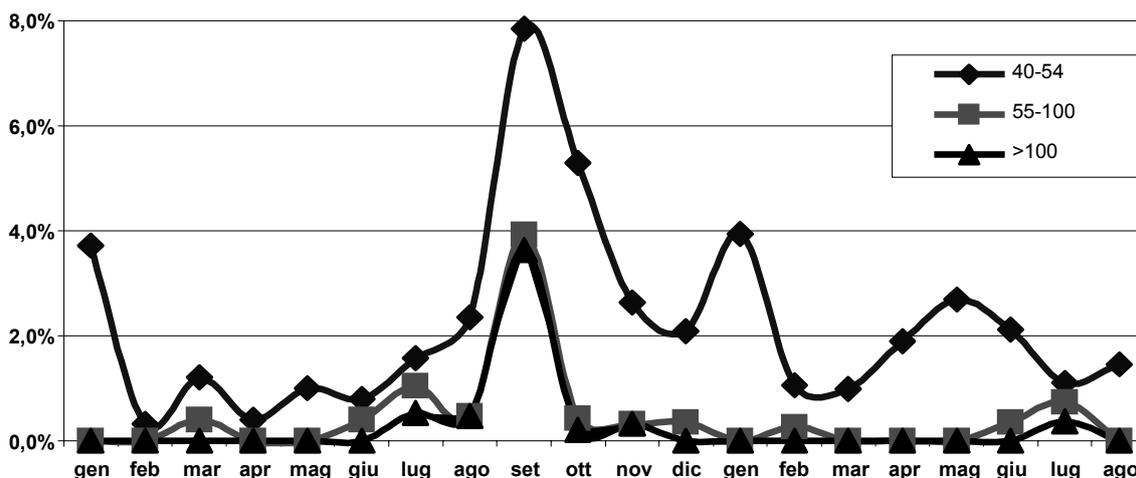


Figura 1. Andamento della concentrazione di AF M₁ nel latte prelevato in allevamento e misurata con metodo ELISA

Infatti con una successiva nota sono state definite più dettagliate procedure di sorveglianza comprendenti modalità di prelievo, tempi di risposta, comunicazione tra aziende produttrici e Servizi addetti al controllo ufficiale, provvedimenti da adottarsi a seguito di risultati analitici irregolari. Per quanto riguarda i controlli alla produzione e al commercio sui prodotti vegetali e derivati, fin dal 2004 sono stati forniti ai Servizi di controllo i criteri relativi alla significatività dei campionamenti, alle corrette modalità di prelievo e di trasporto dei campioni – in ragione delle specifiche matrici campionate – e alla loro distribuzione temporale nell'arco dell'anno,

anche in raccordo con specifici piani previsti da ulteriori programmi ufficiali di controllo. Oltre all'aflatossina M₁ sono state ricercate nelle matrici di origine vegetale anche le aflatossine B₁ e totali, l'ocratossina A e la patulina e, a partire dal 2006, anche le *Fusarium*-tossine.

Risultati

Sono stati prelevati complessivamente più di 880 campioni di alimenti di uso zootecnico, riscontrando nel periodo di emergenze e post emergenza una percentuale di irregolarità pari al 7,4% su 406 campioni. Le irregolarità riscontrate nelle fasi successive sono sensibilmente diminuite passando al 2% nel 2005 e intorno al 1,5% nel 2006. Per quanto riguarda il latte, nelle fasi di emergenza e post emergenza sono stati prelevati complessivamente 8453 campioni conoscitivi negli allevamenti bovini, a cui si aggiungono ulteriori 5224 campioni ufficiali negli allevamenti bovini, negli stabilimenti riconosciuti per la produzione di latte alimentare e nei caseifici. Dalle Tabelle 1 e 2 si evince come le percentuali di irregolarità dal 2003 ad aprile 2005 siano sensibilmente diminuite passando dal 20% del novembre 2003 allo 0,5% dell'aprile 2005 per i campioni conoscitivi (Tabella 1), mentre per i campioni ufficiali si è passati dal 11% allo 0% (Tabella 2). L'incongruenza riscontrata tra i risultati ottenuti sui campioni conoscitivi e quelli ufficiali ha motivato la decisione di proseguire nel piano di sorveglianza utilizzando esclusivamente metodiche di prelievo ufficiale.

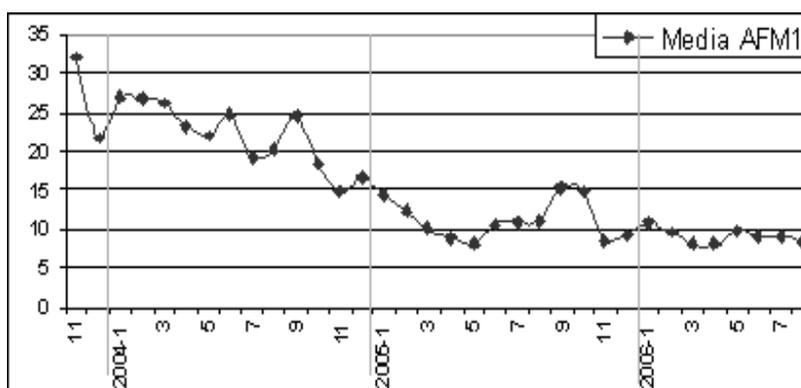
Esaminando l'andamento della concentrazione media di aflatossina M₁ nel latte prelevato in azienda e misurato con il metodo ELISA da novembre 2003 fino a settembre 2006 (Figura 2), emerge un andamento tendenzialmente favorevole e decrescente, ad eccezione del periodo luglio-ottobre 2005, nel quale si è osservato un picco determinato dall'aumento dei campioni ai limiti della positività, come già evidenziato nella Figura 1, ma anche un aumento di quelli decisamente fuori dai limiti di legge.

Tabella 1. Risultati delle analisi della ricerca di AF M₁ nel latte prelevato con campioni conoscitivi

Periodo	Totali	Reg	Irreg	% irreg	<40	40-54	55-100	>100
2003 novembre	1827	1462	365	20,0	1252	210	315	50
dicembre	3042	2800	242	8,0	2591	209	214	28
2004 gennaio	174	147	27	15,5	125	22	23	4
febbraio	28	25	3	10,7	22	3	3	0
marzo	59	55	4	6,8	46	9	4	0
aprile	89	78	11	12,4	73	5	11	0
maggio	264	249	15	5,7	228	21	14	1
giugno	346	318	28	8,1	285	33	20	8
luglio	347	329	18	5,2	312	17	13	5
agosto	312	294	18	5,8	277	17	13	5
settembre	291	268	23	7,9	251	17	16	7
ottobre	277	268	9	3,2	249	19	5	4
novembre	346	342	4	1,2	328	14	0	4
dicembre	314	302	12	3,8	293	9	7	5
2005 gennaio	178	171	7	3,9	170	1	5	2
febbraio	125	123	2	1,6	122	1	1	1
marzo	230	227	2	0,9	223	4	1	1
aprile	204	203	1	0,5	203	0	1	0
Totale	8453	7661	791	9,4	7050	611	666	125

Tabella 2. Risultati delle analisi della ricerca di AF M₁ nel latte prelevato con campioni ufficiali

Periodo	Totali	Reg	Irreg	% irreg	<40	40-54	55-100	>100
2003 novembre	189	168	21	11,1	125	43	18	3
dicembre	859	809	50	5,8	509	300	43	7
2004 gennaio	572	546	26	4,5	396	150	16	10
febbraio	131	122	9	6,9	90	32	6	3
marzo	97	87	10	10,3	64	23	9	1
aprile	52	41	11	21,2	35	6	7	4
maggio	234	223	11	4,7	189	34	6	5
giugno	340	333	7	2,1	298	35	6	1
luglio	309	295	14	4,5	267	28	13	1
agosto	298	296	2	0,7	273	23	1	1
settembre	262	257	5	1,9	223	34	2	3
ottobre	309	305	4	1,3	293	12	4	0
novembre	348	348	0	0,0	345	3	0	0
dicembre	213	213	0	0,0	205	8	0	0
2005 gennaio	170	170	0	0,0	164	6	0	0
febbraio	313	313	0	0,0	312	1	0	0
marzo	255	254	1	0,4	251	3	1	0
aprile	273	273	0	0,0	272	1	0	0
Totale	5224	5053	171	3,3	4311	742	132	39

Figura 2. Andamento della concentrazione media di AF M₁ riscontrata nel latte con metodo ELISA

Le indagini effettuate nel periodo 2004-2006 sulle matrici di origine vegetale destinate all'alimentazione umana, riassunte nella Tabella 3, hanno evidenziato alcune criticità specialmente per quanto riguarda le aflatossine nei semi oleaginosi di importazione da paesi terzi; tra questi i pistacchi sono risultati i prodotti più a rischio con le percentuali di irregolarità più elevate: tali campioni hanno presentato valori di aflatossina AFB₁ compresi tra 10.0 e 50.0 ppb e oltre. Si è notato inoltre che già dal 2003 la percentuale di campioni di semi oleaginosi non conformi era passata dal 4.0% degli anni precedenti al 13.2%, e nel 2004 ha toccato il 24% per tornare sul 14.0% nel 2005. Da segnalare che il 2003 coincide con l'inizio da parte del laboratorio ARPA e delle AUSL dell'adozione del sistema di campionamento previsto dalle norme UE: campione globale da 10 a 30 kg, macinazione e preparazione degli slurry, e successiva suddivisione delle aliquote.

Tabella 3. Risultati delle analisi della ricerca di aflatossine B₁ e totali nelle matrici vegetali

Matrice vegetale	Totale	Parametri	< 0,5 ppb	0,5/2 ppb	2/4 ppb	4/10 ppb	10/50 ppb	>50 ppb
Sfarinati mais, grano e cereali								
2004	179	AF - TOT	172	2	1	2	2	0
		AF - B1	172	3	0	3	1	0
2005	173	AF - TOT	165	6	2	0	0	0
		AF - B1	165	6	2	0	0	0
2006	105	AF - TOT	103	1	0	1	0	0
		AF - B1	103	1	0	0	1	0
Frutta secca, semi oleaginosi e paste per gelati								
2004	56	AF - TOT	41	2	2	0	4	7
		AF - B1	41	2	2	0	6	5
2005	307	AF - TOT	276	10	4	5	8	4
		AF - B1	277	12	1	5	8	4
2006	27	AF - TOT	25	2	0	0	0	0
		AF - B1	25	1	0	0	0	0
Spezie e erbe								
2004	34	AF - TOT	30	1	1	2	0	0
		AF - B1	30	1	2	1	0	0
2005	18	AF - TOT	16	2	0	0	0	0
		AF - B1	16	2	0	0	0	0
2006	11	AF - TOT	7	1	0	2	1	0
		AF - B1	7	1	2	0	1	0

Per quanto riguarda il 2006 la mancanza di riscontro di positività è probabilmente da addebitarsi all'incompleta attuazione del piano di monitoraggio al mese di settembre; infatti per molte matrici in particolare frutta secca e semi oleaginosi i campionamenti sono concentrati nella stagione invernale novembre-gennaio.

Per quanto riguarda la contaminazione dei cereali, le aflatossine sono state riscontrate nel mais, mentre nel frumento è stata rilevata l'ocratossina A a livelli superiori i limiti di legge in 2 campioni (Tabella 4). Tra le spezie, le erbe officinali analizzate, anche se spesso contaminate da ifomiceti, non hanno evidenziato contaminazione da micotossine ad eccezione di 4 campioni nel 2006, di cui 1 presentava valori di AFB₁ pari a 10.1 ppb e Totali pari a 19,4 ppb.

Tabella 4. Risultati delle analisi della ricerca di ocratossina A nelle matrici vegetali

Matrice	Tot.	Inferiori al L.R.	Positivi	Irregolari	Anno
Cereali	116	113	1	2	2004
	147	145	2	0	2005
	71	69	2	0	2006
Vino	31	26	5	0	2004
	66	64	2	0	2005
	57	36	20	1	2006
Frutti essiccati della vite	20	8	12	0	2005
Cacao/ cioccolato	40	29	10	1	2004
	16	15	1	0	2005
	15	13	2	0	2006
Caffè	23	17	4	2	2004
	22	17	3	2	2005
	19	15	1	3	2006

L'ocratossina A è stata riscontrata in campioni di cacao caffè e cereali, ma nella maggior parte dei campioni i valori erano compresi entro i limiti di legge.

I risultati sulla ricerche della patulina negli alimenti per l'infanzia (indagine compresa nel piano di controlli coordinati a livello comunitario per il 2005) hanno presentato, sui succhi di frutta, valori comunque compresi entro i limiti di legge (Tabella 5).

Tabella 5. Risultati delle analisi della ricerca di patulina in succhi e puree di frutta

Tipologia	Tot.	Inferiori al L.R.	Positivi	Irregolari	Anno
Succhi e puree di frutta	38	34	4	0	2004
	34	32	1	1	2005
	19	17	2	0	2006

Conclusioni

I risultati dei controlli effettuati a partire dall'emergenza dell'estate 2003 e fino al settembre del 2006, consentono di affermare l'incontestabile efficacia della sinergia tra controllo ufficiale, espletato dalle AUSL regionali con il supporto dei Laboratori ufficiali di riferimento, l'autocontrollo effettuato dagli operatori del settore alimentare lungo tutta la filiera, gli indirizzi alle buone pratiche di produzione espletate dagli organi regionali e dalle Associazioni dei produttori. In particolare, il piano di sorveglianza regionale ha dimostrato di permettere:

- la condivisione del sistema di rilevazione tra i soggetti coinvolti nel controllo;
- la rilevazione regolare e il ritorno dei dati in tempi utili per attuare misure correttive;
- la sinergia nella predisposizione dei documenti ufficiali;
- l'affiancamento di azioni preventive e formative;
- l'integrazione con altri piani (PNR, PNAA, Programmi controlli coordinati UE, Linee guida del Min. Salute per la predisposizione dei Piani di Prevenzione da aflatossine 2006);
- la rilevazione delle criticità connesse con le procedure di controllo e autocontrollo;
- la possibilità di apportare modifiche in corso d'opera a fronte dei risultati e delle criticità rilevate.

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

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

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

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

(c) Applied Mycology Group, Cranfield Health, Cranfield University, Silsoe (United Kingdom)

Introduzione

In Italia nel 2003 sono stati evidenziati, per la prima volta, problemi legati alla presenza di aflatossine (AF) nel mais dovuti alla contaminazione da *Aspergillus* sezione *Flavi*. Il principale problema del mais in Italia è rappresentato dalla presenza di *Fusarium verticillioides* e alla conseguente contaminazione da fumonisina (Pietri *et al.*, 2004). L'estate del 2003 è risultata, però, particolarmente arida e calda, e il grave stress idrico subito dalle coltivazioni di mais ha determinato una elevata contaminazione da aflatossine della granella, con conseguente innalzamento dei livelli di AFM₁ nel latte e nei derivati, dato che questo prodotto viene comunemente utilizzato nelle razioni per vacche da latte (Battilani *et al.*, 2005). Inoltre, la scarsa esperienza degli addetti del settore per questa problematica, ha portato ad un peggioramento della situazione, creando notevoli perdite economiche nel settore lattiero caseario.

Le specie di *Aspergillus* sezione *Flavi* in grado di produrre aflatossine sono *A. flavus* e *A. parasiticus* (Kurtzman *et al.*, 1987). Queste specie sono morfologicamente molto simili; generalmente si considera che *A. flavus* produca solo AFB₁ e AFB₂ mentre *A. parasiticus* sia in grado di produrre anche le aflatossine G₁ e G₂ (Diener *et al.*, 1987; D'Mello e McDonald, 1997). Tuttavia, Gabal *et al.* (1994) hanno riscontrato ceppi di *A. flavus* capaci di produrre AFG₁ e, in qualche caso, anche AFG₂.

La pericolosità delle aflatossine è stata confermata dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro che ha classificato l'AFB₁ fra le sostanze della classe 1 (cancerogena per l'uomo) e l'AFM₁ fra quelle della classe 2B (possibile cancerogena per l'uomo) (Castegnaro e Wild, 1995). A causa della loro pericolosità, tutte le aflatossine sono regolamentate nella maggior parte dei Paesi del mondo, Europa inclusa, in diversi prodotti (CE, 2001).

Alcuni ceppi di *A. flavus* sono in grado di produrre anche acido ciclopiazonico (CPA). Esistono risultati contraddittori riguardanti l'effetto mutagenico del CPA, comunque ci sono prove del suo effetto inibitorio sulla mutagenicità di AFB₁ (Kuilman-Wahls *et al.*, 2002).

Le informazioni disponibili riguardo alla sensibilità di *A. flavus* e *A. parasiticus* alle condizioni di acqua libera (aw) sono scarse. Questi funghi svernano nel suolo o nei residui colturali e, non appena le condizioni ambientali diventano favorevoli, i conidi vengono dispersi nell'aria e si depositano sulle sete (Payne, 1992). I fattori abiotici fondamentali per lo sviluppo di questi funghi sono la disponibilità di acqua e la temperatura. Per determinare la crescita nel suolo e nei residui colturali, è importante la tolleranza sia allo stress da soluto sia a quello da matrice (Magan, 1988). Lo stress da soluto è determinato dagli scambi ionici di sali e dagli scambi non-ionici dovuti ai legami dell'acqua con i componenti dei residui colturali. Lo stress da matrice, invece, è dovuto all'adsorbimento dell'acqua e al fenomeno della tensione superficiale nel suolo, che porta un ridotto trasporto di soluti (Adebayo e Harris, 1971). Le

interazioni fra stress idrico e temperatura sono fondamentali, poiché rappresentano le nicchie bi-dimensionali in cui i funghi riescono a germinare, crescere e competere attivamente per le risorse disponibili (Marin *et al.*, 1998).

Lo scopo principale di questo studio è stato quello di caratterizzare una popolazione italiana di *Aspergillus* sezione *Flavi* costituita da isolati raccolti nelle regioni del nord Italia, area fondamentale per la produzione maidicola e, quindi, per il settore zootecnico e lattiero caseario.

Materiali e metodi

Caratterizzazione degli isolati. Durante un monitoraggio eseguito in campi di mais in nord Italia, sono stati raccolti 70 isolati di *Aspergillus* sezione *Flavi*, utilizzati poi per la caratterizzazione. Gli isolati sono stati inoculati centralmente su piastre Petri (Ø 6 cm) contenenti Czapek Agar (CZ) e incubati a 30°C al buio per 14 giorni. Le colonie sono poi state osservate per il colore, la morfologia e la dimensione dei conidiofori. Secondo Raper e Fennell (1965), il colore delle colonie di *A. flavus* e *A. parasiticus* è verde più chiaro il primo e più scuro il secondo. La lunghezza conidiofori è differente per le due specie (500 µm per *A. flavus* e da 200 µm a raramente più di 1 mm per *A. parasiticus*) e anche le serie degli sterigmi (primarie e secondarie per *A. flavus* e solo primarie per *A. parasiticus*) (Raper e Fennell, 1965). La produzione di sclerozi è un'altra caratteristica importante, osservata solo per *A. flavus* (Kozakiewicz, 1989). Gli sclerozi possono avere diametro > 400 µm (L) o < 400 µm (S) (Horn, 2003), valutazione eseguita su 5/2 agar a 31°C al buio per 5-7 giorni (Probst *et al.*, 2005).

Per determinare la produzione di aflatossine, gli isolati sono stati inoculati centralmente su piastre Petri (Ø 6 cm) contenenti Coconut Extract Agar (CEA) e incubati a 25°C al buio per 14 giorni. Dopo il periodo di incubazione, sono stati prelevati 3 tasselli da ciascuna piastra e ad essi è stato aggiunto 1 mL di metanolo (Bragulat *et al.*, 2001). Dopo 1 ora, la soluzione è stata filtrata con un filtro Millipore® (Ø 0.45 µm) e analizzata mediante HPLC con rivelazione fluorimetrica. La produzione di CPA è stata misurata trasferendo le colonie fungine su piastre Petri (Ø 6 cm) contenenti CZ e incubandole poi a 30°C al buio per 14 giorni. Dopo il periodo di incubazione, si è proceduto con la metodologia già seguita per l'analisi delle aflatossine (Bragulat *et al.*, 2001). L'estratto è stato analizzato mediante HPLC e rivelazione UV.

Prove ecologiche

Dei 70 isolati raccolti ne sono stati selezionati 40, sulla base della provenienza geografica, e ne sono state testate le capacità di crescita e di produzione di aflatossine in diverse condizioni di temperatura e aw. Tutti i 40 isolati sono stati inoculati centralmente su piastre Petri (Ø 9 cm) contenenti CZ e poi incubati al buio a 15, 25 e 30°C per 14 giorni. Gli stessi ceppi sono stati posti in piastre Petri (Ø 9 cm) contenenti CZ modificato con l'aggiunta di glicerolo a 3 diversi livelli di aw (800, 250 e 0 mL di glicerolo aggiunto per 1 L di CZ per ottenere rispettivamente 0,83, 0,94 e 0,995 aw). Le piastre sono state poi incubate a 25°C al buio per 14 giorni.

Dopo l'incubazione, il diametro delle colonie è stato misurato lungo le due direzioni ortogonali e il livello di AF prodotto è stato quantificato con la metodica descritta precedentemente. I dati ottenuti da queste prove sono stati sottoposti ad un'analisi cluster.

Stress idrico

Tre ceppi di *A. flavus* produttori di AF sono stati usati per determinare la risposta fungina allo stress idrico, sia da soluto sia da matrice. I ceppi sono stati trasferiti in piastre Petri (Ø 9 cm) contenenti un terreno minimale costituito da farina di mais (3%) e agar (2%). Il terreno di coltura è stato modificato osmoticamente aggiungendo il soluto ionico NaCl (Lang, 1967) e il soluto non-ionico glicerolo (Dallyn and Fox, 1980) a -2,8, -7,0, -14,0 e -21,0 MPa (=0,98, 0,95, 0,90 e 0,85 aw). Per ottenere le modificazioni da matrice, invece, al terreno minimale è stato aggiunto glicole polietilenico 8000 (PEG 8000) ricavando un terreno semi-solido. Le quantità aggiunte di PEG 8000 sono state derivate dall'equazione di Michel e Kaufmann (1973), ottenendo i potenziali di matrice di -2,8, -7,0 e -9,8 MPa (=0,98, 0,95 e 0,93 aw). Nelle piastre Petri (Ø 9 cm), oltre al terreno semi-solido ottenuto con il PEG 8000, è stato aggiunto uno strato di tessuto capillare, uno di poliestere e un dischetto di cellophane.

I vari terreni di coltura ottenuti sia con i soluti che con la matrice, sono stati inoculati centralmente con un tassello di agar prelevato da piastre Petri, su cui i 3 isolati di *A. flavus* erano stati posti per una notte a 25°C per permettere la germinazione delle spore. Le piastre così ottenute sono state poi incubate a 25 e 30°C con illuminazione per 12 ore al giorno.

I diametri delle colonie fungine sono stati misurati lungo le due direzioni ortogonali fino a un massimo di 14 giorni e i dati ottenuti sono stati utilizzati per determinare i tassi di crescita.

Risultati e discussione

Caratterizzazione degli isolati

La caratterizzazione degli isolati ha mostrato che dei 70 ceppi analizzati, il 73% ha prodotto sclerozi. Il 70% dei ceppi ha prodotto AFB₁ e il 61% CPA (Figura 1), mentre il 50% ha prodotto entrambe le micotossine. I risultati ottenuti da queste analisi hanno fornito un valido aiuto per l'identificazione degli isolati e, grazie a questi e all'osservazione al microscopio, è stato possibile attribuire i ceppi alle due principali specie *A. flavus* e *A. parasiticus* nella proporzione, rispettivamente, del 93% e 7%. Questo differisce da altri studi condotti negli Stati Uniti, dove la percentuale di *A. parasiticus* era ben più alta (28%) ma, soprattutto, la percentuale di isolati in grado di produrre la tossina era solo il 53% (Wicklow *et al.*, 1998) mentre in Italia è risultata pari al 70%.

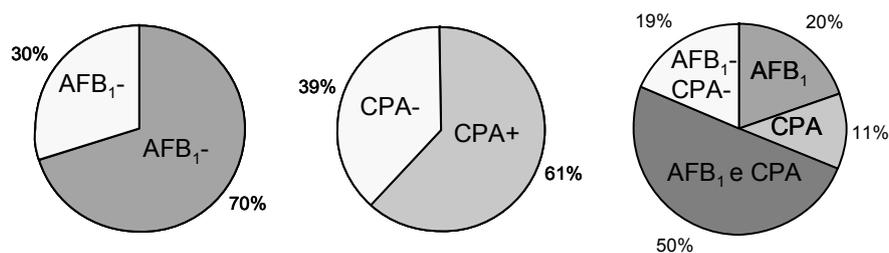


Figura 1. Percentuale di isolati di *A. section Flavi* in grado di produrre AFB₁ e CPA

Prove ecologiche

Gli studi preliminari sulle esigenze ecologiche degli isolati hanno evidenziato che le condizioni ottimali per il loro sviluppo e la produzione di AF 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 AF è diminuita in modo consistente, azzerandosi a 0,83 aw. A 30°C la crescita del fungo è stata maggiore rispetto a quella a 25°C, ma la produzione di AF è risultata bassa e paragonabile a quella ottenuta a 15°C (Figura 2). Questo sembra suggerire che gli isolati italiani siano meno termofili di quelli di altre aree geografiche, dato che da studi precedenti (Scott *et al.*, 1970 e Kheiralla *et al.*, 1992) le temperature ottimali per la produzione di AF erano risultate 28 e 30°C.

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 AF bassi (<1,85 ng/g/giorno), il secondo con quelli alto produttori in tutte le condizioni testate (produzione media di 60 ng/g/giorno) e il terzo con quelli medio-produttori o alti produttori, ma solo ad alcune delle condizioni testate (produzione media di 10 ng/g/giorno) (Figura 2).

CEPPO	NUMERO PROGRESSIVO	TEMPERATURA						Aw						
		15		25		30		0.83		0.94		0.99		
		B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	B	G	
A 2054	1													
A 2110	2													
A 2069	3													
A 2111	4													
A 2071	5													
A 2077	6													
A 2065	7													
A 2086	8													
A 2067	9													
A 2061	10													
A 2097	11													
A 2104	12													
A 2099	13													
A 2063	14													
A 2070	15													
A 2041	16													
A 2046	17													
A 2092	18													
A 2055	19													
A 2053	20													
A 2068	21													
A 2094	22													
A 2059	23													
A 2039	24													
A 2060	25													
A 2040	26													
A 2095	27													
A 2042	28													
A 2101	29													
A 2073	30													
A 2079	31													
A 2049	32													
A 2078	33													
A 2082	34													
A 2048	35													
A 2091	36													
A 2106	37													
A 2052	38													
A 2056	39													
A 2062	40													

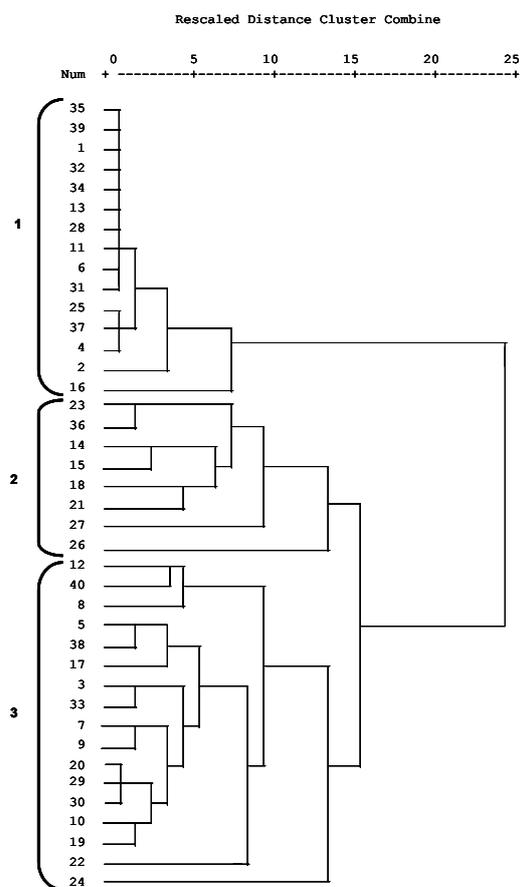


Figura 2. Capacità dei 40 ceppi di A. sezione flavi esaminati di produrre aflatoxine di tipo B e G nelle diverse condizioni di temperatura e aw prese in considerazione e distribuzione nei cluster

Stress idrico

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 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). Le temperature di 25 e 30°C sono state scelte poiché considerate ottimali per la crescita di *A. flavus* (Kheiralla *et al.*, 1992, Neschi *et al.*, 2004). Gli isolati italiani hanno mostrato una crescita maggiore a 30°C nei terreni modificati con PEG 8000 e a 25°C in quelli modificati con i soluti. Questo differisce da uno studio condotto su ceppi argentini, in cui solo le temperature di 20 e 30°C erano state considerate, ottenendo la seconda come ottimale per entrambi i tipi di modifiche al potenziale idrico (Neschi *et al.*, 2004) (Figura 3).

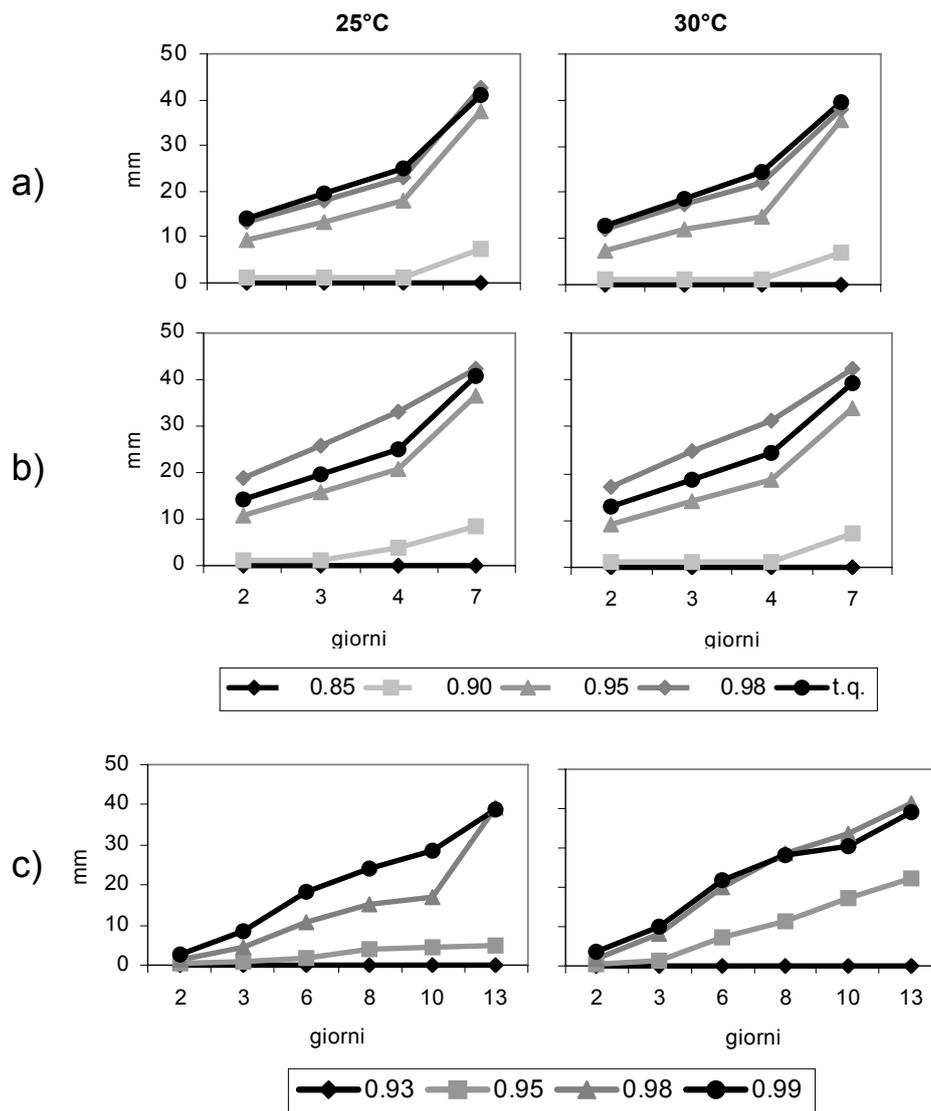


Figura 3. Crescita media nel tempo dei ceppi di *A. flavus* alle diverse condizioni di aw e temperatura nei trattamenti con glicerolo (a), NaCl (b) e PEG 8000 (c)

Si può concludere, quindi, che gli isolati italiani siano in grado, potenzialmente, di colonizzare i residui colturali direttamente o attraverso il suolo alle condizioni più favorevoli di temperatura e stress idrico.

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

Bibliografia

1. Adebayo AA, Harris RF. Fungal growth responses to osmotic as compared to matric water potential. *Soil Sci Soc America* 1971;35:465-9.
2. Battilani P, Scandolara A, Barbano C, Pietri A, Bertuzzi T, Marocco A, Berardo N, Vannozzi GP, Baldini M, Miele S, Salera E, Maggiore T. Monitoraggio della contaminazione da micotossine in mais. *L'informatore agrario* 2005;61:47-9.
3. Bragulat MR, Abarca ML, Cabanes FJ. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *Int J Food Microbiol* 2001;71:139-44.
4. Castegnaro M, Wild CP. IARC activities in mycotoxin research. *Natural Toxins* 1995;3:327-31.
5. Commission of the European Communities. EC Regulation 466/01. *Off J European Union*, L 77/1, 16.03.2001.
6. Dallyn H, Fox A. Spoilage of materials of reduced water activity by xerophilic fungi. In: Gould GH, Corry JEL (Ed.). *Microbial growth and survival extremes of environment*. London, United Kingdom: Academic Press, 1980. p. 129-139.
7. Diener UL, Cole RJ, Sanders TH, Payne GA, Lee LS, Klich MA. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Ann Rev Phytopathol* 1987;25:249-70.
8. D'Mello JPF, MacDonald AMC. Mycotoxins. *Animal Feed Sci Technol* 1997;69:155-66.
9. Gabal MA, Hegazi SA, Hassanin N. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* field isolates. *Veterinary and Human Toxicology* 1994;36:519-21.
10. Horn BW. Ecology and population biology of aflatoxigenic fungi in soil. *J Toxicol-Toxins Rev* 2003;22, 355-383.
11. Kheiralla ZH, Hassanin NI, Amra H. Effect of incubation time, temperature and substrate on growth and aflatoxin production. *Int Biodeterioration & Biodegradation* 1992;30:17-27.
12. Kozakiewicz Z. *Aspergillus species on stored products*. CABI international; 1989.
13. Kuilman-Wahls MEM, Sabater Vilar M, de Nijs-Tjon L, Maas RFM, Fink-Gremmels J. Cyclopiazonic acid inhibits mutagenic action of aflatoxin B1. *Envir Toxicol Pharmacol* 2002;11:207-12.
14. Kurtzman CP, Horn BW, Hesseltine CW. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaris*. *Antonie van Leeuwenhoek* 1987;53:147-58.
15. Lang ARG. Osmotic coefficients and water potentials of sodium chloride solutions from 0-40°C. *Aust J Chem* 1967;20:2017-23.
16. Magan N. Effect of water potential and temperature on spore germination and germ-tube growth *in vitro* and on straw leaf sheaths. *Trans British Mycol Soc* 1988;90:97-107.
17. Marin S, Sanchis V, Sàenz R, Ramos AJ, Vinas I, Magan N. Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium* spp. from maize grain. *J Appl Microbiol* 1998;84:25-36.

18. Michel BE, Kaufmann MR. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiol* 1973;51:914-6.
19. Neschi A, Etcheverry M, Magan N. Osmotic and matric potential effects on growth, sugar alcohol and sugar accumulation by *Aspergillus flavus* Flavi strains from Argentina. *J Appl Microbiol* 2004;96:965-72.
20. Payne GA. Process of contamination by aflatoxin-producing fungi and their impact on crops. In: Sinha KK, Bhatnagar D (Ed.). *Mycotoxins in agriculture and food safety*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1998. p. 279-306.
21. Pietri A, Bertuzzi T, Pallaroni L, Piva G. Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in Northern Italy. *Food Add Contam* 2004;21:479-87.
22. Probst C, Njapau H, Cotty PJ. The S strain of *Aspergillus flavus* is associated with the highly contaminated maize that resulted in deadly aflatoxicoses in Kenya during 2004. In: *Book of Abstracts of The World Mycotoxin Forum, the 3rd conference*. 10-11 November 2005; Noordwijk, The Netherlands. 2005.
23. Raper KB, Fennell DI. *The genus Aspergillus*. New York, NY: Robert E. Krieger Publ Comp Inc.; 1965
24. Scott PM, Lawrence JW, Van Walbeek W. Detection of mycotoxins by thin layer chromatography: application to screening of fungal extracts. *Appl Microbiol* 1970;20:839-42.
25. Wicklow DT, Mcalpin CE, Platis CE. Characterization of the *Aspergillus flavus* population within an Illinois maize field. *Mycological Research* 1998;102:263-8.

VALUTAZIONE AGRONOMICA DELL'ESPOSIZIONE AL RISCHIO DI ACCUMULO DI FUMONISINE NELLA GRANELLA DI MAIS

Andrea Maiorano (a), Guido Maffioli (b), Cesare Ramponi (b), Amedeo Reyneri (a)

(a) Dipartimento di Agronomia, Selvicoltura e Gestione del Territorio, Università di Torino, Torino

(b) Dipartimento Studi e Sperimentazioni, Pioneer Hi-Bred Italia

Introduzione

La severità dei limiti che sono attualmente in discussione per le fumonisine in sede di Unione Europea per i prodotti destinati all'alimentazione umana (Reg. 856/2005) e animale (Racc. della Commissione Europea n° 2006/576/CE) e che dovrebbero entrare in vigore a partire dal 1 ottobre 2007, preoccupa tutti i settori della filiera mais a causa delle contaminazioni registrate negli ultimi anni negli areali maidicoli italiani (CRA, 2005; Battilani *et al.*, 2005).

Questo problema sta quindi sollecitando la ricerca di soluzioni agronomiche in grado di permettere un adeguato controllo delle *Fusarium*-tossine. È infatti dal campo che inizia la contaminazione ed è quindi a partire dalla coltivazione che è necessario intervenire per prevenire lo sviluppo dei funghi tossigeni e la relativa produzione di indesiderabili concentrazioni di micotossine nella granella (Munkvold, 2003; Edwards, 2004; Blandino *et al.*, 2006). La messa a punto di percorsi colturali in grado di ridurre la crescita e lo sviluppo delle muffe tossigene nella granella di mais è il principale obiettivo di una ricerca svolta da una collaborazione tra Pioneer Hi-Bred Italia e il Dip. Agroselviter dell'Università di Torino, iniziata nel 2003.

Impostazione della ricerca

Nell'ambito di una sperimentazione ancora in corso, nel triennio 2003-2005, sono stati raccolti oltre 1300 campioni da parcelle provenienti da 75 campi sperimentali distribuiti in 25 province della Pianura Padana Veneta nei più importanti areali maidicoli italiani.

Sono state valutate le tecniche agronomiche sulle quali il maiscoltore ha maggiore possibilità di scegliere tra differenti opzioni, orientando le proprie azioni avvalendosi di dati e sistemi di supporto alle decisioni oppure realizzandole secondo la tradizione aziendale.

Campi sperimentali e tesi

I campi sperimentali erano costituiti da parcelle ognuna di 12 o 24 file di larghezza per una lunghezza variabile tra i 50 m e i 200 m.

Su 1 ibrido di riferimento di classe FAO 500 e 128 giorni di maturazione, sono state messe a confronto le combinazioni tra le seguenti tesi secondo un modello fattoriale:

- 2 epoche di semina (ottimale e ritardata);
- 2 strategie di controllo della piralide (trattato chimicamente e non trattato);
- 2 densità di semina (ottimale e maggiorata di 1,5 piante/m²);
- 5 livelli di concimazione azotata (da 0 a 450 kg N/ha).

In 2 località per anno sono state eseguite raccolte a 4 livelli di umidità differenti: (I) maggiore del 30%, (II) tra il 30% e il 26%, (III) tra il 26% e il 22%, (IV) minore del 22%.

Rilievi sperimentali e campionamenti durante la maturazione

Tutti i campi sono stati monitorati intorno al periodo della fioritura e a più riprese durante la maturazione e sono state raccolte informazioni relative agli eventuali danni subiti dalla coltura, per decidere se includere i dati analitici del prodotto alla raccolta nell'elaborazione finale, e allo stadio fenologico.

In 4 località per anno, sono stati eseguiti ulteriori rilievi sperimentali a cadenza settimanale a partire dallo stadio precedente l'emissione del pennacchio fino alla maturazione di raccolta, per rilevare i seguenti parametri:

- stadio fenologico della coltura,
- danno da prima generazione di piralide, calcolando l'incidenza delle piante colpite dalla tipica "impallinatura";
- danno da seconda generazione di piralide descritto con l'incidenza e la gravità delle rosure sulle spighe;
- ammuffimenti descritti con l'incidenza e la gravità delle muffe visibili;
- determinazione dell'umidità della granella.

Raccolta dei campioni

La raccolta dei campioni si è svolta secondo 2 modalità: raccolta manuale di campioni di spiga e raccolta dal carro di campioni di granella.

La raccolta manuale è stata eseguita nei 4 campi oggetto dei rilievi più approfonditi, su tutte le tesi sperimentali presenti nel campo e ha previsto il prelievo di 100 spighe per tesi. Su 50 spighe per ogni campione è stata eseguita l'analisi visiva per determinare incidenza e gravità degli ammuffimenti e delle rosure da piralide. Successivamente all'analisi visiva, è stato preparato un campione da 5 kg che è stato congelato fino al momento delle analisi chimiche. Da un secondo campione da 3 kg è stato ricavato un sottocampione di granella di 200 g sul quale è stata effettuata un'analisi visiva volta a distinguere la quantità relativa delle seguenti frazioni di granella: granella sana, spezzata, con rosure da piralide e con ammuffimenti rosa, rossi e scuri.

La raccolta dal carro, eseguita su tutti i campioni della sperimentazione ad opera dei tecnici del Servizio Agronomico Pioneer, ha previsto la raccolta di un campione da 3 kg della granella in uscita dai carri da pesata (weigh wagon) utilizzati normalmente da Pioneer Hi-Bred Italia per la raccolta dei campi sperimentali.

Analisi di laboratorio

Tutti i campioni sono stati sottoposti ad analisi con strumentazione NIRS per la determinazione dei parametri qualitativi della granella (peso specifico, sostanza secca, ceneri, proteina grezza, estratto etereo, NDF, amido, fibra grezza) e ad analisi chimiche per la determinazione delle fumonisine con metodica strumentale ELISA e HPLC presso i laboratori di Pioneer Hi-Bred Italia.

Risultati

Come sintesi di tutto il lavoro svolto nella sperimentazione triennale, è stato elaborato il sistema di valutazione agronomica dell'esposizione al rischio di accumulo di fumonisine. Tale sistema, modulando le informazioni fornite dalle tesi di campo, intende fornire uno strumento tecnico per la valutazione, dal punto di vista agronomico, del rischio di contaminazione da fumonisine a cui viene esposto il raccolto (Tabella 1).

Tabella 1. Sistema di valutazione dell'esposizione agronomica al rischio di accumulo di fumonisine

Epoca di semina ^z	Ottimale 1							
Trattamento piralide ^y	T 1				NT 3			
Epoca raccolta ^x	precoce 1		tardiva 3		precoce 1		tardiva 2	
Densità di semina ^w	Ideale 1	alta 1.5	Ideale 1	alta 1	Ideale 1	alta 1	Ideale 1	alta 1
Concimazione (N) ^v	equil. 1	diseq. 1.5	equil. 1	diseq. 1	equil. 1	diseq. 1	equil. 1	diseq. 1
Coefficiente di Esposizione al Rischio	1.0	1.5 - 2.3	3.0	3.0	3.0	3.0	6.0	6.0
Percorso colturale ^u	A	B	C	D	E	F	G	H
Epoca di semina	Tardiva 5							
Trattamento piralide	T 1				NT 1.5			
Epoca raccolta	precoce 1		tardiva 2		precoce 1		tardiva 2	
Densità di semina	Ideale 1	alta 1	Ideale 1	alta 1	Ideale 1	alta 1	Ideale 1	alta 1
Concimazione (N)	equil. 1	diseq. 1	equil. 1	diseq. 1	equil. 1	diseq. 1	equil. 1	diseq. 1
Coefficiente di Esposizione al Rischio	5.0	5.0	10.0	10.0	7.5	7.5	15.0	15.0
Percorso colturale	I	L	M	N	O	P	Q	R

(z) Epoca di semina ottimale individuata secondo le indicazioni del Programma Semina Anticipate® di Pioneer Hi-Bred Italia. Epoca di semina tardiva effettuata a maggio; (y) T = trattato nelle date indicate a cura del Dip. Studi e Sperimentazioni di Pioneer Hi-Bred Italia, NT = Non trattato; (x) Precoce = umidità granella maggiore al 24%, Tardiva = umidità granella inferiore al 23%; (w) Ideale = 7,8 – 8,2 piante/m², densità consigliata da Pioneer Hi-Bred Italia per l'ibrido utilizzato. Alta: densità ottimale aumentata di 1,5 - 2 piante/m²; (v) Equil. = equilibrata ovvero dosata con un piano di concimazione secondo il Programma Pioneer di Monitoraggio Fertilità dei Suoli, Diseq. = disequilibrata ovvero carenza o eccesso; (u) Ogni lettera indica un percorso colturale diverso.

Esposizione agronomica al rischio di accumulo di fumonisine

Per esposizione agronomica al rischio si intende la probabilità di accumulo di fumonisine, espressa con un coefficiente di esposizione, determinata da un definito percorso colturale prescindendo dalle condizioni ambientali e dell'annata. I coefficienti di esposizione al rischio

sono stati calcolati come il prodotto di punteggi parziali associati ad ogni singola decisione di tecnica agronomica compiuta all'interno del percorso colturale scelto.

Nella stessa Tabella 1, per ogni decisione di tecnica agronomica vengono proposte due opzioni, una a basso rischio, con punteggio parziale di esposizione uguale a 1, e l'altra a maggiore rischio con un punteggio più alto e determinato a seguito dei risultati ottenuti con le prove di campo. La scelta di una o dell'altra alternativa indirizza quindi verso una serie numerosa di percorsi colturali a diversa esposizione al rischio.

Innanzitutto, la Tabella è divisa in due parti, ciascuna delle quali rappresenta l'esposizione al rischio determinata dal momento di semina: l'epoca ottimale e quella tardiva. La scelta, da sola, discrimina in modo netto tra percorsi colturali ad esposizione medio-bassa da altri ad esposizione medio-alta, rimarcando l'importanza della collocazione del ciclo colturale. Successivamente alla scelta dell'epoca di semina vengono gerarchicamente proposte le altre scelte di tecnica agronomica ordinate quindi secondo la loro importanza e la loro influenza verso le scelte successive: pertanto si incontrano prima la scelta del trattamento contro la piralide, poi il momento di raccolta e infine la densità di semina e la dose di concimazione.

In base a quanto è stato riscontrato in campo, l'epoca di semina interagisce con il controllo della piralide: in prima epoca di semina, il mancato trattamento insetticida determina un aumento sensibile dell'esposizione al rischio, mentre con epoca di semina in ritardo, il trattamento perde parzialmente la sua efficacia che si riduce rispetto al trattamento eseguito su una semina ottimale determinando così un punteggio maggiore, ovvero una maggiore esposizione al rischio.

Il momento di raccolta, è un fattore che influenza l'esposizione al rischio in modo molto importante. In particolare, la raccolta precoce, ovvero con umidità dal 23 al 26%, è più efficace a contenere il rischio nel caso di mais seminato in prima epoca e trattato contro la piralide. Per ciò che riguarda la densità di semina e il livello di concimazione, il loro contributo all'esposizione al rischio è meno rilevante rispetto ai fattori precedenti, annullandosi se in precedenza sono state adottate scelte colturali rischiose. Pertanto, questi due fattori diventano rilevanti solo nel momento in cui il percorso colturale è costruito in modo tale da ridurre lo sviluppo delle muffe tossigene e, conseguentemente, da mantenere il più basso livello di esposizione al rischio; nel caso di percorsi "rischiosi" la densità di semina e la concimazione risultano "mascherati" da altri fattori agronomici in grado di influenzare più direttamente lo sviluppo delle muffe tossigene.

Il sistema di valutazione dell'esposizione al rischio qui sopra descritto non deve essere inteso come un modello di previsione: i punteggi parziali assegnati alle decisioni di tecnica agronomica e il derivante coefficiente di esposizione non rappresentano una previsione del possibile contenuto di fumonisine. Esso, infatti, dipenderà anche dalle condizioni pedoclimatiche e dall'ibrido coltivato; pertanto il sistema di valutazione proposto serve a collocare un percorso colturale in una categoria di esposizione al rischio di tipo qualitativo che esprime il livello di probabilità di esporsi ad elevate contaminazioni di fumonisine. In sintesi, le categorie qualitative sono quattro e il percorso colturale seguito viene inserito in una di queste in base al coefficiente di esposizione calcolato (Tabella 2).

Tabella 2. Categorie qualitative di esposizione al rischio e relativi coefficienti di esposizione

Coefficiente di esposizione	Categoria qualitativa di esposizione al rischio
<3	bassa
3 – 5	media
6 – 10	alta
>10	critica

L'attendibilità dei livelli di esposizione al rischio è stata verificata impiegando un dataset recante le contaminazioni rilevate in 217 parcelle nel 2003, 119 nel 2004 e 105 nel 2005, non incluse nell'elaborazione del sistema di valutazione dell'esposizione agronomica al rischio.

Per ciascuna di esse è stato calcolato il coefficiente di esposizione al rischio e quindi è stata attribuita la rispettiva categoria di esposizione. Il risultato è mostrato nella Figura 1. Come si può osservare, coerentemente con l'obiettivo del sistema di valutazione, il tenore di contaminazione da fumonisine cresce progressivamente passando dal livello di esposizione basso al livello di esposizione critico in tutti e tre gli anni.

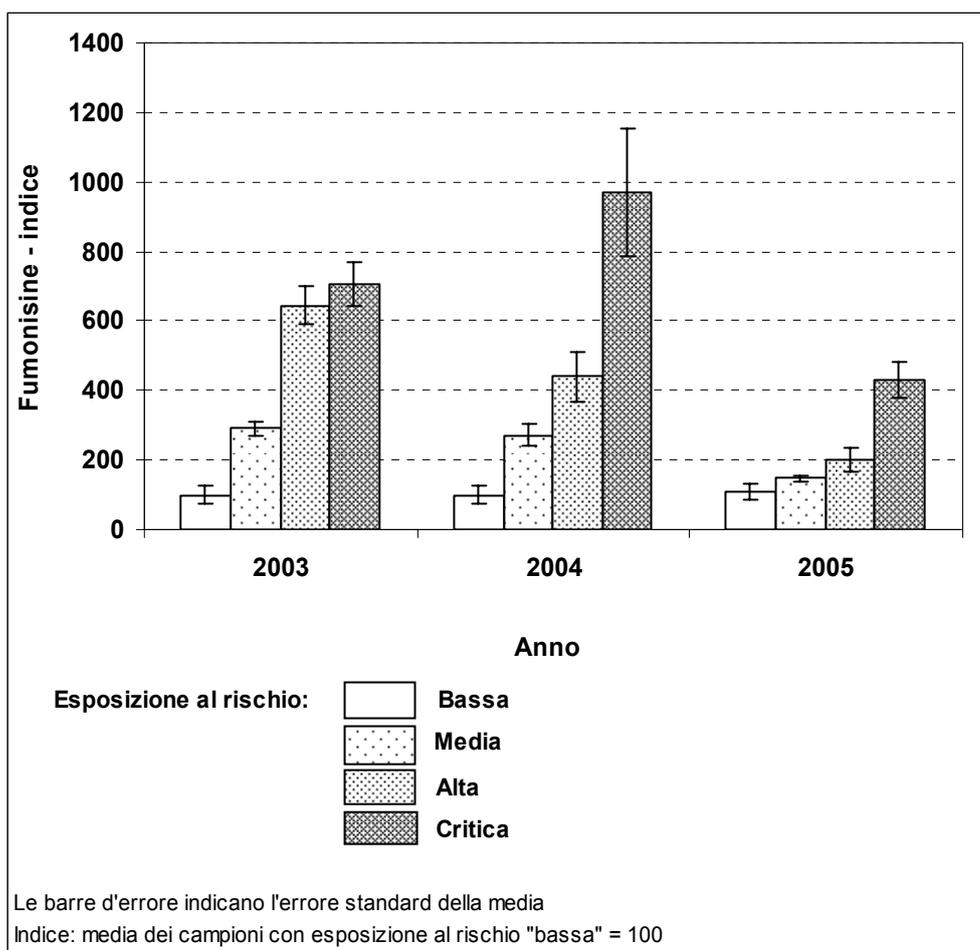


Figura 1. Verifica della coerenza del sistema di valutazione di esposizione agronomica al rischio su parcelle della sperimentazione triennale non utilizzate per l'elaborazione del sistema

Nel 2003, la differenza fra la categoria "Alta" e la categoria "Critica" è ridotta: questo è spiegato dalle condizioni climatiche critiche dell'estate di quell'anno che hanno in molti casi ridotto le differenze tra epoche di semina e attenuato i vantaggi del trattamento contro la piralide. Da sottolineare, in ogni caso, come anche in un anno caratterizzato da tali condizioni climatiche, per i percorsi colturali più attenti, a bassa esposizione al rischio, siano state registrate contaminazioni inferiori di 5-6 volte rispetto alle esposizioni alte e critiche.

Nel 2004 le differenze tra le quattro categorie di esposizione al rischio sono state molto più evidenti. L'andamento climatico più vicino alla media ha esaltato le differenze esistenti tra i vari percorsi colturali, facendo registrare per i percorsi ad esposizione critica contaminazioni di circa 10 volte superiori rispetto ai percorsi più attenti alla qualità della produzione.

Nel 2005, precipitazioni nell'ultima fase della maturazione hanno rallentato le raccolte e avvantaggiato lo sviluppo delle muffe *F. verticillioides*; pertanto, le differenze tra i percorsi colturali sono risultate meno marcate, sebbene si sia chiaramente ribadita la progressione positiva passando dai percorsi colturali a bassa esposizione a quelli ad esposizione critica.

Conclusioni

Grazie alla imponente mole di dati raccolti e di situazioni ambientali e climatiche studiate, questa ricerca ha permesso di tracciare in dettaglio i percorsi colturali in grado di sostenere la qualità del mais. Questo è stato ottenuto non solo esaminando gli effetti sulla contaminazione da fumonisine connessi alle singole pratiche colturali, completando le conoscenze che sono state progressivamente acquisite negli ultimi anni (Pioneer Hi-Bred Italia, 2000; Snidaro e Paviotti, 2002; Maiorano *et al.*, 2005; Mosca, 2006), ma anche attraverso un capillare esame di situazioni pedo-climatiche diverse.

Fra tutte le tecniche colturali prese in considerazione spicca in modo importante il ruolo svolto dall'epoca di semina e dal trattamento chimico contro la piralide in tutti gli ambienti e gli anni esaminati. La decisione corretta su queste due scelte colturali (semina anticipata e controllo chimico mirato contro piralide) influenza in modo importante l'efficacia finale dell'intero percorso di coltivazione volto al raggiungimento di accettabili standard igienico-sanitari della granella.

La frequenza con cui sono state registrate rilevanti differenze nelle contaminazioni a seguito di applicazioni di singole agrotecniche e quindi di percorsi colturali, ribadisce la cruciale importanza della fase di campo per l'intera filiera maidicola.

Il modello proposto di valutazione dell'esposizione al rischio è uno strumento con un carattere fortemente applicativo. È stato infatti pensato come una guida agronomica di riferimento per indirizzare le scelte tecniche in campo in funzione degli standard sanitari che si vogliono ottenere e, conseguentemente, della filiera cui si vuole fare riferimento.

La realizzazione di un percorso colturale formato da scelte tecniche a basso rischio, potrà quindi fare la differenza tra un prodotto di alta qualità e quindi in grado di poter essere valorizzato e impiegato in tutte le filiere a partire da quella per l'alimentazione umana, e un prodotto che, diversamente, vede aumentata la probabilità di superare le soglie fissate e quindi di avere minori opzioni di collocazione sul mercato

Bibliografia

- Battilani P, Scandolaro A, Barban C, Pietri A, Bertucci T, Marocco A, Berardo N, Vannozzi GP, Baldini M, Miele S, Salera E, Maggiore T. Monitoraggio della contaminazione da micotossine nel mais. *L'Informatore Agrario* 2005;6:47-9.
- Blandino M, Carnaroglio F, Reyneri A, Vasara F, Pascale M, Haidukowski M, Saporiti M. Impiego di insetticidi piretroidi contro la piralide del mais. *L'Informatore Agrario* 2006;24:68-72.
- CRA. La diffusione delle micotossine nelle produzioni italiane di mais. *L'Informatore Agrario* 2005;10:47-51.

- Edwards SG. Influence of agricultural practices on *fusarium* infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecenes mycotoxins. *Toxicology letters* 2004;153:29-35.
- Maiorano A, Maffioli G, Burato G, Reyneri A, Ramponi C. Strategies for the control of mycotoxins in corn in the Po Valley (Northern Italy). In: *Book of Abstracts of The Third World Mycotoxin Forum – Noordwijk aan Zee – November 10-11, 2005*.
- Mosca G. Gestione del rischio micotossine nella filiera produttiva del mais. In: *Mais e sicurezza alimentare*. Legnaro: Ed. Veneto Agricoltura, Sezione per l'Innovazione e lo Sviluppo Rurale, 2006. p 30-6.
- Munkvold GP. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annual Review of Phytopathology* 2003;41:99-116.
- Pioneer Hi-Bred Italia, 2000. Alta qualità e sicurezza alimentare per le produzioni di mais. Insetto in *Farmer News* 12, Inverno 2000, pp. 8-12.
- Snidaro M, Paviotti P. Rinnovare la tecnica di coltivazione del mais per migliorare la qualità della granella. *Notiziario ERSA* 2002;1-2/2002:15-7.

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

Gianfranco Panfili, Alessandra Fratianni, Luciano Cinquanta, Tiziana Di Criscio, Lucia Stoduto
DiSTAAM, Università degli Studi del Molise, Campobasso

Introduzione

La recente normativa sui limiti di ocratossina A (OTA) nei vini, che ne fissa la concentrazione massima ammissibile a 2 ppb ($\mu\text{g/L}$), rende di particolare importanza lo studio di metodi adatti alla sua rimozione. Pur considerando il ruolo delle strategie agronomiche volte a minimizzarne la presenza, lo sviluppo di tecniche di decontaminazione in fase di produzione può risultare di notevole utilità, soprattutto se i metodi utilizzati non apportano variazioni significative alle caratteristiche sensoriali dei vini e non determinano sostanziali cambiamenti nei processi tecnologici di produzione. A tal fine è noto che alcuni coadiuvanti tecnologici di chiarificazione si sono dimostrati utili a ridurre i livelli di OTA durante le pratiche ordinarie di vinificazione (Castellari *et al.*, 2001).

Nel presente 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.

Dal momento che è nota l'abilità delle proteine a formare aggregati colloidali con i polifenoli (Poncet-Legrand *et al.*, 2006), in particolare tra caseina e polifenoli totali e polimerici (Sims *et al.*, 1995); così come tra gelatina e proantocianidine (Sarni Manchado *et al.*, 1999); nel presente lavoro si è valutata l'influenza dei coadiuvanti tecnologici su alcune classi di composti fenolici. In particolare si è valutata la diminuzione di componenti responsabili del colore e della struttura dei vini rossi, quali gli antociani totali, i polifenoli totali, i flavonoidi totali e i flavonoidi non antocianici a seguito dei trattamenti effettuati per abbattere la micotossina.

Materiali e metodi

Ad un aliquota di campione di vino, microvinificato in laboratorio, sono stati addizionati 10 ppb di OTA. Aliquote di vino addizionato sono state trattate separatamente con bentonite, caseinato di potassio e gelatina, nelle quantità normalmente utilizzate nelle pratiche enologiche, per 10 h, a 4°C, al buio e sotto agitazione. I campioni sono stati quindi fatti decantare per 48 h a 4°C e sottoposti ad analisi.

L'OTA è stata estratta mediante colonnine di immunoaffinità (Biopharm Ridascreen® Ochratoxin A column) e determinata con un sistema HPLC costituito da due pompe Waters mod. 510, un iniettore Rheodyne con loop da 50 μL e un rivelatore spettrofluorimetrico ($\lambda_{\text{ex}} = 333 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$), gestiti da un computer Digital Venturis 466 provvisto di software Millennium 2.10 della Waters. Per la separazione cromatografica è stata utilizzata una colonna C18 (Dionex) (15 mm X 4,6 mm), di 5 μm I.D., lavorando in isocratica, secondo quanto riportato da Visconti *et al.*, 1999.

Per la determinazione dei componenti del colore, il contenuto in polifenoli totali, antociani, flavonoidi e flavonoidi non antocianici è stato determinato secondo Di Stefano *et al.*, 1989.

Risultati

In Figura 1 sono riportati esempi di cromatogrammi HPLC di OTA estratta dal vino prima e dopo trattamento con bentonite

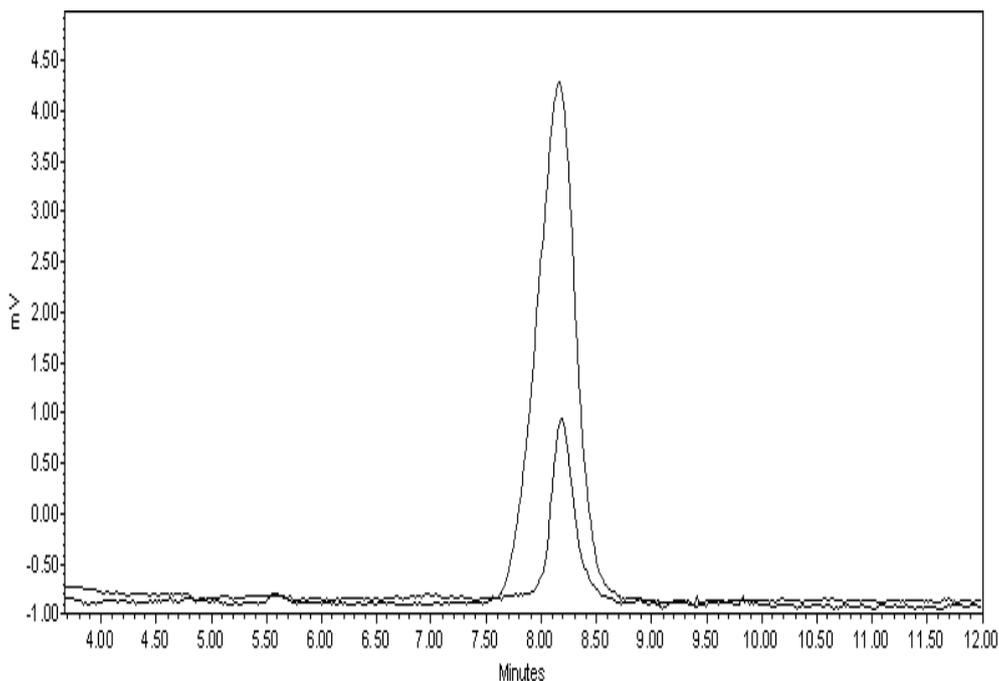


Figura 1. Tipici cromatogrammi di OTA estratta dal vino prima (A) e dopo chiarificazione con bentonite 1 g/L (B)

In Tabella 1 sono riportati i risultati relativi alla rimozione di OTA dal vino mediante l'utilizzo dei diversi agenti chiarificanti testati.

La bentonite e il caseinato di potassio mostrano una maggiore efficienza di rimozione (circa 58%), seguiti da gelatina alla concentrazione di 1 g/L (circa 30%), mentre concentrazioni di gelatina pari a 0,12 g/L non mostrano nessuna interazione con l'OTA.

Tabella 1. Quantità di OTA (%) rimossa dagli agenti chiarificanti per assorbimento

Agente chiarificante	Dosaggio (g/L)	Vino rosso (10 ppb)
Bentonite	1,00 g/L	58%
Caseinato di potassio	1,00 g/L	58%
Gelatina	0,12 g/L	0%
Gelatina	1,00 g/L	28%

I risultati ottenuti utilizzando gelatina in concentrazioni di 1 g /L concordano con quanto riportato da altri autori (Castellari *et al.*, 2001), che mostrano un'efficienza di assorbimento di circa il 30%. Nello stesso lavoro valori di assorbimento minori si osservano per il caseinato (circa il 35%) e ancora meno per la bentonite (circa il 10%). I diversi risultati ottenuti potrebbero essere ascrivibili alle diverse condizioni sperimentali adottate (tempi massimi di chiarificazione di 12 h contro le 48 h adottate nelle nostre condizioni).

È da sottolineare che gli studi effettuati sulla rimozione di OTA mediante i coadiuvanti tecnologici hanno evidenziato che, con le quantità naturalmente utilizzate nelle pratiche enologiche, risulta impossibile la completa rimozione della tossina dal vino, a causa della competizione tra OTA e altre componenti (quali le proteine o altre sostanze colloidali) con i siti specifici di assorbimento.

In considerazione dell'effetto degli agenti chiarificanti sulla concentrazione della componente fenolica, sul vino addizionato di OTA, prima e dopo il trattamento di chiarificazione, è stato determinato il contenuto in polifenoli, antociani, flavonoidi e flavonoidi non antocianici (Tabella 2).

Tabella 2. Diminuzione (%) del contenuto in polifenoli, antociani, flavonoidi e flavonoidi non antocianici a seguito del trattamento con i diversi agenti chiarificanti

	Agente chiarificante			
	<i>Bentonite</i> (1 g/L)	<i>Caseinato di potassio</i> (1 g/L)	<i>Gelatina</i> (1 g/L)	<i>Gelatina</i> (0,12 g/L)
Polifenoli	24,1%	5,8%	11,4%	9,6%
Antociani	11,4%	2,5%	1,0%	5,5%
Flavonoidi	23,7%	8,6%	6,0%	1,7%
Flavonoidi non antocianici	26,8%	10,7%	1,3%	2,7%

Tra gli agenti chiarificanti impiegati, la bentonite ha causato la maggiore rimozione dei composti fenolici totali (24,1%) e degli antociani (11,4%). Il caseinato di potassio ha comportato riduzioni notevolmente inferiori, in modo particolare degli antociani, che hanno subito riduzioni intorno al 2,5%; mentre i flavonoidi non antocianici sono diminuiti di circa il 10%. Nelle prove effettuate con la gelatina si sono registrate riduzioni intorno al 10% nel contenuto in polifenoli totali e riduzioni meno marcate negli altri composti. I risultati ottenuti hanno dimostrato che, nelle condizioni sperimentali adottate, il trattamento con bentonite ha provocato una riduzione più marcata di tutti i composti fenolici considerati, mentre il caseinato di potassio, a parità di abbattimento dell'ocratossina, ha comportato minori variazioni a carico dei composti analizzati.

Conclusioni

Il presente lavoro dimostra come, nelle condizioni sperimentali utilizzate, alcuni agenti enologici di chiarificazione si sono rivelati in grado di rimuovere sostanziali quantità di OTA dal vino, in particolare il caseinato di potassio ha causato significative riduzioni di OTA senza apportare variazioni rilevanti ai composti responsabili del colore e della struttura del vino.

Bibliografia

- Castellari M, Versari A, Fabiani A, Parpinello GP, Galassi SJ. Removal of ochratoxin A in red wines by means of adsorption treatments with commercial fining agents. *Agric Food Chem* 2001;49:3917-21.
- Di Stefano R, Cravero MC, Gentilini N. Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini. *L'Enotecnico* 1989;5:83-9.
- Poncet-Legrand C, Edelmann A, Putaux J-L, Cartalade D, Sarni-Manchado P, Vernhet A. Poly(l-proline) interactions with flavan-3-ols units: Influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. *Food Hydrocolloids* 2006;20:687-97.
- Sarni-Manchado P, Deleris A, Avallone S, Cheynier V, Moutounet M. Analysis and characterization of wine condensed tannins precipitated by proteins used as fining agent in enology. *Am J Enol Vitic* 1999;50:81-6.
- Sims C, Eastridge JS, Bates RP. Changes in phenols, color, and sensory characteristics of muscadine wines by pre- and post-fermentation additions of PVPP, casein, and gelatine. *Am J Enol Vitic* 1995;46:155-8.
- Visconti A, Pascale M, Centonze GJ. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *J Chrom. A* 1999;864:89-101.

MONITORAGGIO, SPERIMENTAZIONE E DISCIPLINARE 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, Pozzuolo del Friuli (UD)

Il mais è da tanti anni la principale coltura della regione Friuli-Venezia Giulia, occupa infatti oltre 95.000 ettari e circa il 60% dei seminativi. La produzione regionale è di oltre 950.000 tonnellate e la maggior parte è destinata al mercato extra regionale. In relazione alla necessità di porre sul mercato il mais per la commercializzazione, tra gli operatori e le istituzioni pubbliche è sempre stata molto viva l'attenzione per la qualità della granella. Infatti, già da diversi anni, con la collaborazione di diversi centri di raccolta cooperativi, viene realizzato dall'ERSA un monitoraggio teso ad evidenziare i rischi di diffusione di micotossine nella granella di mais.

Oltre al monitoraggio sono state allestite in più località della regione Friuli-Venezia Giulia prove sperimentali per verificare quali tecniche potevano aiutare l'operatore a contenere la diffusione delle micotossine nella granella di mais.

Indagine sulle micotossine

Proseguendo l'attività di monitoraggio intrapresa nel 1996, anche dal 2000 al 2005 sono stati fatti periodicamente dei prelievi di granella presso dieci centri di raccolta cooperativi del Friuli-Venezia Giulia che gestiscono circa il 50% della produzione regionale. Sono state individuate tre epoche di raccolta: precoce, normale e tardiva. Il primo prelievo, abbinato alle raccolte precoci della zona, è stato fatto quando i conferimenti corrispondevano a circa il 20% della produzione prevista per l'anno. Il secondo in piena campagna di raccolta, quando era già stato raccolto il 50% della produzione. Il terzo e ultimo prelievo è stato fatto verso la fine della campagna di raccolta.

Ogni campione corrisponde al mais conferito, da diversi agricoltori, in una giornata. Da ogni carro in entrata è stato prelevato circa 0,5 chilogrammo di mais verde. Nell'arco della giornata venivano consegnati all'essiccatoio circa 700 tonnellate di mais.

Dal campione giornaliero di oltre 50 chilogrammi, dopo accurata miscelazione, sono stati prelevati cinque chilogrammi di granella verde e posti in cella d'essiccazione a 70°C per portare il valore dell'umidità attorno al 14%. Dopo la macinazione della granella, un chilogrammo di farina integrale è stato consegnato per le analisi al Laboratorio Chimico Merceologico, Azienda Speciale della CCIAA di Pradamano (UD). Le analisi sono state eseguite con il metodo ELISA, kit immunoenzimatico Neogen distribuito da Diessechem s.r.l. Milano. Le micotossine analizzate sono state: aflatossine, fumonisine, Deossinivalenolo, ocratossina A e zearalenone. Per una verifica della ripetibilità dei dati è stato inserito un campione doppio scelto a caso tra dieci. I risultati sono presentati nei grafici delle Figure 1-5.

L'aflatoossina (Figura 1) è stata rilevata solo nel 2003 principalmente su mais raccolto presto, che ha subito forti danni da stress idrico. Il valore massimo riscontrato è di 5,3 ppb, che è $\frac{1}{4}$ del limite imposto dall'attuale legislazione comunitaria per l'uso zootecnico.

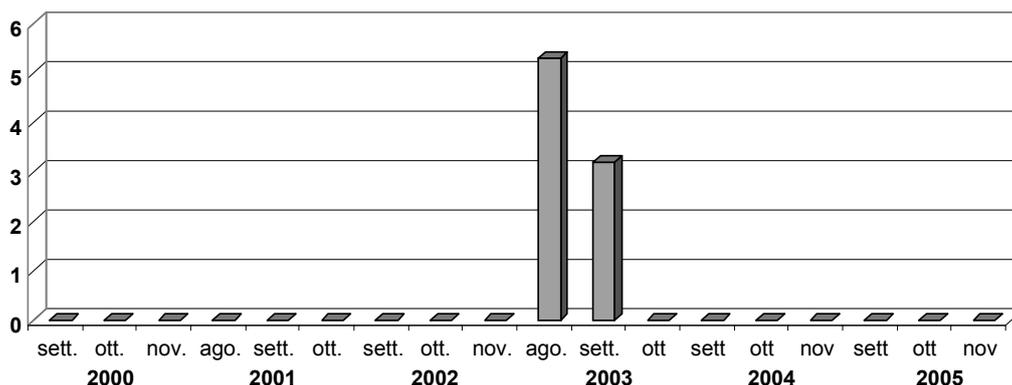


Figura 1. Aflatossine (ppb). Risultati del monitoraggio effettuato presso 10 centri di raccolta del Friuli-Venezia Giulia dal 2000 al 2005

L'ocratossina A è stata rilevata solamente nel 2000 sui raccolti tardi e con valori bassi.

Il deossivalenolo (Figura 2) è stato riscontrato nel 2000 e 2001 con valori inferiori a 500 ppb mentre nel 2004 e soprattutto nel 2005 i valori sono stati più alti fino a raggiungere i 1700 ppb nelle raccolte tardive del 2005.

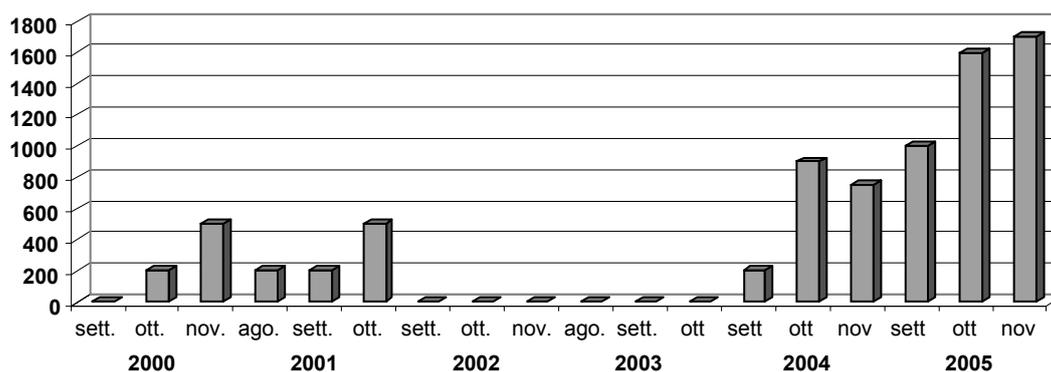


Figura 2. Deossivalenolo (ppb). Risultati del monitoraggio effettuato presso 10 centri di raccolta del Friuli-Venezia Giulia dal 2000 al 2005

Lo zearalenone è stato rilevato con valori molto bassi negli anni dal 2000 al 2003. Nel 2004 e 2005 i valori sono invece più alti fino a raggiungere i 190 ppb nelle raccolte tardive del 2005. (Figura 3)

La fumonisina è stata l'unica micotossina rilevata tutti gli anni. I valori più bassi, ma non inferiori a 3700 ppb, sono stati rilevati nelle raccolte anticipate, mentre nelle raccolte tardive si riscontrano i valori più alti. Nei sei anni le raccolte tardive fanno registrare costantemente dei valori superiori a 10.000 ppb arrivando a 19.100 nelle raccolte d'ottobre 2004 (Figura 4).

Per la fumonisina i valori rilevati nei sei anni sono sempre superiori ai limiti che saranno imposti dalla Comunità Europea nel 2007 per l'uso umano. Nella Figura 5 sono presentati i dati medi del monitoraggio effettuato nei sei anni, dal 2000 al 2005 in Friuli-Venezia Giulia. Appare molto evidente che solo la fumonisina è sempre presente soprattutto nei mais raccolti tardivamente. I valori medi delle altre micotossine sono quasi insignificanti.

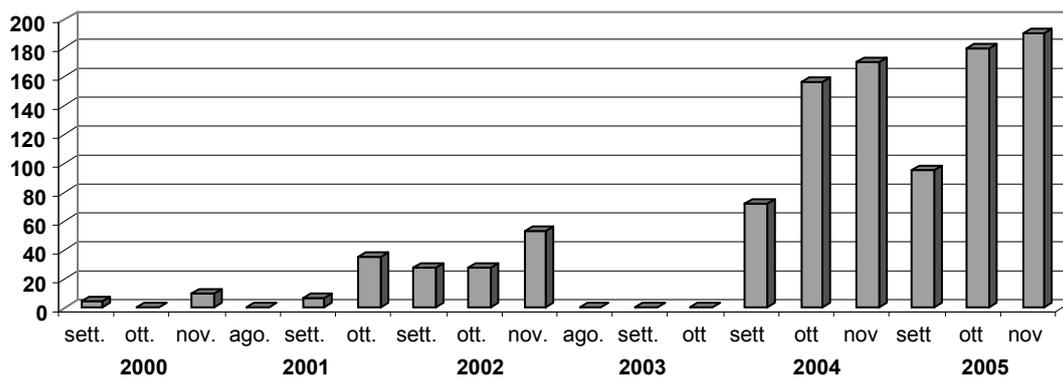


Figura 3. Zearalenone (ppb): risultati del monitoraggio effettuato presso 10 centri di raccolta del Friuli-Venezia Giulia dal 2000 al 2005

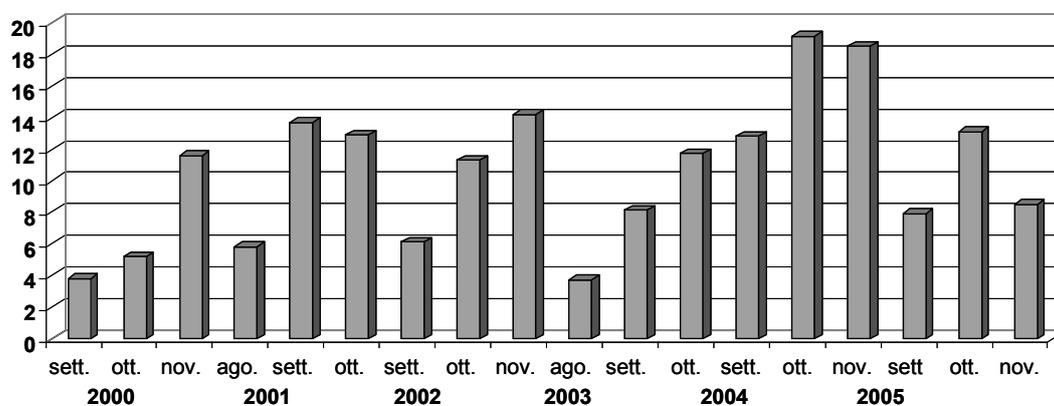


Figura 4. Fumonisine (ppb x 1000): risultati del monitoraggio effettuato presso 10 centri di raccolta del Friuli-Venezia Giulia dal 2000 al 2005

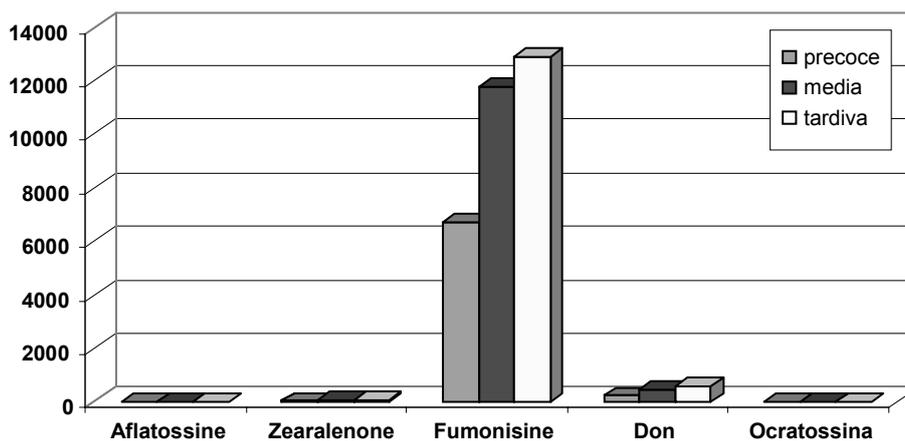


Figura 5. Micotossine (ppb) rilevate presso 10 centri di raccolta del Friuli-Venezia Giulia. Dati medi di sei anni, dal 2000 al 2005 e di tre epoche di raccolta, precoce, media e tardiva

Contenimento della fumonisia

Stante le indicazioni del monitoraggio, che evidenziavano un livello abbastanza sostenuto soprattutto di fumonisia, diverse prove agronomiche sono state impostate in passato con l'obiettivo di ridurre il livello di contaminazione della granella di mais da questa micotossina. Negli ultimi anni ci si è soffermati soprattutto su due aspetti: contenimento della piralide e produzione di mais nel rispetto di un preciso disciplinare già collaudato in passato con la sperimentazione parcellare.

Trattamento contro la piralide

Da diverse nostre esperienze condotte in passato è emerso che le trappole a feromoni utilizzabili per individuare il momento ideale di lotta alle larve di piralide purtroppo non sono molto attendibili e nello stesso tempo è emerso che i trattamenti effettuati per il controllo della prima generazione di piralide non sortiscono effetti positivi per il contenimento della seconda e più importante generazione. Le rosure delle larve sulle cariossidi sono purtroppo direttamente correlate alla presenza di fumonisia nel mais.

Da questa situazione è emersa la necessità di verificare qual è il momento migliore per contenere lo sviluppo delle larve di piralide. E così anche nel 2003, 2004 e 2005 sono state condotte altre prove utilizzando un prodotto insetticida piretroide per verificare con un unico trattamento quale poteva essere il momento migliore di intervento. In due località, utilizzando due ibridi, è stato distribuito l'insetticida in quattro diversi momenti: dieci giorni prima della fioritura, alla fioritura femminile (FF), dieci giorni dopo e venti giorni dopo la fioritura femminile.

I rilievi sulla presenza delle larve sulla spiga sono stati fatti a fine agosto, raccogliendo e analizzando quattro gruppi di 25 spighe per un totale di 100 spighe per tesi.

I dati rilevati, riportati nella Figura 6, hanno messo in evidenza che il trattamento contro la piralide offre un interessante contributo nel contenimento della diffusione delle larve sulla spiga di mais diminuendo da 3,8 larve per spiga del testimone non trattato a 2,1 larve per spiga come media dei quattro trattamenti.

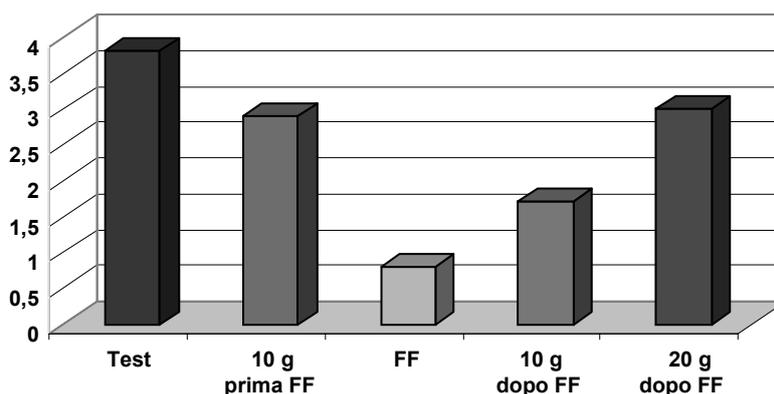


Figura 6. Numero larve di piralide per spiga di mais.
Dati medi di due ibridi, due località di prova del Friuli e tre anni (2003, 2004 e 2005).
Il trattamento insetticida è stato effettuato con Lamda-cyhalothrin in quattro diverse fasi fenologiche del mais. DMS 5% = 0,5 (FF: fioritura femminile)

L'intervento effettuato alla fioritura femminile differisce significativamente dagli altri momenti di trattamento con un contenimento dell'85% delle larve che scendono a 0,8 larve per spiga. Contestualmente sono stati fatti anche i rilievi della fumonisina raccogliendo un campione di 5 kg da ogni parcella mietitrebbiata quando il mais aveva in media il 27,2% di umidità.

Dalle analisi è emerso, in tutti gli anni e nei vari ambienti, un minore contenuto di fumonisina con il trattamento alla fioritura femminile. I valori medi in ppb, rilevati con queste prove, sono di 9820 per il testimone non trattato, 6510 per il trattamento effettuato 10 giorni prima della fioritura femminile (FF), 2540 alla fioritura femminile, 4750 per il trattamento effettuato 10 giorni dopo la FF e 7320 per quello dopo 20 giorni.

Il trattamento offre quindi un buon contenimento della fumonisina ma ciò vale solo per le raccolte anticipate. Ritardare l'epoca di raccolta comporta, infatti, quasi sempre un forte deterioramento della granella e un innalzamento dei valori di micotossine rendendo quasi vano il trattamento contro la piralide.

Produzione di granella di mais in cooperativa con un preciso disciplinare di produzione

Presso di uno dei più importanti essiccatoi della regione, Cooperativa agricola Vieris di Castions di Strada (UD), è stato dato il via ad 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 hanno aderito 24 soci nel 2004 e 30 nel 2005 ai quali è stato indicato di coltivare il mais, su parte della superficie aziendale, con uno specifico disciplinare di produzione

Per questo progetto è stato indicato di fare la coltivazione sui migliori terreni irrigui dell'azienda. Si è scelto di coltivare un unico ibrido di mais, Lolita, classe FAO 600, e di organizzare per tutti i soci un trattamento di difesa contro la piralide al completamento dell'emissione dell'infiorescenza femminile.

Il trattamento è stato fatto da due operatori per tutti i soci aderenti al progetto. Nel 2004 è stato utilizzato l'insetticida Lamda-cialotrina alla dose di 0,8 L/ha di prodotto commerciale e nel 2005 l'alfametrina alla dose di 0,3 L/ha di p.c. Un prodotto adesivante è stato impiegato alla dose di 0,5 L/ha. A tutti i soci è stato fatto obbligo di non raccogliere la granella ad un'umidità inferiore al 25%.

Nel 2004 il 52% dei soci è riuscito a produrre la granella di mais con micotossine a livello zero mentre nel 2005 nessun socio è riuscito (Tabella 1). Nel 2004 la fumonisina è stata la sola micotossina rilevata con valori medi di 2475 ppb. Nel 2005 è stata invece rilevata, come media dei diversi soci, la presenza di 6402 ppb di fumonisine, 110 ppb di deossinivalenolo 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 fatte 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.

Tabella 1. Progetto mais di qualità del FVG 2004 e 2005 (Cerealicola Vieris di Castions di Strada): micotossine (ppb) rilevate per singolo socio in ordine di data

N. socio	Aflatossine	Fumonisine	Zearalenone	Umidità (%)	Raccolta data
2004					
9	0	1.700	0	26,9	24-set
10	0	3.300	0	28,6	24-set
12	0	0	0	25,2	24-set
14	0	0	0	30,6	24-set
17	0	3.800	0	26,5	24-set
19	0	1.300	0	29,0	24-set
20	0	4.300	0	28,4	24-set
<i>media</i>	<i>0</i>	<i>2.000</i>	<i>0</i>	<i>27,9</i>	<i>24-set</i>
1	0	9.300	0	29,3	30-set
4	0	0	0	25,5	30-set
5	0	0	0	24,0	30-set
6	0	9.700	0	25,5	30-set
13	0	6.100	0	25,0	30-set
15	0	0	0	25,2	30-set
21	0	0	0	27,0	30-set
<i>media</i>	<i>0</i>	<i>3.600</i>	<i>0</i>	<i>25,9</i>	<i>30-set</i>
2	0	5.400	0	26,9	06-ott
3	0	0	0	27,5	06-ott
7	0	0	0	28,0	06-ott
8	0	0	0	29,6	06-ott
22	0	0	0	25,6	06-ott
23	0	0	0	24,1	06-ott
24	0	6.400	0	27,1	06-ott
25	0	5.700	0	29,3	06-ott
<i>media</i>	<i>0</i>	<i>2.200</i>	<i>0</i>	<i>27,3</i>	<i>06-ott</i>
11	0	3.000	0	25,9	13-ott
18	0	0	0	25,7	13-ott
<i>media</i>	<i>0</i>	<i>1.500</i>	<i>0</i>	<i>25,8</i>	<i>13-ott</i>
Media	0	2.475	0	26,9	
2005					
6	0	7.200	0	27,6	23-set
7	0	7.400	73	25,3	23-set
11	0	2.800	75	27,9	23-set
12	0	2.200	102	28,9	23-set
24	0	8.800	0	30,4	23-set
25	0	3.200	0	25,6	23-set
27	0	9.600	271	26,0	23-set
30	0	8.400	195	28,0	23-set
<i>media</i>	<i>0</i>	<i>6.200</i>	<i>90</i>	<i>27,5</i>	<i>23-set</i>
1	0	9.600	73	26,2	27-set
5	0	2.400	0	26,3	27-set
8	0	8.800	44	24,6	27-set
9	0	600	99	25,7	27-set
10	0	8.600	0	25,4	27-set
13	0	8.600	151	24,8	27-set
15	0	3.400	255	25,4	27-set
17	0	1.400	0	25,2	27-set
21	0	5.600	86	24,8	27-set
22	0	6.600	0	26,1	27-set
23	0	9.800	212	24,9	27-set
26	0	5.200	0	26,3	27-set
<i>media</i>	<i>0</i>	<i>5.883</i>	<i>77</i>	<i>25,5</i>	<i>27-set</i>

segue

continua

N. socio	Aflatossine	Fumonisine	Zearalenone	Umidità (%)	Raccolta data
3	0	8.300	170	26,1	13-ott
16	0	7.400	302	27,0	13-ott
18	0	6.400	57	24,3	13-ott
19	0	2.400	84	25,0	13-ott
29	0	6.500	98	27,0	13-ott
2	0	9.200	68	24,6	13-ott
4	0	8.500	334	27,0	13-ott
20	0	6.600	103	26,0	13-ott
28	0	8.300	176	24,3	13-ott
14	0	8.200	0	26,9	13-ott
<i>media</i>	0	7.180	139	25,8	13-set
Media	0.0	6.402	101	26,1	

Conclusioni

È proseguito il monitoraggio iniziato nel 1996 sulla presenza di micotossine nella granella di mais stoccato in dieci centri di raccolta cooperativi della regione Friuli-Venezia Giulia. I risultati del monitoraggio hanno evidenziato che il 95% dei campioni era contaminato da fumonisine con valori compresi tra 3700 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 deossinivalenolo 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 1700 per il deossinivalenolo.

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 di uno dei più importanti essiccatoi della regione, un progetto pilota, per la produzione annuale di 1.200 t di granella di mais con un basso contenuto in micotossine.

I risultati hanno evidenziato che è possibile produrre granella di mais con un contenuto molto basso di micotossine ad eccezione della fumonisina i cui valori medi del silo sono pari a 2475 nel 2004 e 6402 nel 2005. Per l'uso umano l'unico parametro oltre i limiti è dunque quello della fumonisina per la quale è necessario continuare con la sperimentazione per cercare nuove soluzioni con l'obiettivo di non superare la soglia dei 2000 ppb.

Ma accanto alla sperimentazione sarà necessario anche rivedere il limite proposto perché non è facile produrre nella pianura padana granella di mais con un contenuto così basso di fumonisina. Infatti, anche nel 2006, alla cooperativa Vieris i valori medi della produzione sperimentale si sono attestati su 3857 ppb.

Da queste esperienze pare di poter concludere che per le fumonisine valori inferiori a 5000 ppb non sono proponibili per le nostre zone, nemmeno per le annate normali, e nemmeno quando si adottano tutti gli accorgimenti di contenimento e in particolare si fa un trattamento insetticida alla fioritura femminile per il contenimento della piralide e si raccoglie la granella di mais ad un'umidità della granella superiore al 25%.

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

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

Introduzione

Nell'attuale situazione europea, i due principali rischi da micotossine per il frumento e derivati riguardano la presenza di ocratossina A (OTA), prodotta principalmente da *Penicillium verrucosum* e da *Aspergillus ochraceus*, e di *Fusarium*-tossine, quali i tricoteceni (TCT), soprattutto di tipo B, prodotti da *Fusarium culmorum* e *Fusarium graminearum*. L'OTA è una micotossina cancerogena, teratogena e immunodepressiva, può provocare nefriti ed epatiti, ed è classificata dallo IARC (*International Agency for Research on Cancer*) nel gruppo 2B, cioè come possibile sostanza ad azione cancerogena nei confronti dell'uomo. Nell'UE per l'OTA è stato fissato un limite di 3 µg/kg per i prodotti destinati al consumo, derivati dai cereali. I TCT hanno una struttura chimica simile, caratterizzata da 4 anelli, con gruppi estere e alcol alla periferia della molecola, e un gruppo epossidico responsabile della loro tossicità. I TCT hanno un elevato potere immunosoppressore; quello che riveste la maggior importanza per diffusione e quantità è il deossinivalenolo (DON), prodotto da *F. graminearum* e *F. culmorum*. Il DON è stato classificato dallo IARC nel gruppo 3, sostanza non cancerogena per l'uomo. Per il DON sono in vigore dal 1° luglio 2006 valori massimi di 750, 500, 200 µg/kg rispettivamente per pasta, prodotti da forno e cereali da colazione, alimenti per l'infanzia. Nella presente ricerca è stato effettuato un monitoraggio sulla contaminazione da OTA e TCT di diverse tipologie di prodotti a base di frumento, confrontando per ogni tipo prodotti convenzionali e integrali. L'indagine è stata condotta su campioni di pasta (16), cereali da colazione (27) e prodotti da forno, quali pane (90), cracker (16), fette biscottate (16) acquistati in diversi punti vendita durante gli anni 2003-2005.

Materiali e metodi

Analisi ocratossina A

L'OTA è stata estratta da 10 g di campione macinato con 100 mL di miscela CH₃OH:sol. acquosa di NaHCO₃ al 3%=50:50, agitando per 45 minuti (1). Dopo filtrazione su filtro a pieghe, 5 mL del filtrato sono stati diluiti a 50 mL con tampone fosfato 10 mM a pH=7,4 (PBS) e la soluzione è stata fatta passare su colonna di immunoaffinità. Effettuato un lavaggio con 5 mL di PBS, l'OTA è stata eluita in provetta graduata con 3 mL di CH₃CN. Dopo avere concentrato l'estratto sotto flusso di N₂, lo si è portato ad 1 mL con una miscela CH₃CN:soluzione acquosa al 2% di CH₃COOH=41:59.

L'analisi dell'OTA è stata effettuata mediante HPLC con fase mobile CH₃CN:soluzione acquosa al 2% di CH₃COOH=41:59 a flusso di 1,0 mL/min, con colonna RP-18 e rivelatore fluorimetrico impostato a λ_{ecc}=333 nm e λ_{em}=470 nm.

Analisi tricoteceni

Dopo aver pesato 25 g di campione macinato, i TCT sono stati estratti con 100 mL di miscela $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}=84:16$, agitando per 90 minuti. Dopo filtrazione su filtro a pieghe l'estratto è stato purificato mediante colonna Mycosep 227 (2), quindi un'aliquota di 2 mL dell'estratto purificato è stata sottoposta a derivatizzazione (formazione dei trimetilsilileteri) con trimetilsililimidazolo (TMSIM) nel seguente modo: dopo aggiunta di 100 μL di standard interno (diacetossiscirpenolo, DAS, a concentrazione di 10 ppm), ed evaporazione completa sotto flusso di N_2 , sono stati aggiunti 200 μL di derivatizzante (TMSIM+trimetilclorosilano=1+0,2) lasciando reagire al buio per 15 minuti. Successivamente sono stati aggiunti 800 μL di esano e 1 mL di H_2O ; dopo centrifugazione, la fase superiore in esano è stata trasferita in *vial*.

La separazione dei TCT è stata effettuata mediante GC-MS, con colonna capillare Rtx 5MS (30m, \varnothing 0,25 mm) e gas di trasporto He, impostando il seguente programma di temperatura: 70°C per 1 min, 70-245°C a 10°C/min, isoterma per 1 min, 245-300°C a 30°C/min, isoterma per 2 minuti. Sono stati iniettati 2 μL con rapporto di partizione (split) 1:30 e tecnica PTV *solvent split*. La rivelazione dei TCT è stata effettuata mediante spettrometro di massa a trappola ionica con tecnica SIM (*Selected Ion Monitoring*) (3).

Risultati e discussione

Percentuali di recupero e limiti di rivelazione

Sono state valutate le percentuali di recupero dei metodi utilizzati, aggiungendo ad aliquote di un campione risultato esente da contaminazione da micotossine, un volume misurato di standard delle micotossine considerate, in modo da avere una contaminazione da OTA pari a 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e da TCT pari a 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

I metodi hanno dato percentuali di recupero superiori al 90%: per l'OTA pari a 92,3%, per il DON a 91,2%. I risultati dei campioni non sono stati corretti per le percentuali di recupero. I limiti di rivelazione (*Limit Of Detection*, LOD, rapporto segnale/rumore 3:1) e di quantificazione (*Limit Of Quantification*, LOQ) sono risultati rispettivamente di 0,010 e 0,020 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per l'OTA e 1 e 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per il DON.

Contaminazione da OTA di pane e prodotti da forno

Per i campioni di pane, la contaminazione da OTA è risultata a valori sempre inferiori al limite di legge, ma comunque non del tutto trascurabili; nel 5% dei campioni è stata trovata una contaminazione superiore a 1,00 $\mu\text{g}/\text{kg}$, con un valore massimo pari a 1,63 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Tabella 1).

Per i campioni di pasta normale e integrale, la contaminazione è risultata invece essere molto limitata, con media e mediana <0,10 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Negli altri prodotti da forno, i valori di OTA sono sempre risultati inferiori a 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, tranne che per un campione di fette biscottate integrali (1,57 $\mu\text{g}/\text{kg}$). All'analisi statistica, è stata rilevata una tendenza alla significatività per una maggiore contaminazione da OTA della pasta integrale rispetto a quella convenzionale.

Tabella 1. Incidenza, media, mediana e valore massimo di OTA in prodotti da forno e pane

Matrice	Campioni positivi	Media \pm DS $\mu\text{g/kg}$	Mediana $\mu\text{g/kg}$	Valore massimo $\mu\text{g/kg}$
Pane	39/46	0,18 \pm 0,21	0,15	1,13
Pane integrale	37/44	0,27 \pm 0,36	0,13	1,63
Pasta	1/8	0,03 \pm 0,06	<0,02	0,18
Pasta integrale	6/8	0,10 \pm 0,09	0,08	0,24
Cracker	4/8	0,08 \pm 0,09	0,04	0,21
Cracker integrali	6/8	0,16 \pm 0,16	0,13	0,49
Fette biscottate	8/8	0,11 \pm 0,07	0,01	0,26
Fette biscoscatte integrali	8/8	0,26 \pm 0,53	0,08	1,57
Biscotti	5/8	0,09 \pm 0,12	0,05	0,34
Biscotti integrali	6/8	0,09 \pm 0,09	0,05	0,25

Contaminazione da DON di pane e prodotti da forno

Il DON è risultato presente in tutti i campioni di pane, con valori superiori al limite di legge di 500 $\mu\text{g/kg}$ in 6 campioni (7,5%), mentre gli altri TCT (3 Ac-DON, 15 Ac-DON, NIV, HT-2 e T-2) non sono mai stati rilevati. Per i campioni di pasta, la contaminazione è risultata più limitata, con un solo campione che si è avvicinato al limite di legge, con 705 $\mu\text{g/kg}$ (Tabella 2).

Tabella 2. Incidenza, media, mediana e valore massimo di DON in prodotti da forno e pane

Matrice	Campioni positivi	Media \pm DS $\mu\text{g/kg}$	Mediana $\mu\text{g/kg}$	Valore massimo $\mu\text{g/kg}$
Pane	46/46	193 \pm 118	180	527
Pane integrale	44/44	248 \pm 200	234	1140
Pasta	8/8	84 \pm 25	88	108
Pasta integrale	8/8	200 \pm 216	133	705
Cracker	8/8	137 \pm 72	126	275
Cracker integrali	8/8	190 \pm 162	149	569
Fette biscottate	8/8	184 \pm 63	170	126
Fette biscoscatte integrali	8/8	171 \pm 86	160	295
Biscotti	8/8	121 \pm 82	99	307
Biscotti integrali	8/8	139 \pm 64	122	239

Per gli altri prodotti da forno un solo campione ha evidenziato un valore maggiore di 500 $\mu\text{g/kg}$ (569 $\mu\text{g/kg}$, cracker integrali). All'analisi statistica, è stata rilevata una tendenza alla significatività per una maggiore contaminazione da DON per il pane integrale, rispetto a quello convenzionale.

Contaminazione di cereali da colazione

L'OTA è stata rilevata con un'incidenza del 70%, con bassi valori di media e mediana (<0,30 $\mu\text{g/kg}$); il valore massimo è risultato pari a 1,46 $\mu\text{g/kg}$ (convenzionale). Dei TCT, solo il DON è stato rivelato ed è risultato presente in tutti i campioni, con un valore medio di 233 \pm 201 $\mu\text{g/kg}$. In 3 campioni (11%) la contaminazione è stata superiore al limite di legge di 500 $\mu\text{g/kg}$ (Tabella 3).

Tabella 3. Valori di media, mediana e valore massimo di OTA e DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$) in cereali da colazione

Valore	OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Media \pm DS	0,26 \pm 0,39	233 \pm 201
Mediana	0,16	182
Valore massimo	1,46	837

Conclusioni

Questa indagine ha rilevato che le contaminazioni da OTA e TCT nei prodotti a base di frumento non sono trascurabili, soprattutto nei campioni di pane (prodotto a più largo consumo). Non sono state rilevate differenze statisticamente significative fra i campioni convenzionali e integrali; solo per i campioni di pasta e pane integrali, è stata determinata una tendenza alla significatività di maggiore contaminazione rispetto ai campioni convenzionali. Soprattutto alla luce dei nuovi limiti di legge in vigore per i TCT, risulta opportuno effettuare un costante monitoraggio sulla presenza di queste micotossine in prodotti a base di frumento.

Bibliografia

1. Scudamore KA, Mac Donald SJ. A collaborative study of an HPLC method for determination of ochratoxin A in wheat using immunoaffinity column clean-up. *Food Addit Contam* 1998;15:401-10.
2. Radova Z, Holadova K, Hajslova J. Comparison of two clean-up principles for determination of trichothecenes in grain extract. *J Chromatogr A* 1998;829:259-67.
3. Eskola M, Rizzo A. Sources of variation in the analysis of trichothecenes in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. *Mycotoxin Research* 2001;17:68-87.

CONTAMINAZIONE DA MONILIFORMINA NEL MAIS PRODOTTO IN NORD ITALIA NEL 2005

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

Introduzione

La moniliformina (MON) è una micotossina prodotta da differenti specie di *Fusarium*, tra le quali sono comprese *F. avenaceum*, *F. subglutinans* e *F. proliferatum*, ed è presente nelle derrate come acido libero o come sale di sodio o potassio. Da studi condotti su alcune specie animali, non è risultata né genotossica, né cancerogena, né teratogena; tuttavia causa immunosoppressione (1). La tossicità acuta si manifesta mediante emorragie intestinali, mentre quelle sub-acuta e cronica si manifestano con la degenerazione e necrosi del miocardio (2). Ricerche condotte hanno dimostrato che la MON è più tossica, per il pollame, della fumonisina B₁, altra fusariotossina (3). La tossina è risultata essere anche più citotossica della FB₁ su colture di linee cellulari di mammiferi (4). La tossicità orale è al livello dei più tossici tricoteceni. Sono stati inoltre osservati effetti fitotossici. Nell'uomo, la MON è sospetta essere causa della malattia degenerativa del miocardio (Keshan disease), osservata in alcune zone della Cina e del Sud-Africa (5). Si pensa che il principale meccanismo attraverso cui la MON esplica la sua tossicità acuta sia l'inibizione della piruvato deidrogenasi, alla quale si lega, impedendo l'accesso del piruvato al ciclo di Krebs: la respirazione mitocondriale ne risulta ridotta. La MON inibisce inoltre l'ossidazione del chetoglutarato. 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; ne è stata rilevata la presenza anche in frumento, segale e riso (6,7). Scopo del lavoro è stato quello di valutare la presenza di MON e di altre *Fusarium*-tossine in campioni di mais prodotto in regioni del nord Italia. È stato pertanto effettuato un monitoraggio su 85 campioni di mais prodotto in Emilia-Romagna e Piemonte nel 2005. Oltre a MON, sono stati determinati: fumonisine B₁ (FB₁) e B₂ (FB₂), tricoteceni (TCT) e zearalenone (ZEA), quest'ultimo solo in 38 campioni. È stato infine valutato se vi fosse un'eventuale correlazione tra la presenza di MON e quella di FB₁, di deossinivalenolo (DON) e di ZEA.

Materiali e metodi

Analisi moniliformina

Dopo macinazione dei campioni con griglia da 1 mm e miscelazione, la MON è stata estratta da 10 g di campione con 100 mL di miscela acetone:acqua (84:16), agitando per 60 min (8). Dopo filtrazione su filtro di carta, 25 mL di filtrato sono stati evaporati con rotavapor a 40°C e il residuo è stato ripreso con 4 mL di CH₃OH. Per la purificazione è stata utilizzata una colonna SAX, condizionata in successione con 2 mL di CH₃OH, 2 mL di H₂O distillata e 2 mL di H₃PO₄ 0,1M. I 4 mL di estratto sono stati fatti passare attraverso la colonna e dopo un lavaggio con 2 mL di H₃PO₄ 0,1 M e 2 mL di miscela CH₃CN:H₂O=10:90, la MON è stata eluita in

provetta graduata con 1,5 mL di soluzione ion pair modifier (a 25 mL di tetrabutylammonio idrossido sono stati aggiunti 25 mL di H₂O per HPLC e 100 mL di KH₂PO₄ 1,1 M; il pH è stato portato a 7 con KOH 0,5 N e la soluzione filtrata sotto vuoto con filtri 0,45 mm), diluito 1:1 con H₂O distillata. Il volume dell'eluato è stato misurato, quindi la soluzione è stata filtrata e sottoposta ad analisi HPLC. La MON è stata separata mediante colonna LiChroSpher 100 (RP 18). La fase mobile (flusso 1 mL/min), era una soluzione costituita da 10 mL di ion pair modifier e 80 mL di CH₃CN portati a 1 litro con acqua pura per HPLC. È stata effettuata una doppia rivelazione alle λ di 227 e 258 nm.

Analisi fumonisina

La FB₁ è stata estratta da 10 g di campione, pesati in provettoni da centrifuga, con 50 mL di miscela CH₃CN:CH₃OH:H₂O=25:25:50. Dopo agitazione per 45 minuti, centrifugazione per 6 minuti a 6000 giri e filtrazione del surnatante su filtro di carta, al residuo rimasto nel provettone sono stati aggiunti altri 50 mL della stessa miscela, effettuando una seconda estrazione per altri 30 minuti; dopo filtrazione, i due estratti sono stati riuniti. Quindi, 2 mL della soluzione così ottenuta sono stati diluiti con 20 mL di tampone fosfato 10 mM a pH=7,4 (PBS) e fatti passare su colonna di immunoaffinità; dopo lavaggio con 2 mL di PBS, la FB₁ è stata eluita con 6 mL di CH₃OH, poi ridotti a 2 mL mediante flusso di N₂. La FB₁, dopo derivatizzazione con o-ftaldialdeide (OPA), è stata separata con colonna Luna Phenyl-Hexil (Phenomenex), utilizzando come fase mobile un gradiente H₂O (acidificata con 2% di CH₃COOH):CH₃CN con flusso di 1 mL/min. La rivelazione fluorimetrica è stata effettuata a λ_{ecc} =335 nm e λ_{em} =440 nm.

Analisi tricoteceni

Dopo aver pesato 25 g di campione macinato, i TCT sono stati estratti con 100 mL di miscela CH₃CN:H₂O=84:16, agitando per 90 minuti. Dopo filtrazione su filtro a pieghe, l'estratto è stato purificato mediante colonna Mycosep 227, quindi un'aliquota di 2 mL dell'estratto purificato è stata sottoposta a derivatizzazione (formazione dei trimetilsilileteri) con trimetilsililimidazolo (TMSIM) nel seguente modo: dopo aggiunta di 100 μ l di standard interno (diacetossiscirpenolo, DAS, a concentrazione di 10 ppm) ed evaporazione completa sotto flusso di N₂, sono stati aggiunti 200 μ l di derivatizzante (TMSIM+trimetilclorosilano=1+0,2) lasciando reagire al buio per 15 minuti. Successivamente sono stati aggiunti 800 μ l di esano e 1 mL di H₂O; dopo centrifugazione, la fase superiore in esano è stata trasferita in *vial*. La separazione dei TCT è stata effettuata mediante GC-MS, con colonna capillare Rtx 5MS (30m, \varnothing 0,25 mm) e gas di trasporto He, impostando il seguente programma di temperatura: 70°C per 1 min, 70-245°C a 10°C/min, isoterma per 1 min, 245-300°C a 30°C/min, isoterma per 2 minuti. Sono stati iniettati 2 μ l con rapporto di partizione (*split*) 1:30 e tecnica PTV solvent split. La rivelazione dei TCT è stata effettuata mediante spettrometro di massa a trappola ionica con tecnica SIM (*Selected Ion Monitoring*).

Analisi zearalenone

Lo ZEA è stato estratto da 20 g di campione con 100 mL di miscela CH₃CN:H₂O 75:25, agitando per 45 minuti; l'estratto è stato filtrato su filtro di carta, quindi 2 mL di filtrato sono stati diluiti con 25 mL di tampone fosfato 10 mM (PBS) a pH 7,4 e fatti passare su colonna di immunoaffinità. Dopo lavaggio della colonna con 5 mL di PBS, lo ZEA è stato eluito con 3 mL di CH₃OH. Per l'analisi HPLC è stata utilizzata una colonna RP-18 (Merck) e come fase mobile

un gradiente H₂O (acidificata con 2% di CH₃COOH):CH₃CN, con flusso di 1 mL/min. La rivelazione fluorimetrica è stata effettuata a $\lambda_{ecc}=274$ nm e $\lambda_{em}=440$ nm.

Risultati e discussione

Percentuali di recupero e limiti di rivelazione

Sono state valutate le percentuali di recupero dei metodi utilizzati, aggiungendo ad aliquote di un campione risultato esente da contaminazione da micotossine, un volume misurato di standard delle micotossine considerate, in modo da avere una contaminazione da MON e FB₁ pari a 1000 µg/kg, da ZEA e da DON pari a 500 µg/kg. Per la MON la percentuale di recupero medio è stata di 92,1±2,8%, per la FB₁ di 96,3±2,9%, per il DON di 91,2±3,6% e per lo ZEA di 95,6±2,1%. I risultati dei campioni non sono stati corretti per le percentuali di recupero. I limiti di rivelazione (*Limit Of Detection*, LOD, rapporto segnale/rumore 3:1) sono risultati di 15 µg/kg per la MON; di 20 µg/kg per la FB₁, di 2 µg/kg per il DON, e di 10 µg/kg per lo ZEA.

Contaminazione da moniliformina

La MON è risultata presente in quasi tutti i campioni (92%); dall'analisi dei dati è stato calcolato un valore medio di 764±782 µg/kg e una mediana pari a 629 µg/kg. Valori superiori a 1000 µg/kg sono stati riscontrati in 20 campioni (23%) con un valore massimo di 5465 µg/kg (Figura 1).

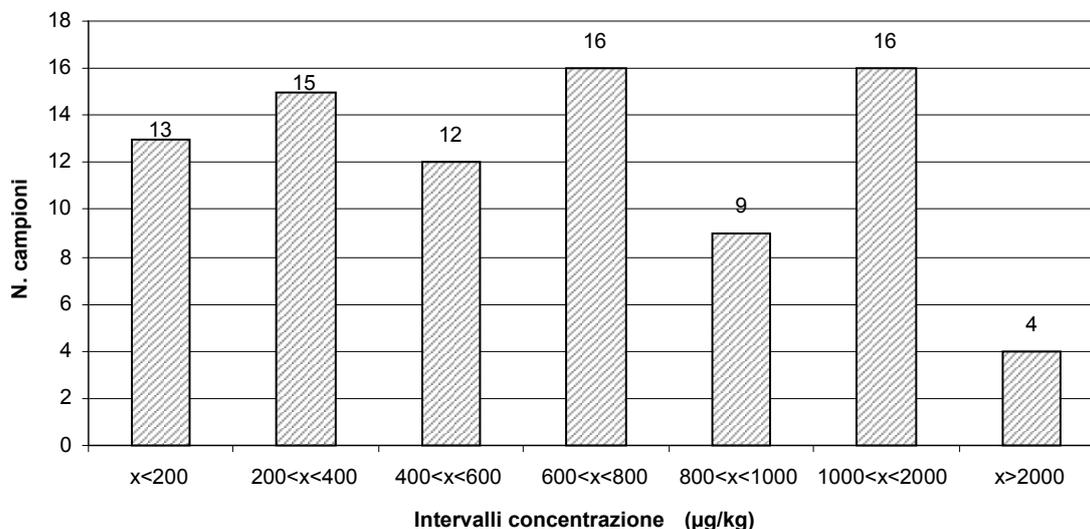


Figura 1. Intervalli di contaminazione da MON

Non è stata rilevata nessuna differenza statisticamente significativa tra i campioni provenienti dalle due regioni del nord Italia. Sugli stessi campioni sono state eseguite le analisi per la determinazione dei TCT mediante GC-MS (3 Ac-DON e tossine T-2 e HT-2 assenti in tutti i campioni), delle FB₁ e FB₂ e dello ZEA mediante HPLC. Nella Tabella 1 sono riportati

media, deviazione standard, mediana e valore massimo dei livelli di DON, 15 Ac-DON, nivalenolo (NIV), FB₁, FB₂ e ZEA.

Tabella 1. Valori ($\mu\text{g}/\text{kg}$) di media, mediana e valore massimo di DON, 15 Ac-DON, NIV, FB₁, FB₂ e ZEA

Valore	DON	15 Ac-DON	NIV	FB ₁	FB ₂	ZEA
Media \pm DS	145 \pm 262	25 \pm 54	11 \pm 28	9642 \pm 6445	4964 \pm 4421	152 \pm 265
Mediana	30	<2	<2	8556	4107	50
Valore massimo	1647	257	180	28521	15099	1075

Per il DON e per lo ZEA la correlazione con MON non è risultata significativa ($R=0,15$ ed $R=0,08$, rispettivamente), mentre per la FB₁ (Figura 2) è stata riscontrata una correlazione altamente significativa ($R=0,43$, $P<0,001$).

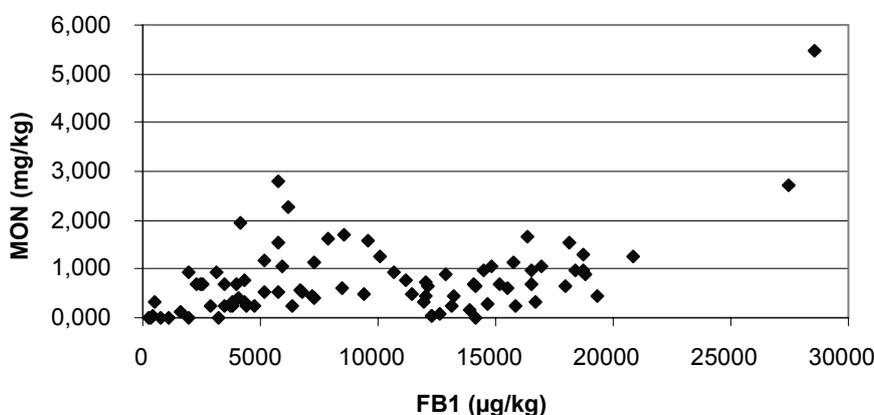


Figura 2. Correlazione valori FB₁-MON ($R=0,43$; $P<0,001$)

Tale risultato è probabilmente conseguenza del fatto che i principali produttori di DON (*F. graminearum* e *F. culmorum*) non producono MON, mentre un'importante produttore di FB₁ (*F. proliferatum*) produce anche MON.

Bibliografia

1. Burka LT, Doran J, Wilson BJ. Enzyme inhibition and the toxic action of moniliformin and other vinylogous α -ketoacids. *Biochemical Pharmacology* 1982;31:79-84.
2. Thiel PG. A molecular mechanism for the toxic action of moniliformin, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*. *Biochemical Pharmacology* 1978;27:483-6.
3. Javed T, Bennet GA, Richard JL, Dombrink-Kurtzman MA, Cote LM, Buck WB. Mortality in broiler chicks on feed amended with *Fusarium proliferatum* culture material or purified fumonisin B₁ and moniliformin. *Mycopathologia* 1993;123:171-84.
4. Vesonders RF, Gasdorf H, Petersen RE. Comparison of the cytotoxicities of *Fusarium* metabolites and *Alternaria* metabolites AAL-toxin to cultured mammalian cell lines. *Arch Environ Contam Toxicol* 1993;24:473-7.

5. Bottalico A. *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles in Europe. *Journal of Plant Pathology* 1998;80:85-103.
6. Gutema T, Minimbazi C, Bullerman LB. Occurrence of fumonisins and moniliformin in corn and corn-based food products of U.S. origin. *Journal of Food Protection* 2000;63:1732-7.
7. Jestoi M, Rokka M, Yli-Mattila T, Parikka P, Rizzo A, Peltonen K. Presence and concentrations of the *Fusarium*-related mycotoxins beauvericin, enniatins and moniliformin in Finnish grain samples. *Food Additives and Contaminants* 2004;21(8):794-802.
8. Uhlig S, Torp M, Jarp J, Parich A, Gutleb AC, Krska R. Moniliformin in Norwegian grain. *Food Additives and Contaminants* 2004;21(6):598-606.

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

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

Introduzione

Il mais è un componente importante delle razioni per le bovine in lattazione. Il mais contaminato da aflatoSSine, prodotto nell'estate 2003, caratterizzata da siccità e alte temperature, ha causato notevoli problemi nel comparto lattiero caseario nel periodo ottobre 2003-settembre 2004, dato che il latte di molte aziende agricole presentava talvolta valori di aflatoSSina M₁ (AFM₁) superiori al limite comunitario (solo in Lombardia sono state eliminate oltre 7000 tonnellate di latte, con rilevanti danni economici). Tale limite (0,05 µg/kg di latte) vale infatti a livello di singola azienda e in caso di superamento del limite è espressamente proibita la diluizione con altro latte non contaminato. Se latte contaminato viene usato nella produzione di formaggi, questi presentano una concentrazione di AFM₁ maggiore di quella del latte di partenza, con un fattore di arricchimento per i formaggi molli compreso fra 2,5-3,5 (1). Questa maggiore concentrazione è dovuta ad un'interazione idrofobica che si viene a formare tra AFM₁ e caseina nel corso della caseificazione (2). Nel caso dello yogurt, invece, alcuni studi hanno evidenziato una minore concentrazione di AFM₁ rispetto al latte di partenza (3). Al fine di valutare l'impatto della diffusa contaminazione da aflatoSSina del mais, prodotto nella pianura padana nel 2003, sul latte e sui prodotti lattiero caseari freschi, 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.

Materiali e metodi

Nel periodo sopra citato, in vari esercizi commerciali della zona di Piacenza, con cadenza settimanale sono stati prelevati complessivamente 67 campioni di latte fresco (prevalentemente 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.

Analisi AFM₁ nel latte

Dopo centrifugazione del latte per 10 min a 5500 g e a 4°C e successiva filtrazione su filtro di carta, 20 mL del filtrato sono stati fatti passare attraverso una colonna ad immunoaffinità (IA) (4). La colonna è stata lavata con 5 mL di acqua distillata e successivamente l'AFM₁ eluita in provetta graduata con 2,5 mL di CH₃OH. Dopo concentrazione del campione sotto flusso di N₂, l'estratto è stato portato a 2 mL con miscela CH₃CN:H₂O=25:75, dissolvendo in bagno ad ultrasuoni; dopo omogeneizzazione su vortex, l'estratto è stato filtrato e analizzato mediante HPLC.

Analisi AFM₁ in formaggi e yogurt

In un provettone da centrifuga sono stati pesati 5 g di formaggio precedentemente grattugiato o di yogurt, quindi sono stati aggiunti 50 mL di una soluzione di pepsina allo 0,2% in HCl 0,1 N (5). Il campione è stato posto in stufa termostata a 42°C per 16 ore sotto continua agitazione. Successivamente, la soluzione è stata centrifugata a 4500 g a 4°C per 15 min allo scopo di separare la parte lipidica residua. Dopo filtrazione su filtro di carta, è stato misurato il volume del filtrato, che è stato neutralizzato con NaOH 1N. Tutto il filtrato è stato fatto passare su colonna di IA; la colonna è stata lavata con 5 mL di acqua distillata e l'AFM₁ eluita in provetta graduata con 2,5 mL di CH₃OH. Dopo essiccazione dell'estratto sotto flusso di N₂, è stato aggiunto 1 mL di miscela CH₃CN:H₂O=25:75, sciogliendo il residuo in bagno ad ultrasuoni; dopo omogeneizzazione su vortex, l'estratto è stato filtrato e analizzato mediante HPLC.

Analisi HPLC

È stata utilizzata una colonna RP-18 (Merck), con fase mobile CH₃CN:H₂O=25:75 a flusso 1 mL/min e rivelazione fluorimetrica (λ_{ecc} 365, λ_{em} 440 nm).

Risultati e discussione

Percentuale di recupero e limiti di rivelazione

Sono state valutate le percentuali di recupero dei metodi utilizzati, aggiungendo ad aliquote di un campione risultato esente da contaminazione da AFM₁, un volume misurato di standard di AFM₁, in modo da avere una contaminazione pari a 0,050 µg/kg per latte e yogurt e 0,250 µg/kg per il formaggio. I metodi hanno fornito percentuali di recupero del 96,2±1,3%, 94,1±2,1% e 96,1±1,6% rispettivamente per latte, yogurt e formaggio. È stato testato anche un campione FAPAS di latte in polvere con valore teorico di 0,26 µg/kg con intervallo di accettabilità tra 0,15 e 0,38 µg/kg; all'analisi è risultato un valore pari a 0,254±0,006 µg/kg. I risultati dei campioni non sono stati corretti per le percentuali di recupero. I limiti di rivelazione (*Limit Of Detection*, LOD, rapporto segnale/rumore 3:1) e di quantificazione (*Limit Of Quantification*, LOQ) sono risultati di 0,001 e 0,002 µg/kg per il latte e 0,005 e 0,010 µg/kg per formaggio e yogurt.

Latte fresco e UHT

Nei campioni di latte fresco, l'AFM₁ è stata riscontrata in 63 campioni (94%), 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 (Tabella 1).

Tabella 1. Valori di media, mediana e valore massimo di AFM₁ nel latte fresco

Matrice	N. campioni	Media ± DS µg/kg	Mediana µg/kg	Valore massimo µg/kg
Latte fresco	67	0,021±0,012	0,020	0,061
Latte UHT	28	0,012±0,009	<LOQ	0,034

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 riscontrati 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 rispetto ai campioni di latte fresco (Test di Wilcoxon, P<0,05). La minore contaminazione riscontrata è probabilmente dovuta alla provenienza in gran parte estera di questo tipo di latte.

Formaggi molli

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 (tabella 2); in 5 campioni (7,7%) è stato rilevato un livello di contaminazione superiore a 0,250 µg/kg (Tabella 2).

Tabella 2. Valori (µg/kg) di media, mediana e valore massimo di AFM₁ in formaggi molli

Matrice	N. campioni	Media ± DS µg/kg	Mediana µg/kg	Valore massimo µg/kg
Mozzarella	8	0,035±0,024	0,035	0,070
Crescenza	8	0,031±0,013	0,028	0,053
Robiola	3	0,021±0,008	0,024	0,028
Primo sale	5	0,079±0,037	0,075	0,129
Scamorza	2	0,006±0,007	0,006	0,011
Quartirolo	5	0,042±0,031	0,056	0,072
Taleggio	4	0,073±0,120	0,016	0,252
Gorgonzola	3	0,055±0,032	0,038	0,092
Caciotta	23	0,109±0,007	0,082	0,534
Provolone	3	0,172±0,171	0,107	0,366
Ricotta	6	0,017±0,002	0,017	0,022

Yogurt

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.

Conclusioni

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.

Bibliografia

1. Brackett RE, Marth EH. Fate of AFM₁ in Parmesan and mozzarella cheese. *Journal of Food Protection* 1982;45(7):597-600.

2. Van Egmond HP. *Mycotoxins in dairy products*. London: Elsevier Applied Science 1989.
3. Govaris A, Roussi V, Koidis PA, Botsoglou NA. Distribution and stability of aflatoxin M₁ during production and storage of yogurt. *Food Additives and Contaminants* 2002;19 (11):1043-50.
4. Mortimer DN, Gilbert J, Shepher MJ. Rapid and highly sensitive analysis of AFM₁ in liquid and powdered milk using an affinity column cleanup. *Journal of Chromatography* 1987;407:393-8.
5. Pietri A, Bertuzzi T, Fortunati P, Piva G. Determinazione dell'aflatossina M₁ nei formaggi: nuovo metodo enzimatico di estrazione. In: Miraglia M, Brera C (Ed.). *1° Congresso nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 29-30 novembre 2004*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2005. (Rapporti ISTISAN 05/42). p. 318-321.

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

Introduzione

La liquirizia è una pianta erbacea perenne, appartenente alla famiglia delle Leguminose papilionacee. È originaria dell'Europa sud-orientale e dell'Asia minore; la sua coltivazione è soprattutto praticata nei paesi del bacino mediterraneo e in Germania, Russia, Cina e Australia. Alla raccolta l'umidità dei rizomi è circa pari al 50%, perciò viene eseguita un'essiccazione fino al raggiungimento del 10% di umidità. Alcune indagini sulla contaminazione da ocratossina A (OTA) in prodotti contenenti liquirizia (1,2), hanno evidenziato una contaminazione talvolta molto elevata (valore massimo 216 µg/kg); un successivo lavoro (3) ha rilevato presenza di OTA, ma non di aflatoSSine (AF). Non sono noti studi micologici mirati all'identificazione di ceppi fungini produttori di micotossine o alle modalità di contaminazione, ovvero se questa può avvenire in campo o dopo la raccolta. Al fine di confermare i livelli di contaminazione, talvolta preoccupanti, di OTA e AF riscontrati nelle precedenti indagini, è stato condotto uno studio su 20 prodotti a base di liquirizia prelevati al dettaglio durante il periodo novembre 2004-maggio 2005. L'indagine è stata effettuata sia su prodotti lavorati di liquirizia pura (spezzatine, liquirizia in polvere) che su prodotti dolciari a base di liquirizia (caramelle). Sono stati prelevati e analizzati anche alcuni prodotti di origine biologica.

Materiali e metodi

Analisi delle aflatoSSine

Le AF sono state estratte da 10 g di campione, precedentemente macinato, con 100 mL di una miscela di CH₃OH:H₂O=80:20, mediante agitazione meccanica per 45 minuti. Dopo filtrazione su filtro di carta, un volume di 5 mL dell'estratto filtrato è stato diluito con 50 mL di acqua distillata e purificato su colonna ad immunoaffinità (IA). Effettuato successivamente un lavaggio della colonna di IA con 5 mL di acqua distillata, le AF sono state eluite in provetta graduata con 2,5 mL di CH₃OH. Dopo concentrazione con flusso di N₂, l'estratto purificato è stato portato a 2 mL con la miscela CH₃CN:H₂O=25:75, utilizzando un bagno ad ultrasuoni per la dissoluzione; la soluzione è stata miscelata (su vortex), filtrata (0,45 µm) e sottoposta ad analisi mediante HPLC. È stata utilizzata una colonna RP-18 Superspher (Merck) e come eluente una miscela H₂O:CH₃OH:CH₃CN=64:23:13 a flusso 1 mL/min; la rivelazione fluorimetrica ($\lambda_{\text{ecc}}=365$ nm, $\lambda_{\text{em}}=440$ nm) è stata effettuata dopo derivatizzazione post colonna con *Pyridinium* Bromide Perbromide (25 mg sciolti con bagno ad ultrasuoni in 500 mL di acqua) a flusso 0,1 mL/min.

Analisi della ocratossina A

L'OTA è stata estratta da 10 g di campione, precedentemente macinato, con 100 mL di una miscela di CH₃OH:sol. acquosa di NaHCO₃ 0,5M=50:50 mediante agitazione meccanica per 45 minuti. Dopo filtrazione su filtro di carta, un volume di 5 mL dell'estratto filtrato è stato diluito con 50 mL di tampone PBS (NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L, Na₂HPO₄ 1,15 g/L, KH₂PO₄ 0,2 g/L, pH 7,4) e purificato su colonna ad immunoaffinità (IA). Effettuato successivamente un lavaggio della colonna di IA con 5 mL di tampone PBS, l'OTA è stata eluita in provetta graduata con 2,5 mL di CH₃OH acido per CH₃COOH al 2%. Dopo concentrazione dell'estratto purificato con flusso di N₂, il residuo è stato portato a 1 mL con la miscela CH₃CN:H₂O=41:59, utilizzando un bagno ad ultrasuoni per la dissoluzione; la soluzione è stata miscelata (su vortex), filtrata (0,45 µm) e sottoposta ad analisi mediante HPLC. Per la separazione è stata utilizzata una colonna RP-18 Superspher (Merck) con fase mobile CH₃CN:soluzione acquosa al 2% di CH₃COOH=41:59 a flusso 1 mL/min; la determinazione dell'OTA è avvenuta con rivelazione fluorimetrica ($\lambda_{ecc}=333$ nm, $\lambda_{em}=470$ nm). L'OTA è stata quindi confermata mediante metilazione dell'estratto purificato e successiva analisi HPLC dell'estere metilico (4).

Risultati e discussione

Prove di recupero e limiti di quantificazione

Sono state valutate le percentuali di recupero dei due metodi, aggiungendo ad aliquote di un campione di liquirizia, risultato esente da AF e OTA, un volume misurato di standard delle micotossine cercate, in modo da avere un livello di contaminazione rispettivamente pari a 2 e 5 µg/kg. I risultati, indicativi dell'accuratezza e della precisione dei due metodi utilizzati, sono risultati pari a 94,22,6% per AFB₁ e a 92,33,7% per OTA. I risultati dei campioni non sono stati corretti per le percentuali di recupero. I limiti di rivelazione (*Limit Of Detection*, LOD, rapporto segnale/rumore 3:1) e i limiti di quantificazione (*Limit Of Quantification*, LOQ) sono risultati rispettivamente di 0,02 e 0,05 µg/kg per AFB₁ e AFG₁, di 0,05 e 0,10 µg/kg per AFB₂ e AFG₂, e di 0,05 e 0,10 µg/kg per OTA.

Contaminazione da aflatossine e ocratossina A

Le analisi sono state effettuate su 11 prodotti di liquirizia pura e 9 dolcificati a base di liquirizia. Per quanto riguarda la contaminazione da AF, i livelli sono risultati abbastanza contenuti (Tabella 1). I campioni positivi sono stati pari al 50%; il valore massimo per l'AFB₁ è stato di 6,90 µg/kg, riscontrato in un prodotto dolcificato di origine biologica, ma complessivamente solo due campioni superavano i 2 µg/kg. Non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa tra le due tipologie di prodotti (Tabella 2). Molto più preoccupante è risultato il livello di contaminazione da OTA, soprattutto per i prodotti di liquirizia pura (Tabella 1). Complessivamente, l'OTA è risultata presente in 18 campioni su 20; per i prodotti di liquirizia pura, solo un campione evidenziava un livello inferiore a 5 µg/kg, mentre in 8 su 11 l'OTA superava i 20 µg/kg. In questa tipologia di prodotti è stato trovato il valore massimo dell'indagine, pari a 80,11 µg/kg. È stata riscontrata una differenza statisticamente significativa (P<0,01) tra i prodotti dolcificati a base di liquirizia e quelli di liquirizia pura, evidenziata anche dai valori di media e mediana.

Tabella 1. Valori di AF e OTA in prodotti di liquirizia

Matrice	Campione	AFB ₁ (µg/kg)	AFB ₂ (µg/kg)	AFG ₁ (µg/kg)	AFG ₂ (µg/kg)	OTA (µg/kg)
Prodotti dolciari a base di liquirizia	1	0,08	<0,10	< 0,05	<0,10	0,55
	2	0,11	<0,10	< 0,05	<0,10	1,36
	3	< 0,05	<0,10	< 0,05	<0,10	0,17
	4	< 0,05	<0,10	< 0,05	<0,10	3,68
	5	< 0,05	<0,10	< 0,05	<0,10	0,25
	6	< 0,05	<0,10	< 0,05	<0,10	1,56
	7	1,86	0,24	0,44	<0,10	6,77
	8	2,79	<0,10	< 0,05	<0,10	<0,10
	9 bio	6,90	0,48	< 0,05	<0,10	<0,10
Prodotti di liquirizia	1	2,19	0,20	< 0,05	<0,10	8,07
	2	< 0,05	<0,10	< 0,05	<0,10	68,90
	3	< 0,05	<0,10	< 0,05	<0,10	20,14
	4	< 0,05	<0,10	< 0,05	<0,10	8,13
	5	< 0,05	<0,10	< 0,05	<0,10	80,11
	6	1,50	<0,10	< 0,05	<0,10	23,09
	7	1,62	<0,10	< 0,05	<0,10	31,16
	8 bio	1,49	<0,10	0,38	<0,10	0,59
	9 bio	0,33	<0,10	< 0,05	<0,10	35,01
	10 bio	< 0,05	<0,10	< 0,05	<0,10	22,61
	11 bio	< 0,05	<0,10	< 0,05	<0,10	40,00

Tabella 2. Percentuale di positivi, media, mediana e valore massimo di AFB₁ e OTA

Matrice	Micotossina	% Positivi	Media µg/kg	Mediana µg/kg	Val. massimo µg/kg
Prodotti dolciari a base di liquirizia	AFB ₁	55	1,31±2,32	0,08	6,90
	OTA	78	1,64±2,30	0,55	6,77
Prodotti di liquirizia	AFB ₁	45	0,66±0,85	<0,05	2,19
	OTA	100	30,71±24,84	23,09	80,11

Livello di esposizione all'ocratossina A

Il Comitato Scientifico europeo per gli alimenti ha proposto un livello di TDI (ingestione giornaliera tollerabile) per OTA pari a 5 ng/kg di peso corporeo. In base agli elevati livelli di OTA rilevati nella presente indagine, è stato valutato se a questa contaminazione corrisponda un reale rischio di esposizione, riferendosi soprattutto alla fascia degli adolescenti, che possono essere considerati i maggiori consumatori di prodotti a base di liquirizia. Dato quindi il valore della mediana dell'indagine (7,42 µg/kg) e ipotizzando un'assunzione media di liquirizia di 3 g al giorno, la quantità media di OTA assunta risulta pari a 22,3 ng. Considerando un peso medio di 35 kg per un adolescente, l'assunzione calcolata per kg di peso corporeo è di 0,64 ng di OTA; tale valore è equivalente al 13% del TDI e rappresenta sicuramente un contributo significativo all'esposizione complessiva.

Conclusioni

Alla luce dei risultati dell'indagine effettuata, emerge un reale rischio di elevata assunzione di OTA da prodotti di liquirizia. Risulta opportuno effettuare un monitoraggio più ampio sulla contaminazione da OTA e AF in questi prodotti, oltre che sviluppare studi mirati all'identificazione delle specie fungine produttrici e individuare i punti critici di contaminazione, durante le fasi di raccolta e di conservazione.

Bibliografia

1. Bresch H, Urbanek M, Nusser M. Ochratoxin A in food containing liquorice. *Nahrung* 2000;44 (4):276-8.
2. Majerus P, Max M, Klaffke H, Palavinskas R. Ochratoxin A in liquorice root, sweet liquorice and their manufactured products. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 2000;96 (12):451-4.
3. Trucksess M, Weaver C, Oles C, D'Ovidio K, Rader J. Determination of aflatoxins and ochratoxin A in ginseng and other botanical roots by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of AOAC International* 2006;89(3):624-30.
4. Gareis M. Vorkommen der Mycotoxine Ochratoxin A und B in deutscher Braugerste und daraus hergestelltem Malz. *Archiv fur Lebensmittelhygiene* 1999;50:83.

INDAGINE SULLA CONTAMINAZIONE DA AFLATOSSINE E FUMONISINA B₁ IN 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

Introduzione

Le micotossine che più frequentemente vengono riscontrate nel mais prodotto in Italia sono: fumonisine, deossivalenolo, zearalenone e aflatoSSine (1). Le ultime annate, caratterizzate da un clima caldo e secco, hanno visto prevalere i funghi produttori di fumonisine (*F. verticillioides* e altri), favoriti anche da forti attacchi di piralide alle piante; in queste condizioni, è stata notata una contaminazione variabile (tra gli anni e le aree) da aflatoSSine. Quando il clima è stato particolarmente caldo e siccitoso, come nell'estate 2003, la contaminazione da aflatoSSine (AF) è risultata rilevante. Le AF sono un gruppo di micotossine prodotte da ceppi di *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*; quelle che vengono riscontrate negli alimenti di origine vegetale sono quattro: AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂. La temperatura ottimale per la produzione delle tossine è intorno a 30°C; questo spiega perché le aflatoSSine vengano più frequentemente rilevate in derrate provenienti da zone a clima caldo o su colture estive, come il mais. L'aflatoSSina B₁ (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 (è l'epatocarcinogeno naturale più potente che si conosca: classe IARC 1, sicuramente cancerogeno per l'uomo). Nella UE sono in vigore limiti fissati dal regolamento (CE) 466/2001; per i cereali e prodotti derivati per il consumo diretto il tenore massimo è di 2,0 e 4,0 µg/kg per AFB₁ e AF totali, rispettivamente. Le fumonisine sono un gruppo di metaboliti tossici, prodotti soprattutto da *F. verticillioides* e *F. proliferatum* (comunissimi agenti del "marciume rosa del culmo e della spiga"); la fumonisina B₁ (FB₁, la più abbondante) causa leucoencefalomalacia nel cavallo e edema polmonare nel suino; è dotata di attività cancerogena e si ritiene che possa causare il cancro dell'esofago nell'uomo (classe IARC 2B, possibilmente cancerogena per l'uomo); studi di correlazione effettuati in Sudafrica (Transkei) suggeriscono un legame tra esposizione alla FB₁ nella dieta e cancro esofageo (2). Elevate incidenze di questo tumore sono state osservate in popolazioni (in regioni della Cina e dell'Iran) per le quali il mais è l'alimento base della dieta e alta è l'esposizione alla FB₁, in quanto le condizioni ambientali ne favoriscono l'accumulo sul mais.

Due studi hanno evidenziato una correlazione tra consumo di mais, in particolare polenta, e incidenza di tumori nella cavità orale, faringe ed esofago nel Veneto e Friuli-Venezia Giulia (3,4). Per quanto riguarda il contenuto di fumonisine nelle farine di mais, il Regolamento CE 856/2005 ha stabilito che, se non verranno determinati specifici livelli entro il 1° ottobre 2007, entrerà in vigore, come limite di legge, il valore di 1000 µg/kg per farina fioretto e farina bramata. Allo scopo di valutare le conseguenze del clima dell'estate 2003 sulla qualità delle farine di mais al consumo, è stata condotta un'indagine per valutare la presenza di AF (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) e FB₁ in farine di mais per polenta.

Materiali e metodi

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. La macinazione dei campioni è stata eseguita con griglia da 1 mm.

Analisi aflatossine

Le AF sono state estratte da 10 g di campione con 100 mL di miscela CH₃OH:H₂O 80:20, agitando per 45 minuti; l'estratto è stato filtrato su filtro di carta, quindi 5 mL di filtrato sono stati diluiti con 45 mL di H₂O dist. e fatti passare su colonna di immunoaffinità (5). La colonna è stata lavata con 5 mL di H₂O dist., quindi le AF sono state eluite in provetta graduata con 2,5 mL di CH₃OH. Dopo concentrazione con flusso di N₂, l'estratto purificato è stato portato a 2 mL con la miscela CH₃CN:H₂O=25:75, utilizzando un bagno ad ultrasuoni per la dissoluzione; l'estratto è stato miscelato, filtrato (0,45 µm) e sottoposto ad analisi mediante HPLC. Per la separazione delle AF è stata utilizzata una colonna RP-18 Superspher (Merck), con fase mobile H₂O:CH₃OH:CH₃CN=64:23:13; la rivelazione fluorimetrica è stata effettuata (λ_{ecc} =365 nm e λ_{em} =440 nm) dopo derivatizzazione post-colonna con *Pyridinium Bromide Perbromide* (50mg/L a flusso 0,1 mL/min).

Analisi fumonisina

La FB₁ è stata estratta da 10 g di campione, pesato in provettone da centrifuga, con 50 mL di miscela CH₃CN:CH₃OH:H₂O 25:25:50. Dopo agitazione per 45 minuti, centrifugazione per 6 minuti a 4500 g e filtrazione del surnatante su filtro di carta, al residuo rimasto nel provettone sono stati aggiunti altri 50 mL della stessa miscela, effettuando una seconda estrazione per altri 30 minuti; dopo filtrazione, i due estratti sono stati riuniti (6). Un'aliquota di 2 mL della soluzione così ottenuta è stata diluita con 20 mL di tampone fosfato a pH=7 (PBS) e fatta passare su colonna di immunoaffinità; dopo lavaggio della colonna con 2 mL di PBS, la FB₁ è stata eluita con 6 mL di CH₃OH, poi ridotti a 2 mL mediante evaporazione sotto flusso di N₂. La FB₁, dopo derivatizzazione con o-ftaldialdeide (OPA), è stata separata con colonna Luna Phenyl-Hexil (Phenomenex), utilizzando come fase mobile un gradiente H₂O (acidificata con 2% di CH₃COOH):CH₃CN a flusso 1mL/min. La rivelazione fluorimetrica è stata effettuata a λ_{ecc} =335 nm e λ_{em} =440 nm.

Risultati e discussione

Percentuali di recupero e limiti di rivelazione

Sono state valutate le percentuali di recupero dei metodi utilizzati, aggiungendo ad aliquote di un campione risultato esente da contaminazione da micotossine, un volume misurato di standard di AF e FB₁, in modo da avere una contaminazione pari a 2 µg/kg per ogni singola AF, e a 1000 µg/kg per FB₁. La percentuale di recupero è stata di 97,8±1,6% per la AFB₁ e maggiore del 93% per le altre AF, mentre per la FB₁ è risultata pari al 91,5±1,9%. Per l'analisi dell'AFB₁ è stato testato anche un campione FAPAS di farina di mais con valore teorico di

4,1±1,0 µg/kg; all'analisi è risultato un valore pari a 4,2±0,2 µg/kg. I risultati dei campioni non sono stati corretti per le percentuali di recupero. I limiti di rivelazione (*Limit Of Detection*, LOD, rapporto segnale/rumore 3:1) e di quantificazione (*Limit Of Quantification*, LOQ) sono risultati di 0,02 e 0,05 µg/kg per la AFB₁ e di 30 e 60 µg/kg per la FB₁.

Contaminazione da aflatossine e fumonisina B₁

Nei campioni relativi al 2003 è stata riscontrata una diffusa (un solo campione negativo) e non trascurabile contaminazione da AF (Tabella 1). 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 invece evidenziato una minore contaminazione; nel 70% dei campioni il livello di contaminazione è stato inferiore a 0,5 µg/kg e solo in 4 campioni (6,7%) è stata rilevata AFB₁ ad una concentrazione superiore a 2 µg/kg. La contaminazione da FB₁ ha invece evidenziato un andamento simile nei due anni (Tabella 1). I livelli medi di AF e FB₁ sono risultati superiori nei campioni di farine biologiche rispetto alle convenzionali, ad eccezione per la FB₁ nel 2004, (Tabella 2), anche se non è stata riscontrata alcuna differenza statisticamente significativa, dato anche l'esiguo numero di farine biologiche disponibili. Per i campioni di farine convenzionali, i livelli di AFB₁ relativi al 2003 sono risultati significativamente superiori ($P < 0,05$) a quelli del 2004.

Tabella 1. Valori (µg/kg) di media, mediana e valore massimo di AFB₁, AFB₂ e FB₁

Parametro	AFB ₁ (µg/kg)		AFB ₂ (µg/kg)		FB ₁ (µg/kg)	
	2003	2004	2003	2004	2003	2004
Media ± DS	2,11±4,66	0,67±0,99	1561±1932	1820±1206	1561±1932	1820±1206
Mediana	0,95	0,30	1054	1610	1054	1610
Valore massimo	30,71	5,27	9887	7153	9887	7153

Tabella 2. Valori (µg/kg) di media, mediana e valore massimo di AFB₁ e FB₁ nei campioni biologici e convenzionali

Parametro	AFB ₁ (µg/kg)				FB ₁ (µg/kg)			
	2003		2004		2003		2004	
	<i>bio</i>	<i>conv</i>	<i>bio</i>	<i>conv</i>	<i>bio</i>	<i>conv</i>	<i>bio</i>	<i>conv</i>
Media	6,96	1,39	0,82	0,59	3082	1334	1807	1828
± DS	±11,59	±1,61	±1,19	±0,89	±3919	±1343	±1109	±1269
Mediana	1,9	0,87	0,33	0,25	1052	1054	1576	1644
Valore massimo	30,71	6,56	4,43	5,27	9887	6811	4734	7153

Conclusioni

Dall'indagine sulla presenza di aflatossine in farina per polenta, acquistata al dettaglio, è stato evidenziato un elevato livello di contaminazione per i campioni relativi al mais prodotto nell'annata 2003, caratterizzata da un clima particolarmente caldo e siccitoso. Una percentuale

alta, pari al 25%, è infatti risultata avere una contaminazione da AFB₁ superiore al limite di legge di 2 µg/kg. I campioni relativi alla successiva annata 2004, hanno invece mostrato una minore, anche se diffusa, presenza di aflatossine. La contaminazione da FB₁ ha invece evidenziato un andamento simile nei due anni, con valori medi e di mediana sempre superiori a 1000 µg/kg, valore proposto dalla UE come futuro limite di legge a partire da ottobre 2007.

Bibliografia

1. Pietri A, Bertuzzi T, Pallaroni L, Piva G. Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in Northern Italy. *Food Additives and Contaminants* 2004;21(5):479-87.
2. Sydenham EW, Thiel PG, Marasas WFO, Shepharf GS, Van Schalkwyk DJ, Koch KR. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxin in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. *Journal Agriculture Food Chemistry* 1990;38:1900-3.
3. Rossi M, Ancona E, Mastrangelo G, Solimbergo D, Paruzzolo P, Assarini G, Sorrentina P, Peracchia A. Epidemiologic findings in esophageal cancer in the Veneto Region. *Minerva Medica* 1982;73:1531-40.
4. Franceschi S, Bidoli E, Baron AE, La Vecchia C. Maize and risk of cancer of the oral cavity, pharynx and esophagus in northeastern Italy. *Journal of the National Cancer Institute* 1990;82:1407-11.
5. Stroka J, Petz M, Joerissen U, Anklam E. Investigation of various extractants for the analysis of aflatoxin B₁ in different food and feed matrices. *Food Additives and Contaminants* 1999;16(8):331-8.
6. Visconti A, Solfrizzo M, de Girolamo A. Determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn flakes by liquid chromatography with immunoaffinity column cleanup: collaborative study. *Journal of AOAC International* 2001;84(6):1828-37.

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

Raffaello Castoria (a), Luisa Mannina (b), Maiuro Lucia (b), Sobolev Anatoli (c), Alberto Ritieni (d), Rosalia Ferracane (d), Spina A. (a)

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

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

(c) Istituto di Metodologie Chimiche, CNR, Roma

(d) Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Università di Napoli, Napoli

Introduzione

La patulina contamina pomacee e prodotti derivati a seguito dell'attacco sui frutti del fungo patogeno postraccolta *Penicillium expansum*. È una delle micotossine più importanti, sia per la sua tossicità, sia perché contamina prodotti alimentari molto usati nell'infanzia (1-3). La patulina provoca nell'uomo gastrite e nausea a seguito di intossicazioni acute, è associata ad immunodepressione ed ha effetto embriotossico, teratogeno, mutageno, inducendo danni al DNA di cellule umane coltivate *in vitro* (4-7). Recentemente, la Commissione Europea ha stabilito i valori massimi ammissibili per questa micotossina in prodotti a base di pomacee [Commission Regulations (EC) No 1425/2003 and 455/2004 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards patulin]. Oltre alla patulina, anche la presenza di residui di fitofarmaci nei prodotti derivati rappresenta un importante problema legato alla qualità e sicurezza alimentare. I rischi sanitari e ambientali legati all'uso di fitofarmaci di sintesi hanno quindi stimolato la ricerca di alternative biologiche ai fungicidi.

Un metodo promettente è l'utilizzo di microrganismi agenti di biocontrollo (AB) che hanno efficace attività antagonistica contro diversi funghi patogeni del postraccolta (8). Il ceppo di lievito di biocontrollo *Rhodotorula glutinis* isolato LS11 ha elevata attività antagonistica contro numerosi funghi e previene gli attacchi di *P. expansum* su mele conservate (9-13). Inoltre, causa un significativo decremento dell'accumulo di patulina, prodotta dal fungo, nelle mele infettate (*in vivo*) (12). Questo fenomeno sembra dovuto ad un rallentamento dello sviluppo del fungo, causato dal lievito, nei frutti attaccati. *In vitro*, LS11 metabolizza la patulina formando nuovi composti, di cui uno appare più stabile e il probabile prodotto finale della metabolizzazione (12). Ulteriori studi sono necessari per chiarire il meccanismo/i del decremento di patulina determinato *in vivo* da LS11.

In questo lavoro sono riportate nuove informazioni sul meccanismo/i del decremento di patulina determinato dall'AB *R. glutinis* LS11: la caratterizzazione, mediante analisi NMR, del più stabile dei metaboliti della patulina prodotto da *R. glutinis* LS11; osservazioni al microscopio elettronico a scansione sul destino dell'AB, volte a chiarire se le sue cellule seguono le ife fungine nella penetrazione nel tessuto del frutto, venendo così a contatto col sito dove presumibilmente avviene la maggiore sintesi di patulina.

Materiali e metodi

Produzione del metabolita della patulina

Il lievito *R. glutinis* isolato LS11 è stato allevato in agitazione in beute contenenti terreno Lilly-Barnett (LB) (14) a 23°C per 24-36 ore. Le colture sono state centrifugate e le cellule trasferite, alla concentrazione di $1,0 \times 10^5$ UFC/mL, in LB contenente patulina 250 µg/mL. Dopo 72 ore, durante le quali la formazione dei metaboliti della patulina è stata monitorata mediante cromatografia su strato sottile, le colture sono state centrifugate, le cellule eliminate, e il sovrinatante liofilizzato, prima della purificazione del metabolita a noi noto come più stabile e abbondante.

Purificazione del metabolita della patulina

Il sovrinatante *cell free* liofilizzato delle colture di LS11 allevato in presenza di patulina è stato risospeso in acqua acidulata con acido acetico (pH 4). Per la purificazione del metabolita della patulina è stato utilizzato un apparecchio HPLC serie 200 Perkin Elmer, con due micropompe e rilevatore UV-VIS 785 A impostato a 276 nm. Fase stazionaria: colonna Phenomenex Luna 5µ C18 100 A, 250 x 4,6 mm. Fase mobile: H2O acidulata (con 1% di acido acetico) e metanolo 95:5 (v/v). Flusso: 1 mL/min. Sono state iniettate aliquote da 100 µL ciascuna, sono state raccolte frazioni del picco con tempo di ritenzione 15,2 min., e sono stati ottenuti circa 2 mg di campione purificato per le successive analisi NMR.

Analisi NMR

Il metabolita purificato è stato sciolto in D₂O e acido acetico deuterato 0,17 M, aggiustando il pH a 4,0 per aggiunta di carbonato di potassio. Tutti gli esperimenti NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) sono stati eseguiti a 27°C in uno spettrometro Bruker AVANCE AQS600 operante alla frequenza di Risonanza del protone di 600,13 MHz ed equipaggiato con una testa di misura multinucleare a rilevazione inversa con gradienti z. Le assegnazioni 1H and 13C sono state ottenute per mezzo di esperimenti bi-dimensionali 1H-1H COSY, 1H-13C HSQC and 1H-13C HMBC (15).

Osservazioni al SEM

Per le osservazioni al SEM (*Scanning Electron Microscope*) mele cv Golden Delicious sono state disinfettate in ipoclorito di sodio, sciacquate con acqua distillata e asciugate. Su ciascun frutto sono state praticate 4 ferite (3 mm x 3 mm) attorno alla zona del peduncolo. In ogni ferita sono state posti 30 µL di una sospensione cellulare dell'AB (108 UFC/mL) e, dopo 2 ore, 15 µL di una sospensione conidica (1×10^4 conidi/mL) di *P. expansum* in acqua distillata. I frutti sono stati incubati al buio a 20°C e 95-98% UR fino a quando, dopo 5 giorni, erano ben evidenti i marciumi delle ferite in cui l'AB non aveva prevenuto l'infezione.

Le mele sono state congelate e sono state prelevate sezioni cilindriche dei marciumi, tagliando circolarmente ad 1 cm attorno al margine di questi. Il cilindro è stato diviso longitudinalmente in 2 parti uguali che sono state ulteriormente sezionate trasversalmente all'asse maggiore della sezione cilindrica, per ottenere campioni a distanze crescenti dalla

superficie del frutto. Tali sezioni sono state fissate per immersione in 3% glutaraldeide (v/v) con tampone fosfato 0,1 M e, successivamente, post-fissate in OsO₄ 1% (v/v). I campioni sono quindi stati deidratati mediante concentrazioni crescenti di etanolo, essiccate in atmosfera di CO₂ mediante Emitech K850 critical point drier, montati su stub di alluminio, *gold-coated* in un Emitech K550 sputter coater, ed esaminate con un SEM ZEISS DSM 940 A.

Risultati

La purificazione e l'analisi NMR del metabolita più stabile della patulina prodotto *in vitro* dall'AB *Rhodotorula glutinis* LS11 hanno consentito di identificare tale composto come acido desossipatulिनico (Figura 1).

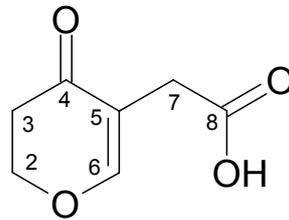


Figura 1. Struttura dell'acido desossipatulिनico, metabolita della patulina prodotto *in vitro* dall'agente di biocontrollo *Rhodotorula glutinis* isolato LS11, identificato mediante analisi NMR.

Assegnazione spettro ¹H NMR (600. 13 MHz) in D₂O e acido acetico deuterato 0,17 M, pH 4,0: 7,62 (6, 1H, t, J=0,7Hz) 4,61 (2, 2H, t, J=7,1Hz) 2,72 (3, 2H, t, J=7,1Hz) 3,18 (7, 2H, d, J=0,7Hz).
Assegnazione spettro ¹³C NMR (150 MHz) in D₂O e acido acetico deuterato 0,17 M, pH 4,0: 164,7 (6), 67,9 (2), 34,6 (3), 30,5 (7), 195,6 (4), 111,8 (5), 176,5 (8)

Le osservazioni al SEM delle mele pretrattate con LS11, ma ugualmente attaccate da *P. expansum*, mostra che la presenza di cellule vive di lievito è limitata alle ferite artificiali prodotte alla superficie della mela marcescente, dove tali cellule sono state applicate prima dell'inoculazione con conidi del fungo tossigeno (Figura 4).

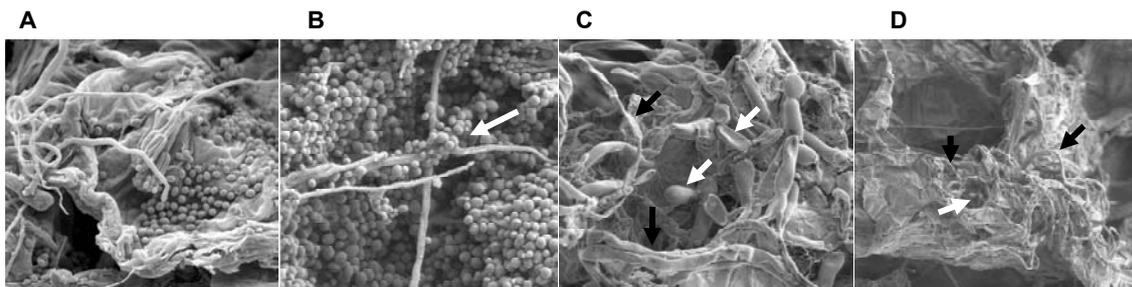


Figura 4. Microfotografie al SEM a diversi ingrandimenti (A=1000x; B=1000x; C=2000x; D=500x) di ferite di mele pretrattate con l'AB *Rhodotorula glutinis* LS11 e infettate con *Penicillium expansum*.

A e B: ferite superficiali dove LS11 è stato applicato prima dell'inoculazione del patogeno;
la freccia bianca in B mostra l'attaccamento delle cellule di LS11 alle ife del fungo
C e D: parte interna più profonda del tessuto marcescente di mela (1-1,2 cm dalla ferita superficiale); le immagini mostrano che sono presenti solo le ife del fungo (freccie nere) e alcuni conidi (freccie bianche)

Discussione

È noto che il lievito *Saccharomyces cerevisiae* metabolizza la patulina ad E-ascladiolo in condizioni di anaerobiosi, e ciò spiega l'abbattimento della presenza di questa micotossina in prodotti fermentati quale il sidro (16). Secondo le attuali conoscenze l'E-ascladiolo è ancora dotato di tossicità, sebbene inferiore alla patulina (17). Nel caso dell'AB LS11, invece, la metabolizzazione *in vitro* della patulina avviene in condizioni di aerobiosi, con la formazione di un composto che le analisi NMR hanno identificato come acido desossipatulico (DPA). Il DPA, sulla base delle informazioni disponibili, non è tossico per una serie di microrganismi verso i quali è invece tossica, nelle stesse condizioni di saggio, la patulina (18). Il DPA potrebbe derivare da una serie di reazioni degradative implicanti reazioni spontanee, e altre in cui invece intervengono enzimi di LS11 (Rebecca Goss, personal communication).

Il lievito esaminato in questo studio è in grado di stabilire contatto fisico diretto con le ife di un patogeno fungino quale *Botrytis cinerea* (9), manifesta cioè un carattere tipico dell'iperparassitismo, ritenuto uno dei meccanismi attraverso cui gli AB esplicano la loro attività antagonista contro i patogeni fungini. Sebbene da confermare, le osservazioni al S.E.M. di mele trattate con LS11 ma infettate da *P. expansum* mostrano che le cellule di LS11 sembrano in grado di stabilire interazione fisica diretta anche con le ife di *P. expansum*. Ciononostante, le cellule vive (12) del lievito che persistono nel tessuto marcescente, non seguono le ife fungine nella loro penetrazione profonda nel tessuto del frutto. L'assenza di penetrazione del lievito all'interno della mela marcescente, dove presumibilmente avviene la maggior sintesi di patulina, suggerisce che LS11 non metabolizzi, in queste condizioni, la micotossina. Questo meccanismo non può tuttavia ancora essere escluso, poiché è noto che la patulina diffonde dal tessuto di mela infettato nel tessuto sano (1) e potrebbe quindi giungere a contatto con l'AB localizzato sulla superficie del tessuto infettato dal fungo dove è presente anche LS11.

In conclusione, il lievito agente di biocontrollo *R. glutinis* LS11 ha la potenzialità di detossificare la patulina, poiché metabolizza la tossina *in vitro*, formando un composto, il DPA, caratterizzato da bassa o assente tossicità, almeno verso i microrganismi verso cui è stato saggiato. Sono in corso studi per verificare la metabolizzazione della tossina anche *in vivo*, cioè in mele pretrattate con l'antagonista ma comunque infettate dal fungo, e per ottenere ulteriori informazioni sulla tossicità del DPA.

Bibliografia

1. Beretta B, Gaiaschi A, Galli CL, Restani P. Patulin in apple-based foods: occurrence and safety evaluation. *Food Additives and Contaminants* 2000;17 (5):399-406.
2. Larsen TO, Frisvad JC, Ravn G, Skaaning T. Mycotoxin production by *Penicillium expansum* on blackcurrant and cherry juice. *Food Additives and Contaminants* 1998;15(6):671-5.
3. Prieta J, Moreno MA, Diaz S, Suarez G, Dominguez L. Survey of patulin in apple juice and children's apple food by diphasic dialysis membrane procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1994;42:1701-3.
4. Bourdiol D, Escoula L. Effect of Patulin on microbicidal activity of mouse peritoneal macrophages. *Food Chemistry and Toxicology* 1990;28:29-33.
5. FAO/WHO (Food and Agricultural Organisation of United Nations/World Health Organisation). *The use of hazard analysis and critical points (HACCP) in food control*. Roma: FAO Food and Nutrition Division; 1995. (Food and Nutrition Paper, 1995; NO. 58).

6. IARC. Patulin. In Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man. *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, Lyon, France, 1986; 40: 83-98.
7. Liu BH, Yu FY, Wu TS, Li SY, Su MC, Wang MC, Shih SM. Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2003;191:255-63.
8. Janisiewicz WJ, Korsten L. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology* 2002;40:411-41.
9. Castoria R, De Curtis F, Lima G, De Cicco V. β -1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology* 1997;12:293-300.
10. Castoria R, Logrieco A. Mycotoxins in fruits and major fruit-derived products – an overview. In: Ward OP, Ray RC (Ed.). *Microbial biotechnology in horticulture*. Vol. II. New Hampshire, USA: Science Publishers; (in press).
11. Castoria R, Caputo L, De Curtis F, De Cicco V. Resistance of Postharvest biocontrol yeasts to oxidative stress: a possible new mechanism of action. *Phytopathology* 2003;93:564-72.
12. Castoria R, Morena V, Caputo L, Panfili G, De Curtis F, De Cicco V. Effect of the biocontrol yeast *Rhodotorula glutinis* strain LS11 on patulin accumulation in stored apples. *Phytopathology* 2005;95:1271-8.
13. Lima G, De Curtis F, Castoria R, De Cicco V. Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against postharvest rots on different fruits. *Biocontrol Science and Technology* 1998;8:269-79.
14. Lilly VG, Barnett HL. *Physiology of the fungi*. New York, NY: McGraw-Hill; 1951.
15. Braun S, Kalinowsky HO, Berger S. *150 and more basic experiments: a practical NMR course*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 1998.
16. Moss MO, Long MT. Fate of patulin in the presence of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Additives and Contaminants* 2002;19(4):387-99.
17. Suzuki T, Takeda M, Tanabe H., A new mycotoxin produced by *Aspergillus clavatus*. *Chem Pharm Bull* 1971;19:1786-8.
18. Scott PM, Kennedy B, Van Walbeek W. Desoxyapatulinic acid from a patulin-producing strain of *Penicillium patulum*. *Experientia* 1972;28:1252.

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 Agroambientali, Università di Bologna, Bologna
(b) Granarolo SpA, Bologna

Introduzione

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.

In una precedente comunicazione (Piccaglia *et al.*, 2004) si pose in evidenza l'elevata professionalità di 17 importanti aziende italiane, i cui mangimi per lattifere risultarono avere un tenore medio di aflatossina B₁ ben al di sotto del limite massimo consentito (5 ppb), anche se il 7,6% dei campioni superava il suddetto limite di legge, inducendo a considerare molto utile continuare nell'attività di monitoraggio.

Nella presente nota, finalizzata alla verifica della presenza di aflatossine in mangimi prodotti da diverse aziende, i dati relativi al 2003 vengono integrati con le osservazioni effettuate nel biennio 2004-2005.

Materiali e metodi

Nel triennio 2003-2005 sono stati monitorati mangimifici di rilevanza nazionale o regionale, prelevando campioni di mangime per lattifere in tempi successivi, passando da un massimo di 8 ad un minimo di 1 controllo all'anno.

Sono stati complessivamente monitorati 42 mangimifici, 11 per un triennio, 16 per un biennio, e 15 per un solo anno, ubicati in diverse regioni italiane (Figura 1).

Ogni campione globale, del peso di 10 kg, era la risultante di numerosi campioni elementari (30-50) prelevati sulla linea produttiva dei mangimi per lattifere.

In tutti i campioni si sono determinati in cromatografia liquida ad alte prestazioni (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), i livelli di aflatossine (B₁, B₂, G₁, G₂) secondo un procedimento assai diffuso che prevede la purificazione degli estratti con colonnine ad immunoaffinità, la derivatizzazione post colonna e la determinazione HPLC/FLD (*FLuorescence Detector*).



Figura 1. Ubicazione dei mangimifici interessati dall'indagine

Risultati e discussione

L'aflatossina maggiormente presente è stata la B₁: essa ha raggiunto valori medi di 1,56 ppb, ben al di sotto al limite massimo consentito nei mangimi composti per lattifere (5 ppb). A tal proposito si fa presente che esistono inoltre capitolati di fornitura che obbligano le aziende a consegnare mangimi con tenori di aflatossine più bassi; ad esempio i fornitori degli allevamenti associati a Granlatte s.c.r.l. debbono garantire un limite massimo di aflatossina B₁ di 3 ppb.

Nel 2003 (Figura 2) il contenuto medio di B₁ è risultato di 1,96 ppb; in nessun mangimificio la media di tutti i prelievi ha superato i 5 ppb, mentre nel 15% dei campioni tale tossina era presente a livelli indeterminabili e solo nel 7,6% dei rilievi essa superava il limite di legge (valore medio di tali campioni: 7,9 ppb).

Nel 2004 la media generale di aflatossina B₁ è risultata di 1,68 ppb; in un'azienda, nella quale è stata tuttavia effettuato un unico controllo, essa ha superato i 14 ppb e in un'altra, visitata 3 volte, ha raggiunto i 5,28 ppb, ma a causa dell'alto valore di 1 campione su 3.

Nel 2005 il livello medio di contaminazione del mangime è risultato di appena 1,28 e nessun mangimificio, in media, ha superato la soglia di 5 ppb.

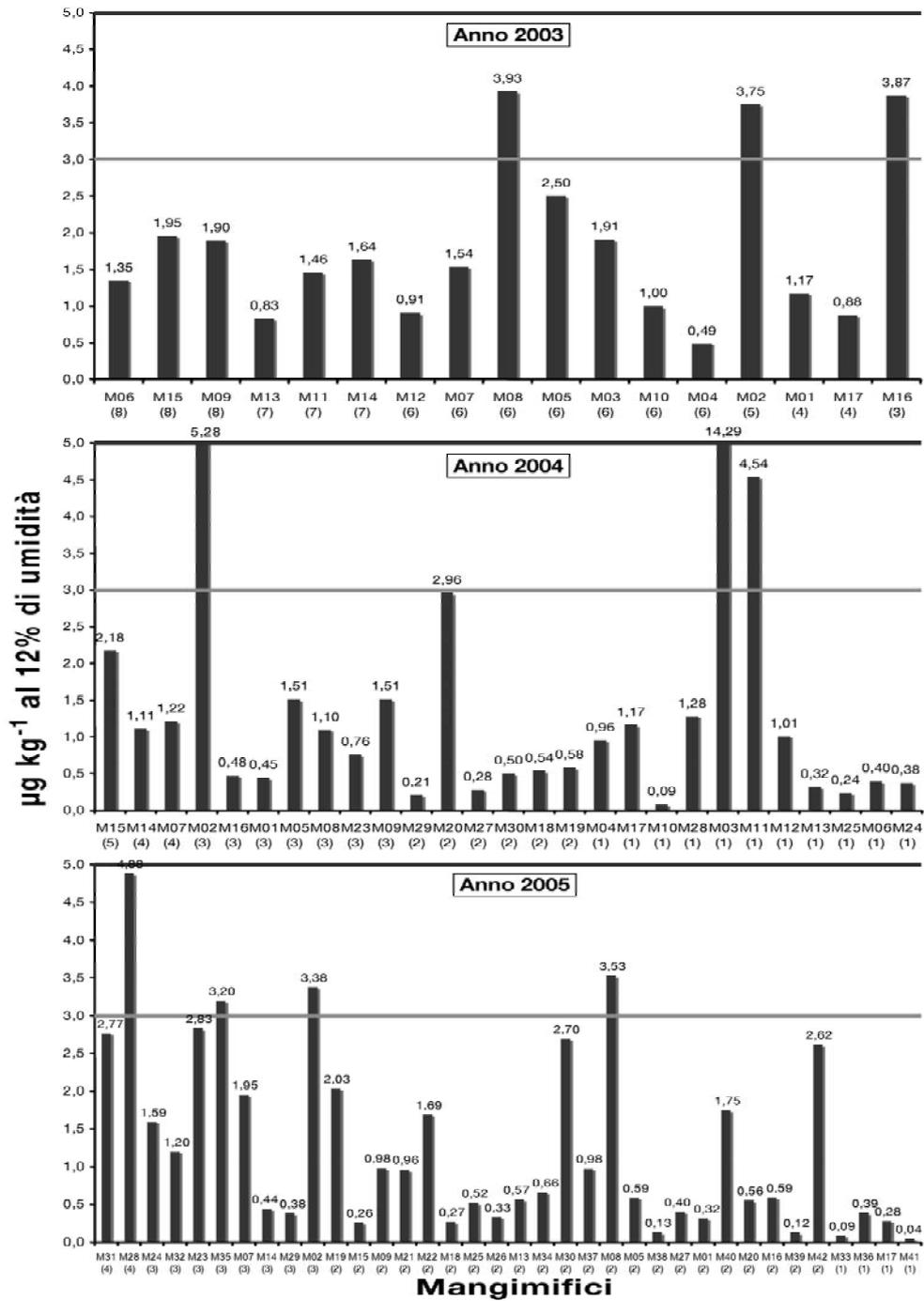


Figura 2. Contenuto medio di aflatoxina B₁ e tra () il numero di campioni prelevati.

Nella Figura 3 sono riportati i valori medi cumulativi dei diversi mangimifici in funzione degli anni di indagine.

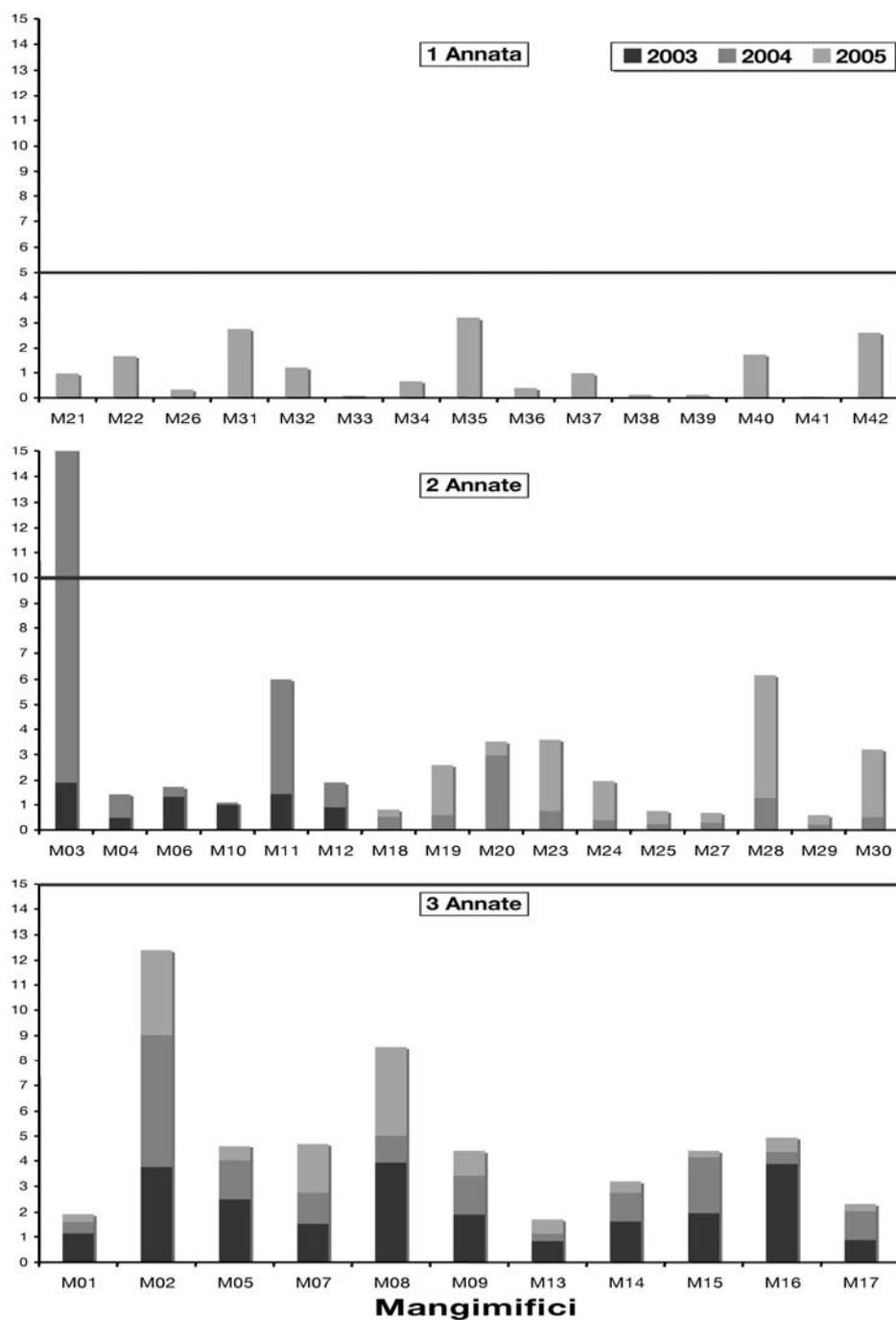


Figura 3. Valori medi cumulativi dei diversi mangimifici in funzione degli anni di indagine

Conclusioni

Il trattamento con prodotti antipiralide è risultato efficace per il contenimento della contaminazione con aflatoossina B₁ solo nel caso di forte attacco fungino, senza tuttavia dimostrarsi risolutivo.

Bibliografia

1. Cinti F, Grandi S, Casagrandi M. Effetto del trattamento antipiralide sulla presenza di tossine in granella di mais. In: Miraglia M, Brera C (Ed.). *Atti del 1° Congresso nazionale "Le micotossine nella filiera agro-alimentare", 29-30 novembre 2004. Istituto Superiore di Sanità. Roma: Istiuto Superiore di Sanità; 2005. (Rapporti ISTISAN 05/42). p. 100-102*
2. Fennell DI, Lillehoj EB, Kwolek WF, Guthrie WD, Sheeley R, Sparks AN, Widstrom NW, Adams GL. Insect larval activity on developing corn ears and subsequent aflatoxin contamination of seed. *Journal of Economic Entomology* 1978;71(4):624-8.
3. Gorman DP, Kang MS. Preharvest aflatoxin contamination in maize: resistance and genetics. *Plant Breeding* 1991;107(1):1-10.
4. McMillian WW, Widstrom NW, Wilson DM. Impact of husk type and species of infesting insects on aflatoxin contamination in preharvest corn at Tifton, Georgia. *Journal of Entomological Science* 1987;22(4):307-10.
5. Pietri A. Micotossine la situazione odierna in Italia. *Rivista di avicoltura* 1998;1/2:32-8.
6. Piva G, Pietri A. Le micotossine: origine, diffusione e rischi per il consumatore. *Atti della Società Italiana di Buiatria* 2001;33:403-11.
7. Piva G, Pietri A, Masoero F, Moschini M. Micotossine e allevamento bovino. *Atti della Società Italiana di Buiatria* 1998;30:9-42.
8. Rodriguez JG, Patterson CG, Potts MF, Poneleit CG, Beine RL. Role of selected corn insects and plant stress in aflatoxin production in Kentucky corn. *Transactions of the Kentucky Academy of Science* 1984;45(3-4):138-43.

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), Silvia Felloni (b)

(a) Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna, Bologna

(b) AgriOK SpA, Bologna

Introduzione

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 (Bottalico, 1994; Avantaggiato *et al.*, 2002; Avantaggiato & Visconti, 2003). In una precedente comunicazione (Cinti *et al.*, 2005) si era evidenziata una riduzione del contenuto di aflatossina B₁ del 62% seguendo il protocollo AgriOK, rispetto a modalità di coltivazione “convenzionali”, e del 18% come effetto delle operazioni di “pulitura + essiccamento”. Nella presente nota, finalizzata alla valutazione dell’applicazione di un protocollo nella filiera coltivazione-stoccaggio di granella di mais al fine di contenere la presenza di micotossine, si riportano i risultati di ulteriori osservazioni sul tema.

Materiali e metodi

Nel 2005 è stata condotta una ricerca in 4 province (3 emiliane, 1 in Friuli-Venezia Giulia) Bologna) seguendo 12 partite di granella di mais di dimensioni comprese tra 100 e 7.000 t (totale: 58.200 t) e aventi un contenuto medio di umidità compreso tra 20,7 e 27,6%, sei delle quali ottenute con le tecniche agronomiche ordinarie della zona e sei realizzate con il protocollo predisposto da AgriOK (un insieme di buone norme agronomiche ed esecuzione di trattamento contro la seconda generazione di *Ostrinia nubilalis* Hb.), consegnate a sei diversi centri di stoccaggio (2 in provincia di Ferrara, 2 in provincia di Rovigo e 2 rispettivamente in provincia di Modena e di Udine).

Sono stati prelevati campioni di granella sia all’atto del conferimento delle partite alle aziende stoccatrici sia dopo l’essiccazione. È stato prelevato un campione globale di 30 kg ogni 200 tonnellate di granella conferita, composto ognuno da 100 campioni elementari di 300 grammi. Ogni campione globale, dopo un’accurata miscelazione, è stato suddiviso in 3 campioni per il laboratorio.

Su tutti i campioni si sono determinati i contenuti di aflatossine (B₁, B₂, G₁, G₂) e di fumonisine (B₁ e B₂) mediante purificazione degli estratti con colonnine ad immunoaffinità, derivatizzazione post colonna e HPLC/FLD (*High Performance Liquid Chromatography / Fluorescence Detector*) per le aflatossine B₁, B₂, G₁, G₂; derivatizzazione pre colonna e HPLC/FLD per le fumonisine B₁, B₂.

Risultati e discussione

La granella ottenuta con il protocollo AgriOK ha presentato un contenuto totale di aflatossine nettamente inferiore a quello registrato sulla granella di provenienza “convenzionale” (14,16 contro 61,62 ppb, pari ad una riduzione del 77%) (Figura 1).

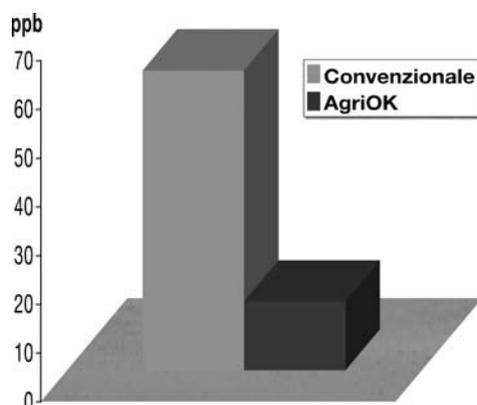


Figura 1. Effetto della modalità di di coltivazione sulla contaminazione della granella con aflatossina B₁, B₂, G₁, G₂

La granella all'uscita dallo stoccaggio presentava un contenuto totale di aflatossine inferiore a quello ante essiccamento: nel caso della coltura condotta convenzionalmente si è passati da 61,62 ppb a 32,50 ppb (-47%), mentre nella granella ottenuta con l'applicazione del protocollo AgriOK si è passati da 12,54 ppb a 7,50 ppb (-40%) (Figura 2).

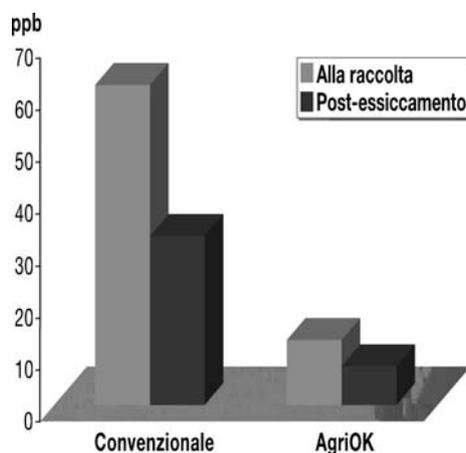


Figura 2. Effetto della pulitura-essiccamento sulla contaminazione della granella con aflatossina B₁

Per quanto riguarda le fumonisine totali si sono registrati valori compresi tra 6 e 10 ppm e non differenziati in funzione delle tesi. Trattasi di valori nettamente inferiori ai limiti ritenuti accettabili per derrate destinate all'alimentazione animale (Tabella 1).

Tabella 1. Fumonisine B₁ e B₂ (mg kg⁻¹ sul secco) ottenuta da coltivazioni convenzionali e AgriOK in granella di mais nei vari centri di stoccaggio

Centri di Stoccaggio	Convenzionale verde	Convenzionale secco	AgriOK verde	AgriOK secco
Fumonisina B₁				
cs-1	3,04	6,15	4,37	5,62
cs-2	4,39	4,02	4,85	4,03
cs-3	4,07	4,68	3,81	4,28
cs-4	3,30	3,18	3,21	3,19
cs-5	3,56	3,13	1,96	6,93
cs-6	-	-	3,07	4,68
Medie	3,67	4,23	3,64	4,81
Fumonisina B₂				
cs-1	2,83	3,40	2,89	3,83
cs-2	4,99	4,31	5,87	4,30
cs-3	4,31	4,85	3,93	4,67
cs-4	3,91	3,24	3,59	3,61
cs-5	1,45	1,31	0,86	1,45
cs-6	-	-	2,88	3,52
Medie	3,50	3,42	3,43	3,57

Conclusioni

In definitiva, questa ricerca corrobora le osservazioni precedentemente effettuate e cioè che un'attenta gestione dei seminati e delle fasi di stoccaggio appaiono in grado di ridurre il livello di contaminazione da aflatossine della granella di mais.

Bibliografia

- Avantaggiato G, Visconti A. Misure di controllo della contaminazione da micotossine e strategie di detossificazione. *Tecnica-Molitoria* 2003;54(10):1025-38.
- Avantaggiato G, De Girolamo A, Fanelli C, Ricelli A. Funghi tossigeni e micotossine: metodi di decontaminazione delle derrate. *Informatore Fitopatologico* 2002;(12):4349.
- Bottalico A. Riflessi degli attacchi dei funghi tossigeni alle colture agrarie, sulla qualità finale dei prodotti alimentari. In: *I rischi microbiologici del 2000 nel settore alimentare: muffe, lieviti e micotossine*. Milano: Unipath Editore; 1994. p. 11-28.
- Cinti F, Gaspari F, Casagrandi M. Influenza della modalità di coltivazione, essiccamento e stoccaggio sulla presenza di aflatossine in granella di mais. In: Miraglia M, Brera C (Ed.). *Atti del 1° Congresso nazionale "Le micotossine nella filiera agro-alimentare"*, 29-30 novembre 2004, Istituto Superiore di Sanità. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2005. (Rapporti ISTISAN 05/42). p. 203-5.

EFFETTO DEL TRATTAMENTO ANTIPIRALIDE PER IL CONTENIMENTO DELLE MICOTOSSINE NELLA GRANELLA

Franco Cinti (a), Silvia Grandi (a), Fiorindo Gaspari (a), Viviana Babini (a), Mirco Casagranti (b),
Giovanna Del Pupo (b), Silvia Felloni (b)

(a) Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna, Bologna

(b) AgriOK SpA, Bologna

Introduzione

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 (Pietri, 1998; Piva *et al.*, 1998; Piva & Pietri, 2001). Il controllo della piralide può quindi contribuire a ridurre la presenza di questi contaminanti nelle derrate (Fennel *et al.*, 1978; Rodriguez *et al.*, 1984; Mc Millian *et al.*, 1987; Gorman & Kang, 1991). In una precedente comunicazione (Cinti *et al.*, 2005) si è constatata la notevole efficacia di un insetticida (λ -cialotrina; prodotto commerciale Karate) nel contenere l'attacco della piralide alle spighe di mais, cui ha corrisposto un forte abbattimento del tenore in ocratossina A, ma una modesta riduzione del contenuto di aflatossina B₁.

Lo scopo della ricerca è stato quello di valutare l'efficacia di diverse modalità di trattamento antipiralide ai fini della riduzione del grado di contaminazione della granella di mais con aflatossine (B₁, B₂, G₁, G₂) e fumonisine (B₁, B₂).

Materiali e metodi

Le osservazioni hanno riguardato mais da granella coltivato secondo il protocollo AgriOK che prevede dove possibile l'esclusione del ristoppio, l'utilizzazione di ibridi a ciclo medio, raccolte non troppo ritardate e l'applicazione complessiva di "buone norme agronomiche".

Nell'annata agraria 2004-2005 sono stati condotti 16 esperimenti: 1 in provincia di Ravenna, 2 in quella di Ferrara, 9 di Bologna, 1 di Modena, 1 di Mantova, 1 di Bergamo e 1 di Cremona.

In ciascuna prova sono stati effettuati trattamenti, diversificati per prodotti utilizzati, epoche e numero di interventi, per l'elenco dei quali si rimanda alla Tabella 1.

Alla raccolta (estate 2005) sono stati prelevati campioni di granella di 10-30 kg composti ognuno da numerosi campioni elementari di 100-300 grammi. Ogni campione globale, dopo un'accurata miscelazione, è stato suddiviso in 3 campioni per il laboratorio sui quali si sono effettuate le analisi mediante purificazione degli estratti con colonnine ad immunoaffinità, derivatizzazione post colonna e HPLC/FLD (*High Performance Liquid Chromatography / Fluorescence Detector*) per le aflatossine B₁, B₂, G₁, G₂; derivatizzazione pre colonna e HPLC/FLD per le fumonisine B₁, B₂.

Tabella 1. Tesi a confronto nelle diverse località

Località		Tesi				
RA-1	NT	P2	P2+R1	P2+R1	P2	+R1
FE-1	NT	P2+R1				
FE-2	NT	P4	F4			
RO-1	NT	P4	F4			
BO-1	NT	P2+R1	P3	P6		
BO-2	NT	P5	F4	O1		
BO-3	NT	P3	O1			
BO-4	NT	P1	P6			
BO-5	NT	P3				
BO-6	NT	P2	P2+F1			
BO-7	NT	P2+R2	F3	P2+F5	O1	
BO-8		P4	F3	O1+F1		
BO-9		P1	P3			
MO-1	NT	P1	P6			
MO-1	NT	P6				
MO-1	NT	P6	F4			
MO-1	NT	P2+R1				
CR-1	NT	P4				
MN-1	NT	P2+R1				
BG-1	NT	P2	P2+R1			

NT: nessun trattamento

Tipo di insetticida

P Piretroidi
R Regolatori di crescita
F Fosfororganici
O Oxidiazine

Epoca trattamento

A	pre-deposizione uova
B	deposizione uova
C	nascita larve

Trattamento insetticida	Prodotto commerciale	Principio attivo	Dosi utilizzate in 600 L/ha	Epoche
P1	RUFAS E-FLO	Acinatrina 75 g/L	0,6 L	B
P2	CONTEST	Alfamestrina 14,5%	0,3 kg	A
P3	BRIGATA FLO	Bifentrin 20 g/L	1 L	B
P4	DECIS JET	Deltametrina 15 g/L	0,8 L	B e C
P5	KESHET EC	Deltametrina 25 g/L	0,5 L	B
P6	KARATE ZEON	Lambda-Cialotrina 100 g/L	0,2 L	B
R1	NOMOLT	Teflubenzuron 150 g/L	0,5 L	A
R2	CRESIT	Teflubenzuron 150 g/L	0,3-0,5 L	A
F1	DURSBAN 75 WG	Clorpirifos 75%	1 kg	C
F2	PYRINEX ME	Clorpirifos 250 g/L	1,5 L	C
F3	PYRINEX QUIK	Clorpirifos 250 g/L + Deltametrina 6 g/L	1,3	B
F4	NURELLE D	Clorpirifos 500 g/L + Cipermetrina 50 g/L	1 L	C
F5	RELDAN 22	Clorpirifos-metile 223 g/L	2 L	C
O1	STEWART	Indoxcarb 30%	125 g	B

Risultati e discussione

Per quanto riguarda le aflatossine l'unica ad essere talora presente in modo significativo è la B₁. In 11 esperimenti su 15, tuttavia anche l'aflatossina B₁ è risultata non determinabile o presente in tracce, non consentendo il confronto tra i vari trattamenti (Tabella 2).

Tabella 2. Contenuti di aflatossine e fumonisine in parcelle di mais ottenute da colture trattate con insetticidi

Località	Tesi	Aflatossine µg kg ⁻¹ sul secco ppb				Fumonisine mg kg ⁻¹ sul secco ppm	
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	B ₁	B ₂
RA-1	NT	nd	nd	nd	nd	-	-
RA-1	NT	tr	nd	nd	nd	-	-
RA-1	NT	tr	nd	nd	nd	-	-
RA-1	NT	nd	nd	nd	nd	-	-
RA-1	P2 (B)	nd	nd	nd	nd	-	-
RA-1	P2 (B)	nd	nd	nd	nd	-	-
RA-1	P2 (B)	tr	tr	nd	nd	-	-
RA-1	P2 (B)	nd	nd	nd	nd	-	-
RA-1	P2+R1 (A)	nd	nd	nd	nd	-	-
RA-1	P2+R1 (A)	nd	nd	nd	nd	-	-
RA-1	P2+R1 (A)	nd	nd	nd	nd	-	-
RA-1	P2+R1 (A)	nd	nd	nd	nd	-	-
RA-1	P2+R1 (B)	nd	nd	nd	nd	-	-
RA-1	P2+R1 (B)	nd	nd	nd	nd	-	-
RA-1	P2+R1 (B)	nd	nd	nd	nd	-	-
RA-1	P2+R1 (B)	16,23	1,01	tr	nd	-	-
RA-1	P2+R1 (A+B)	nd	nd	nd	nd	-	-
RA-1	P2+R1 (A+B)	nd	nd	nd	nd	-	-
RA-1	P2+R1 (A+B)	nd	nd	nd	nd	-	-
RA-1	P2+R1 (A+B)	nd	nd	nd	nd	-	-
FE-1	NT	37,74	1,75	0,78	0,08	2,12	2,08
FE-1	NT	89,72	6,28	1,89	0,23	2,71	2,65
FE-1	P2+R1	22,44	1,23	2,27	0,11	2,47	2,47
FE-1	P2+R1	63,24	3,76	2,68	0,22	2,83	2,15
FE-2	NT	71,24	4,14	0,78	0,12	2,69	2,65
FE-2	P4	19,27	1,27	1,99	0,20	3,00	3,24
FE-2	F4	28,06	1,93	8,79	1,06	2,85	3,46
BO-1	NT	1,86	0,12	0,51	0,08	3,15	1,27
BO-1	P2+R1	8,18	0,34	0,57	tr	3,86	1,63
BO-1	P3	1,96	0,19	0,52	0,01	2,72	0,98
BO-1	P6	0,24	tr	tr	tr	1,34	0,54
BO-2	NT	1,43	0,19	0,47	0,09	4,90	2,09
BO-2	P5	nd	nd	nd	nd	4,51	2,69
BO-2	F4	nd	nd	nd	nd	3,45	3,54
BO-2	O1	tr	nd	tr	nd	3,55	2,73
BO-3	NT	0,65	0,14	0,59	0,11	3,06	3,01
BO-3	P3	tr	nd	tr	nd	3,05	2,40
BO-3	O1	0,35	0,07	tr	nd	3,06	3,09

segue

continua

Località	Tesi	Aflatossine µg kg ⁻¹ sul secco ppb				Fumonisine mg kg ⁻¹ sul secco ppm	
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	B ₁	B ₂
BO-4	NT	nd	nd	nd	nd	4,21	2,45
BO-4	P1	nd	nd	nd	nd	4,09	2,94
BO-4	P6	nd	nd	nd	nd	1,99	1,10
BO-5	NT	tr	nd	nd	nd	3,58	1,43
BO-5	P3	0,53	tr	tr	nd	2,44	1,09
BO-6	NT	tr	nd	nd	nd	3,38	2,94
BO-6	P2	nd	nd	nd	nd	3,83	1,70
BO-6	P2+F1	nd	nd	nd	nd	4,01	2,13
BO-7	NT	0,90	0,09	nd	nd	2,78	3,02
BO-7	P2+R2	tr	nd	nd	nd	4,27	2,34
BO-7	F3	tr	nd	nd	nd	2,84	3,09
BO-7	P2+F5	0,27	tr	nd	nd	4,02	2,47
BO-7	O1	nd	nd	nd	nd	4,22	2,96
BO-8	P4	nd	nd	nd	nd	3,87	3,21
BO-8	F2	5,90	0,29	1,42	0,08	3,24	3,13
BO-8	F1+O1	nd	nd	nd	nd	2,85	2,95
BO-9	P1	11,02	0,68	nd	nd	1,74	1,88
BO-9	P3	14,34	0,82	nd	nd	2,66	2,50
MO-1	NT	0,79	0,10	nd	nd	3,70	3,06
MO-1	P1	0,60	0,08	nd	nd	3,38	2,35
MO-1	P6	3,39	tr	nd	nd	2,52	2,23
MO-1	NT	1,77	tr	nd	nd	3,36	2,45
MO-1	P6	1,62	0,22	0,56	0,08	2,72	2,03
MO-1	NT	1,38	tr	tr	nd	4,28	1,38
MO-1	P6	tr	tr	tr	nd	2,95	1,15
MO-1	F4	13,75	0,62	tr	nd	2,97	1,84
MO-1	NT	tr	nd	nd	nd	2,31	1,49
MO-1	P2+R1	nd	nd	nd	nd	2,99	2,25
CR-1	NT	tr	nd	nd	nd	2,11	2,33
CR-1	P4	nd	nd	nd	nd	1,92	2,18
MN-1	NT	0,29	tr	nd	nd	3,36	3,80
MN-1	P2+R1	nd	nd	nd	nd	2,89	2,68
BG-1	NT	nd	nd	nd	nd	1,40	0,89
BG-1	P2	nd	nd	nd	nd	0,36	0,14
BG-1	P2+R1	nd	nd	nd	nd	0,28	0,12

(*) Le medie sono state calcolate utilizzando LOD/2 per i risultati inferiori a LOD (LOD= *Limit Of Detection*) e LOQ/2 per i risultati compresi tra LOQ e LOD (LOQ=*Limit Of Quantification*)

Nelle due prove condotte nel ferrarese, in presenza di alti valori di contaminazione il trattamento antipiralide ha determinato il netto calo del tenore di aflatossina B₁, passato nella prova 1 da 63,73 ppb del testimone a 42,84 ppb del trattato (-33%), e nella prova 2 da 71,24 ppb a 23,66 ppb per la media dei due trattati (-67%).

Nelle prove di Bologna 1 e Modena 1, si sono invece registrati valori di contaminazione relativamente bassi (in media rispettivamente 3,06 e 2,33 ppb) con andamenti discordanti che non consentono di evidenziare il beneficio del trattamento antipiralide.

Il contenuto di fumonisine in generale è risultato compreso tra 1 e 4 ppm, con leggere variazioni non imputabili ai trattamenti e perciò nettamente inferiore ai limiti accettabili per derrate destinate all'alimentazione zootecnica.

Conclusioni

Il trattamento con prodotti antipiralide è risultato efficace per il contenimento della contaminazione con aflatoxina B₁ solo nel caso di forte attacco fungino, senza tuttavia dimostrarsi risolutivo.

Bibliografia

- Cinti F, Grandi S, Casagrandi M. Effetto del trattamento antipiralide sulla presenza di tossine in granello di mais. In: Miraglia M, Brera C (Ed.). *Atti del 1° Congresso nazionale "Le micotossine nella filiera agro-alimentare"*, 29-30 novembre 2004, Istituto Superiore di Sanità. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2005. (Rapporti ISTISAN 05/42). p. 100-2.
- Fennell DI, Lillehoj EB, Kwolek WF, Guthrie WD, Sheeley R, Sparks AN, Widstrom NW, Adams GL. Insect larval activity on developing corn ears and subsequent aflatoxin contamination of seed. *Journal of Economic Entomology* 1978;71(4):624-8.
- Gorman DP, Kang MS. Preharvest aflatoxin contamination in maize: resistance and genetics. *Plant Breeding* 1991;107(1):1-10.
- McMillian WW, Widstrom NW, Wilson DM. Impact of husk type and species of infesting insects on aflatoxin contamination in preharvest corn at Tifton, Georgia. *Journal of Entomological Science* 1987;22(4):307-10.
- Pietri A. Micotossine la situazione odierna in Italia. *Rivista di avicoltura* 1998;1/2:32-8.
- Piva G, Pietri A. Le micotossine: origine, diffusione e rischi per il consumatore. *Atti della Società Italiana di Buiatria* 2001;33:403-11.
- Piva G, Pietri A, Masoero F, Moschini M. Micotossine e allevamento bovino. *Atti della Società Italiana di Buiatria* 1998;30:9-42.
- Rodriguez JG, Patterson CG, Potts MF, Poneleit CG, Beine RL. Role of selected corn insects and plant stress in aflatoxin production in Kentucky corn. *Transactions of the Kentucky Academy of Science* 1984;45(3-4):138-43.

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 di Messina,
Messina

Introduzione

Fra le micotossine, l'ocratossina A, riscontrata frequentemente in alimenti sia di origine vegetale che animale, sta ricevendo una grande attenzione mondiale a causa delle sue proprietà nefrotossiche, teratogeniche, mutageniche, genotossiche, e immunosoppressive manifestate sugli animali e per le sue possibili ripercussioni patogenetiche anche sull'uomo (1, 2). La tossina infatti è stata classificata dall'IARC (*International Agency for Research on Cancer*) nel gruppo 2B, dove vengono collocate le sostanze potenzialmente cancerogene per l'uomo e gli animali, ed è sospettata di essere l'agente eziologico di una malattia cronica terminale conosciuta come Nefropatia Endemica Balcanica (3-5) patologia particolarmente diffusa nelle popolazioni rurali in limitate aree della penisola balcanica.

L'ocratossina A è prodotta solo da un ridotto numero di specie appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Petromyces*, *Neopetromyces*, e *Penicillium* (6). Originariamente descritta come metabolita di *Aspergillus alutaceus* (già noto come *Aspergillus ochraceus*), è stata successivamente identificata come prodotto secondario anche di *Penicillium verrucosum*, specie fungina molto diffusa in cereali e derivati del nord Europa e del Canada. In seguito furono individuati come produttori di ocratossina A, miceti appartenenti al genere *Aspergillus* sezione Nigri come *Aspergillus niger* "aggregate" e *Aspergillus carbonarius* (7, 8).

Penicillium verrucosum e *A. ochraceus* sono i produttori principali di ocratossina A; il primo è considerato responsabile della produzione della micotossina negli alimenti prodotti nei climi temperati del pianeta, il secondo negli alimenti prodotti in aree geografiche a clima caldo umido. Gli aspergilli appartenenti ad *A. niger* "aggregate" e ad *A. carbonarius* sono stati indicati come probabili responsabili della produzione di ocratossina A nell'uve e nei suoi derivati prodotti in regioni calde e tropicali del pianeta (9-12). Ipotesi supportata dal frequente isolamento, post-raccolta, di questi miceti dagli acini dell'uva (13). È stato anche osservato che, mentre la percentuale di *A. niger* "aggregate" che producono la micotossina è bassa e variabile con una incidenza che va dal 1,7% (14) al 18,5% (11) al 46% (15) a seconda del numero di ceppi isolati e dal metodo usato per l'identificazione della micotossina, gran parte dei ceppi di *A. carbonarius* sono stati riportati come produttori di ocratossina A tanto che essi risultano essere, in ordine di importanza, la terza specie fungina produttrice della tossina.

La presenza di ocratossina A, nei vini, è stata riportata per la prima volta da Zimmerli e Dick (9) in Svizzera in vini in vendita al dettaglio. Successivamente la micotossina è stata rilevata nei vini prodotti in Francia (16, 17), in Grecia (18), in Portogallo (19-21) in Spagna (13, 22), in Sud Africa (23), in Australia (24), in Argentina e in Brasile (25) ed è stata anche rilevata in mosti e vini prodotti in varie regioni italiane (26-28). È stato ipotizzato che un ruolo importante nella diffusione di ocratossina A in regioni a clima caldo-temperato e tropicali fosse dovuta alla contaminazione delle uve da parte di ceppi di *Aspergillus* spp. poiché le condizioni climatiche di queste regioni favoriscono la loro crescita rispetto a quella dei *Penicillium* spp. che invece tendono a predominare nelle regioni più fredde. Da allora numerosi studi sono stati effettuati in molte parti del mondo per studiare il ruolo che le varie specie fungine possono rivestire nella diffusione di

ocratossina A nei vini. Abbiamo pertanto ritenuto importante indagare sull'origine della contaminazione da ocratossine nei vini italiani esaminando dal punto di vista micologico campioni di uve destinate alla vinificazione provenienti da alcune regioni italiane, la cui lavorazione in alcuni casi aveva comportato la contaminazione del prodotto finito da ocratossina A, e studiando dal punto di vista micotossicologico i ceppi isolati che potessero rappresentare i potenziali produttori della micotossina.

Materiali e metodi

Campioni

Sono stati esaminati 12 campioni di uve destinate alla vinificazione provenienti da tre diverse regioni italiane: Toscana (1-4), Campania (5-8) e Sicilia (9-12), vendemmia 2000. Tutti i campioni esaminati avevano subito trattamenti anticrittogamici secondo le indicazioni suggerite per la vinificazione. Alcuni di essi provenivano da uve nella cui vinificazione sono stati rilevati quantità variabili di ocratossina A (Tabella 1).

Tabella 1. Trattamento e livelli di contaminazione di OTA riscontrati nel prodotto finito

Campione	Colore dell'uva	Trattamento anticrittogamico	OTA ($\mu\text{g/L}$) nei vini
1	Rossa	Zolfo 80 PB + Quinoxifen 250SC	0,22
2	Rossa	Zolfo 80 PB + Fenarimol 12SC	0,11
3	Rossa	Zolfo 80 PB + Fenarimol 12SC	0,11
4	Rossa	Zolfo 80 PB + Azoxystrobin 250SC	0,07
5	Bianca	Zolfo 80 PB + Quinoxifen 250SC	ND
6	Bianca	Zolfo 80 PB + Fenarimol 12SC	ND
7	Bianca	Zolfo 80 PB + Fenarimol 12SC	ND
8	Bianca	Zolfo 80 PB + Azoxystrobin 250SC	ND
9	Bianca	Zolfo 80 PB + Quinoxifen 250SC	ND
10	Bianca	Zolfo 80 PB + Fenarimol 12SC	0,02
11	Bianca	Zolfo 80 PB + Fenarimol 12SC	0,02
12	Bianca	Zolfo 80 PB + Azoxystrobin 250SC	0,01

ND=Non Determinata. PB= Polvere Bagnabile, SC= Sospensioni Concentrate.

Esame micologico e identificazione dei funghi filamentosi

I campioni sono stati esaminati ponendo 25 g di ognuno in 225 mL di soluzione fisiologica peptonata allo 0,1% e, dopo omogeneizzazione in Stomacher (mod. Lab Blender 400) per 1 minuto, opportunamente diluiti e inoculati su terreno colturale DRBC agar (Oxoid CM 727 B). Le piastre Petri sono state incubate a $25\pm 1^\circ\text{C}$ per 5-7 giorni per determinare la carica micetica totale. I ceppi più rappresentativi sono stati isolati in terreni culturali Potato Dextrose Agar (Oxoid CM 139 B), Czapek-Dox Agar (Oxoid CM 097 B) e Malt Extract Agar (Oxoid CM 059 B) e identificati mediante chiavi tassonomiche ufficiali (29, 30).

Identificazione dei ceppi produttori di ocratossine

I ceppi potenzialmente produttori di ocratossine, *A. niger* "aggregate" (367 ceppi), *Penicillium* spp. (230 ceppi) e *Aspergillus carbonarius* (3 ceppi) sono stati inoculati in PDA e incubati a 25°C fino ad abbondante sporulazione (7-10 giorni). Successivamente, ogni ceppo è

stato seminato su Yeast Extract Sucrose agar (YES-Agar) (estratto di lievito 20 g; saccarosio 150 g; agar 20 g; acqua 1000 mL; pH 6.5) addizionato a 0,5 g/L solfato di magnesio, e incubato a $25\pm 1^\circ\text{C}$ ed esaminati per la produzione di ocratossina A dopo 7 e 14 giorni.

Come controlli positivi per la produzione di ocratossina A sono stati utilizzati quattro ceppi: *Aspergillus ochraceus* MAM 112, proveniente dalla collezione dal Dipartimento di Scienze Microbiologiche Genetiche e Molecolari dell'Università di Messina. *Aspergillus carbonarius* NRRL 369, inviateci gentilmente dal Prof. Wicklow del Dipartimento di Agricoltura della University Street, Peoria, USA. *Aspergillus niger* CECT 20156 e *Penicillium verrucosum* CECT 2906 proveniente dalla collezione spagnola (Colección Española de Cultivos Tipo).

Messa in evidenza della produzione dell'ocratossina A

Cromatografia su strato sottile

È stato utilizzato il metodo proposto da Filtenborg *et al.* (31), che prevede la coltivazione dei ceppi in terreno colturale YES-Agar per 7-14 giorni a 25°C , l'estrazione della micotossina con una miscela CHCl_3 -MeOH (2:1) da tappi di agar (\varnothing 0,4 cm), corsa cromatografia su lastre TLC (*Thin Layer Chromatography*) con una miscela eluente Toluene/Etile acetato/Acido Formico (TEAF) (5:4:1), e messa in evidenza contro standard (Makor chemicals LTD Jerusalem) mediante UV a 366 nm e 254 nm prima e dopo trattamento con una soluzione idroalcolica di NaHCO_3 al 5%.

CD-ELISA

61 ceppi di *A. niger* "aggregate" e 22 ceppi di *Penicillium spp.* scelti in maniera random, e i 3 ceppi di *Aspergillus carbonarius* sono stati saggiati per la capacità di produrre *in vitro* la micotossina mediante, metodica immunoenzimatica competitiva CD-ELISA (*Competitive Direct - Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) (Veratox, Neogen Corporation, USA/Canada). Ciascun ceppo cresciuto su PDA (*Potato Dextrose Agar*) a 25°C fino ad abbondante sporulazione, è stato inoculato su YES-Agar e incubato a $25\pm 1^\circ\text{C}$ per 7 gg ed esaminato per la produzione di ocratossina A dopo estrazione in metanolo/ H_2O (1:1) a temperatura ambiente per 2 h in agitatore orbitale a 120 rpm (Edmund Bulhler KS-15) e successivo stazionamento a 37°C per 30 minuti. Il campione filtrato su carta Whatman n. 1 è stato saggiato secondo le indicazioni riportate dalla casa produttrice.

Risultati

Tutti i campioni esaminati presentavano una microflora pressoché simile dal punto di vista qualitativo. Alcune differenze sono state rilevate nelle cariche fungine il cui range era compreso tra $3,60 \times 10^3$ nel campione 7 e $1,65 \times 10^5$ nel campione 12. In tutti i campioni infatti era presente una microflora lievitiiforme; e tra gli ifomiceti, la specie maggiormente rappresentata è stata *Aspergillus niger* "aggregate", seguita da *Penicillium spp.*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* e *Rhizopus sp.* Soltanto 3 ceppi di *Aspergillus carbonarius* sono stati riscontrati provenienti da tre differenti campioni (Tabella 2).

Per quanto concerne la produzione di ocratossina A, rilevata mediante metodica cromatografia (TLC), soltanto i tre ceppi di *Aspergillus carbonarius* sono risultati positivi mentre tutti i ceppi di *Aspergillus niger* "aggregate" e *Penicillium spp.* hanno dato esito negativo.

Il livello di micotossina prodotta dai ceppi di *Aspergillus niger* "aggregate" era compresa tra 2 e 5 ppb (95,4% dei ceppi) e tra 10 e 15 ppb (4,6%) mentre la quantità prodotta dai tre ceppi di *A. carbonarius* è risultata maggiore di 25 ppb.

Tabella 2. Carica micetica in unita formanti colonie (UFC/g) per campione

Campione	Carica	Lieviti	A. n	A. c	P. spp	C. h	B. c	A. a	R. sp
1	4,00x10 ⁴	++	++++ (35)	-	++++(25)	++	+	+	+
2	3,45x10 ⁴	+	++++ (30)	-	+++ (15)	++	+	++	+
3	3,55x10 ⁴	++	++++ (31)	-	+++ (16)	++	+	++	+
4	3,05x10 ⁴	+	++++ (32)	-	+++ (15)	++	+	+	+
5	1,65 x10 ⁴	+	++++ (25)	-	+++ (19)	+	-	+	-
6	1,90 x10 ⁴	++	++++ (20)	+(1*)	+++ (17)	+	-	+	-
7	3,60 x10 ³	++	++++ (32)	+(1*)	+++ (13)	++	+	+	+
8	4,65 x10 ³	+++	++++ (32)	-	+++ (15)	+++	+	++	+
9	4,80 x10 ⁴	+++	++++ (36)	+(1*)	+++ (20)	++	+	++	+
10	5,35 x10 ⁴	++++	++++ (30)	-	++++(22)	++++	+	+	+
11	5,35 x10 ⁴	++++	++++ (35)	-	++++(25)	+++	-	++	-
12	1,65 x10 ⁵	++	++++ (29)	-	+++ (18)	+	+	+	-
numero totale dei ceppi considerati			(367)	(3*)	(230)				

- = (non presente); + (presente occasionalmente); ++ (scarsamente presente); +++ (frequente); ++++ (molto frequente); () tra parentesi il n° di ceppi esaminati. *Ceppi positivi per la produzione di OTA dopo coltivazione su YES-Agar, estrazione e messa in evidenza mediante TLC. A. n = *A. niger*; A. c = *A. carbonarius*; P. spp = *Penicillium spp*; C. h = *Cladosporium herbarum*; B. c = *Botrytis cinerea*; A. a = *Alternaria alternata*; R. spp = *Rhizopus spp*.

Tabella 3. Numero ceppi considerati per campione e saggiati per CD-ELISA/numero ceppi risultati produttori di OTA

Campione	<i>A. niger</i> "aggregate"	<i>A. carbonarius</i>	<i>Penicillium spp.</i>
1	7(4)	0(0)	3(0)
2	5(4)	0(0)	2(0)
3	5(2)	0(0)	3(0)
4	5(5)	0(0)	2(0)
5	3(1)	0(0)	1(0)
6	4(4)	1(1)	1(0)
7	5(3)	1(1)	1(0)
8	5(4)	0(0)	1(0)
9	7(4)	1(1)	2(0)
10	5(4)	0(0)	3(0)
11	7(5)	0(0)	2(0)
12	3(3)	0(0)	1(0)
Totale ceppi	61(43)	3(3)	22(0)

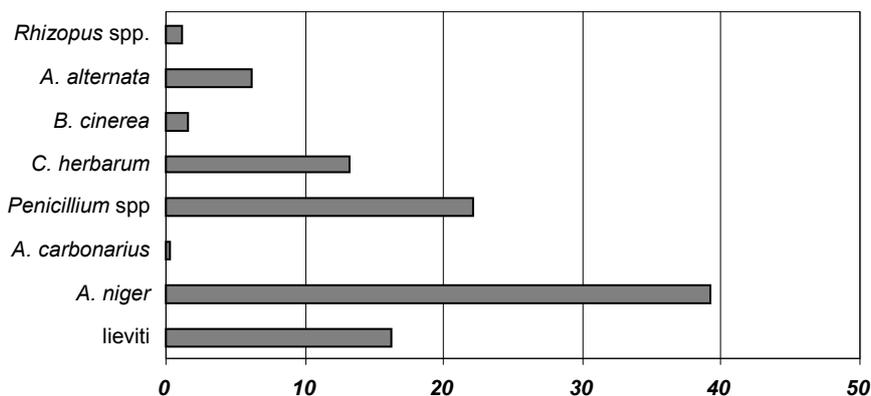


Figura 1. Incidenza dei miceti nei 12 campioni di uve

Discussioni e conclusioni

I dati da Noi ottenuti, in questo studio, hanno evidenziato una uniforme distribuzione di funghi filamentosi e di lieviti in tutti i campioni esaminati. La microflora era rappresentata da miceti che contaminano normalmente le uve e i prodotti derivati in varie parti del mondo. È stata comunque rilevata una biodiversità fungina più limitata rispetto a dati riportati da altri Autori in altre regioni (17, 20, 27). Questo dato oltre che per i già citati trattamenti anticrittogamici potrebbe essere attribuito anche al lungo periodo di conservazione mediante congelamento dei campioni, prima dell'esame micologico. Anche dal punto di vista quantitativo i valori di carica micetica espressi in UFC/g hanno evidenziato che questi rientrano tra i valori normalmente rilevati nelle uve destinate alla vinificazione anzi in alcune occasioni risultano essere più bassi rispetto a quelli riportati in altri lavori (25).

Tra i funghi filamentosi potenzialmente ocratossigenici nei nostri campioni non è stata mai riscontrata una contaminazione degli acini da parte dei due principali produttori di ocratossina A (*A. ochraceus* e *P. verrucosum*) confermando i risultati ottenuti in precedenza da altri ricercatori che si sono occupati della problematica in altre aree geografiche (13, 16, 17, 20, 27, 28).

I nostri dati sul ruolo dei Penicilli indicano, che nessuno dei ceppi di *Penicillium* spp. isolati dai campioni di uve, ed esaminati sia con la metodica cromatografia TLC che con la metodica immunoenzimatica competitiva (CD-ELISA), è risultato produttore della micotossina.

Il ruolo dei Penicilli rispetto alla produzione di ocratossina nelle uve non risulta molto chiaro poiché, anche se in vari casi viene ipotizzata la produzione di tossina a carico di questo genere, in nessun caso i vari AA che si sono occupati della problematica, hanno indicato la specie responsabile. D'altro canto sebbene siano state riportate varie specie di Penicilli produttori di ocratossine (*P. purpurescens*, *P. implicatum*, *P. montanense*, *P. sclerotiorum*, *P. glabrum*, *P. variabile*, *P. purpurogenum*, *P. canescens*, *P. expansum* e *P. nordicum*), fino ad oggi soltanto *Penicillium verrucosum* ha dato prova di sicura affidabilità come produttore della micotossina.

Gli unici miceti produttori di ocratossina A nelle uve esaminate sono risultati appartenere ad *Aspergillus niger* "group": *A. niger* "aggregate" e *A. carbonarius* in accordo con i dati sperimentali ottenuti da aree geografiche a clima caldo-temperato. Questi miceti infatti, dopo la dimostrazione da parte di alcuni Autori della capacità di produrre ocratossine *in vitro* (7, 8), sono stati indicati come i principali miceti produttori di ocratossina A nei mosti e nei vini.

I nostri risultati evidenziano anche, che la metodica cromatografica utilizzata in questo esperimento non è sufficientemente sensibile per rilevare la produzione *in vitro* di ocratossina A da parte dei ceppi *A. niger* "aggregate" potenzialmente produttori isolati dalle uve. Ciò è possibile imputarlo con molta probabilità alla capacità ridotta dei ceppi di questo gruppo a produrre la tossina nelle condizioni sperimentali utilizzate e alla scarsa quantità di campione che è possibile esaminare con questa metodica. Infatti, gli stessi ceppi saggiati mediante metodica immunoenzimatica competitiva (CD-ELISA) hanno fornito dati nettamente differenti con risultati positivi del 70,5% nei ceppi saggiati. D'altro canto risultati paragonabili, o addirittura migliori, potrebbero essere ottenuti con tecniche quantitative ancora più sensibili come la HPLC, metodica ampiamente utilizzata per il rilevamento dell'ocratossina.

A differenza di quanto riportato in altre occasioni sia in Italia che in varie altre parti del mondo (13, 16, 17, 27, 28) la presenza di *Aspergillus carbonarius* nei nostri campioni positivi è da considerarsi occasionale. Infatti è stato riportato che la maggior parte dei funghi produttori di ocratossina A isolati dalle uve di 16 vigneti distribuiti sul territorio nazionale appartiene al genere *Aspergillus* (88%) e di questi la specie predominante è stata *A. carbonarius* (31% circa) (27), inoltre Cabañes *et al.* (13) in Spagna e Sage *et al.* (16, 17) in Francia, hanno isolato dalle uve destinate alla vinificazione ceppi di *Aspergillus carbonarius*; rispettivamente 18 ceppi (tutti produttori di ocratossina A) e 15 ceppi (14 produttori).

È da rilevare che nel nostro caso, la scarsa presenza dei ceppi *A. carbonarius*, non sembra poter giustificare da sola la contaminazione nei vini da ocratossina A. D'altro canto i nostri dati evidenziano la grande diffusione delle specie appartenenti ad *Aspergillus niger* "aggregate", che nei campioni esaminati ha rappresentato il micete maggiormente presente in assoluto. Pertanto alla luce dei risultati ottenuti, è evidente che nel nostro caso un ruolo rilevante è rivestito dalle specie *A. niger* "aggregate", che anche se più scarsi produttori della micotossina sono invece molto più diffusi di *A. carbonarius*. È possibile infatti ipotizzare che il numero elevato di ceppi appartenenti a queste specie, pur essendo responsabili della produzione di piccole quantità o addirittura di "microquantità" della micotossina possano comunque contribuire efficacemente al raggiungimento di quantità di ocratossina A rilevabili nei prodotti finiti quindi anche nei mosti e nei vini.

Bibliografia

1. Kuiper Goodman T, Scott PM. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A: an update. *Food Add Contam* 1996;13:53-7.
2. Bayman P, Baker JL. Ochratoxins: a global perspective. *Mycopathologia* 2006;162(3):215-23.
3. Castegnaro M, Wild C. IARC actives in mycotoxin research. *Natural Toxins* 1995;3:327-31.
4. Pitt JI, Basilico JC, Abarca ML, Lopez C. Mycotoxin and toxigenic fungi. *Medical Micology* 2000;38(1):41-6.
5. Abouzied MM, Horvath AD, Podlesny PM, Regina NP, Metodiev VD, Kamenova-Tozeva RM, Nigalova ND, Stein AD, Petropoulos EA, Gonev VS. Ochratoxin A concentrations in food and feed from a region Balkan Endemic Nephropathy. *Food Addit Contam* 2002;19:755-64.
6. Frisvad JC, Samson RA. Neopetromyces gen. nov. and an overview of teleomorphs of *Aspergillus* subgenus Circumdati. *Stud Mycol (Baarn)* 2000;45:201-7.
7. Abarca ML, Bragulat MR, Castellà G, Cabañes FJ. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 1994;60(7):2650-2.
8. Horie Y. Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section Nigri. *Nippon Kingakukai Kaiho* 1995;36:73-6.
9. Zimmerli B, Dick R. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food Addit. Contam* 1996;13:655-68.
10. Burdaspal PA, Legarda TM. Ochratoxin A in wines and grape product originating from Spain and other European countries. *Alimentaria* 1999;36:107-13.
11. Abarca ML, Accensi F, Bragulat MR, Cabañes FJ. Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. *Journal of Food Protection* 2001;64(6):903-06.
12. Battilani P, Pietri A. Ochratoxin A in grapes and wine. *European Journal Pathology* 2002;108:639-43.
13. Cabañes FJ, Acensi F, Bragulat MR, Abarca ML, Castellà G, Minguez S, Pons A. What is the source of ochratoxin A in wine? *International Journal of Microbiology* 2002;79:213-15.
14. Heenan CN, Shaw KJ, Pitt JI. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. *J. Food Mycol* 1998;1:67-72.
15. Dalcero A, Magnoli C, Hallak C, Chiacchiera SM, Palacio G, Rosa CA. Detection of ochratoxin A in animals feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section Nigri in Argentina. *Food Addit Contam* 2002;19(11):1065-72.

16. Sage L, Krivobok S, Delbos E, Seigle-Murandi F, Creppy EE. Fungal Flora and Ochratoxin A Production in Grapes and Must from France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002;50:1306-11.
17. Sage L, Garon D, Seigle-Murandi F. Fungal microflora and ochratoxin a risk in French vineyards. *J Agric Food Chem* 2004;52(18):5764-8.
18. Tjamos SE, Antoniou PP, Kazantzidou A, Antonopoulos DF, Papageorgiou I, Tjamos EC. *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* in Corinth Raisin and Wine-Producing Vineyards in Greece: Population Composition, Ochratoxin A Production and Chemical Control. *Journal of Phytopathology* 2004;152(4):250-55.
19. Abrunhosa L, Paterson RRM, Kozakiewicz Z, Lima N, Vanancio A. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology* 2001;32:240-2.
20. Serra R, Abrunhosa L, Kozakiewicz Z, Venancio A. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *Int J Food Microbiol* 2003;88(1):63-8.
21. Serra R, Braga A, Venancio A. Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. *Research in Microbiol* 2005;156(4):515-21.
22. Bau M, Bragulat MR, Abarca ML, Minguez S, Cabanes FJ. Ochratoxin a producing fungi from Spanish vineyards. *Adv Exp Med Biol* 2006;571:173-9.
23. Shephard GS, Fabiani A, Stockenstrom S, Mshicileli N, Sewram V. Quantitation of ochratoxin A in South African wines. *J Agric Food Chem* 2003;51(4):1102-6.
24. Leong SL, Hocking AD, Pitt JI, Kazi BA, Emmett RW, Scott ES. Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. *Int J Food Microbiol* 2006;111(1):S10-17.
25. Da Rocha R, Palacios V, Combina M, Fraga ME, De OR, Magnoli CE, Dalcero AM. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Addit Contam* 2002;19(4):408-14.
26. Pietri A, Bertuzzi T, Pallaroni L, Piva G. Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. *Food Additives and Contaminants* 2001;18(7):647-54.
27. Battilani P, Giorni P, Languasco L, Pietri A, Bertuzzi T. Fungal flora and ochratoxin A production in Italian grapes in 2001. Proceedings 9th SIPaV Annual Meeting, Rome (Italy) 2002. *Journal of Plant Pathology* 2002. p. 175.
28. Battilani P, Giorni P, Bertuzzi T, Formenti S, Pietri A Black aspergilli and ochratoxin A in grapes in Italy. *Int J Food Microbiol* 2006;111(1):S53-60.
29. Raper KB, Fennel DI. *The genus Aspergillus*. Baltimore: The Williams and Wilkins company; 1965.
30. Samson RA, van Reenen-Hoekstra ES. *Introduction to food-borne Fungi*. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures; 1988.
31. Filtenborg O, Frisvad JC, Svendsen JA. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Appl Environ Microbiol* 1983;45(2):581-5.

VALUTAZIONE 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
*Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Consiglio per la Ricerca e sperimentazione in Agricoltura,
Bergamo*

La costituzione di piante capaci di sottrarsi, in tutto o in parte, ai danni provocati da patogeni vegetali è un tradizionale obiettivo per i genetisti. La selezione elimina infatti i genotipi di mais particolarmente suscettibili agli attacchi dei patogeni fungini; tuttavia non è infrequente riscontrare negli ibridi attualmente coltivati di questo cereale gravi contaminazioni da diversi fitopatogeni (1).

I funghi *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, in particolare, sono responsabili dell'accumulo nel mais (*Zea mays* L.) di aflatoxine (AF), sostanze tossiche potenzialmente cancerogene (2-4). Tra le diverse molecole che appartengono alla famiglia delle aflatoxine la componente B₁ è quella presente in quantità più rilevanti; su tale componente è stato focalizzato l'interesse dei ricercatori per l'elevata tossicità acuta e cronica e per l'attività epatocancerogena che questa esplica possibilmente sugli animali, oltre che per i potenziali effetti sull'uomo (5).

In Italia particolare attenzione rispetto alla contaminazione di aflatoxine è stata posta alla fine della campagna maidicola 2003, annata con condizioni climatiche particolarmente favorevoli alla crescita di *A. flavus*. La granella di mais, utilizzata nelle razioni zootecniche, è risultata una delle cause principali della contaminazione del latte prodotto, in cui è stata segnalata una presenza inusuale di aflatoxina M₁ (AFM₁ milk toxin), metabolita escreto nel latte dei mammiferi che ingeriscono AFB₁ (6).

La resistenza all'infezione di *A. flavus* è influenzata dal genotipo, dalle pratiche agronomiche e dalle condizioni ambientali (7-9). La resistenza della pianta di mais ad aflatoxine è sotto controllo genetico ed è stata riscontrata un'ampia variabilità genotipica per tale carattere. Studi in quest'ambito hanno permesso di identificare e sviluppare fonti di resistenze genetiche in linee pure (Mp420, Mp313E, Mp715, Tex6, LB31, CI2) e popolazioni segreganti (GT-MAS:gk) (9). È stato inoltre riscontrato che le differenze genetiche dipendono da fattori ascrivibili prevalentemente ad effetti genetici additivi e dominanti; tali fattori sono utilizzabili in programmi di selezione volti a potenziare la tolleranza ad *Aspergillus* ssp. L'impiego di tali fonti di resistenza in programmi di miglioramento genetico è, peraltro, penalizzato dalle difficoltà di incorporare nelle varietà coltivate resistenze poligeniche provenienti da germoplasma esotico e dalla notevole variabilità di concentrazione che si riscontra generalmente, in prove sperimentali (10). Ulteriori ricerche hanno permesso di individuare regioni cromosomiche (1L, 2L, 4S) contenenti fattori di resistenza all'accumulo di aflatoxine e di identificare marcatori molecolari da impiegare in metodi di selezione assistita per il loro trasferimento in linee impiegate per la produzione di ibridi commerciali (11).

Sono stati, inoltre, identificati caratteri secondari utili a prevenire la colonizzazione del patogeno e pertanto l'accumulo di aflatoxine, quali la presenza di brattee avvolgenti e aderenti alla spiga; caratteristiche fisiche del pericarpo (spessore, presenza di cere) e resistenze e/o tolleranze della pianta ad elevate temperature e carenze idriche. In generale, gli ibridi dotati di brattee avvolgenti e aderenti alla spiga mostrano una maggior resistenza agli insetti e

* La Ricerca si è sviluppata nell'ambito del Progetto AFLARID

accumulano minor livelli di aflatoxine (12). È stato, altresì, mostrato che la resistenza ad aflatoxine risulta, in alcuni casi, associata da uno o più composti presenti nel seme, quali acido α -linoleico, β -tocoferolo, inibitori delle tripsine, aldeidi, chitinasi, zeamatine, proteine che inattivano i ribosomi, antocianine, fenoli, β -carotene, che impediscono la crescita del fungo o la produzione di aflatoxine, riassunto in (5). In quest'ambito, Brown *et al.* (13) hanno descritto il ruolo positivo di un inibitore specifico della tripsina; gli autori citati sostengono che questo inibitore possa essere coinvolto nella resistenza riscontrata in molte delle fonti di germoplasma tolleranti alla colonizzazione da *Aspergillus*. È prevedibile che l'identificazione di fonti di resistenza, avvalendosi di saggi di laboratorio e dell'associazione delle resistenze stesse con specifici composti prodotti da vie biosintetiche attive nei semi, consentirà di elaborare strategie atte a contrastare lo sviluppo di aflatoxine e ad accelerare i programmi di selezione per lo sviluppo di piante tolleranti all'attacco di *Aspergillus*.

Più in dettaglio, le ricerche attuali sono state orientate ad incorporare nelle piante di mais resistenze genetiche tramite i) l'aggiunta e il potenziamento di geni che influenzano l'espressione di composti che bloccano la sintesi di aflatoxine e lo sviluppo del fungo, ii) la riduzione della produzione di aflatoxine nel fungo con strategie mirate a disattivare la funzione di geni che pilotano la sintesi delle aflatoxine stesse (5). La presente ricerca è indirizzata a ridurre l'accumulo di aflatoxine nella granella di mais mediante l'impiego e la selezione di genotipi resistenti all'attacco da *Aspergillus* ssp. Ciò consentirà la coltivazione del mais impiegando tecniche agronomiche più rispettose dell'ambiente ed eco-compatibili evitando interventi con sostanze chimiche e insetticidi, e l'impiego di costosi metodi di detossificazione e/o decontaminazione.

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 presente ricerca condotta nel 2005, mira a valutare e confrontare 34 ibridi commerciali di mais (appartenenti alle classi FAO 300-400-500-600-700) per la resistenza ad *A. flavus* e per l'accumulo di aflatoxine.

Il materiale sperimentale è stato allevato adottando uno schema a blocchi randomizzati a parcelle suddivise, replicati in due epoche di semina. Le parcelle elementari erano costituite da 4 file lunghe 4 m, spaziate 0,75 m contenente 15 piante per fila; all'interno di ciascuna parcella sono state condotte impollinazioni controllate (SIB). Per ciascuna parcella elementare si è proceduto ad inoculo artificiale di 10 spighe primarie per ciascun genotipo, 7 giorni dopo l'impollinazione (DAP, *Days After Pollination*), tramite la tecnica di inoculo *non-wounding* SCIA (*Silk Channel Inoculation Assay*), proposta da Zummo e Scott (14). Le sete sono state inoculate tramite la vaporizzazione di 1,5 mL (per spiga), di una sospensione di conidi (108 spore/mL in acqua distillata sterile), impiegando un miscuglio di ceppi di *A. flavus* isolati nel nord Italia (MPUP, A-2052; A-2055; A-2059; A-2082; A-2092) forniti dalla Prof.ssa Battilani (Università di Piacenza). I controlli sono stati prelevati da: i) spighe auto-impollinate non inoculate (SIB); ii) spighe auto-impollinate inoculate con 1,5 mL di acqua distillata sterile (H₂O), come descritto in precedenza per l'inoculo con *A. flavus*.

Per ogni parcella elementare sono stati rilevati: epoca di fioritura, altezza pianta e spiga, umidità alla raccolta; è stato inoltre valutato l'aspetto delle sete e la lunghezza del canale delle sete all'impollinazione (quest'ultimo parametro mostra variabilità tra i genotipi con valori da 3,1 cm a 10,6 cm, media: 7,04 \pm 1,882). Sono stati, inoltre, registrati alcuni parametri meteorologici quali temperatura e piovosità. Per tutti gli ibridi in esame sono stati altresì rilevati (10 spighe/genotipo) caratteri morfologici e fisiologici delle spighe alla raccolta, relativamente al grado di aderenza e sviluppo delle brattee, secondo la scala di valutazione riportata da Betran *et al.* (9) (punteggio 1: brattee aderenti all'apice della spiga, 2: apertura 1-2 cm, 3: apertura 2-4

cm; 4: apertura 4-5 cm; 5: apertura oltre 5 cm). I dati relativi ai parametri morfo-fisiologici della spiga, mostrano variabilità tra i genotipi con punteggio pari a 1 (apice della spiga coperta da brattee, in 9 genotipi), punteggio intermedio tra 1 e 2 (zona della spiga scoperta 1-2 cm, riscontrata in 21 genotipi), punteggio compreso tra 2 e 3 (2-4 cm di apertura delle brattee riscontrata in 4 genotipi).

Alla raccolta, dopo la valutazione dei caratteri morfologici del grado di aderenza delle brattee, le spighe sono state essiccate e valutate con un'indagine visiva per grado di infezione da *A. flavus*, utilizzando la scala di valutazione proposta da Reid e Hamilton (15) (*Disease Severity Rating* - DSR: 1=0%-no infection; 2=1-3%; 3=4-10%; 4=11-25%; 5=26-50%, 6=51-75%; 7=76-100% area della spiga con micelio visibile). Sono state registrati, altresì, i danni generati da insetti. I dati relativi alla valutazione visiva della contaminazione da *Aspergillus*, delle spighe inoculate artificialmente, mostrano che la risposta degli ibridi all'infezione artificiale è genotipo-specifica con valori di contaminazione variabile da 1 a 5,05 (media DSR: $2,45 \pm 0,96$). I controlli (SIB, non inoculati e inoculati con H₂O), di norma non mostrano in alcun genotipo segni di contaminazione da *Aspergillus*, con valori medi DSR (valutazione visiva) pari a $1,02 \pm 0,06$ nel caso dei SIB e pari a $1,01 \pm 0,03$ nel caso di inoculo con H₂O. Questo risultato evidenzia che la tecnica di inoculo applicata è stata efficace, in quanto le piante sottoposte al trattamento mostrano valori DSR superiori rispetto ai relativi controlli.

Per valutare la contaminazione interna al seme, sono state prelevate per ciascun campione 50 cariossidi, sterilizzate superficialmente e incubate *in vitro* (10 repliche con 5 semi/piastra) su terreno selettivo agarizzato DRBC (*Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol*) (16). Sette giorni dopo la piastratura è stato valutato il numero di cariossidi con segni visibili di micelio fungino. Anche per tale parametro i dati registrati mostrano significativi livelli di variabilità tra gli ibridi sottoposti ad infezione artificiale, con valori percentuali relativi di cariossidi contaminate internamente da *Aspergillus*, variabili da 0 ad 88 (media: $16,47 \pm 15,25$). I controlli, in genere hanno una percentuale di cariossidi contaminate internamente inferiore rispetto ai corrispettivi campioni inoculati (SIB, non inoculati media: $0,94 \pm 1,81$ e inoculati con H₂O media: $0,6 \pm 1,03$).

Sulla farina degli stessi campioni inoculati artificialmente e sui controlli (SIB, non inoculati e inoculati con H₂O) è stato determinato il contenuto di aflatoossine (AFB₁) tramite metodo immuno-enzimatico ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) (utilizzando il kit Ridascreen-Aflatoxin B₁ 30/15-R-Biopharm-Art. No: R1211). Per ciascuna condizione sperimentale saggiata all'interno dei genotipi, sono state valutate tre repliche. I dati relativi al contenuto di AFB₁ (ppb- $\mu\text{g}/\text{kg}$) mostrano che questa micotossina è presente in quantità elevate in alcuni degli ibridi sottoposti all'infezione artificiale (intervallo ibridi inoculati: 0-180, con media: $27 \pm 48,16$), mentre non è rilevabile nei relativi controlli non è rilevabile, oppure è presente in tracce (SIB: media $2 \pm 2,89$ e inoculi con H₂O: media $2 \pm 5,09$).

Una delle considerazioni più importanti di questa ricerca, consiste nell'identificazione di un metodo efficiente e riproducibile di inoculo della pianta, dimostrando che il protocollo adottato è efficace nell'evidenziare differenze nella risposta dei diversi genotipi all'attacco di patogeni fungini.

Per la validazione della risposta degli stessi ibridi in condizione di infezione naturale e impollinazione libera, rispetto alle impollinazioni controllate (SIB) impiegate nella prova di inoculo artificiale sono stati effettuati campionamenti nell'ambiente italiano, provenienti da prove sperimentali agronomiche e da prove *on farm*. Per quanto riguarda questi materiali, su 10 spighe per genotipo, sono state effettuate le seguenti indagini: i) caratteri morfologici e fisiologici delle spighe alla raccolta, ii) valutazione visiva per grado di infezione da *A. flavus*; iii) grado di contaminazione interna al seme da *Aspergillus*, iv) determinazione del contenuto di aflatoossine (AFB₁) nella farina.

Nell'ambito dello sviluppo di metodi di valutazione dei materiali per resistenza al fungo, oltre al saggio dei genotipi tramite inoculo artificiale in prove di campo, è in corso anche la valutazione di metodologie che permettano di evidenziare la resistenza in saggi di laboratorio, con l'obiettivo di approntare un metodo veloce di indagine. In tal senso, si sta procedendo alla messa a punto di un metodo riproducibile e attendibile per inoculare cariossidi integre dei genotipi di mais tramite una sospensione di spore di *A. flavus*. La risposta dei materiali all'inoculo da *Aspergillus* condotto in biosaggio su cariossidi mature, sarà confrontato con la risposta dello stesso genotipo all'inoculo artificiale e in condizione di infezione naturale.

L'analisi finale della messa a punto di metodi di screening basati su infestazione artificiale "puntiforme" con validazione delle indicazioni attraverso campionamento in diverse località italiane, degli stessi ibridi in condizioni di infestazione naturale, e la correlazione tra i vari parametri rilevati, sono attualmente oggetto di indagine.

Bibliografia

1. Munkvold GP. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annu Rev Phytopathol* 2003;41:99-116.
2. Deiner UL, Cole RJ, Sanders TH, Payne GA, Lee LS, Klich MA. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Ann Rev Phytopathology* 1987;25:249-70.
3. CAST. *Aflatoxin and other mycotoxins: An agricultural perspective*. Ames, IA: Council for Agricultural Science and Technology; 1979.
4. Castegnaro M, McGregor D. Carcinogenic risk assessment of mycotoxins. *Rev Med Vet* 1998;149:671-8.
5. Moreno OJ, Kang S. Aflatoxins in maize: the problem and genetic solutions. *Plant Breeding* 1999;118:1-16.
6. Piva G, Pietri A. Aflatossine: un pericolo per la salute umana e degli animali. *L'informatore agrario* 2004;14:7-8.
7. Payne GA. Aflatoxin in maize. *Crit. Rev. Plant Sci.* 1992; 10:423-440.
8. Brown R, Bhatnagar D, Cleveland TE, Cary JW. Recent advances in preharvest prevention of mycotoxin contamination. In: Sinha KK, Bhatnagar D (Ed.). *Mycotoxins in agriculture and food safety*. New York: Marcel Dekker; 1998.
9. Betran FJ, Isakeit T, Odvody G. Aflatoxin accumulation of White and Yellow maize inbreds in diallel crosses. *Crop Science* 2002;42:1894-901.
10. Campbell KW, White DG. Evaluation of corn genotypes for resistance to *Aspergillus* ear rot, kernel infection, and aflatoxin production. *Plant Disease*. 1995; 79:1039-1042.
11. Rocheford TR, White DG. Identification and selection of molecular markers associated with resistance to aflatoxin production in maize, and value of inbred CI2 as resistance source. In: *Proceedings of the Aflatoxin/Fumonisin Workshop 2000*; Yosemite, CA 25-27 Oct. 2000.
12. Lillehoj EB, Kwolek WF, Vandergraff EE, Zuber MS, Calvert OH, Widstrom N, Futrell MC, Bockholt AJ. Aflatoxin production in *Aspergillus flavus* inoculated ears of maize grown at diverse locations. *Crop Science* 1975;15:267-70.
13. Brown RL, Chen Z-Y, Cleveland TE, Russin JS. Advances in the development of host resistance in corn to aflatoxin contamination by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 1999; 89(2):113-7.
14. Zummo N, Scott GE. Evaluation of field inoculation techniques for screening maize genotypes against kernel infection by *Aspergillus flavus* in Mississippi. *Plant Disease* 1989;73:313-6.

15. Reid LM, Hamilton RI, Mather DE. Screening maize for resistance to *Gibberella* ear rot. Agriculture and Agri-Food Canada. *Technical Bulletin Eastern Cereal and Oilseed Research Centre*, 1996-5E.
16. King AD, Hocking AD, Pitt JI. Dichloran-Rose Bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Applied and environmental microbiology* 1979;37(5):959-64.

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 Centro Servizi e Analisi Srl, Arezzo

Introduzione

La recente problematica relativa alla presenza di aflatossina M₁ (Figura 1) nel latte ovino pone l'esigenza di affrontare alcuni aspetti che possono contribuire sia alla gestione della stessa, sia all'acquisizione di dati scientifici per una maggiore conoscenza del problema nel suo complesso.

Come spesso accade ci si ritrova, in situazioni di emergenza, a dover dare risposte scientifiche che permettano di prendere decisioni relative alla sicurezza del consumatore. A livello zootecnico diventa quindi importante attuare sistemi adeguati per lo stoccaggio di mangimi al fine di ridurre il livello di contaminazione.

Con questo lavoro si pone l'obiettivo di valutare alcuni aspetti di variabilità emersi dai dati ottenuti dall'analisi del latte e dei mangimi. Allo scopo sono state monitorate n. 5 aziende agricole con annesso laboratorio di caseificazione prelevando campioni di mangime, latte e formaggio prodotti internamente all'azienda.

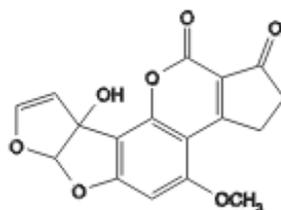


Figura 1. Struttura molecolare della aflatossina M₁

Materiali e metodi

I campioni di mangime sono stati prelevati nei periodi di raccolta e stoccaggio, ogni campione globale del peso di 1 kg per ogni lotto presente (totale campioni analizzati n. 120) (Figura 2). In tutti i campioni è stato determinato il tenore di aflatossine (B₁, B₂, G₁, G₂), mediante metodo di *screening* ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) con conferma mediante HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

È stato inoltre sottoposto ad analisi il latte delle 5 aziende agricole, per un totale di 80 campioni, per la determinazione della aflatossina M₁ mediante *ring test*; nelle aziende risultate positive sono stati analizzati in HPLC i derivati della caseificazione prodotti con il latte positivo al *ring test* (Figura 3).



Figura 2. Mangime: campionamento, preparazione del campione e analisi

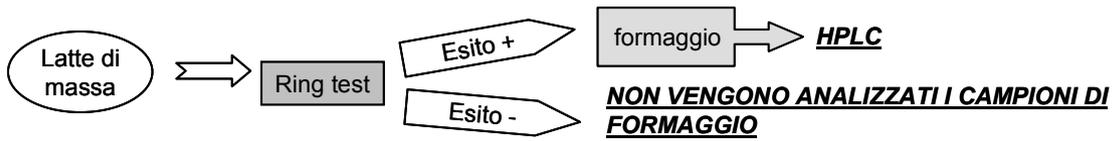


Figura 3. Latte e formaggio: campionamento, preparazione del campione e analisi

Risultati

Il valore limite di aflatoossina B₁ nei mangimi semplici è di 20 ppb (linea tratteggiata in Figura 4).

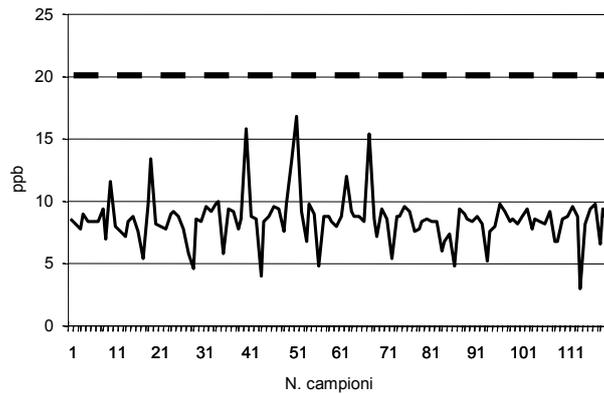


Figura 4. Valori di aflatoossina B₁ in campioni di mangimi semplici

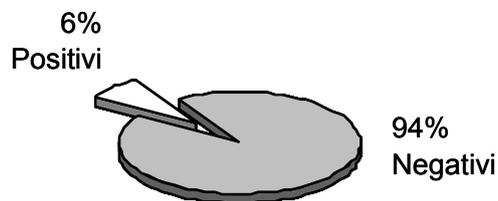


Figura 5. Percentuale di campioni positivi e negativi nel ring test del latte

Il valore limite di aflatoossina M₁ nel latte è di 0,05 ppb (linea tratteggiata in Figura 6).

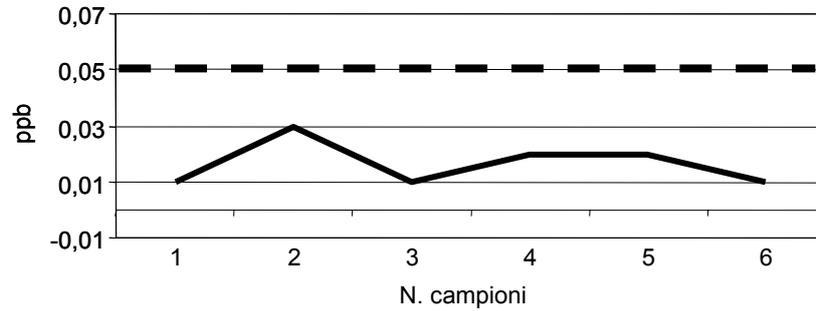


Figura 6. Aflatoossina M₁ in campioni di formaggio

Conclusioni

Il complesso delle osservazioni scaturite dallo studio dell'intera filiera di produzione "dal mangime al prodotto finito", come si nota dall'elaborazione grafica dei dati analitici, testimonia un buon livello di attenzione da parte delle aziende, le quali si sono rivelate molto attente nello stoccaggio dei cereali e foraggi. Nella produzione del formaggio la presenza di aflatoossina M₁ risulta essere sempre entro i limiti consentiti (<0,05 ppb). Il tutto si traduce nell'immissione sul mercato di un prodotto conforme alle normative vigenti.

SCREENING DEL DEOSSINIVALENOLO SU FRUMENTO DURO IN COLTURA BIOLOGICA

Gabriella Aureli, Maria Grazia D'Egidio, Fabrizio Quaranta, Andreina Belocchi, Cristina Pilo
*Istituto Sperimentale per la Cerealcoltura, Consiglio per la Ricerca e sperimentazione in Agricoltura,
Roma*

Introduzione

In Italia la fusariosi della spiga o “scabbia” (*Fusarium head blight*) è una delle principali malattie fungine dei cereali a paglia. Il frumento duro in particolare presenta un’alta suscettibilità verso tale fitopatìa, attribuibile almeno in parte al progressivo spostamento della coltura in zone meno vocate (1, 2). Gli agenti causali della malattia sono funghi del genere *Fusarium*, in particolare *F. graminearum* e *F. culmorum*, i quali sono anche potenziali produttori di metaboliti tossici appartenenti al gruppo dei tricoteceni. Fra i più importanti tricoteceni, per diffusione e tossicità, è compreso il deossinivalenolo (DON), il primo ad essere stato isolato e caratterizzato su orzo infettato da *Fusarium* (3).

L’azione tossica del DON nelle piante e negli animali coinvolge aspetti fondamentali del metabolismo cellulare fra i quali l’inibizione della sintesi proteica e degli acidi nucleici (DNA ed RNA), le funzioni mitocondriali, la divisione cellulare e le funzioni di membrana (4-6). Anche le forme acetilate della tossina principale, come il 15-Acetil-DON e il 3-Acetil-DON, possono liberare la micotossina a seguito di processi di idrolisi nell’ambiente intestinale (7). Casi di micotossicosi nell’uomo, a seguito di assunzione di alimenti contaminati da DON, sono stati segnalati in alcuni Paesi come Giappone, Cina e India (8).

La coltura del grano duro in Italia è prevalentemente attuata con un limitato uso di sostanze chimiche di sintesi per il controllo dei funghi patogeni e, nel caso di coltivazione biologica, il ricorso ai fitofarmaci non è consentito nemmeno per la concia della semente; ciò suggerisce di dedicare particolare attenzione verso eventuali rischi sanitari legati al grado di contaminazione delle derrate.

La riduzione del rischio di contaminazione in campo può essere perseguita attraverso l’adozione di buone pratiche agronomiche come la rotazione colturale e l’utilizzo di varietà caratterizzate da una minore suscettibilità allo sviluppo delle fusariosi.

Nell’ambito della Rete nazionale di confronto tra varietà di frumento duro in coltura biologica (9) afferente al progetto BIOCER (Cerealcoltura Biologica), è stato effettuato uno screening triennale (2004-2006) per la determinazione del DON su 10 varietà provenienti da 9 località rappresentative delle principali zone di coltivazione del frumento duro in Italia.

Materiali e metodi

Sono stati presi in esame i campioni di granella provenienti da 9 località della Rete nazionale (Figura 1) relativi a 10 varietà, ciascuna replicata in campo 4 volte. La granella delle 4 ripetizioni è stata riunita in un unico campione, macinato con mulino Cyclotec (PBI).

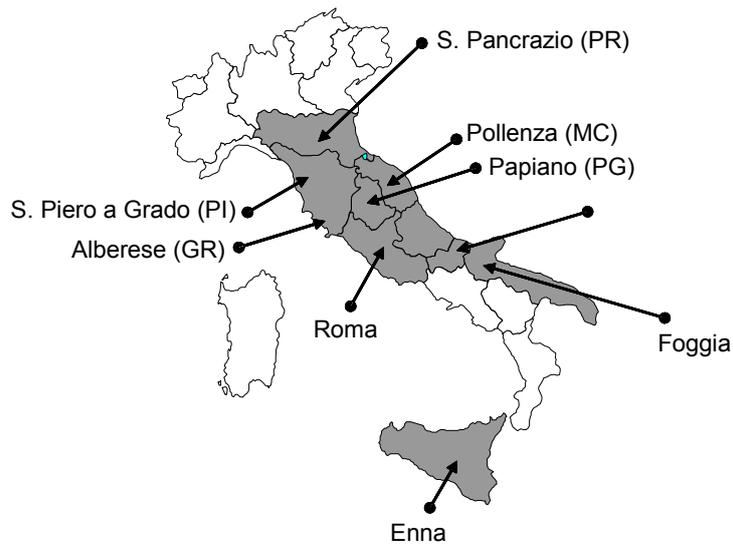


Figura 1. Localizzazione dei campi di prova

Lo sfarinato integrale di ciascun campione è stato sottoposto ad estrazione con acqua distillata e analizzato con metodologia immunoenzimatica (ELISA, *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) mediante l'impiego del kit Ridascreeen DON (R-Biopharm); l'analisi è stata eseguita utilizzando l'analizzatore automatico BRIO (SEAC) e il lettore per micropiastre SIRIO S (SEAC).

Risultati

L'analisi di screening per il DON ha evidenziato una scarsa contaminazione in tutti e tre gli anni presi in esame, con valori notevolmente al di sotto dei limiti normativi stabiliti per il grano duro non trasformato e pari a 1750 ppb (Figura 2).

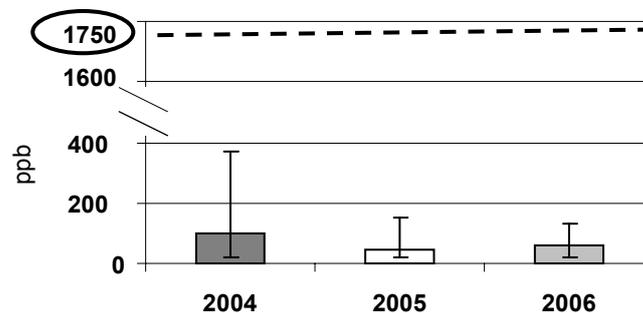


Figura 2. Valori medi, massimi e minimi di DON dei soli campioni positivi registrati nei tre anni di prova (medie di 9 località e 10 varietà)

In particolare, il valore medio più alto del triennio (relativo ai soli campioni positivi) è stato di 100 ppb rilevato nel 2004, verosimilmente per le condizioni climatiche più favorevoli allo sviluppo del *Fusarium*. Nello stesso anno è stato registrato il valore percentuale più elevato dei campioni risultati positivi all'analisi (80%), mentre decisamente più basse sono risultate le percentuali di positività nel 2005 e nel 2006 (Tabella 1).

Tabella 1. Incidenza (%) per anno dei campioni positivi per il DON al test ELISA (su un totale di 90 analizzati ogni anno)

Anno	Incidenza (%)
2004	80
2005	20
2006	28

Per quanto riguarda le località, la percentuale dei campioni risultati positivi all'analisi non sembra particolarmente influenzata dall'ambiente di coltivazione (Tabella 2) mentre maggiori differenze sono state registrate relativamente alla quantità di DON (Figura 3).

Tabella 2. Incidenza (%) per località dei campioni positivi per il DON al test ELISA (su un totale di 30 analizzati per ogni località).

Località	Incidenza (%)
S. Pancrazio (PR)	3
Pollenza (MC)	43
Papiano (PG)	30
S. Piero a Grado (PI)	77
Alberese (GR)	53
Roma	53
Campobasso	33
Foggia	43
Enna	47

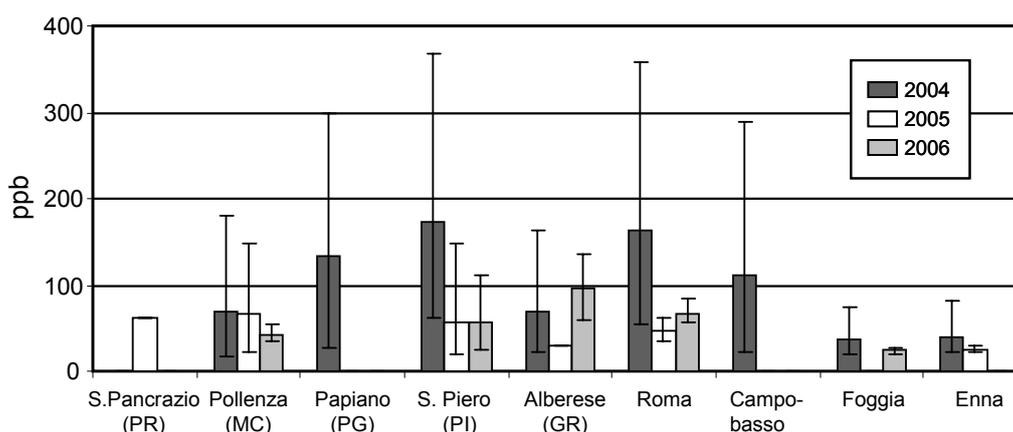


Figura 3. Valori medi, massimi e minimi di DON dei soli campioni positivi registrati nelle 9 località di prova (medie di 10 varietà nei tre anni)

Negli ultimi due anni, in presenza di un grado di contaminazione medio particolarmente basso, è stata riscontrata l'assenza di campioni positivi in molte località, fra le quali si sono distinte S. Pancrazio (PR), per un unico campione positivo, e le due località meridionali, Foggia ed Enna, per valori di DON decisamente bassi, di poco superiori al limite di sensibilità del metodo di analisi, pari a 18,5 ppb.

In linea generale i livelli maggiori di contaminazione sono stati rilevati nelle zone dell'Italia centrale nel 2004, con valori massimi di 368 ppb a S. Piero a Grado (PI) e 359 ppb a Roma.

Relativamente al comportamento varietale (Figura 4) le cultivar più tardive hanno mostrato i valori medi di contaminazione da DON tendenzialmente più bassi; da segnalare in particolare la varietà tardiva Creso che si è distinta anche per la più bassa incidenza media dei campioni positivi, pari al 26% (Tabella 3).

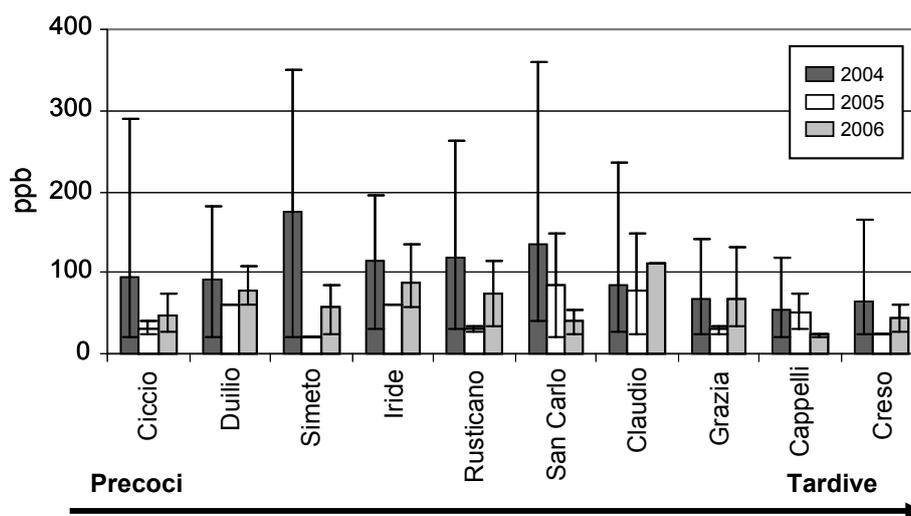


Figura 4. Valori medi, massimi e minimi di DON dei soli campioni positivi registrati per 10 varietà in prova (medie di 9 località nei tre anni)

Tabella 3. Incidenza (%) per varietà dei campioni positivi per il DON al test ELISA (su un totale di 27 analizzati per ciascuna varietà)

Varietà	Incidenza (%)
Ciccio	52
Duilio	44
Simeto	44
Iride	41
Rusticano	44
San Carlo	44
Claudio	41
Grazia	44
Cappelli	44
Creso	26

Conclusioni

I risultati dello screening hanno consentito di evidenziare innanzitutto l'importanza dell'ambiente agro-climatico in merito all'entità della contaminazione da DON nella granella di frumento duro. I dati ottenuti, inoltre, hanno fornito alcune indicazioni sulla risposta delle varietà analizzate riguardo all'accumulo di DON nella granella, evidenziando una tendenza delle cultivar più tardive ad un minor grado di contaminazione.

In particolare dai risultati ottenuti è possibile evidenziare i seguenti aspetti:

- a livello territoriale, le zone meridionali risultano meno a rischio di contaminazione mentre in altre zone del territorio nazionale tale rischio potrebbe aumentare in relazione alla posizione geografica, alle caratteristiche climatiche dell'annata e alle condizioni agrotecniche;
- a livello varietale, la tendenza alla minore suscettibilità alla contaminazione delle cultivar più tardive conferma l'importanza dell'impiego di cultivar idonee in ciascuna zona di coltivazione; tuttavia è opportuno sottolineare che la scelta delle varietà deve considerare comunque quelle caratteristiche produttive e qualitative imprescindibili per una corretta gestione dell'impresa agricola.

In conclusione, sulla base dell'analisi di screening effettuata nel triennio 2004-2006 su campioni di frumento duro provenienti da coltura biologica è possibile affermare che il grado di contaminazione da DON si è mantenuto sempre entro valori molto bassi e pertanto il rischio di elevati livelli di DON nel frumento duro di coltivazione nazionale sembrerebbe alquanto ridotto, ferma restando l'adozione di corrette pratiche agronomiche.

Bibliografia

1. Infantino A, Pucci N, Conca G, Di Giambattista G, Santori A. La fusariosi della spiga del frumento in Italia. *L'informatore Agrario* 2005;12(suppl.1):12-6.
2. Romani S, Pinnavaia GG, Dalla Rosa M, Pancaldi D. Caratteristiche qualitative e presenza di micotossine in grano duro infetto da *Fusarium* spp. *Tecnica Molitoria* 2005;6:617-24.
3. Yoshizawa T, Morooka N. Deoxynivalenol and its monoacetate: New mycotoxins from *Fusarium roseum* and moldy barley. *Agric Biol Chem* 1973;37:2933-4.
4. Pestka J, Smolinski AT. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, part B 2005;8:39-69.
5. Rocha O, Ansari K, Doohan FM. Effects of tricothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Additives and Contaminants* 2005;22(4):369-78.
6. Reid LM, Zhu X, Ma BL. Crop rotation and nitrogen effects on maize susceptibility to Gibberella (*Fusarium graminearum*) ear rot. *Plant and Soil* 2001;237:1-14.
7. Sinha RC and Savard M E. Comparison of immunoassay and gas chromatography methods for the detection of mycotoxin deoxynivalenol in grain samples. *Canadian Journal of Plant Pathology* 1996;18:233-6.
8. Miller J D. Fungi and mycotoxins in grain implications for stored product research. *J Stored Res* 1995;31(1):1-16.
9. Quaranta F, Belocchi A, D'Egidio MG, Fornara M, Mazzon V, Melloni S, Desiderio E. Varietà di grano duro a confronto in biologico. *L'Informatore Agrario* 2006;62(37):44-9.

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

Carlo Brera, Barbara De Santis

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

Introduzione

La recente entrata in vigore dei regolamenti comunitari 882/2004 e 854/2004 (1-2) relativi ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali e sulla organizzazione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano, hanno di per sé accelerato l'emanazione di una serie di ulteriori provvedimenti legislativi finalizzati alla definizione delle azioni applicative da intraprendere in ottemperanza a quanto disposto dal Regolamento stesso.

Ciò in funzione soprattutto di una radicale modifica, da considerarsi senz'altro innovativa, del concetto di controllo ufficiale, basato cioè essenzialmente sulla considerazione che la qualità e la frequenza e di conseguenza l'efficacia dell'attività di controllo scaturiscano essenzialmente dalla effettuazione di una analisi preliminare per la valutazione del rischio.

Più specificatamente, la problematica delle micotossine è stata oggetto della emanazione di due Regolamenti unici che hanno avuto la funzione di armonizzare e riunire in un unico documento le precedenti disposizioni emanate per le singole micotossine.

Il Regolamento 401/2006 (3) ha infatti dettato per tutte le micotossine normate, piani di campionamento *ad hoc* sia per i prodotti all'importazione sia per quelli al dettaglio. Inoltre, il Regolamento 1881/2006 (4) ha riunito tutti i precedenti Regolamenti recanti i limiti massimi tollerabili per le singole micotossine.

Nondimeno si prevede che tale regolamento possa ancora subire modifiche in quanto è attualmente in fase di discussione una possibile revisione dei limiti massimi per le fumonisine nel mais in seguito ad esplicite e formali richieste formulate alla Commissione Europea dal Ministero della Salute di concerto con l'Istituto Superiore di Sanità e anche dalle Associazioni nazionali ed europee di categoria.

Per quanto attiene il discorso prettamente diagnostico, si è registrato pertanto un chiaro orientamento della UE nell'eliminare fonti di dubbio e condizioni di disarmonizzazione tra gli Stati Membri nella effettuazione dei controlli sulle derrate in entrata o distribuite sul territorio.

Inoltre, sul fronte micotossine, altre importanti disposizioni specifiche sono state recentemente emanate sia per regolamentare i controlli delle merci all'importazione (Decisione della Commissione 2006/504/CE) (5), sia per fornire utili indicazioni nella prevenzione della contaminazione da *Fusarium*-tossine nei cereali (Raccomandazione 2006/583/CE) (6). La Decisione stabilisce condizioni particolari per l'importazione di determinati prodotti alimentari da alcuni paesi terzi a causa del rischio di contaminazione da aflatossine di tali prodotti, unitamente alla formulazione di specifiche indicazioni per una corretta implementazione da

parte delle Autorità competenti delle attività di controllo ufficiale (documento disponibile sul sito http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/aflatoxin_guidance_it.pdf).

La Raccomandazione ha avuto la finalità di stimolare i vari settori del sistema agro-alimentare coinvolti nella produzione e trasformazione delle materie prime nei prodotti destinati al consumatore, alla applicazione di specifiche norme di buona pratica agricola e industriale finalizzate alla riduzione se non eliminazione della contaminazione dei prodotti alimentari da parte delle *Fusarium*-tossine.

Non ultima, la Raccomandazione della Commissione (2006/576/CE) (7) sulla presenza di deossinivalenolo, zearalenone, ocratossina A, tossine T-2 e HT-2 e fumonisine in prodotti destinati all'alimentazione degli animali, con cui la UE ha recentemente ritenuto necessario raccomandare valori di riferimento per fornire orientamenti agli Stati Membri sull'accettabilità dei cereali e dei prodotti a base di cereali, nonché dei mangimi composti per l'alimentazione degli animali ed evitare disparità nei valori accettati dai singoli Stati Membri, con il conseguente rischio di distorsione della concorrenza.

In pratica, tutta la filiera diagnostica è stata scrupolosamente presa in esame fornendo elementi indiscutibilmente chiari su chi, come, quando, perché, e dove i controlli devono essere effettuati. Sarà ora compito di ogni singolo Stato Membro far proprio tutto quello che è stato sancito cercando di mantenere su tutto il territorio, nel recepimento gestionale delle disposizioni comunitarie, quel carattere di armonizzazione che deve poter garantire che le attività di controllo ufficiale siano effettuate in modo speculare in tutto il nostro Paese, superando, se possibile, le attuali differenziazioni dovute ad una diversità nelle capacità gestionali proprie di ciascuna realtà regionale, alle risorse assegnate e al loro strategico impiego, all'adeguamento alle norme da parte delle strutture preposte, alla formazione del personale e alla individuazione di strutture di riferimento a livello nazionale. Per il superamento di tutte le barriere elencate, il nostro Paese sta lavorando alacremente per raggiungere un livello qualitativo che possa supportare con autorevolezza la enorme quantità di lavoro che si è ormai da un po' di tempo presentato alle realtà logistiche presenti sul territorio e che è destinata ad aumentare in virtù dei nuovi Regolamenti unici.

Legislazione vigente e attività diagnostiche

Regolamento CE/882/2004

L'entrata in vigore del regolamento 882/2004 si è resa necessaria sia per ovviare ad una effettiva ampia variabilità con cui la legislazione comunitaria era attuata nei vari Paesi Membri, sia per consolidare e ampliare i requisiti già previsti in disposizioni legislative di settori specifici. Lo scopo del Regolamento è stato quello di creare un approccio alle attività di controllo ufficiale "dal campo al piatto" che risultasse più comprensibile, integrato, e soprattutto basato sull'analisi del rischio. Tra gli obiettivi da perseguire, uno tra i più rilevanti è stato quello di migliorare l'efficacia e la congruità dei controlli in tutti i Paesi dell'Unione, e di conseguenza, aumentare gli standard di sicurezza alimentare e di protezione del consumatore, aumentandone la fiducia verso le Autorità competenti.

Nel raggiungimento di livelli qualitativi delle attività di controllo, la diagnostica riveste senza dubbio un ruolo primario e alcuni dei punti più innovativi, riscontrabile nel Regolamento sono di seguito riportati.

Designazione dei laboratori di riferimento nazionali

Al fine di armonizzare a livello europeo e nazionale le attività di controllo dei prodotti alimentari e dei mangimi, il Regolamento 882/2004 ha decisamente rafforzato la necessità di disporre di una rete di laboratori che agiscano a livello nazionale come riferimento per le realtà laboratoristiche operanti sul territorio. Questa condizione è di estrema importanza in quanto è l'unica che può garantire la costituzione di una banca dati attendibile e rappresentativa sulla contaminazione da micotossine nei prodotti alimentari sia all'importazione sia circolanti sul territorio. I Laboratori Nazionali di Riferimento (LNR) dovranno:

- a) collaborare con il laboratorio comunitario di riferimento nel loro ambito di competenza;
- b) coordinare, nella loro sfera di competenza, le attività dei laboratori ufficiali responsabili dell'analisi dei campioni a norma dell'articolo 11;
- c) se del caso, organizzare test comparativi tra i laboratori nazionali ufficiali e assicurare un adeguato follow-up dei test comparativi effettuati;
- d) assicurare la trasmissione all'autorità competente e ai laboratori nazionali ufficiali delle informazioni fornite dai laboratori comunitari di riferimento;
- e) offrire assistenza scientifica e tecnica all'autorità competente per l'attuazione di piani di controllo coordinati adottati a norma dell'articolo 53 del Regolamento;
- f) assumersi la responsabilità di effettuare altri compiti specifici previsti secondo la procedura di cui all'articolo 62, paragrafo 3, fatti salvi ulteriori compiti nazionali previsti.

Accreditamento dei laboratori ufficiali

In base all'articolo 12 del regolamento 882/2004, l'Autorità Competente designa i laboratori che possono eseguire l'analisi dei campioni prelevati durante i controlli ufficiali. Tali laboratori, compresi gli LNR, devono obbligatoriamente essere accreditati, o aver avviato l'iter di accreditamento, conformemente alla norma europea EN ISO/IEC 17025 riguardante i criteri generali sulla competenza dei laboratori di prova e di taratura.

Caratterizzazione dei metodi analitici

I metodi di campionamento e di analisi utilizzati nel contesto dei controlli ufficiali devono conformarsi a norme comunitarie esistenti o a norme internazionali ufficialmente riconosciute. Per quanto riguarda le micotossine, sia la *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) che il *Comité Européen de Normalisation* (CEN), hanno emanato una serie di norme specifiche riguardanti sia le caratteristiche di efficienza dei metodi di analisi per la determinazione delle micotossine sia una serie di metodi di analisi validati per le micotossine più note e per le matrici più comuni in cui esse sono presenti. Sono, infatti, disponibili metodi validati per le aflatossine in arachidi, pistacchi e altra frutta secca, mais e altri cereali, mangimi, alimenti per l'infanzia, latte e formaggio, per la ocratossina A nel mais, grano, orzo, caffè tostato, vino, birra, alimenti per l'infanzia, uva secca, per il deossinivalenolo nel grano e altri cereali, e alimenti per l'infanzia, per lo zearalenone nel mais e in altri cereali, per la fumonisina nel mais e prodotti derivati, e per la patulina nei succhi e nella composta di mela.

Diritto dell'operatore alla richiesta di revisione di analisi

In base all'articolo 11 (commi 5-6), gli operatori del settore dei mangimi e degli alimenti hanno il diritto di chiedere un ulteriore parere di esperti per i prodotti oggetto di campionamento

e di analisi. Per i prodotti all'importazione, ovviamente la procedura di revisione di analisi deve poter consentire in tempi brevi la definizione dell'esito, attraverso un iter procedurale avente necessariamente modalità diverse da quelle adottate per i prodotti nazionali.

Regolamento 1881/2006

L'entrata in vigore nel gennaio 2007 con applicazione dal 1 marzo 2007 del Regolamento 1881/2006 ha introdotto rispetto alle disposizioni precedenti i seguenti punti innovativi:

- Riferimento alla Raccomandazione sulla prevenzione e riduzione delle *Fusarium*-tossine nei cereali a cui dovrebbero essere correlati codici di buona pratica a livello nazionale
- Riferimento alla scarsità di dati sulla T-2 e HT-2
- Riferimento al parere dell'EFSA (*European Food Safety Authority*) circa la valutazione tossicologica della OTA
- Riferimento ai recenti risultati ottenuti dalle SCOOP Task.

Prevenzione e riduzione delle *Fusarium*-tossine nei cereali

Il considerando 33 del regolamento riporta tra le considerazioni di base un tema di grande attualità dato il trend climatico verso cui l'universo sta tendendo, vale a dire l'influenza delle condizioni climatiche che durante la crescita, in particolare durante la fioritura, possono giocare un ruolo significativo sul contenuto di *Fusarium*-tossine. A tale proposito, è stato introdotto il riferimento ad una effettiva applicazione delle buone pratiche agricole, volte a ridurre al minimo i fattori di rischio. La raccomandazione 2006/583/CE della Commissione, del 17 agosto 2006, sulla prevenzione e sulla riduzione delle *Fusarium*-tossine nei cereali, infatti, descrive in maniera alquanto esaustiva le attività preventive da attuare durante tutta l'intera filiera agro-alimentare, portando all'attenzione di tutti gli stakeholders, utili elementi per impostare proprie linee produttive e proprie strategie di intervento.

In accordo alla Raccomandazione, a livello di alcune regioni dell'Italia settentrionale, sono già state altresì formulate linee guida *ad hoc* ricalcando e, se possibile, migliorando i disciplinari di intervento da utilizzare in maniera mirata a seconda dello specifico problema.

Riferimento alla scarsità di dati sulla T-2 e HT-2

Il considerando 31 attesta che stime sull'assunzione indicano che la presenza delle tossine T2 e HT-2 può essere preoccupante per la salute pubblica. È quindi necessario e altamente prioritario sviluppare un metodo di analisi sensibile e affidabile, raccogliere ulteriori dati sulla incidenza di contaminazione e svolgere ulteriori indagini sui fattori che incidono sulla presenza delle tossine T-2 e HT-2 nei cereali e nei prodotti a base di cereali, in particolare nell'avena e nei prodotti a base di avena. A questo proposito, è auspicabile che studi di monitoraggio siano programmati nell'immediato, ma in modo coordinato sul territorio in modo da garantire l'attendibilità dei risultati ottenuti in termini di numerosità campionaria, rappresentatività geografica, differenziazione dei prodotti controllati, qualità del dato analitico e procedure di campionamento confrontabili. In assenza di tali requisiti gli studi e i risultati derivati perderebbero la necessaria valenza sia per una utilizzazione da parte degli operatori di filiera inclusi i consumatori sia da parte della Commissione Europea.

Riferimento al parere dell'EFSA circa la valutazione tossicologica della OTA

L'ocratossina costituisce senza dubbio la micotossina maggiormente pericolosa per la salute pubblica in quanto, anche se dotata di tossicità intrinseca notevolmente inferiore alle aflatoxine, risulta presente negli alimenti in modo notevolmente più ampio. Infatti, cereali, spezie, birra, vino, caffè, frutta secca ed essiccata, cacao e prodotti derivati, succhi di frutta, prodotti carnei, e recentemente anche la liquirizia, costituiscono in percentuale differenti fonti alimentari che contribuiscono all'assunzione totale giornaliera di un consumatore.

I parametri tossicologici che sono stati via via presentati e adottati a livello internazionale hanno mostrato notevoli differenze basate soprattutto sui diversi criteri di tossicità da cui si è partiti. Tali valori sono riassunti nella Tabella 1.

Tabella 1. Parametri tossicologici per la ocratossina A

TDI (ng/kg p.c. al giorno)	Organizzazione
4	Health Canada 1989; 1996
5	Nordic Council, 1991
5	EU, 1998
14	JECFA, 1996, 2001
120 (TWI)	EFSA 2006

TDI: Tolerable Daily Intake

TWI: Tolerable Weekly Intake

* EFSA, Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. Question N° EFSA-Q-2005-154. Adottata il 4 aprile 2006.

Recentemente l'EFSA, basandosi su evidenze scientifiche che attestano che la tossicità renale sia molto probabilmente da attribuire ad un danno ossidativo cellulare e che l'effetto genotossico non sia da considerarsi possibile data la comprovata assenza di specifici addotti OTA-DNA, ha individuato un livello tollerabile settimanale (*Tolerable Weekly Intake*, TWI) di 120 ng/kg p.c., derivato da un LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Level*) di 8 µg/kg pc/die relativo a tossicità renale in specie suine e applicando un fattore di incertezza pari a 450. Questo dato che si discosta di molto dalle precedenti valutazioni non è al momento applicabile ad una fascia di consumatori molto critica quale quella dei bambini e dei neonati in quanto le banche dati dei consumi per queste tipologie di consumatori non sono attualmente disponibili.

Riferimento ai recenti risultati ottenuti dalle SCOOP Task

Tra i criteri utilizzati nella definizione dei limiti massimi tollerabili, la Commissione Europea è ricorsa alla valutazione dei risultati emersi dalle SCOOP Task per l'ocratossina, le *Fusarium*-tossine e la patulina. Alla luce dei pareri scientifici e delle valutazioni dell'assunzione alimentare, non sono emerse condizioni da ritenersi a rischio per la salute del consumatore europeo con valori calcolati di assunzione molto al di sotto delle rispettive TDI (*Tolerable Daily Intake*). Bisogna altresì rilevare che studi di monitoraggio effettuati sia a livello nazionale che europeo hanno recentemente mostrato livelli di concentrazione in alcuni casi molto elevati di aflatoxina B₁ e soprattutto fumonisine nei prodotti a base di mais. Ciò in funzione di fattori stagionali come estrema aridità e temperature elevate che hanno facilitato l'attacco fungino sulle coltivazioni con conseguenti forti produzioni di micotossine.

Rispetto al Regolamento CE/856/2005, si ritiene importante che allo stato attuale delle consultazioni, è stata mantenuta per le *Fusarium*-tossine la disposizione relativa al punto della filiera cerealicola dove applicare i limiti massimi tollerabili, che come è noto si diversifica da quello previsto per le aflatoxine e per la OTA, e individua nel mulino il sito preferenziale dove effettuare le operazioni di controllo.

Infatti, poiché per i cereali non trasformati commercializzati per la prima trasformazione, non essendo considerati parte della prima trasformazione i procedimenti di pulizia, cernita ed essiccazione in quanto non viene esercitata alcuna azione fisica sulla cariosside, i limiti massimi tollerabili, per le sole *Fusarium*-tossine, si devono applicare dopo la pulitura e prima della trasformazione industriale.

Regolamento 401/2006 e linee guida per le Autorità Competenti preposte all'effettuazione delle attività di controllo ufficiale

Come è noto, analogamente al regolamento unico sui limiti massimi tollerabili, anche per le modalità di prelievo e analisi delle micotossine nei prodotti alimentari la Commissione Europea ha emanato nel marzo del 2006 con applicazione a decorrere dal 1 luglio 2006, un Regolamento unico, il 401/2006, e anche una guida pratica esplicativa delle modalità in cui il controllo ufficiale deve avvenire. Tale guida è consultabile sul sito della DG SANCO all'indirizzo Internet: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/aflatoxin_guidance_it.pdf.

Dei due provvedimenti legislativi si descrivono di seguito gli elementi innovativi:

- Adozione di criteri uniformi per esprimere la misura relativa al risultato di analisi (incertezza di misura e calcolo dei fattori di recupero).
- Per i cereali la grandezza del campione elementare (CE) è stata ridotta a 100 grammi e quella del campione globale a 10 kg.
- Definizione di un nuovo criterio di accettabilità di una partita.
- Descrizione della procedura di formazione del campione globale e delle aliquote di legge.
- Descrizione delle modalità di campionamento dei prodotti al dettaglio

Adozione di criteri uniformi per esprimere la misura

In riferimento a come esprimere il risultato analitico sul rapporto di prova, viene espressamente descritto nell'allegato II del regolamento, che esso deve essere riportato in forma corretta o meno per il recupero, ma devono, comunque, essere indicati il modo in cui è stato espresso il risultato analitico e il livello di recupero. Per verificare la conformità, si deve utilizzare il risultato analitico corretto per il recupero. Il risultato analitico deve essere riportato come $x \pm U$, dove x è il risultato analitico e U l'incertezza di misura estesa, calcolata utilizzando un fattore di copertura 2 corrispondente ad un livello di confidenza del 95%.

Per gli alimenti di origine animale è possibile tenere conto dell'incertezza di misura anche stabilendo il limite di decisione ($CC\alpha$) conformemente della decisione 2002/657/CE (7) della Commissione (punto 3.1.2.5 dell'allegato sul caso di sostanze per le quali è stabilito un limite consentito).

Ai fini dell'accettazione o del rifiuto della partita, tali criteri si applicano al risultato analitico ottenuto sul campione sottoposto al controllo ufficiale. Nel caso di revisioni di analisi si applica la normativa nazionale.

A tale proposito nel Regolamento sono chiaramente indicati i parametri di efficienza del metodo (recupero, ripetibilità, riproducibilità, incertezza massima standard, incertezza estesa) entro cui attenersi.

Inoltre, i laboratori preposti alla effettuazione dei controlli devono soddisfare la norma ISO/IEC 17025 come riportato nell'art. 12 del regolamento 882/2004.

Un utile documento di riferimento riguardante la correlazione tra risultato analitico, incertezza di misura, fattori di recupero e provvedimenti legislativi a livello comunitario è consultabile sul sito http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/report-sampling_analysis_2004_en.pdf, dal titolo "Report on the relationship between analytical results, measurement uncertainty, recovery factors and the provisions of EU food and feed legislation, with particular reference to community legislation concerning contaminants in food".

Grandezza del campione elementare per i cereali

Allo scopo di uniformare le procedure di campionamento per tutte le micotossine nei prodotti cerealicoli, il peso del campione elementare da prelevare è stato ridotto da 300 g a 100 g e conseguentemente il peso del campione globale è compreso tra 1 kg e 10 kg.

Criterio di accettabilità di una partita

L'accettabilità di un lotto viene caratterizzata da un nuovo concetto secondo il quale un lotto è ritenuto non conforme solo se il campione globale o la media dei sottocampioni superano il limite massimo oltre ogni ragionevole dubbio tenendo conto dell'incertezza di misurazione e della correzione per il recupero. La spiegazione della dicitura "oltre ogni ragionevole dubbio" è facilmente comprensibile dall'esame della Figura 1.

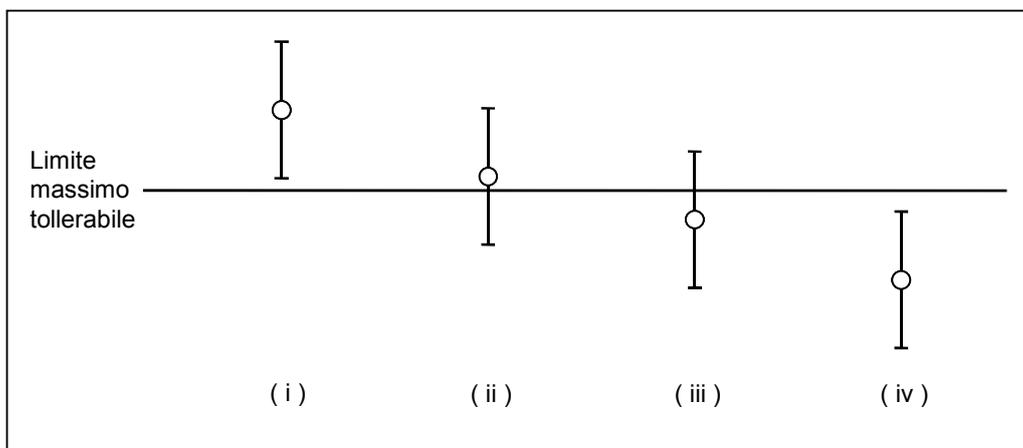


Figura 1. Schema illustrativo della relazione tra valore misurato e accettazione del lotto

Nei casi descritti nella Figura 1, solo il caso (i) presenta una condizione per la quale si può affermare oltre ogni ragionevole dubbio che il valore riscontrato eccede il limite massimo tollerabile; pertanto solo in questo caso il lotto sarà giudicato non conforme. Nei casi (ii) e (iii) il lotto può essere considerato conforme, in quanto pur essendo la misura al di sopra (ii) o al di sotto (iii) del limite massimo tollerabile esiste un ragionevole dubbio che considerando l'incertezza relativa alla misura il risultato cada al di sotto del limite massimo tollerabile. In

questi casi è facoltà del laboratorio ripetere o meno l'analisi su un altro campione per confermare la prima osservazione. Solo il caso (iv) presenta una condizione per la quale il lotto è da considerarsi effettivamente conforme, in quanto il risultato comprensivo dell'intervallo di incertezza cade tutto al di sotto del limite massimo tollerabile.

Descrizione della procedura di formazione del campione globale e delle aliquote di legge

La procedura descritta nel Regolamento e più specificatamente nelle linee guida, individua nel laboratorio il luogo dove formare le aliquote ufficiali alla presenza dell'Autorità preposta al prelievo e del rappresentante della Azienda.

Come è noto, la procedura differisce se il prodotto si intende destinato al consumo umano diretto o se invece necessita di ulteriore trattamento fisico o di cernita prima del consumo.

Nel primo caso, dovranno essere formati anche presso il punto di campionamento primario, tre campioni di laboratorio che opportunamente miscelati saranno poi macinati in laboratorio individualmente. Dai tre campioni di laboratorio così macinati, a secco o preferibilmente tramite aggiunta di acqua (*slurry*), si formeranno, per ciascun campione di laboratorio, le quattro o cinque aliquote secondo i casi. Pertanto, complessivamente le aliquote formate in laboratorio saranno 12 o 15. L'accettabilità del lotto sarà in questo caso correlata alla condizione che tutte le tre aliquote risultino conformi. Viceversa, nel caso di prodotti destinati ad ulteriori trattamenti prima del consumo, la procedura non prevede la suddivisione in campioni di laboratorio ovvero nel caso di non disponibilità di un omogeneizzatore industriale in grado di macinare 30 kg di prodotto, si dovrà operare la suddivisione in tre campioni di laboratorio valutando la conformità del lotto in base al risultato medio che si ottiene dall'analisi dei tre campioni di laboratorio (Figura 2).

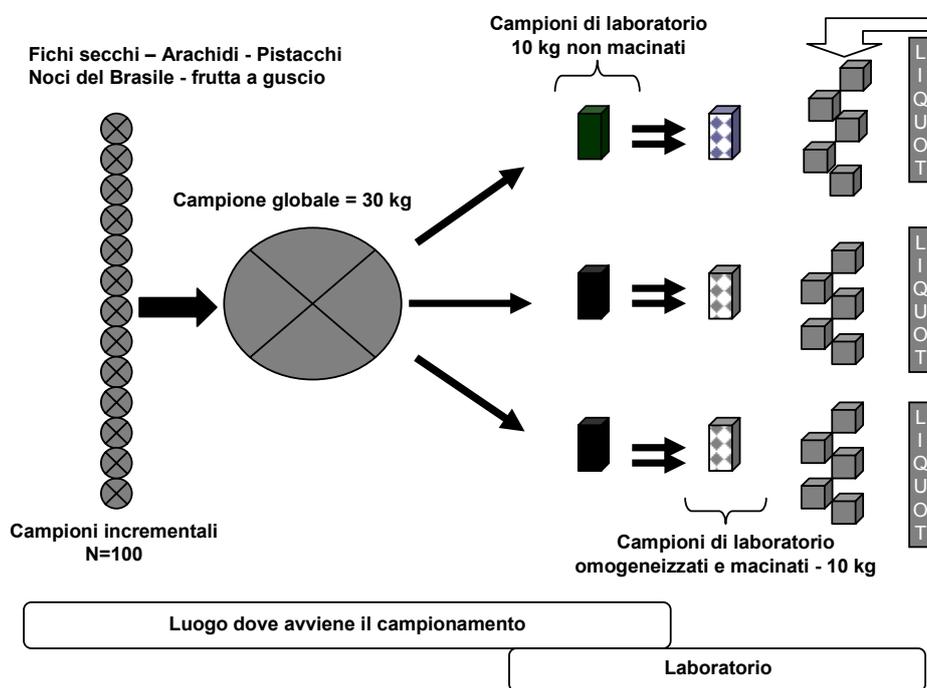


Figura 2. Schema generale per la formazione del campione globale e delle aliquote di legge per frutta secca destinata al consumo umano diretto

Descrizione delle modalità di campionamento dei prodotti al dettaglio

Rispetto alle normative precedenti, il Regolamento 401/2006 introduce per la prima volta una dettagliata spiegazione delle modalità che devono essere osservate per il prelievo dei campioni al dettaglio, rimandando alle disposizioni di legge nazionali per la formazione delle aliquote di legge.

Nella parte relativa al campionamento al dettaglio, sono chiaramente indicate le differenti modalità di prelievo a seconda del peso dei campioni incrementali, la differenza tra confezione originale chiusa e campione incrementale, che può coincidere o meno, il ricorso a procedure di campionamento alternative in casi particolari come quelli in cui le confezioni al dettaglio pesino 500 grammi od 1 kg.

Riepilogando, all'atto della formazione delle aliquote (quattro o cinque a seconda dei casi) il laboratorio deve attenersi a quanto stabilito dal DPR n. 327 del 26/03/1980 all'art. 6 e Allegato A comma 3 (e) (8).

Una condizione necessaria e indispensabile per poter effettuare le analisi di controllo in modo accurato è quello di conoscere la destinazione d'uso del prodotto alimentare. Infatti, le procedure di campionamento, la formazione delle aliquote, la effettuazione delle analisi e il criterio da adottate per esprimere il giudizio differiscono a seconda che il prodotto sia destinato al consumo umano diretto o ad ulteriore trattamento industriale fisico prima del consumo.

Al fine di ottenere un collegamento effettivo tra le Autorità competenti preposte al prelievo dei campioni e il laboratorio che effettua le analisi è necessario che nel verbale di primo prelievo (importazione o dettaglio) sia espressamente dichiarata la natura del prodotto in modo tale da consentire un chiaro e inequivocabile controllo.

Conclusioni

Sulla base di quanto descritto è auspicabile che, al fine di migliorare il livello di qualità dei controlli sul territorio, nel prossimo futuro siano raggiunti alcuni dei seguenti obiettivi:

- Effettuazione di un censimento regionale al fine di configurare una mappatura dei laboratori accreditati per la ricerca delle micotossine.
- Costituzione di una rete coordinata nazionale di laboratori al fine di armonizzare le attività di controllo.
- Programmazione di un piano di controllo prioritario basato sull'analisi del rischio per evidenziare le tematiche più rilevanti in fatto di contaminazione da micotossine.
- Divulgazione di linee guida riguardanti gli aspetti pratici legati alla fase di campionamento e analisi delle micotossine.
- Diffusione di piani di formazione del personale preposto alla effettuazione delle attività di campionamento e analisi.
- Organizzazione di prove interlaboratorio volte sia all'ottenimento di metodi validati sia alla valutazione della efficienza dei laboratori impegnati nel controllo dei prodotti alimentari e dei mangimi.

Bibliografia

1. Regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 165/1 del 30.4.2004

2. Regolamento (CE) n. 854/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 139/206 del 30.4.2004.
3. Regolamento (CE) N. 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 70/12 del 9.3.2006
4. Regolamento (CE) n. 1881/2006 Della Commissione del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 364/5 del 20.12.2006.
5. Decisione della Commissione 2006/504/CE del 12 luglio 2006 che stabilisce condizioni particolari per l'importazione di determinati prodotti alimentari da alcuni paesi terzi a causa del rischio di contaminazione da aflatoxine di tali prodotti. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 199/21 del 21.7.2006.
6. Raccomandazione Della Commissione 2006/583/Ce del 17 agosto 2006 sulla prevenzione e sulla riduzione delle *Fusarium*-tossine in cereali e prodotti derivati. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 234/35 del 29.8.2006.
7. Raccomandazione della Commissione 2006/576/CE del 17 agosto 2006 sulla presenza di deossivalenolo, zearalenone, ocratossina A, tossine T-2 e HT-2 e fumonisine in prodotti destinati all'alimentazione degli animali. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 229/7 del 23.8.2006.
8. Italia. DPR del 26/03/1980, n. 327 - Regolamento di esecuzione della L. 30 aprile 1962, n.283, e successive modificazioni, in materia di disciplina igienica della produzione e della vendita delle sostanze alimentari e delle bevande. *Gazzetta Ufficiale* n. 193 del 16/07/1980.

MESSA A PUNTO DI UN METODO IN HPLC PER LA DETERMINAZIONE DELL'AFLATOSSINA B₁ IN CAMPIONI DI MAIS E MANGIME

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

Introduzione

L'aflatossina B₁ (AFB₁) è una micotossina prodotta principalmente da due specie del genere *Aspergillus*, l'*A. flavus* e *A. parasiticus*. (1, 2) Le matrici principalmente suscettibili da contaminazione sono cereali e prodotti a base di cereali (frumento, mais, orzo, avena, segale, pasta, pane, polenta, ecc), semi oleaginosi (arachidi, girasole, semi di cotone, ecc.), frutta secca ed essiccata (pistacchi, mandorle, noci, nocciole, fichi secchi, ecc.), spezie (peperoncino, pepe, mostarda, zenzero, ecc.).

Il Regolamento CE 1881/2006 (3) riporta i limiti per le micotossine nelle diverse matrici alimentari e per quanto riguarda le aflatossine nei cereali prevede un limite di 2,0 µg/kg per la AFB₁ e di 4,0 µg/kg per le aflatossine totali (AFs – somma delle aflatossine B₁, B₂, G₁ e G₂).

I limiti di legge fissati dall'Unione Europea per le aflatossine nel mais, a differenza di quelli per altri cereali, sono differenziati a seconda che si riferiscano alla granella o ai prodotti derivati dalla molitura. I limiti dei prodotti derivati a base di mais sono quelli precedentemente riportati e riferiti ai cereali in generale; mentre per il mais che debba essere sottoposto ad ulteriori trattamenti prima di essere destinato all'alimentazione umana i limiti sono più alti 5,0 µg/kg per la AFB₁ e 10.0 per le AFs. Tali limiti sono stati fissati prendendo in esame studi effettuati sulla distribuzione della contaminazione da micotossine nelle varie frazioni di molitura (4).

L'aflatossina B₁ è classificata dall'*International Agency for Research on Cancer* (IARC) come cancerogena per l'uomo (gruppo 1); viene escreta inalterata attraverso il tratto intestinale, coniugata attraverso le vie biliari e urinarie e come aflatossina M₁ (AFM₁) nel latte come risultato del *carryover* dai mangimi (5).

Il mais, tra le matrici potenzialmente contaminate da aflatossina B₁, è forse il cereale di più largo consumo collocandosi pertanto tra i maggiori responsabili dell'esposizione a tale micotossina. La disponibilità di un metodo analitico specifico per la determinazione della aflatossina B₁ in campioni di mais e di mangimi a base di mais, messo a punto in un intervallo di concentrazione in armonia con i limiti di legge attualmente in vigore riveste pertanto una notevole importanza.

Il metodo è stato messo a punto su due differenti matrici, il mais tal quale e una formulazione mangimistica a base di mais e a diversi livelli di contaminazione. I campi di concentrazione sono stati scelti, come sopramenzionato, tenendo in considerazione i limiti di legge in vigore nella Comunità Europea.

Materiali e metodi

Le prove analitiche per la messa a punto del metodo sono state effettuate su campioni di mais e mangime. La granella di mais è stata macinata e omogeneizzata in laboratorio, così come i campioni di mangime a base di mais. Al fine di poter verificare l'applicabilità del metodo a diversi livelli di contaminazione sono stati reperiti materiali naturalmente contaminati a diversa concentrazione di aflatoossina B₁; inoltre, per il calcolo del fattore di recupero sono stati reperiti anche materiali non contaminati. I livelli di concentrazione presi in esame sono stati i seguenti:

- *Campioni di mais:*
 - (a) < limite di quantificazione (*Limit Of Quantification*, LOQ)
 - (b) 1,70 µg/kg
 - (c) 17,60 µg/kg
- *Campioni di mangime:*
 - (d) <LQ
 - (e) 6,00 µg/kg
 - (f) 18,00 µg/kg

Reagenti

Tutti i reagenti impiegati sono di grado analitico noto; ove non specificato l'acqua si intende di grado 3 (ISO 3696).

- (a) PBS – Sciogliere in 900 mL di acqua 0,20 g di KCl, 0,20 g di KH₂PO₄, Na₂HPO₄ [1.16 g; disodio idrogeno fosfato 12 H₂O (2,92 g)], e 8,00 g di NaCl. Correggere il pH a 7,4 (con HCl 0,1 M o NaOH 0,1 M). Portare a 1,0 L. In alternativa possono essere usate le tavolette di PBS in commercio.
- (b) Piridinio idrobromuro perbromuro (PBPB) - CAS No.39416-48-3.
- (c) Bromuro di potassio.
- (d) Acido trifluoroacetico per spettrofotometria.
- (e) Acetonitrile per HPLC.
- (f) Metanolo per HPLC.
- (g) Acqua per HPLC (Grado 1, ISO 3696).
- (h) Solvente di estrazione: metanolo-acqua (80+20, v/v)
- (i) Fase mobile: acqua-acetonitrile-metanolo (54+17+29, v/v/v).
- (j) Derivatizzante post-colonna – sciogliere 25 mg di PBPB in 500 mL H₂O. La soluzione può essere conservata per 4 giorni al riparo dalla luce a temperatura ambiente.
- (k) Toluene-acetonitrile (90+10, v/v).
- (l) Materiale di riferimento di aflatoossina B₁ in polvere.
- (m) Soluzione standard madre di aflatoossina B₁ – 10,0 µg/mL in toluene-acetonitrile (90+10, v/v).
- (n) Soluzione standard di lavoro di aflatoossina B₁ – prelevare 100 µL della soluzione (m) e trasferirli in un matraccio tarato da 10 mL. Portare a secco sotto flusso di azoto. Portare a volume con metanolo-acqua (4+6, v/v). La soluzione così ottenuta avrà una concentrazione di 100 ng/mL.
- (o) Soluzioni standard di calibrazione di aflatoossina B₁ – prelevare dalla soluzione (n) e trasferire in un set di matracci tarati i volumi riportati in Tabella 1. Portare a volume con metanolo-acqua (4+6, v/v).

La concentrazione della soluzione standard madre di aflatoossina B₁ (m) è stata verificata spettrofotometricamente seguendo le indicazioni riportate dall'AOAC (6).

Tabella 1. Aliquote da prelevare per la preparazione delle soluzioni standard di calibrazione di aflatoxina B₁

Soluzioni standard di calibrazione di AFB ₁	Aliquote di soluzione standard di lavoro di AFB ₁ , µL	Matracci tarati mL	Concentrazione AFB ₁ ng/mL
1	20	50	0,04
2	40	10	0,4
3	80	10	0,8
4	200	10	2,0
5	240	10	2,4

Apparecchiature

Le apparecchiature utilizzate sono state le seguenti:

- (a) Mulino Romer labs.
- (b) Blender – capacità 1 L, alta velocità (20.000 rpm).
- (c) Filtri di carta – diametro 24 cm.
- (d) Filtro a microfibra di vetro – diametro 11 cm.
- (e) Sistema da vuoto – per immunoaffinità.
- (f) Vetreria tarata – 5, 10, and 50 mL.
- (g) Pompa HPLC –flusso tra 0,20 e 1,00 mL/min.
- (h) Sistema di iniezione – capacità del *loop* tra 100 e 1000 µL.
- (i) Colonna per HPLC a fase inversa – 4,6 x 250 mm, 5 µm, LC-18 o ODS-2.
- (j) Sistema di derivatizzazione post-colonna – pompa HPLC, valvola a T, tubi di reazione 450 x 0,5 mm id in politetrafluoroetilene (PTFE).
- (k) Spettrofluorimetro – lunghezze d'onda di eccitazione 365 nm, di emissione 435 nm.
- (l) Pipette – 25 mL.
- (m) Bilancia analitica – accuratezza ± 0,1 mg.
- (n) Bilancia tecnica – accuratezza ± 0,01 g.
- (o) Micropipette – 20-1000 µL.
- (p) Colonne di immunoaffinità – con anticorpi specifici per aflatoxina B₁.

Messa a punto del metodo

Il metodo è stato messo a punto con lo scopo di fornire uno strumento versatile che possa essere utilizzato nel controllo ufficiale di campioni di mais e mangime. Il metodo deve dunque avere un buon limite di quantificazione in modo da garantire risultati affidabili per tutti i laboratori del controllo ufficiale e una buona efficienza basata sul calcolo del fattore di recupero; inoltre il metodo deve coniugare le buone prestazioni con una certa rapidità di esecuzione. A tal fine sono stati indagati e ottimizzati diversi parametri:

– *Quantitativo di campione da sottoporre ad analisi*

La scelta della porzione di campione su cui eseguire la determinazione analitica è legata sia alla variabilità del campione sia alla micotossina, e le aflatoxine in particolare, presentano una contaminazione molto eterogenea nella matrice, dunque benché il campione sia stato prelevato seguendo opportuni piani di campionamento, e benché siano stati presi tutti gli accorgimenti necessari per minimizzare tale eterogeneità, è sconsigliabile pesare, per l'analisi, meno di 50 g di campione. Altro fattore che influenza

la decisione del quantitativo di campione da analizzare è il limite di quantificazione associato al metodo. Non essendoci restrizioni particolari circa il LQ, per evitare un ulteriore contributo alla variabilità, si è deciso di pesare 50,0 g di campione da sottoporre all'analisi. Per facilitare l'estrazione della tossina dal campione aumentando la forza ionica, al campione vengono aggiunti 5,0 g di NaCl.

– *Efficienza di estrazione*

Sono state testate diverse miscele di estrazione, acetonitrile:acqua 85:15 v/v; acetone:acqua 60:40 v/v; metanolo:acqua 80:20 v/v. Per verificare l'efficienza di estrazione si è adoperato il calcolo del fattore di recupero. Confrontando i valori ottenuti per i diversi solventi di estrazione si è verificato che la condizione migliore è rappresentata dalla miscela metanolo:acqua 80:20 v/v. Il campione estratto viene passato su filtro di carta.

– *Diluizione*

Il campione filtrato (20 mL) viene diluito con il PBS (20 mL) al fine di facilitare il successivo passaggio di purificazione. La diluizione con PBS comporta in questo, come del resto in molti altri casi, una precipitazione che intorpidisce il filtrato. Per ovviare ad eventuali problemi durante il passaggio in colonna di immunoaffinità si può procedere in due diverse direzioni, vale a dire aumentando la percentuale di diluizione del filtrato oppure procedendo ad una seconda filtrazione su filtro a microfibra di vetro. Una diluizione più spinta aumenta il valore del LQ a meno che non si decida di passare una maggiore quantità di campione diluito in IAC allungando i tempi di analisi. La valutazione di questi due fattori ha portato ad optare per la seconda filtrazione non penalizzando il limite di quantificazione e mantenendo ragionevoli i tempi di analisi.

– *Purificazione su colonna di immunoaffinità*

La purificazione del campione viene effettuata tramite passaggio del filtrato su colonna di immunoaffinità. Le IAC consentono una maggiore purificazione del campione perché basate sulla reazione altamente selettiva tra antigene e anticorpo, e garantiscono pertanto maggiore specificità e selettività. Molti metodi per la determinazione delle micotossine in matrici complesse prevedono la purificazione in IAC prima della analisi in HPLC (7). Per poter individuare le migliori condizioni analitiche è necessario tenere in considerazione da una parte il funzionamento e i requisiti delle colonne di immunoaffinità e dall'altra i tempi di analisi. Le colonne di immunoaffinità devono contenere anticorpi monoclonali per l'aflatossina B₁, devono avere una capacità di carico di almeno 40 ng di AFB₁ e devono fornire un valore di recupero almeno dell'80%. In questo studio sono state impiegate le colonne di immunoaffinità *Easy-extract aflatoxin* (R-Biopharm Rhône Ltd., Glasgow, UK). La capacità di carico della IAC stabilisce il limite superiore di concentrazione di tossina che è possibile determinare. Il quantitativo di campione da passare in IAC invece resta determinato dalle valutazioni fatte per la scelta della percentuale di diluizione. Tenendo in considerazione la capacità di carico, la diluizione e la necessità di diminuire il più possibile i tempi di analisi si è deciso di passare in colonna di immunoaffinità 20 mL di campione diluito.

La IAC viene poi lavata con acqua per rimuovere meccanicamente eventuali impurezze e la tossina eluita con metanolo (2 mL). L'eluato viene raccolto e portato a volume con acqua direttamente in matraccio tarato da 5 mL.

– *Condizioni cromatografiche*

La scelta delle condizioni cromatografiche è dettata dalla necessità di avere un cromatogramma caratterizzato da una buona risoluzione del picco di interesse, con un

tempo di ritenzione ragionevole. In questo studio l'attenzione si è concentrata sulla determinazione della sola aflatoxina B₁ ma nel cromatogramma di campioni naturalmente contaminati potrebbero essere presenti anche i picchi cromatografici delle aflatoxine B₂, G₁ e G₂, è quindi importante avere un cromatogramma libero da interferenze nella zona di eluizione delle aflatoxine e verificare la risoluzione del picco di AFB₁. In Figura 1 è riportata la sovrapposizione dei profili cromatografici di uno standard di AFs e di un campione naturalmente contaminato.

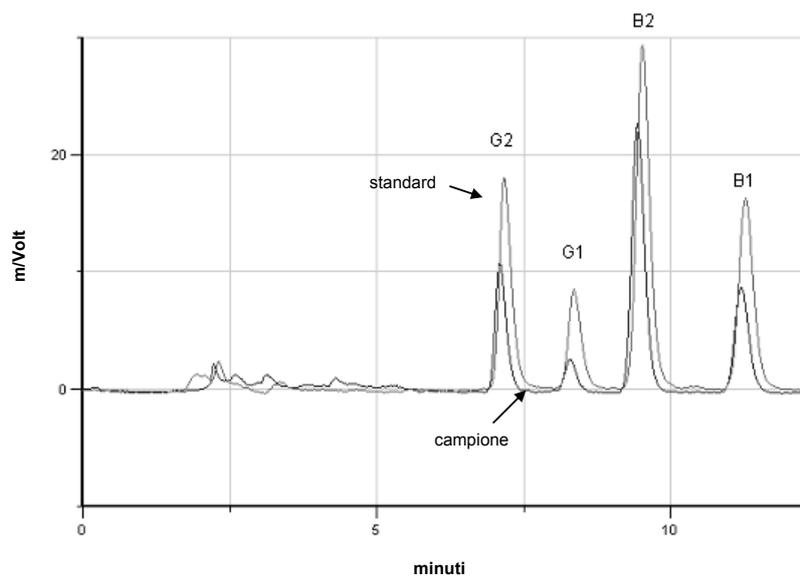


Figura 1. Sovrapposizione dei profili cromatografici di uno standard di aflatoxina B₁ e di un campione naturalmente contaminato

La determinazione in HPLC della aflatoxina B₁ è stata condotta seguendo condizioni cromatografiche standardizzate:

- Fase mobile acetonitrile:metanolo:acqua 17:29:54 v/v/v
- Flusso 1 mL/min
- Derivatizzazione post colonna con PBPB – Flusso pompa derivatizzante 0,4 mL/min.
- V_{inj} = 150 µL
- Colonna C18 250x4,6 mm 5µ – La colonna è stata termostata a 40°C±1°C
- Spettrofluorimetro: λ_{ecc} = 365nm; λ_{em} = 435 nm

Risultati e discussione

Le scelte effettuate al fine di ottimizzare il metodo di analisi sono state giustificate nella sezione “Messa a punto del metodo”. Al fine di poter valutare la bontà delle scelte fatte e quindi del metodo è stata calcolata l'esattezza. L'esattezza è definita come grado di concordanza tra il valore medio ottenuto a partire da un grande insieme di risultati di prova e un valore di riferimento accettato (ISO 3534: 3.10).

I valori di esattezza ottenuti sono riportati in Tabella 2.

Tabella 2. Valori di esattezza calcolati per i campioni di mais e di mangime

Matrice	Livello di contaminazione aggiunto ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	N. prove effettuate	Fattore di recupero medio (%)	Deviazione standard ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Mais	2,00	10	86,6	5,1
Mais	5,00	10	85,8	2,1
Mangime	5,00	10	104,0	1,0
Mangime	20	10	94,0	1,0

Tali valori sono più che soddisfacenti, sia per i livelli più bassi, sia per quelli più alti, se paragonati con le performance richieste nel Regolamento CE 401/2006 (8), che prevedono un valore di recupero medio compreso tra 50 e 120% per una contaminazione da $\text{AFB}_1 < 1,0 \mu\text{g}/\text{kg}$, tra 70 e 110% per un intervallo di contaminazione tra 1 e $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ e compreso tra 80 e 110% per un intervallo di contaminazione da $\text{AFB}_1 > 10 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Il metodo messo a punto è stato oggetto di uno studio collaborativo di validazione che ha dato esiti soddisfacenti ed è in corso di pubblicazione sul *Journal of AOAC* (9).

Il metodo sviluppato in questo studio ha messo a disposizione un valido strumento per l'analisi in HPLC per la determinazione della aflatossina B_1 nel mais, da utilizzare nelle attività di controllo ufficiale sia dei prodotti destinati al consumo umano sia di quelli utilizzati per l'alimentazione zootecnica in ottemperanza ai Regolamenti EC 1881/2006 (3) e EC 882/2004 (10).

Bibliografia

1. Fanelli C, Fabbri AA, Passi S. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* during incubation with lipid sources in culture media. *Trans Br Mycol Soc* 1981;77:416-9.
2. Dashek WV, Llewellyn GC. Aflatoxin and plants. *Adv Pol Microbiol* 1982;21:65-84.
3. Regolamento (CE) No. 1881/2006 del 19 dicembre 2006. *Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea* L364/5-24.
4. Brera C, Catano C, De Santis B, Debegnach F, De Giacomo M, Pannunzi E, Miraglia M. Effect of Industrial Processing on the Distribution of Aflatoxins and Zearalenone in Corn Milling Fractions. *J Agr Food Chem* 2006;54:5014-9.
5. International Agency for Research on Cancer. *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*. Vol. 82. Lyon: IARC; 2002.
6. Horwitz W, Latimer GW (Ed.). *Official methods of analysis of AOAC International*. 17th edition. Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists International; 2000
7. Scott PM, Trucksess MW. Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. *J AOAC Int* 1997;80:941-9.
8. Regolamento (CE) No. 401/2006 del 23 febbraio 2006. *Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea* L70/12-34.
9. Brera C, Debegnach F, Minardi V, Pannunzi E, De Santis B, Miraglia M. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxin B_1 in corn samples: collaborative study. *J AOAC Int* 2007;86(6):1179-86.
10. Regolamento (CE) No. 882/2004 del 29 aprile 2004. *Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea* L165.

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 Chimica Organica e Industriale, Università di Parma

(b) Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Consiglio per la Ricerca e sperimentazione in Agricoltura, Roma

Introduzione

Le fumonisine comprendono una famiglia di micotossine, strutturalmente simili, prodotte dal metabolismo secondario di alcuni funghi del genere *Fusarium*, in particolare *F. verticillioides* (sinonimo: *F. moniliforme*) e *F. proliferatum*, largamente diffusi nel suolo e come contaminanti dei cereali, soprattutto del mais (1). Da quando è stata definita per la prima volta la struttura chimica delle fumonisine (2) sono stati identificati numerosi tipi di molecole appartenenti alla medesima famiglia. Tuttavia soltanto le fumonisine del gruppo B (FB₁, FB₂ ed FB₃) si ritrovano frequentemente e a livelli significativi nei substrati naturalmente contaminati.

L'assunzione di alimenti contaminati da fumonisine è causa di numerose patologie negli animali (3,4), mentre per quanto riguarda i rischi per la salute umana tale assunzione è stata considerata sia come fattore di rischio per i difetti del tubo neurale in popolazioni molto esposte (5,6) sia come fattore associato all'incidenza di cancro esofageo (7) e cancro epatico (8). Le fumonisine B₁, B₂ e la fusarina C sono state classificate dalla *International Agency for Research on Cancer* (IARC) nel gruppo 2B (9), ossia come possibile cancerogeno per l'uomo. Per tale ragione, nella valutazione complessiva del rischio di esposizione alle fumonisine attraverso gli alimenti occorre considerare che tale rischio risulta essere fortemente dipendente dal tipo di procedimento tecnologico al quale viene sottoposta la materia prima, soprattutto riguardo alla macinazione e alle varie fasi di processo che portano al prodotto finito. In quest'ultimo caso, in particolare, il trattamento dei prodotti ad alte temperature o con alcalinizzanti (es.: nixtamalizzazione) può comportare rischio di una sottostima del reale grado di contaminazione da fumonisine dovuto, probabilmente, sia a possibili modificazioni strutturali (es. idrolisi delle catene laterali delle micotossine) sia all'eventuale legame delle stesse con componenti della matrice di varia natura come, ad esempio: proteine, zuccheri, grassi, ecc. (10, 11).

In questo studio preliminare sono riportati i risultati relativi alle analisi cromatografica (LC-MS/MS: *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*) e immunoenzimatica (ELISA, *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) delle fumonisine in estratti di mais naturalmente contaminato, in presenza e 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.

Materiali e metodi

Preparazione campioni (n. 3 + bianco) di frumento macinato: addizione di aliquota di FB₁ (Sigma F-1147) in soluzione di alcole metilico (100 ng/ μ L) a g 5 di campione (x 3 repliche) pari

alla concentrazione finale di 1125 ppb, conservazione dei campioni a +4°C per 48 ore. Estrazione e analisi secondo metodica ELISA delle aliquote, conservate alle temperature di +25°C e -20°C, ad intervalli di tempo stabiliti (T_0 , T_7 = gg7 e T_{21} = gg 21).

Preparazione campioni

La preparazione dei campioni è stata effettuata secondo le seguenti procedure:

- *Mais macinato* - matrice certificata OR SELL, (n. 6 campioni in totale)
g 5 (x 3 repliche) di matrice + 11.25 mL di acqua distillata e g 5 (x 3 repliche) di matrice + 11.25 mL di acqua distillata con 5000 U di α -amilasi pancreatica (SIGMA), incubazione a 37°C per 6 minuti, aggiunta di mL 26,25 di alcole metilico (grado HPLC, C. Erba), agitazione per 3 minuti, filtrazione (Whatman n. 1), suddivisione in aliquote e conservazione di tutti i campioni alle temperature di +4°C e +30°C. Analisi ad intervalli di tempo stabiliti (T_0 , T_1 = gg 2, T_2 = gg 5 e T_3 = gg8) con metodi HPLC-MS/MS ed ELISA.
- *Frumento duro* – sfarinato integrale, (n. 3 repliche + bianco)
ogni replica è stata addizionata con una aliquota di FB_1 (Sigma) disciolta in CH_3OH , pari ad una concentrazione finale di 1125 ppb; gli estratti, conservati alle temperature di +25°C e -20°C, sono stati analizzati ad intervalli di tempo stabiliti con metodo ELISA.

Le condizioni operative dei metodi impiegati sono state le seguenti:

- *Analisi ELISA*
È stata applicata la metodica del kit Ridascreen Fumonisin 3401, (R-Biopharm), con specificità pari al 100% per FB_1 , circa 40% per FB_2 e circa 100% per FB_3 ; l'analisi è stata eseguita utilizzando l'analizzatore automatico BRIO (SEAC) e il lettore per micropiastre SIRIO S (SEAC).
- *Analisi LC-MS*
Analisi effettuate mediante un sistema LC-MS costituito da un modulo separativo 2695 Alliance (Waters Co., Milford, MA, USA) accoppiato ad uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo QuattroTM con sorgente electrospray (Micromass, Waters). Condizioni cromatografiche: colonna C18 XTerra Waters narrowbore (250 mm× 2,1 mm, 5 μ m); flusso: 0,2 mL/min, temperature: 30°C; volume di iniezione: 10 μ L. L'eluizione in gradiente è stata effettuata con H_2O (eluent A) e CH_3OH (eluent B), entrambi acidificati con $HCOOH$ 0,1%. Le condizioni di massa hanno utilizzato ionizzazione ESI positiva, capillare 3,2 kV, cono 30 V, energia di collisione 30 eV. L'acquisizione è stata effettuata in MRM monitorando le transizioni caratteristiche di ciascun composto analizzato.

Risultati e discussione

Lo studio della stabilità nel tempo di fumonisin B_1 standard, addizionata ad estratti di frumento (Figura 1) ha evidenziato da un lato un netto decremento di concentrazione tra T_0 a T_7 , con successiva tendenza alla stabilizzazione della risposta, dall'altro un effetto trascurabile della temperatura sulla stabilità degli estratti. Osservando l'andamento della concentrazione di fumonisine negli estratti di mais naturalmente contaminato (Figura 2) si può notare una diminuzione dei valori medi di concentrazione tra T_0 e T_1 e un successivo aumento della risposta tra T_1 e T_3 con tendenza alla stabilizzazione. Inoltre, mentre appare non significativo l'effetto della temperatura, appare sufficientemente evidente la tendenza a valori medi più elevati in presenza di α -amilasi.

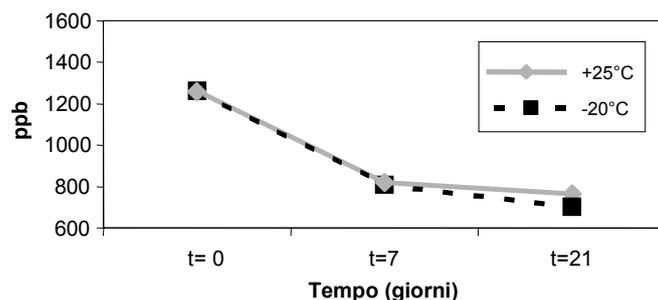


Figura 1. Test ELISA: valori medi di fumonisin B₁ in estratti di sfarinato integrale di frumento addizionato con FB₁.
Sono di seguito riportati i valori di CV%: +25°C: t₀=14, t₇=13, t₂₁=2; -20°C: t₀=14, t₇=9, t₂₁=5.

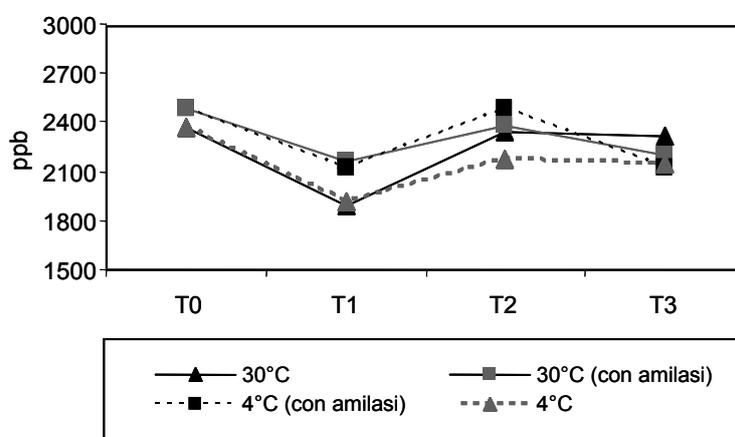


Figura 2. Test ELISA: valori medi di fumonisine in estratti di mais naturalmente contaminato.
Sono di seguito riportati i valori di CV%: +4°C: T₀=14, T₁=11, T₂=8, T₃=15; con amilasi: T₀=16, T₁=36, T₂=32, T₃=14; +30°C: T₀=14, T₁=10, T₂=7, T₃=12; con amilasi: T₀=16, T₁=32, T₂=25, T₃=10

Gli estratti ottenuti dal mais naturalmente contaminato sono stati sottoposti anche ad analisi mediante LC-ESI-MS/MS, in modo da valutare sia la stabilità delle fumonisine presenti, sia l'eventuale presenza di ulteriori composti di degradazione delle stesse.

I risultati riportati nella Figura 3, relativi alle fumonisine totali, comprendenti FB₁, FB₂, FB₃ e derivati idrolizzati (HFB₁, HFB₂ e HFB₃), mostrano un andamento pressoché costante tra T₁ e T₃, a differenza di quanto osservato mediante test ELISA.

Se però si osserva l'andamento dei valori di concentrazione di FB₁ e HFB₁ (Figura 4), è evidente la progressiva idrolisi della forma nativa con conseguente aumento della forma idrolizzata. Anche in questo caso l'effetto dell' α -amilasi sulla reazione di idrolisi sembra trascurabile, mentre la temperatura sembra incrementare la cinetica della reazione.

L'andamento dei valori del test immunoenzimatico tra le fasi T₀ e T₁, sia negli estratti di frumento che in quelli di mais, sembra trovare giustificazione nella progressiva diminuzione della FB₁ nel tempo e nel concomitante aumento della forma idrolizzata. Le differenti temperature di incubazione dei campioni sembrano non incidere in modo particolarmente significativo su quanto osservato

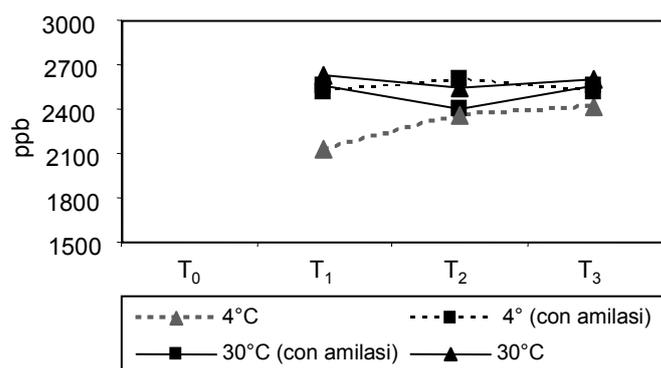


Figura 3. LC-MS/MS: valori medi di FB₁ e HFB₁ su estratti di mais.
 Sono riportati i valori di CV%: +4°C: T₁=3, T₂= 3, T₃=6; con amilasi: T₁=21, T₂= 20, T₃= 26; +30°C: T₁=22, T₂= 23, T₃=23; con amilasi: T₁=19, T₂=18, T₃= 21

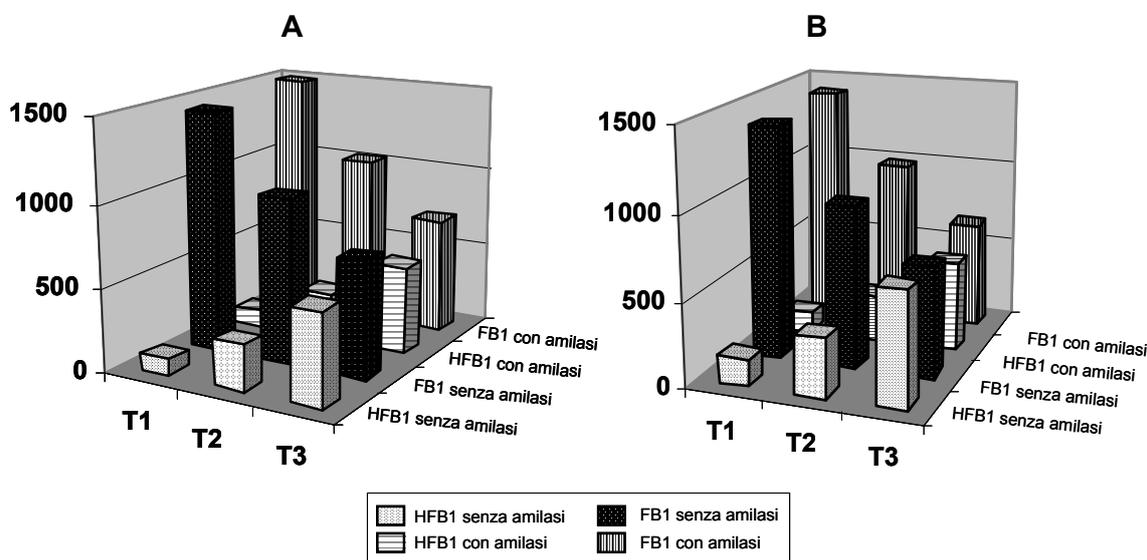


Figura 4. LC-MS/MS: valori medi di concentrazione di FB₁ e HFB₁ nei campioni a +4°C (A) e +30°C (B).
 Sono riportati i valori di CV%: +4°C: T₁=3, T₂= 3, T₃=6; con amilasi: T₁=21, T₂= 20, T₃= 26.
 +30°C: T₁=22, T₂= 23, T₃=23; con amilasi: T₁=19, T₂=18, T₃= 21

La Figura 5, si riferisce ai cromatogrammi di FB₁ e di HFB₁ registrati al tempo T₁ (A) e ai cromatogrammi di massa registrati in T₃ (B); in questi ultimi si evidenzia la presenza di alcuni picchi attribuibili a composti contenenti lo scheletro amminopentolico della fumonisina.

È interessante notare che la comparsa dei composti di coniugazione inizia ad evidenziarsi solo dopo T₁ ed è massima in T₃: tale fenomeno potrebbe giustificare l'aumento di risposta che si riscontra nell'analisi mediante ELISA, dovuta probabilmente ad un parziale riconoscimento di tali derivati da parte dell'anticorpo. La comparsa di tali derivati potrebbe essere dovuta ad un fenomeno di parziale rilascio dei coniugati dalle componenti proteiche o polisaccaridiche ad elevato peso molecolare, indotto dalla loro permanenza in ambiente idroalcolico per un tempo

abbastanza lungo. Il legame tra fumonisina e proteine e/o amido potrebbe non impedire il riconoscimento dell'epitopo da parte dell'anticorpo.

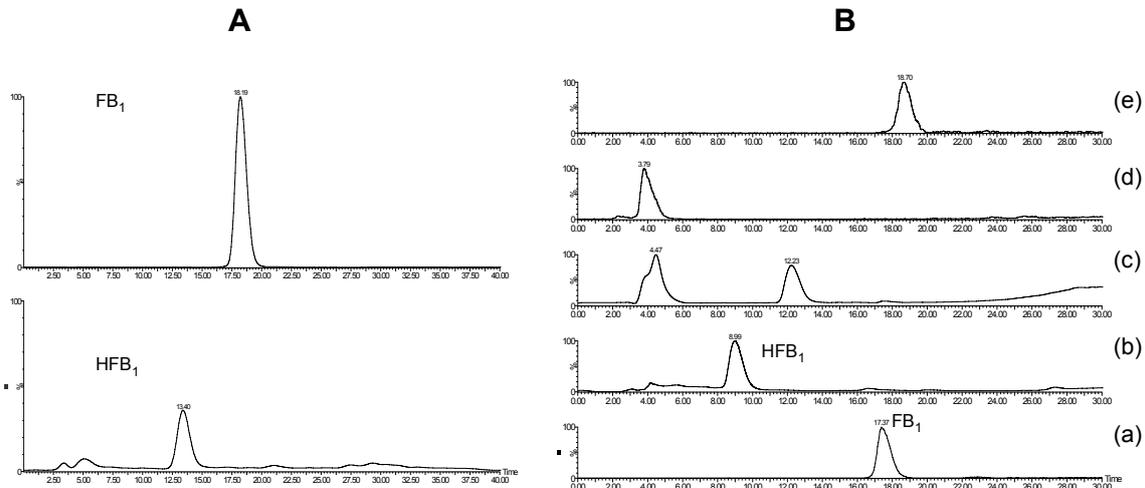


Figura 5. (A) Cromatogrammi di FB1 e HFB1 in T1. (B) Cromatogrammi di composti contenenti lo scheletro amminopentolico della fumonisina (tracciate c, d, e) e di FB1 e HFB1 (tracciate a e b, rispettivamente), registrati in T3

L'utilizzazione dei due metodi di analisi ha messo in evidenza da un lato un netto decremento della fumonisina negli estratti tra T_0 e T_1 in entrambi le matrici e dall'altro la presenza di composti aventi lo scheletro amminopentolico della fumonisina nella matrice di mais naturalmente contaminata.

La somma delle diverse dinamiche nel tempo (rapida formazione degli idrolizzati e lento rilascio dei composti dalla matrice riconoscibili dall'anticorpo) potrebbe fornire una spiegazione plausibile all'andamento dei valori di concentrazione riportati nella Figura 1.

Il confronto dei risultati relativi agli estratti di frumento e di mais pone l'attenzione sul diverso andamento nel tempo della concentrazione delle fumonisine nei due tipi di matrice che suggerisce una possibile diversa interazione micotossina-matrice in condizioni di contaminazione artificiale e naturale che, in quest'ultimo caso, sembrerebbe caratterizzata da aspetti di natura più complessa.

Bibliografia

1. Soriano JM, Dragacci S. Occurrence of fumonisins in foods. *Food Research International* 2004;37:985-1000.
2. Bezuidenhout SC, Gelderblom WCA, Gost-Allman CP, Horak RM, Marasas WFO, Spiteller G. *et al.* Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *Journal of the Chemical Society – Chemical Communications* 1988;19:743-5.
3. Marasas WF, Kellerman TS, Gelderblom WC, Coetzer JA, Thiel PG, van der Lugt JJ. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 1988;55:197-203.
4. Bucci TJ, Hansen DK, LaBorde JB. Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin fumonisin B₁. *Natural Toxins* 1996;4:51-2.

5. Hendricks K. Fumonisin and neural tube defects in South Texas. *Epidemiology* 1999;10:198-200.
6. Marasas WFO, Riley RT, Hendricks KA, Stevens VL *et al.* Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and *in vivo*: a potential risk factor for human neural tube defects among population consuming fumonisin-contaminated corn. *J Nutr* 2004;134:711-6.
7. Franceschi S, Bidoli E, Baron A, La Vecchia C. Maize and risk of cancers of the oral cavity, pharynx and esophagus in Northeastern Italy. *Journal of National Cancer Institute* 1990;82:1407-11.
8. Li FQ, Yoshizawa T, Kawamura O, Luo XY, Li YW. Aflatoxins and fumonisins in corn from the high-incidence area for human hepatocellular carcinoma in Guangxi, China. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2001;49:4122-6.
9. WHO-IARC. *Toxins derived from Fusarium moniliforme: Fumonisin B₁ and B₂ and fusarin C*. Lyon: IARC; 1993.
10. Gutema T, Munimbazi C, & Bullerman LB. Occurrence of fumonisins and moniliformin in corn and corn-based food products of U.S. origin. *Journal of Food Protection* 2000;63:1732-7.
11. Park JW, Scott PM, Lau BPY, Lewis A. Analysis of heat-processed corn foods for fumonisins and bound fumonisins. *Food Additives and Contaminants* 2004;12:1168-78.

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*

Introduzione

Nel corso degli anni duemila si è concentrato un notevole interesse attorno allo sviluppo di metodiche in grado di riconoscere precocemente i mutamenti nelle qualità e il deterioramento dei cereali. Ulteriore stimolo alla ricerca su questo argomento è stato fornito dalla disponibilità di tecnologie adeguate, tra le quali ruolo di interesse è ricoperto anche dal naso elettronico, definibile 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. Molte delle indicazioni bibliografiche riguardanti l'impiego del naso elettronico nel settore dei cereali sono relative allo studio degli effetti delle attività metaboliche dei diversi generi e specie fungini (1, 2).

In considerazione dei recenti aggiornamenti legislativi europei, riguardanti anche la contaminazione da micotossine nei cereali destinati agli utilizzi alimentari sia umano che animale, e in relazione alle necessità dell'industria del settore di una costante implementazione dei sistemi di controllo qualitativo delle materie prime che contemporaneamente soddisfino esigenze di efficacia e praticità di impiego, si è inteso attraverso la sperimentazione descritta, fornire un contributo, valutando l'efficacia applicativa del naso elettronico alla determinazione della tossina deossinivalenolo (DON) nel grano duro (*Triticum durum*).

Materiali e metodi

Per la sperimentazione sono stati considerati un totale di 300 campioni, provenienti da diverse regioni geografiche (Francia, Siria, Grecia, USA, Canada, Turchia, Italia, Francia, Spagna, Australia). Ciascun campione è stato suddiviso in frazioni analitiche omogenee conservate ad una temperatura di -20°C.

Ciascun campione è stato sottoposto ad un pannello analitico comprendente: analisi batteriologica attraverso conta batterica totale, indagini per la verifica di naturale presenza di muffe e funghi attraverso analisi microscopica, determinazione della presenza e quantificazione di metalli pesanti (Pb, Cd, Cr), attraverso metodica ad assorbimento atomico, e determinazione della presenza e quantificazione di composti organofosforati (59 parametri), e piretroidi (18 parametri), tramite metodo gascromatografico. Su tutti i campioni sono state svolte analisi per la determinazione di aflatossine B₁, B₂, G₁, G₂, totali e tossine T₂ ed HT₂ tramite saggio

immunoenzimatico, ocratossina A e DON tramite *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) e purificazione con colonna ad immunoaffinità (limite di rilevabilità 0,2µg/kg e 10µg/kg, rispettivamente per le due micotossine). Sul totale di campioni analizzati, sono stati considerati per la successiva analisi tramite naso elettronico (*Electronic Nose*, EN), tutti i campioni risultati positivi alla sola quantificazione del DON e una selezione di campioni risultati negativi all'intero pannello analitico per un totale di 41 campioni.

I risultati delle analisi in HPLC per la determinazione del DON sono stati presi come riferimento per l'impostazione della successiva fase sperimentale, destinando tre aliquote (pari a 3 g ciascuna) per ciascun campione, ad analisi tramite EN. Lo strumento impiegato è stato un EN PEN₂ (Air sense Analytics GmbH, Sherwin, Germany), dotato di 10 sensori MOS (*Metal Oxide Semiconductor*, semiconduttori ad ossidi di metallo), le cui caratteristiche sono riportate in Tabella 1, e accessoriato con autocampionatore.

Tabella 1. Caratteristiche dei sensori MOS del naso elettronico PEN₂ (Air sense Analytics GmbH, Sherwin, Germany)

<i>Identificativo</i>	<i>Nome del sensore</i>	<i>Descrizione</i>	<i>Riferimento</i>
1	W1C-aromatic	Reattività verso composti aromatici	Toluene, 10 ppm
2	W5S-broadrange	Ampio spettro di reattività agli ossidi di azoto e all' ozono. Alta sensibilità e andamento negativo del segnale	NO ₂ , 10 ppm
3	W3C-aromatic	Reattività verso composti aromatici	Benzene, 10ppm
4	W6S-hydrogen	Sensibilità prevalente verso idrogeno	H ₂ , 100 ppb
5	W5C-arom-aliph	Sensibilità verso alcani, composti aromatici, composti scarsamente polari	Propano, 1ppm
6	W1S-broad-methane	Sensibilità al metano (ca. 10 ppm). Ampio spettro di reattività, simile al sensore No. 8	CH ₄ , 100 ppm
7	W1W-sulphur-organic	Reattivo a composti solforati (H ₂ S 0.1 ppm) e organici solforati. Inoltre reattivo a terpeni	H ₂ S, 1 ppm
8	W2S-broad-alcohol	Reattività ad alcoli, composti aromatici. Ampio spettro di reattività	CO, 100 ppm
9	W2W-sulphur-chlor	Reattività a composti aromatici e aromatici solforati	H ₂ S, 1ppm
10	W3S-methane-aliph	Reattività a concentrazioni alte (>100 ppm metano), in alcuni casi molto selettivo	CH ₄ , 10 ppm

Ciascuna aliquota è stata chiusa ermeticamente tramite tappo settato in *vial* da 12 mL e sottoposta ad equilibratura a temperatura ambiente, seguita, poi, da riscaldamento in fornello-agitatore dell'autocampionatore. Inizialmente, dopo il pretrattamento descritto, le analisi sono state impostate inviando lo spazio di testa dei campioni direttamente alle celle dei sensori dello strumento, successivamente, il protocollo è stato implementato, comprendendo nel pretrattamento l'uso di un arricchitore/desorbitore EDU₂ (Air sense Analytics GmbH, Sherwin, Germany). Entrambi i protocolli analitici (con e senza ricorso all'arricchitore/desorbitore) sono stati applicati più volte, variando le impostazioni relative a durata (di equilibratura, riscaldamento, adsorbimento, desorbimento quando applicati, contatto dello spazio di testa con le celle dei sensori), temperatura (di riscaldamento, adsorbimento, desorbimento), nonché flussi

(di adsorbimento, desorbimento e di camera). In ogni caso, i tracciati relativi a ciascuna analisi forniti dall'EN e corrispondenti alle variazioni di resistenza nel tempo di ciascuno dei 10 sensori, sono stati registrati e pretrattati, al fine di poter confrontare correttamente campioni acquisiti in sedute diverse. La formula impiegata a tale scopo è la seguente: $R(j)=[R(j)-R0(j)/R0(j)]$, dove $R(j)$ rappresenta il valore di resistenza elettrica dello specifico sensore e $R0(j)$ la resistenza elettrica della corrispondente "baseline" (3, 4). I dati sono successivamente stati sottoposti ad analisi chemometrica tramite il software statistico SAS (5) al fine di individuare il protocollo meglio caratterizzante e più efficace. La fase esplorativa dei dati è stata svolta prevalentemente attraverso l'applicazione della *Principal Component Analysis* (PCA) in matrice di correlazione, seguita dall'applicazione di modelli di classificazione (*Linear Discriminant Analysis*, LDA) e regressione multipla (*Partial Least Square regression*, PLSr).

Al fine di individuare il protocollo più efficiente per la predizione della concentrazione di DON presente nei campioni, si è proceduto ad una validazione tramite metodo "leave one out".

Risultati e discussione

I campioni positivi all'analisi HPLC per la presenza di DON sono risultati 25, caratterizzati da concentrazioni di analita comprese tra 0,30 e 2,50 ppm. Nello specifico, i valori di contaminazione di 16 campioni sono risultati inferiori ai livelli normativi di 1,75 ppm (Reg. (CE) 856/2005) (6), mentre i rimanenti 9 hanno mostrato contaminazioni superiori (Tabella 2).

Tabella 2. Livelli di contaminazione da DON riscontrati tramite metodica HPLC nei campioni impiegati per la sperimentazione

Identificativo dei campioni	DON (ppm)
1	0,30
2	0,44
3	0,50
4	0,50
5	0,52
6	0,60
7	0,87
8	0,90
9	1,00
10	1,10
11	1,14
12	1,20
13	1,25
14	1,33
15	1,50
16	1,70
17	1,77
18	1,83
19	1,87
20	2,00
21	2,13
22	2,15
23	2,25
24	2,32
25	2,50

Il data set è stato, infine, integrato, considerando 16 campioni negativi all'intero pannello analitico, raggiungendo un totale di 41 campioni sui quali è stato svolto lo studio, comparando i risultati HPLC con quelli forniti dall'analisi con EN. L'esplorazione dei dati, svolta tramite PCA ha consentito di selezionare un protocollo analitico con EN associato all'uso di arricchitore/desorbitore della durata di 28 minuti. Una ulteriore applicazione della PCA sui dati ottenuti dal protocollo selezionato ha permesso di distinguere tra campioni negativi alla presenza di DON e campioni caratterizzati da concentrazioni di micotossina inferiore o superiore ai tenori normativi. In un solo caso un campione a concentrazione di DON compresa tra 0 e 1,75 ppm non è stato localizzato nella nuvola di dati del gruppo corretto d'appartenenza (Figura 1).

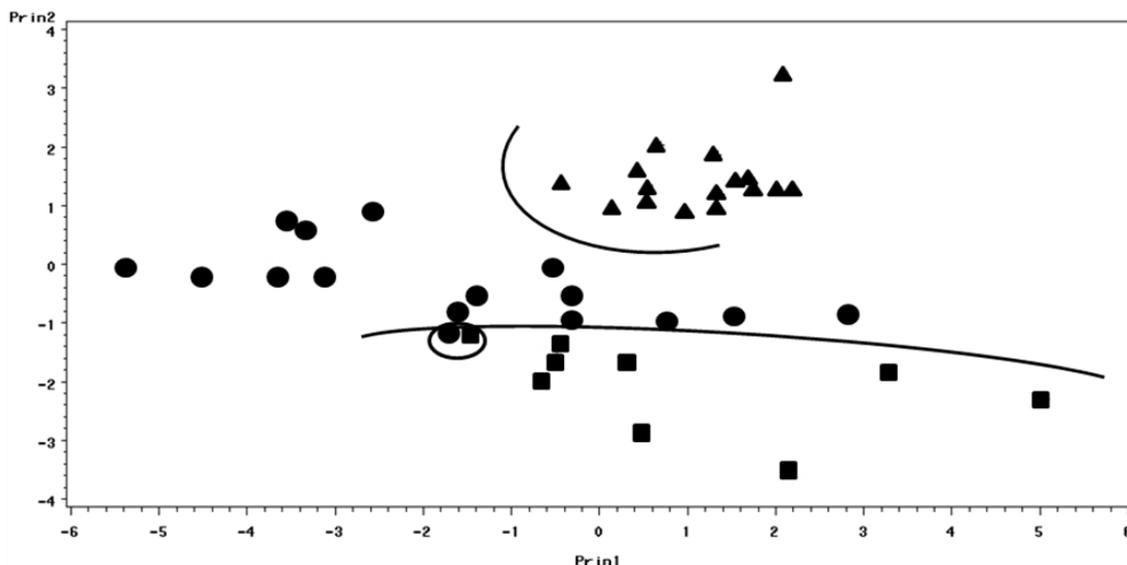


Figura 1. Score plot della PCA.

I simboli di forma triangolare, quadrata e circolare indicano, rispettivamente, i campioni negativi, positivi a concentrazione <1,75 ppm, positivi a concentrazione >1,75ppm alla presenza di DON.
Il simbolo di forma quadrata racchiuso in ellisse indica il campione localizzato non correttamente

La visualizzazione grafica dei tre gruppi tramite score plot derivante dalla PCA permette di evidenziare come la separazione fra campioni sia più evidente in funzione dell'asse delle ordinate del grafico, corrispondente alla seconda componente principale, per la quale gli autovettori di maggior valore sono risultati corrispondenti ai sensori 9-W2W Sulphur-chloride, 3-W3C Aromatic2, 5-W5C Aromatic-aliphatic. Un ulteriore contributo alla distinzione tra gruppi è fornito anche dall'asse delle ascisse, rappresentante la prima componente principale, e i cui autovettori di maggior valore sono risultati corrispondenti ai sensori 4-W6S Hydrogen, 2-W5S Broadrange, 7-W1W Sulphur-organic. Il modello applicato ha mostrato di includere l'89,33% della variabilità totale dei dati attraverso le prime 4 componenti principali (*Principal Component*, PC) con effetti così distribuiti: 48,58% attribuito alla prima PC, 21,88% alla seconda, 10,14% alla terza e 8,73% alla quarta PC.

Al fine di verificare se i tre gruppi di campioni, suddivisi in funzione dei livelli di DON, venissero riconosciuti come classi separate, è stato considerato l'uso di un modello classificativo LDA. Il risultato dell'applicazione del modello ha evidenziato la costituzione di tre classi distinte nelle quali tutti i campioni sono stati classificati correttamente tranne in un caso in cui, confermando i risultati originati dalla PCA, un campione appartenente alla classe

due (concentrazione intermedia di DON) è stato erroneamente attribuito alla classe tre (elevata concentrazione in DON) con un valore PPM (*Posterior Probability of Membership*) pari a 90,32% per l'attribuzione alla classe 3 e 9,68% per l'attribuzione alla classe 2 (Tabella 3).

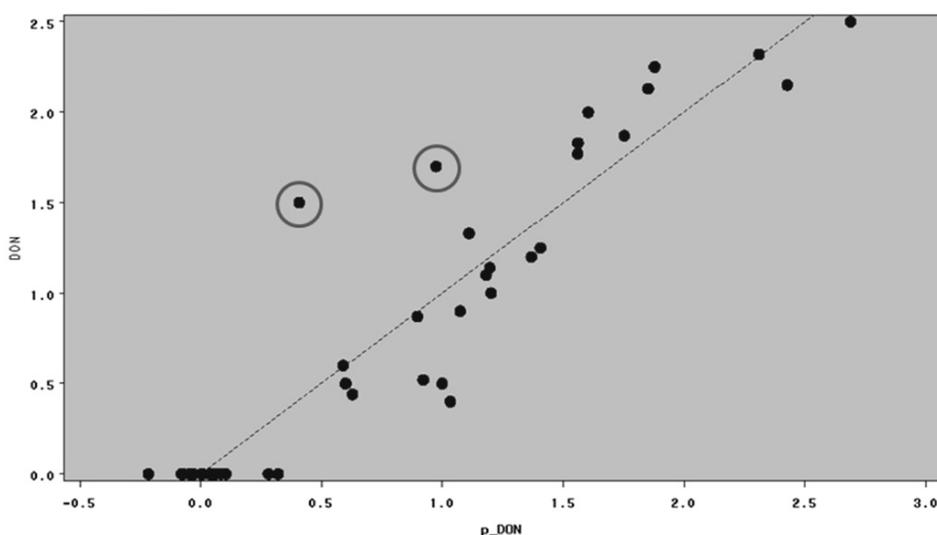
Tabella 3. Risultati dell'applicazione della LDA

Classe	Numerosità	Campioni classificati correttamente
1 (DON=0 ppm)	16	16
2 (0<DON<1,75 ppm)	16	15
3 (DON>1,75 ppm)	9	9

(n. 1 campione identificato come appartenente classe 3)

Il parametro ECE (*Error Count Estimates*) è risultato pari al 3,03% e 12,12% rispettivamente per lo stesso parametro stimato in cross validation.

Al fine di valutare ulteriormente le potenzialità dell'EN a fini predittivi è stata applicata una regressione PLS (Figura 2).



**Figura 2. Risultati dell'applicazione della Partial Last Square regression.
I due campioni cerchiati rappresentano gli outlier**

Il modello ha mostrato le seguenti parametri di PRESS (*Predictive Error Sum of Squares*) 0,39, R2 0,89, adj R2 0,87. La presenza di due campioni outliers (tracciati nella Figura 2) ha indotto un effetto di riduzione delle potenziali performances del modello. Un ulteriore ampliamento del data set potrebbe costituire uno dei possibili interventi di correzione.

Conclusioni

I risultati ottenuti e le caratteristiche di impiego del naso elettronico permettono di poter considerare lo strumento adatto ad analisi di screening inseribile nella routine aziendale per il

controllo dalla presenza di micotossine nelle materie prime. Nell'esperienza descritta il naso elettronico ha permesso, infatti, di ottenere indicazioni sul livello di contaminazione da DON in campioni di frumento duro, distinguendo tra campioni caratterizzati da livelli di micotossine superiori od inferiori a quelli indicati dalla normativa vigente a livello Europeo.

L'analisi è caratterizzata da una durata di circa 30 minuti e da una fase di preparazione del campione minima, praticamente integrata con la fase di determinazione vera e propria. Lo strumento impiegato inoltre, in virtù delle sue limitate dimensioni, può essere considerato portatile e quindi facilmente adattabile a situazioni di campo quali banchine portuali, aree di ricezione merci o di "carico/scarico" in stabilimento.

Considerando, inoltre, la flessibilità della metodica, non sono da escludere ulteriori applicazioni nel controllo dei contaminanti alimentari e nella valutazione dello stato di conservazione.

Bibliografia

1. Magan N, Evans P. Volatiles as an indicator of fungal activity and differentiation between species, and the potential use of electronic nose technology for early detection of grain spoilage. *Journal of Stored Products Research* 2000;36:319-40.
2. Schnurer J, Olsson J, Borjesson T. Fungal volatiles as indicators of food and feeds spoilage. *Fungal Genetics and Biology* 1999;27:209-17.
3. Brudzewski K, Osowski S, Markiewicz T. Classification of milk by means of an electronic nose and SVM neural network. *Sensors and Actuators B* 2004;98:291-8.
4. Brudzewski K, Osowski S, Markiewicz T, Ulaczyk J. Classification of gasoline with supplement of bio-products by means of an electronic nose and SVM neural network. *Sensors and Actuators B* 2006;113:135-41.
5. SAS Institute. *SAS/STAT. User's Guide*. Version 8. Cary, NC, USA: SAS Institute; 1999.
6. Comunità Europea. Regolamento (CE) n. 856/2005 della Commissione, del 6 giugno 2005, che modifica il regolamento (CE) n. 466/2001 per quanto riguarda le *Fusarium*-tossine. *Gazzetta ufficiale* n. L 143, 7 giugno 2005.

ESTRAZIONE E DETERMINAZIONE SIMULTANEA DI DIECI *FUSARIUM*-TOSSINE NEI CEREALI: UN NUOVO APPROCCIO SPERIMENTALE MEDIANTE LC/MS/MS

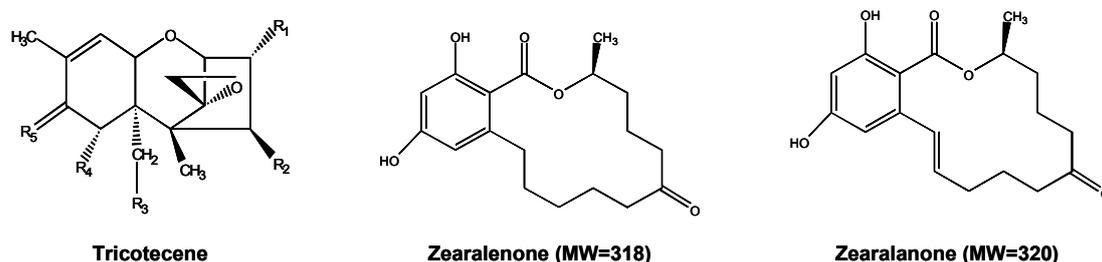
Maria Carmela Somma (a), Rosalia Ferracane (b), Alberto Ritieni (b)

(a) Laboratorio Alimenti Benessere e Sicurezza, Portici (NA)

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

Introduzione

Le micotossine sono metaboliti secondari, tossici, prodotti da diversi funghi sulle derrate agrarie in campo o durante lo stoccaggio (Krska *et al.*, 2001). I tricoteceni e lo zearalenone sono le principali micotossine prodotte dal genere *Fusarium*. I tricoteceni sono comunemente classificati in quattro tipi, A, B, C, D, a seconda del gruppo funzionale presente nella struttura molecolare. I tricoteceni di tipo A comprendono la tossina HT-2, la tossina T-2, il diacetossiscirpenolo (DAS) e il neosolaniolo (NEO) e differiscono dal gruppo di tricoteceni di tipo B, comprendenti il deossinivalenolo (DON), conosciuto anche come deossinivalenolo, il nivalenolo (NIV) e i loro derivati acetilici, rispettivamente 3-acetildeossinivalenolo (3-AcDON) e il fusarenone X (FUS X), per l'assenza di un gruppo carbonilico in posizione C8 (Berthiller *et al.*, 2005) (Figura 1).



Tricotecene	MW	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
Tipo A						
Neosolaniolo (NEO)	382	OH	Oac	Oac	H	OH
HT-2	424	OH	OH	Oac	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
T-2	466	OH	OH	Oac	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Diacetossiscirpenolo (DAS)	366	OH	OH	Oac	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Tipo B						
Deossinivalenolo (DON)	296	OH	H	OH	OH	=O
3-Acetil-DON (3-AcDON)	338	Oac	H	OH	OH	=O
Nivalenolo (NIV)	312	OH	OH	OH	OH	=O
Fusarenone-X (FUS-X)	354	OH	Oac	OH	OH	=O

Figura 1. Struttura chimica delle *Fusarium*-tossine e dello standard interno di Zearalanone (ZAN)

L'esposizione alle *Fusarium*-tossine con la dieta, può indurre una serie di effetti dannosi per la salute degli animali e degli uomini che includono effetti tossici su pelle e superfici mucose, perdita di peso, vomito, reazioni immunosoppressive ed emorragia, inibizione della biosintesi

delle proteine e della sintesi di DNA ed RNA. Lo scopo di questo lavoro sperimentale è stato quello di sviluppare un metodo d'analisi simultanea di dieci *Fusarium*-tossine NIV, DON, FUS-X, 3AcDON, DAS, HT-2, T-2, NEO, ZON (Zearalenone) e ZAN da due matrici bianche: grano e mais, mediante spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS: *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*). Questa procedura consentirebbe un'analisi di più composti mediante una sola corsa cromatografica. Sono state provate tre diverse estrazioni delle *Fusarium*-tossine sopra menzionate, due delle quali sono state seguite da una procedura di purificazione del campione, mentre il metodo estrattivo alla fine validato non ha previsto alcuna fase di *clean-up*.

Materiali e metodi

Materiali

Gli standard dei tricoteceni, di ZON e di ZAN sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia) e conservati a 4°C. Tali standard sono stati poi sciolti in metanolo, singolarmente e aliquote di ognuna di queste soluzioni standard sono state diluite con un miscela CH₃OH/H₂O 70:30; v/v. Le colonne C18 per le prove di *clean-up* sono state acquistate dalla Phenomenex (Aschaffenburg, Germany) mentre le colonne *Trichothecenes* EP dalla R-Biopharm Rhone LTD (Darmstadt, Germany). I reagenti e i solventi sono stati acquistati dalla Merck (Germania) e sono di grado analitico o HPLC. Per la filtrazione degli estratti è stata impiegata carta da filtro tipo Whatman n. 4 fornita dalla Microglass (Italia).

Estrazione del campione

L'estrazione contemporanea dei tricoteceni sopra citati, di ZON e di ZAN è stata effettuata aggiungendo a 10 g di grano e mais finemente triturato, 50 mL di una soluzione CH₃CN/H₂O (84:16; v/v). Dopo essere stato lasciato in agitazione su piano basculante per 1 h, il campione è stato filtrato su carta e 5 mL del filtrato sono stati recuperati.

Sono stati valutati tre metodi differenti di preparazione del campione: nel primo metodo i 5 mL di filtrato recuperati sono stati portati a secco mediante un evaporatore centrifugo (Savant) e direttamente analizzati; nella seconda procedura il filtrato è stato passato su una colonna *Trichothecenes* EP e il residuo portato a secco in Savant. Infine nel terzo metodo è stata utilizzata una procedura di *clean-up* con l'utilizzo di una colonna C18.

Analisi LC/MS/MS

L'analisi di spettrometria di massa è stata realizzata mediante uno spettrometro di massa dell'Applied Biosystem (Toronto, Canada) Sciex API 3000 triplo quadrupolo, con interfaccia APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) ad una temperatura di 450°C. La separazione cromatografica è stata ottenuta usando due micropompe Serie 200 (Perkin Elmer, Canada). L'analisi delle micotossine è stata eseguita utilizzando una colonna Gemini 3u C18 110A, 150x4.60 mm della Phenomenex (USA), termostata a 50°C. I solventi impiegati sono stati una miscela H₂O/CH₃OH (90:10 v/v), 5mM Ammonio Acetato (fase A) e una miscela CH₃OH/H₂O (90:10 v/v), 5mM Ammonio Acetato (fase B). Il gradiente impiegato è stato il seguente: 10-35% B in 7 min, 35-80% B da 7 a 9 min, 80% B costante fino a 13 min, 80-100% B da 13 a 15 min, per poi tornare alle condizioni iniziali in 3 min.

L'acquisizione è stata effettuata in modalità MRM (*Multiple Reaction Monitoring*).

Prove di recupero

In questa fase due matrici bianche, grano e mais sono state contaminate usando una soluzione contenente un mix di standard NIV, DON, FUS-X, NEO, 3ADON, DAS, HT-2, T-2, ZON and ZAN sciolti in metanolo. Le matrici contaminate ad un livello di 250 µg/kg sono state, poi, analizzate per ognuna delle tre differenti procedure descritte (Tabella 1). Infine la validazione del metodo messo a punto, che non ha richiesto l'uso del *clean-up*, è stata effettuata testando tre livelli di contaminazione: 30, 100 e 250 µg/kg.

Tabella 1. Recupero (%) dei campioni di grano contaminati con i tricoteceni, ZON e ZAN

Micotossina	Recupero del grano a 250 µg/kg		
	senza <i>clean-up</i>	con C18	con le colonne Tricotecene EP
NIV	80,4	9	79
DON	89,8	22,3	88
FUS-X	94,6	70	39,5
3AcDON	95	86,8	33,9
T2	91,2	85,6	72
HT-2	95,4	83,6	79,2
DAS	91,5	83,6	98,9
NEO	90,8	75,6	73,6
ZON	114	111	-
ZAN	71,8	48	-

Risultati e discussioni

Procedura d'estrazione

I campioni di grano e mais sono stati estratti con una miscela CH₃CN/H₂O (84:16, v/v). Successivamente sono stati omogeneizzati su piano basculante per 1 h. L'estratto ottenuto è stato poi filtrato su carta e 5 mL di filtrato sono stati portati a secco.

Opportuni esperimenti di recupero sono stati condotti per la validazione del metodo.

Per ognuna delle matrici estratte sono stati provati tre differenti livelli di contaminazione: 250 µg/kg, 100 µg/kg and 30 µg/kg. I risultati degli esperimenti di recupero delle micotossine in esame, su grano e mais sono riportati in Tabella 2.

Tabella 2. Recupero (%) e RDS (%), ottenuti da campioni di grano e mais contaminati con i tricoteceni, ZON e ZAN

Micotossina	Recupero a 250 ppb		Recupero a 100 ppb		Recupero a 30 ppb	
	grano	mais	grano	mais	grano	mais
NIV	80,4±11,5	82,3±6,4	63,4±2,5	68,3±5,8	78±6,4	63±13,9
DON	89,8±12,3	96,5±9,6	95,7±5,5	81,3±17,8	72,1±13,4	71,9±15,5
FUS-X	94,7±1,8	93,9±4,7	90,2±8,3	90,4±7,3	107±12,7	83,2±1,6
3AcDON	95,1±5,1	96,5±10	84,2±4,5	95,6±7	102,6±17,6	110±13,1
T2	91,2±10,6	83,5±17,2	109±7,8	113,3±10,1	109±11,3	103,7±16,1
HT-2	95,5±1,7	104,6±8,5	79,8±14,7	91,7±1,7	106,2±7,6	85,8±0,3
DAS	91,5±5,7	92,8±8,4	84,5±9,3	83,1±9,7	80,6±4	80,8±7,8
NEO	80,8±0,9	86,2±13,2	95±4,8	89,9±14,1	95±4,8	99,5±7,8
ZON	104±15	111±1,4	101±10	115,8±15,8	-	-
ZAN	70,5±4,4	81±5,8	59,1±16,4	79,7±8,2	85±4,2	90,9±15,5

Ottimizzazione dei parametri LC-MS/MS

Le condizioni ottimali per l'analisi di spettrometria di massa (*Declustering Potential*, DP; e *Collision Energy*, CE) sono state ottenute infondendo direttamente in sorgente, soluzioni standard di ogni micotossina analizzata (10 µg/mL) ad un flusso di 5 µL/min. I tricoteceni di tipo B hanno dato una più elevata intensità di ionizzazione nella modalità degli ioni negativi con la formazione di addotti [M+CH₃COO]⁻; mentre i tricoteceni di tipo A nella modalità degli ioni positivi con la formazione di addotti [M+NH₄]⁺, ZON e ZAN ionizzano nella modalità degli ioni negativi, formando le molecole deprotonate [M-H]⁻. Nella Tabella 3 sono riportate le caratteristiche LC/MS/MS degli standard analizzati.

Tabella 3. Caratteristiche LC/MS/MS delle micotossine analizzate

Analita	Tempo di ritenzione (min)	Ione precursore	Ione prodotto	DP	CE
NIV	6,4	371,1 [M+CH ₃ COO] ⁻	59; 281	-35	-15; -22
DON	8,9	355,1 [M+CH ₃ COO] ⁻	265; 59	-31	-19; -45
3Ac-DON	12,05	397,2 [M+CH ₃ COO] ⁻	59; 307	-31	-35; -21
FUS X	11,2	413,3 [M+CH ₃ COO] ⁻	59; 187	-28	-42; -38
NEO	11,4	400,1 [M+NH ₄] ⁺	305,1; 244,9	40	17; 17
T-2	15,9	484,2 [M+NH ₄] ⁺	305,2; 185	35	19,6; 29
HT-2	14,6	442,4 [M+NH ₄] ⁺	263; 215	30	18; 18
DAS	13,4	384,2 [M+NH ₄] ⁺	307,2; 105	40	17; 49
ZAN	17,1	319,1 [M-H] ⁻	275,2; 205,1	-75	-28; -31
ZON	17,4	317,2 [M-H] ⁻	175; 131,2	-75	-32; -37

La Figura 2 mostra il cromatogramma TIC di un campione di grano contaminato ad un livello di 250 µg/kg.

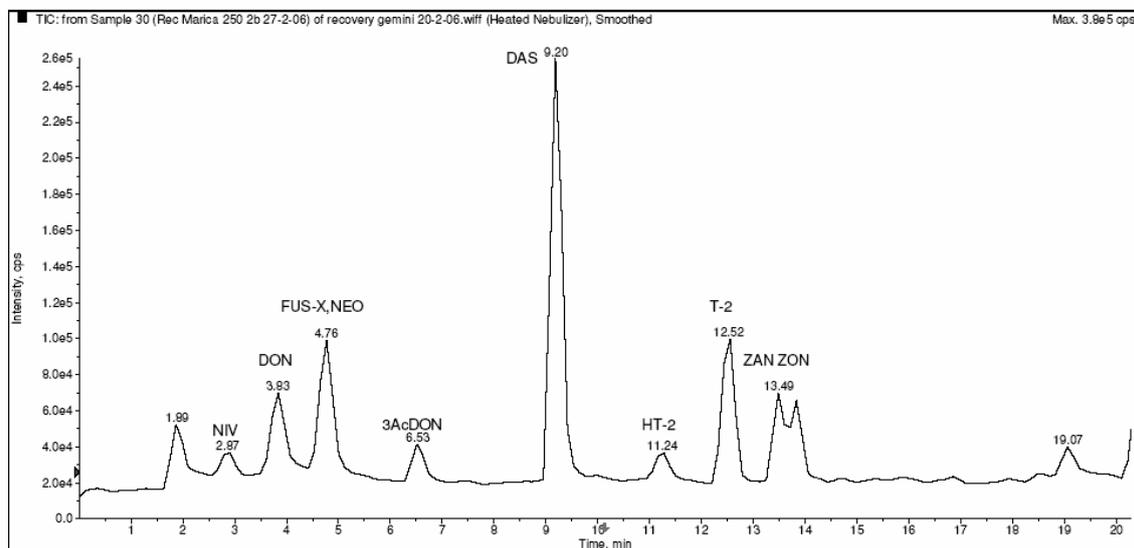


Figura 2. Cromatogramma TIC di un campione di grano contaminato ad un livello di 250 µg/kg

Conclusioni

In questo lavoro è stato sviluppato un metodo estrattivo rapido ed economico, grazie all'assenza del *clean-up*, che consente di ricercare dieci *Fusarium*-tossine in una sola corsa cromatografia.

A tale scopo è stata scelta una tecnica analitica più selettiva della metodica tradizionale per ogni composto analizzato.

Studi futuri potrebbero permettere la validazione del metodo messo a punto attraverso uno screening su campioni commerciali o contaminati naturalmente.

Bibliografia

Krska R, Baumgartner S, Josephs R. The state-of-the-art in the analysis of type-A and – B trichothecene mycotoxins in cereals. *Fresenius Journal Analytical Chemistry* 2001;371(3):285-99.

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, Istituto Sperimentale Lattiero Caseario, Lodi*
(b) *Dipartimento di Scienze Molecolari Agroalimentari, Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Milano, Milano*
(c) *Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

Introduzione

Gli eventi climatici che si sono verificati dell'estate del 2003 hanno portato ad una grave "emergenza aflatoxine" nei settori zootecnico e lattiero caseario. L'aflatoxina B₁ (AFB₁) è una micotossina prodotta da *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e, se presente nella razione giornaliera della vacca, viene biotrasformata per idrossilazione a livello epatico, dando luogo alla formazione di aflatoxina M₁ (AFM₁). Tale molecola è stata classificata dallo IARC come possibile cancerogena per l'uomo; il problema del settore lattiero caseario è rappresentato dal *carry over* e dagli effetti di concentrazione che si verificano in fase di produzione casearia (1).

La determinazione del contenuto aflatoxine nel latte viene condotto mediante cromatografia liquida ad alta efficienza (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) (2) e metodi immunoenzimatici ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). La maggior parte delle analisi di screening effettuate ogni anno nel settore lattiero caseario per la ricerca di AFM₁ vengono eseguite con metodi ELISA (3). Questa tecnica presenta notevoli vantaggi quali la facilità di conduzione del test, il basso costo unitario per campione e il possibile monitoraggio di un elevato numero di campioni per unità di tempo. Il suo svantaggio è legato alla necessità di ricorrere, in presenza di campionamenti che abbiano comportato il sequestro della partita, a metodi analitici di conferma (4).

Il Regolamento 466/2001 (5) sottolinea, tra l'altro, l'importanza di fissare criteri generali ai quali si devono attenere i laboratori al fine di rendere possibile la comparazione delle prestazioni analitiche. La norma UNI EN ISO 14675 (6) per la determinazione del contenuto di AFM₁ in latte e prodotti del latte, prevede l'utilizzo di saggi immunoenzimatici competitivi di tipo monoclonale o policlonale che abbiano una buona affinità (*cross-reactivity* con altre aflatoxine inferiore al 20%) e un'elevata specificità (*cross-reactivity* con AFM₁ pari a 100%) nei confronti dell'antigene. La quantificazione prevede la creazione di una curva di taratura calcolata mediante la funzione matematica "logistica a quattro parametri".

Alla luce dell'accentuata diversificazione di prodotto del settore lattiero caseario e dei potenziali effetti biologici di AFM₁ nei confronti dell'uomo, risulta importante controllare in modo efficace e sistematico tale tossina con metodi affidabili e che assicurino la riferibilità delle misure.

Scopo del lavoro è stato quello di valutare i parametri, quali la natura della matrice analizzata, la tipologia dei test immunochimici e il metodo di preparazione del campione, che possono influire sulla performance del saggio.

Materiali e metodi

Sono stati considerati quattro livelli di AFM₁ (0, 30, 100, 200 ng/kg [ppt]): i *batch* di latte contaminato sono stati prodotti miscelando latte vaccino altamente contaminato (HL, [AFM₁] = circa 2000 ng/kg), prodotto presso l'Azienda CERZOO della Facoltà di Agraria di Piacenza, con latte crudo avente un basso livello di tossina (bianco, [AFM₁] < 5 ng/kg). Ciascun *batch* – denominato “pool” – del volume di circa 15 l, è stato destinato a caseificazione su scala pilota.

Le lavorazioni eseguite hanno riguardato diverse tipologie di prodotto: formaggi molli (crescenza e caprino) formaggi a pasta filata (mozzarella con acido citrico e mozzarella con fermenti) e derivati ad alto contenuto lipidico (panna da affioramento, panna da centrifuga e burro). I sieri di tutte le caseificazioni sono stati utilizzati per la produzione di ricotta. Il totale di campioni analizzati è stato pari a 150.

Metodo ELISA

Per l'analisi ELISA sono stati impiegati tre kit commerciali a 96 pozzetti di tipo policlonale (Immunoscreen AFLA M₁ - code MA 418, TECNA, Trieste, Italia; Ridascreen Aflatoxin M₁, R-Biopharm, Germania) e monoclonale (Agraquant® Aflatoxin M₁ Assay 5/100, code COKAQ7000, Romer Labs, Singapore, commercializzato da ASTORI, Poncarale, Brescia, Italia). Le caratteristiche specifiche di ciascun kit sono riportate nella Tabella 1.

Tabella 1. Specifiche dei kit commerciali utilizzati nella sperimentazione

Kit	Standard (ppt)	Range di linearità
Monoclonale	0-100	5-100
Policlonale 1	0-80	5-80
Policlonale 2	0-250	5-250

I kit commerciali utilizzati garantiscono 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 aflatossine eventualmente presenti nel latte, è dichiarato sempre inferiore al 20%, come richiesto dalla norma UNI (6).

L'analisi di campioni di latte è stata effettuata come descritto nelle istruzioni del kit. I reflui di caseificazione (siero, scotta, latticello) sono stati analizzati previa neutralizzazione con NaOH 1N.

La preparazione dei campioni di formaggio e di ricotta è stata eseguita mediante estrazione con solvente, consigliata per i derivati del latte dai protocolli di tutti e tre i kit utilizzati, e per idrolisi con pepsina come specificato nelle indicazioni del kit policlonale 2 al fine di confrontare le due metodologie.

Estrazione con solvente: 2 g di campione vengono miscelati per 5 min con diclorometano (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA); la miscela viene successivamente filtrata e una aliquota di estratto viene evaporato a 60°C. Il residuo viene sciolto in tampone di estrazione (fornito con il kit) e in solvente (esano o eptano) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA), agitato e centrifugato. La fase organica sovrastante viene eliminata, mentre la fase acquosa contenente l'analita viene diluita con opportuno tampone di diluizione fornito dal produttore. L'analisi viene condotta su 100 µL di estratto.

Estrazione con pepsina: 3 g di campione vengono incubati per 16 h a 42°C sotto agitazione in una soluzione di HCl 0,1 N e pepsina allo 0,2% (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA).

Un'aliquota di soluzione filtrata e neutralizzata con NaOH 0,5N viene sottoposta ad analisi, previa diluizione con il tampone di diluizione fornito dal kit.

Per ciascun campione si è proceduto ad analisi in doppio.

Determinazioni HPLC

I campioni di latte e i reflui di caseificazione sono stati analizzati seguendo la metodica ufficiale dell' *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)* (2). I formaggi sono stati analizzati dopo estrazione con pepsina e purificazione mediante colonne di immunoaffinità contenenti specifici anticorpi per aflatoxina M₁, secondo il metodo proposto da Pietri *et al.* (7).

Risultati e discussione

Nella prima fase dello studio, è stata valutata, su 30 campioni liquidi (latte e siero), la risposta interlaboratorio del metodo ELISA.

La Figura 1 mostra una buona corrispondenza ($R^2=0,9724$) tra i dati ottenuti da due diversi laboratori. Questi dati hanno confermato che per campioni altamente contaminati, il cui risultato analitico non ricade nella zona di linearità della curva di calibrazione, è indispensabile una diluizione del campione non superiore ad un fattore dieci (8).

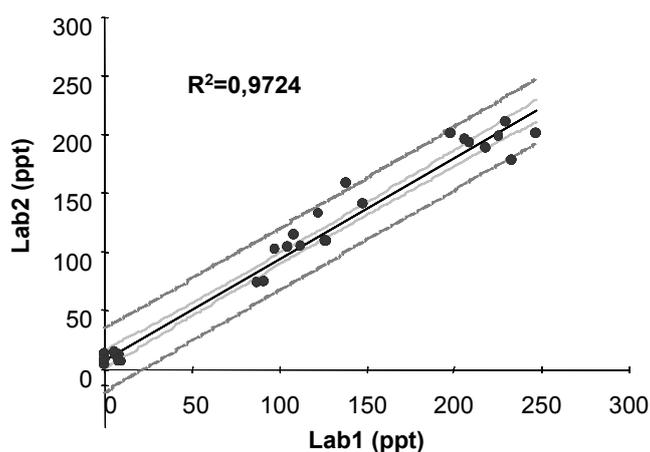


Figura 1. Correlazione interlaboratorio di campioni liquidi analizzati mediante ELISA (kit policlonale 1)

Gli stessi campioni, analizzati con kit monoclonale, hanno fornito risultati analoghi e un primo confronto fra le due diverse tipologie di kit, ha permesso di verificare un'elevata correlazione delle risposte ($R^2= 0,983$). Il kit policlonale ha presentato maggior tendenza alla sovrastima del livello di contaminazione imputabile principalmente a fenomeni di *cross*-reattività con altre aflatoxine.

I risultati ottenuti con i diversi test ELISA sono stati quindi confrontati con quelli derivanti dall'impiego di metodi HPLC (2, 7).

Le due tipologie di kit hanno fornito, su matrici liquide, risultati soddisfacenti in termini di comparabilità di risposta con il metodo ufficiale (2), associati a coefficienti di distribuzione (R^2) rispettivamente di 0,8970 e 0,8795 e ad una casuale distribuzione dei residui.

Occorre peraltro sottolineare che nell'analisi di matrici solide il kit policlonale 2 (Figura 2) ha presentato un miglior allineamento con il metodo HPLC (7) con una migliore distribuzione dei dati, che risultano tutti ricadere all'interno dell'intervallo di confidenza scelto, con $p=0,05$, associata ad un più elevato valore del coefficiente di distribuzione ($R^2=0,9038$).

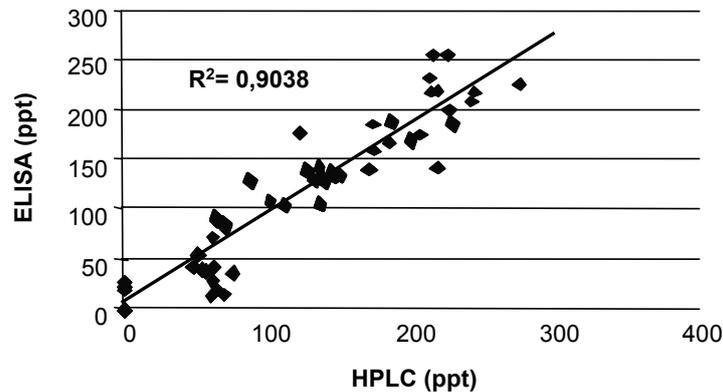


Figura 2. Confronto ELISA/HPLC (kit policlonale 2) per analisi condotte su matrici solide (formaggio e ricotta)

Questo risultato deriva dal fatto che il kit policlonale 2, caratterizzato da intervalli di determinazione e di linearità più ampi rispetto agli altri due test, se fornisce da un lato risultati meno selettivi, permette dall'altro una quantificazione più precisa di AFM_1 anche in campioni altamente contaminati ($[AFM_1]>200$ ppt).

Inoltre, le differenze di performance sono parzialmente imputabili al fatto che l'analisi di campioni liquidi non richiede particolari trattamenti nella fase di preparazione rispetto al dosaggio in matrici solide, che, al contrario, devono essere sottoposte a procedure di estrazione.

Le modalità di estrazione di AFM_1 , nel caso di analisi di formaggi a pasta molle, sono previste da tutte le case produttrici, mentre i diversi protocolli differiscono per i volumi di solventi utilizzati. Questo porta, nel caso dei kit monoclonale e policlonale 1, ad una diluizione del campione pari a 10, mentre nel kit policlonale 2 il campione risulta subire una diluizione di 7,5 volte. Il kit policlonale 2 permette, quindi, di ottimizzare il limite di quantificazione fino a 37,5 ppt nel formaggio, rispetto ai valori di 50 ppt associati agli altri due tipi di saggio considerati in questo studio.

Infine, è stata presa in considerazione la procedura di estrazione della tossina da formaggio a pasta filata.

La determinazione di AFM_1 in campioni di mozzarella è stata eseguita utilizzando, per l'estrazione della tossina, sia il metodo con solvente che il metodo di idrolisi enzimatica (consigliato solo per i formaggi a pasta dura). Quest'ultimo si è mostrato, nella totalità dei campioni analizzati, il più efficace; infatti i recuperi di tossina sono risultati soddisfacenti, con valori molto prossimi al 100%.

Valori inferiori di recupero di tossina, ottenuti con il metodo di estrazione con solvente, sono in prima analisi imputabili alla tecnologia di produzione della mozzarella, che prevede una filatura del formaggio ad alta temperatura in grado di influire sulla strutturazione finale del coagulo che risulta in grado di trattenere maggiormente la tossina.

Conclusioni

I risultati di questo studio hanno permesso di formulare le seguenti considerazioni.

Le determinazioni di AFM₁ in matrici casearie liquide effettuate con sistemi ELISA anche in laboratori diversi, forniscono dati attendibili e comparabili ($R^2= 0,9724$), confermando buone caratteristiche di affidabilità della tecnica se utilizzata in fase di screening.

Tutti i kit ELISA, utilizzati nel presente studio per l'analisi di un numero rilevante di campioni liquidi ed eterogenei (latte crudo, siero, scotta, latticello), hanno fornito risultati comparabili a quelli ottenuti con metodi HPLC.

In particolare, il metodo ELISA è risultato in grado di fornire buone prestazioni in termini di correlazione con i metodi cromatografici anche al di fuori degli intervalli di linearità dichiarati e fino a concentrazioni di AFM₁ pari a 200 ppt.

Nel caso di derivati caseari (formaggio e ricotta), i migliori risultati sono stati ottenuti con kit policlonale 2, il cui intervallo di linearità copre concentrazioni di tossina da 5 a 250 ppt.

Le procedure di estrazione con solvente si sono rivelate adatte al dosaggio della tossina in campioni di formaggio fresco e/o a pasta molle. Per contro, dai dati preliminari ottenuti e relativi al dosaggio di AFM₁ in campioni di mozzarella, si evince che la procedura di digestione con pepsina è l'unica in grado di assicurare percentuali di recupero prossime al 100%. Occorre a nostro avviso quindi approfondire gli studi relativi alle procedure di estrazione di AFM₁ da matrici solide per l'ottimizzazione del recupero della tossina in funzione del tipo di matrice in analisi.

Ringraziamenti

Lo studio è stato parzialmente realizzato su fondi MiPAAF – Progetto finalizzato AFLARID: Riduzione della contaminazione da aflatossine: filiera mais - prodotti lattiero-caseari – Area tematica: Trasformazione del latte in derivati e trattamento degli effluenti.

Bibliografia

1. Monti L, Panarelli EV, Iametti S, Cattaneo MP. Interazione tra aflatossina M₁ e i principali sistemi proteici del latte di specie minori. In: *Ricerche e Innovazioni nell'industria alimentare* Volume VII, Pinerolo: Chiriotti Editori. (In stampa)
2. Aflatoxin M₁ and M₂ in fluid milk. In: Horwitz W, Latimer GW (Ed.). *Official methods of analysis of AOAC International*. 17th edition. Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists International; 2000AOAC, 2000. n. 986.16; 49.3.06, Chapter 49, 40-42.
3. Paleologo M. Saggi immunoenzimatici: quale ruolo nel controllo delle micotossine? In: Miraglia M, Brera C (Ed.). *Atti 1° Congresso nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 29-30 novembre 2004*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2005. (Rapporto ISTISAN 05/42). p. 301-13.
4. Italia. Circolare del 9 giugno 1999, n.10. Direttive in materia di controllo ufficiale sui prodotti alimentari: valori massimi ammissibili di micotossine nelle derrate alimentari di origine nazionale, comunitaria e Paesi terzi. *Gazzetta Ufficiale* n.135, 11.06.1999.
5. Europa. Regolamento CE 12 dicembre 2003, n. 2174/2003. Modifica del regolamento CE n. 466/2001 della commissione dell'8 Marzo 2001 per quanto concerne i tenori massimi di aflatossine presenti nelle derrate alimentari. *Gazzetta Ufficiale* n. 326/12, 13 dicembre 2003.

6. UNI EN ISO 14675. *Linee guida per l'utilizzo di metodi selettivi per la determinazione del contenuto di aflatoossina M₁ in latte e derivati del latte, basate su prove immunoenzimatiche competitive*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2003.
7. Pietri A, Bertuzzi T, Fortunati P, Piva G. Determinazione dell'aflatoossina M₁ nei formaggi: nuovo metodo enzimatico di estrazione. In: Miraglia M, Brera C (Ed.). *Atti 1° Congresso nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 29-30 novembre 2004*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2005. (Rapporto ISTISAN 05/42). p. 318-21.
8. Monti L, Panarelli EV, Cattaneo TMP. Utilizzo del test ELISA come metodo di *screening* nella determinazione dell'aflatoossina M₁ nel latte. *La rivista del latte* 2005;2:20-4.

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

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

Introduzione

La patulina è una micotossina prodotta da alcuni funghi del genere *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssoschlamys*, la si può ritrovare su diversi tipi di alimenti inclusi frutta, grano e formaggio, ma a causa della natura dell'alimento, dei processi di raffinazione che subisce o del consumo che lo caratterizza, la contaminazione da patulina è sostanzialmente un problema di sicurezza alimentare derivante dai succhi e puree di frutta ottenuti con prodotti precedentemente contaminati dalla tossina (1).

La tossicità associata a questa tossina è di tipo cronico, sono infatti stati rilevati effetti mutageni su colture cellulari, dovuti all'interazione con il DNA tramite meccanismi ossidativi che causano cross-links (2). Secondo la JECFA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) la patulina è classificata mutagena, embriotossica, immunotossica, ma non teratogena (3).

Il Reg. CE n. 1425/2003 (4) 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 (*High Performance Liquid Chromatography/Diodearray-Detector*) è difficile rilevare contaminazioni da patulina di alcuni ppb, come richiesto per il controllo ufficiale dei baby food, 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: *Liquid Chromatography ElectroSpray Ionisation Tandem Mass Spectrometry*).

Materiali

La soluzione standard di patulina, 4-idrossi-4H-furo[3,2-c]piran-2(6H)-one, in cloroformio a concentrazione di circa 100 µg/ mL è stata acquistata da Supelco (Milano, Italia) e conservata a -20°C in vial di vetro scuro; la soluzione di Pectinasi, isolata da *Aspergillus niger*, a 10.000 unità al 40% in glicerolo è stata acquistata dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia) e conservata a 4°C in contenitore di vetro scuro.

L'acetonitrile utilizzato per la preparazione della fase mobile è di grado HPLC (purezza >99,9%) e fornito dalla Carlo Erba Reagenti (Milano, Italia), l'acqua ultrapura è prodotta da un impianto Milli-Q (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA); sia la miscela eluente che la soluzione di ridissoluzione dell'estratto finale sono ulteriormente filtrate su filtri Millipore HA con maglie di 0,45 µm (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). L'ammoniaca utilizzata come additivo per la soluzione eluente (soluzione in soluzione acquosa al 30%), l'acido acetico glaciale (purezza >99,9%), il sodio carbonato (purezza >99,5%), il sodio solfato (anidro,

purezza 99,5%) e l'etile acetato (purezza >99,9%) sono forniti dalla Carlo Erba Reagenti (Milano, Italia).

Preparazione del campione

La tipologia di campioni analizzata è composta da succhi e puree di frutta con particolare riguardo a mela, pera e pesca. La presenza di pectina influisce notevolmente sull'efficienza di estrazione e quindi sul grado di purezza dell'estratto finale.

Si è dunque ritenuto opportuno suddividere i campioni in due tipologie, succhi e puree, e applicare la procedura di estrazione descritta nel metodo della *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) 2000.02 (5).

Per i succhi: 20 g di campione sono addizionati di 1 mL di soluzione di Pectinasi e posti al buio a temperatura ambiente per una notte. Per le puree: 10 g di campione vengono diluiti con 10 mL di acqua deionizzata, addizionati di 1 mL di soluzione di Pectinasi e posti al buio a temperatura ambiente per una notte. Successivamente la soluzione viene trasferita in provette Falcon da 50 mL da centrifuga e centrifugati alla velocità di 4500 g per 30 min.

10 mL della fase surnatante sono trasferiti in imbuto separatore di vetro da 250 mL e estratti con 20 mL di etile acetato. La fase acquosa viene trasferita in un secondo imbuto separatore da 250 mL e si ripete il l'estrazione con 20 mL di etile acetato per altre due volte.

Le fasi organiche vengono riunite in un unico imbuto separatore e addizionate di 4 mL di una soluzione acquosa di sodio carbonato all'1,5%; dopo completa separazione si elimina la fase acquosa e si raccoglie la fase organica in pallone da evaporatore rotante da 100 mL, filtrandola con filtro di carta a pieghe tenente 2,5 g di sodio solfato, per eliminare eventuali residui di fase acquosa.

L'estratto ottenuto viene portato a secchezza sotto vuoto mediante evaporatore rotante con bagnomaria alla temperatura di 35°C. Il contenuto del pallone viene disciolto in 1 mL di acqua Milli-Q precedentemente portata a pH 4,00 con acido acetico glaciale. La scelta di ridissolvere la tossina in ambiente acido è dettata dalla sua elevata stabilità in ambiente acido, motivazione principale per cui si ritrova in prodotti come succhi o puree, caratterizzati da un pH compreso tra 3,5 e 4,0 e dalla presenza di acido ascorbico che ne previene l'ossidazione (6).

Dopo circa 5 min la soluzione ottenuta viene trasferita in *vial* di vetro e analizzata in LC-MS/MS.

Preparazione di matrici contaminate

Per la valutazione dell'efficienza di estrazione del metodo sono stati condotti degli studi di recupero su matrici di tre tipi: un succo di mela limpido, un succo di mela torbido e purea di mele, artificialmente contaminate a due livelli di concentrazione 80 µg/kg e 10 µg/kg.

La contaminazione viene effettuata mediante una aggiunta di una soluzione standard di patulina alla concentrazione di 1 µg/mL.

120 g di succo o 60 g di purea esenti da contaminazione vengono posti in una beuta con tappo da 250 mL e contaminati con un volume idoneo di soluzione standard di contaminazione, la beuta viene lasciata al buio per 15 min. e successivamente posta in agitatore orizzontale per 1 ora alla velocità di 250 RPM. Da questa soluzione si prelevano 20 g di succo o 10 g di purea e si analizzano come descritto precedentemente nel paragrafo Preparazione del campione.

Analisi in LC/MS/MS

Lo strumento utilizzato è un HPLC Alliance® 2695 (Waters, Milliford, MA, USA), con autocampionatore Alliance® 2695 (Waters, Milliford, MA, USA) termostato a 5°C. La separazione avviene con una colonna Discovery Supelco C18 (50 x 2,1 mm, 5 µm) della Supelco (Milano, Italia). L'eluizione è condotta in condizioni isocratiche con una fase mobile composta da acqua Milli-Q/ acetonitrile in proporzioni 90:10 addizionata di ammoniaca (1 mL per litro di eluente). Il flusso di lavoro è di 200 µL/min. e la colonna è termostata a 20°C.

Lo spettrometro di massa utilizzato è un triplo-quadrupolo Quattro Micro™ API (Waters, Milliford, MA, USA) con ESI in modalità negativa. I parametri di massa sono stati ottimizzati mediante infusione di una soluzione standard di patulina a concentrazione di 1 µg/mL in acqua Milli-Q a pH 4,00 a flusso 10 µL/min. e con l'utilizzo della T in fase mobile a flusso di 200 µL/min.

Il voltaggio applicato all'ago ESI è -3500 V, la temperatura della sorgente ESI è 120°C, il flusso del gas di desolvatazione, azoto prodotto da generatore *High Purity Nitrogen Generator* (Peak Scientific, Scozia), è 250 L/ora.

Nella fase di ricerca dei parametri ottimali di formazione dello ione precursore è stata fatta una scansione in modalità MS-scan in una finestra di valori massa su carica (m/z) 50-200, che evidenziava la presenza dello ione $[M-H]^-$ m/z 153 (Figura 1).

Successivamente si è passati ad una scansione in MS/MS che ha evidenziato la predominanza di tre frammenti con m/z 109, di abbondanza maggiore e utilizzato per la quantificazione, 125 e 135, utilizzati per conferma (Figura 2).

I parametri di *tuning* dello ione precursore e dei frammenti selezionati sono riassunti in Tabella 1. Per l'acquisizione e il processo dei dati è stato utilizzato il software Masslynx 4.0 (Waters, Milliford, MA, USA).

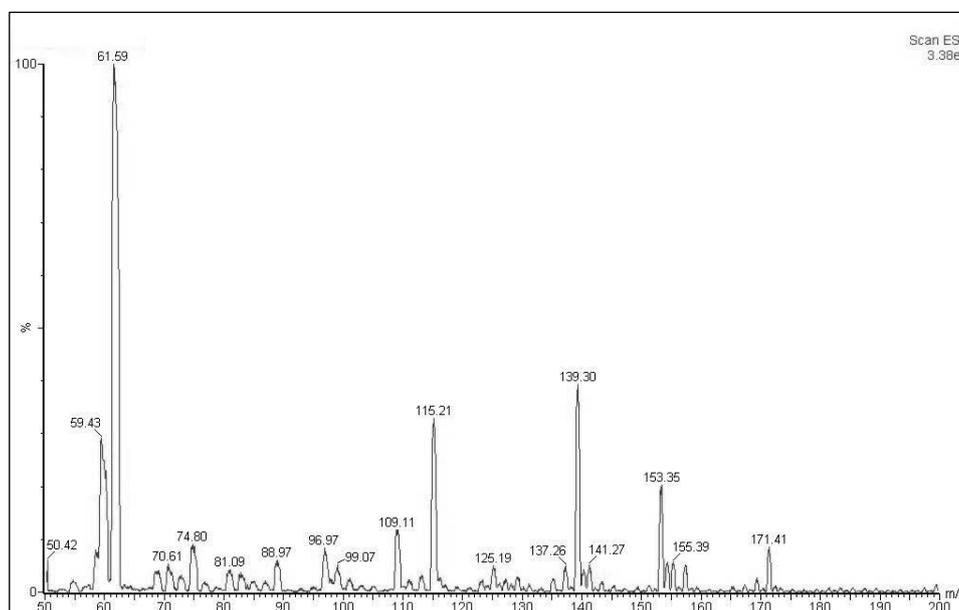


Figura 1. Spettro di massa ottenuto per infusione di una soluzione standard di patulina 1 µg/mL in modalità ESI negativa MS-scan. Si evidenzia la presenza dello ione $[M-H]^-$ PM 153

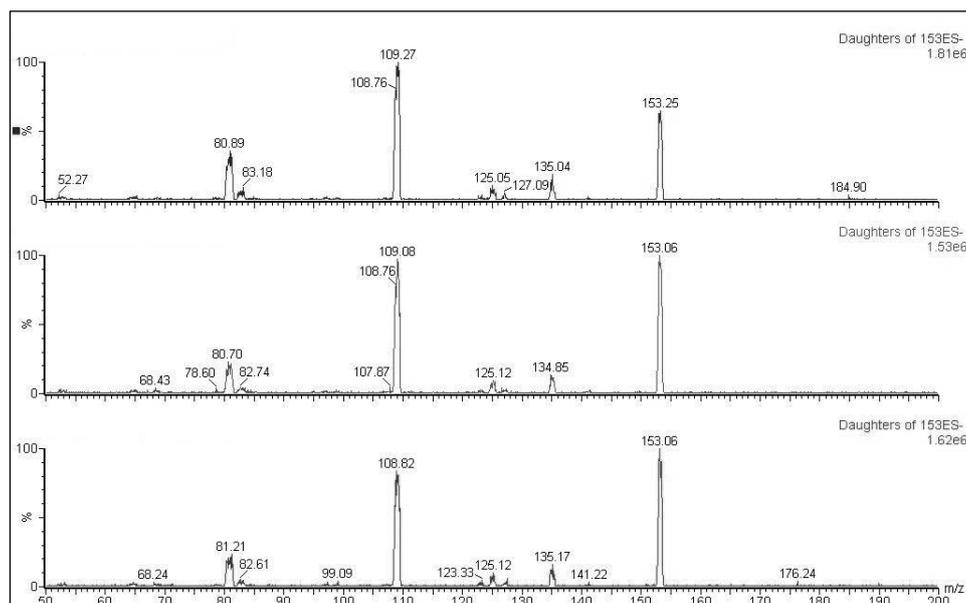


Figura 2. Spettri di massa ottenuti per infusione di una soluzione standard di patulina 1 µg/mL in modalità ESI negativa MS/MS-scan. Si evidenziano i frammenti 153 > 109, 153 > 125, 153 > 135

Tabella 1. Condizioni LC/MS/MS di formazione dello ione precursore e dei frammenti monitorati in modalità ESI negativa-MRM

Ione precursore (Da)	Frammento (Da)	Dwell (s)	Voltaggio del cono (V)	Energia di collisione (eV)	Delay (s)
153	135	0,300	19,00	8,00	0,02
153	125	0,300	19,00	9,00	0,02
153	109 (Q)	0,300	19,00	9,00	0,20

Validazione del metodo

La validazione del metodo è stata eseguita calcolando i parametri di limite di rilevabilità (*Limit Of Detection*, LOD), limite di quantificazione (*Limit Of Quantification*, LOQ), precisione, recupero e ripetibilità strumentale. L'elaborazione statistica è stata eseguita secondo le "Linee guida e la validazione dei metodi analitici e per il calcolo dell'incertezza di misura" di ARPA Emilia Romagna (7).

Curva di calibrazione

La curva di calibrazione è stata preparata partendo da una soluzione standard di lavoro alla concentrazione di 10 µg/mL in acqua Milli-Q a pH 4,00 e diluendola opportunamente in modo da ottenere un range di concentrazione che va da 25 µg/mL a 1000 µg/mL, con 6 livelli di calibrazione (Figura 3).

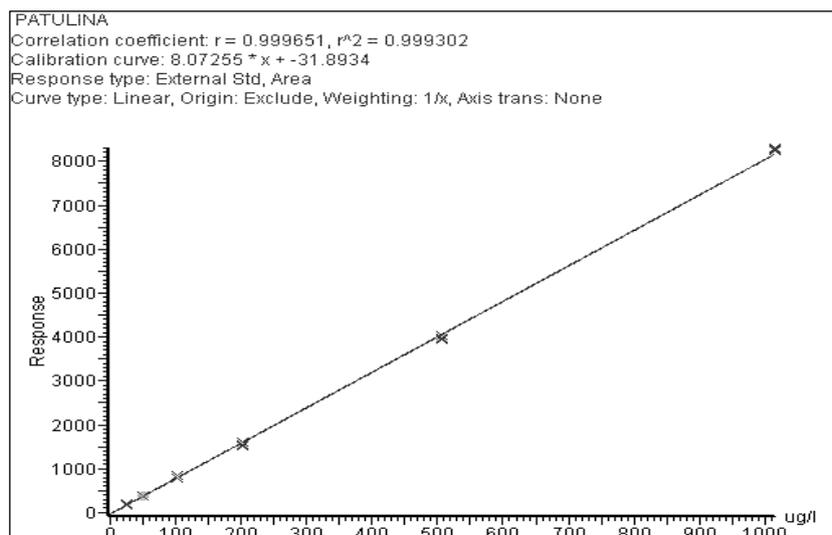


Figura 3. Curva di calibrazione ottenuta con soluzioni standard in concentrazioni comprese tra 25 e 1000 µg/L

La curva di calibrazione in Figura 3 presenta una buona linearità di segnale MRM (r^2 0,998), ha un LOD di 1,2 µg/kg e un LOQ di 3,6 µg/kg, questo permette di estendere il campo di applicazione del metodo anche ai prodotti destinati alla prima infanzia, per i quali il limite di legge è di 10 µg/kg, senza modificare l'estrazione mantenendo invariati i volumi e i tempi di esecuzione.

Valutazione delle prove di recupero e precisione

La valutazione del recupero è stata eseguita su 6 prove con tre matrici distinte a due livelli di contaminazione. Le aggiunte sono state eseguite su matrici bianche di succo limpido, succo torbido e purea. Le percentuali di recupero si sono rivelate decrescenti all'aumentare della presenza di pectina nel campione. I risultati, riportati in Tabella 2, di $RDS_r\%$ (*Relative Standard Deviation di ripetibilità*) e Recupero% calcolati dai dati sperimentali soddisfano i requisiti richiesti dal Regolamento CE 401/2006 punto 4.3.1. (8).

Tabella 2. Risultati delle prove di recupero su tre matrici differenti e deviazione standard percentuale associata al dato

MATRICE		RDS _r %	Recupero%
Succo limpido		6	96,8
Succo torbido	Contaminazione 80 µg/kg	6	88
Puree		9,6	64,5
Succo	Contaminazione 10 µg/kg	7,2	98,2
Puree		6,1	62,2

Valutazione della ripetibilità del sistema HPLC/MS/MS

Le performance dello strumento vengono valutate mediante 10 iniezioni ripetute di una soluzione standard di patulina 200ng/mL. La deviazione standard percentuale del tempo di ritenzione RDS% T è pari a 0,0%, e la deviazione standard percentuale dell'area del picco, RDS% A è pari a 1,8%. Questi valori sono indice del buon funzionamento dello strumento e in particolare che le condizioni di ionizzazione scelte sono in grado di garantire una costante e ripetibile formazione dello ione molecolare in sorgente ESI.

Conclusioni

Il metodo sviluppato permette la determinazione di patulina in succhi puree di frutta anche a bassi livelli di contaminazione, con un tempo di analisi strumentale di 10 minuti e un limite di rilevabilità 10 volte inferiore al limite di legge stabilito per gli alimenti destinati alla prima infanzia.

Bibliografia

1. Fritz W, Engst R. Survey of selected mycotoxins in food. *J Environ Sci Health* 1981;B16(2):193-210.
2. Schumacher DM, Müller C, Metzler M, Lehmann L. DNA-DNA cross-links contribute to the mutagenic potential of the mycotoxin patulin. *Toxicology Letters* 2006;166:268-75.
3. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *Evaluation of certain food additives and contaminants*. Geneva: Food and Agricultural Organization, World Health Organization; 1995. (Tech. Report Series. 44).
4. Regolamento CE/UE n. 1425/2003 della Commissione dell'11 agosto 2003. Modifica del regolamento CE/UE n. 466/2001 per quanto riguarda la patulina. *Gazzetta Ufficiale Unione europea* n. L203 del 12/08/2003.
5. MacDonald S, Long M, Gilbert J. Liquid chromatographic method for determination of Patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree: collaborative study. *Journal of AOAC International* 2000;83(6):1387-94.
6. Drusch S, Kopka S, Kaeding J. Stability of patulin in a juice-like aqueous model system in the presence of ascorbic acid. *Food Chemistry* 2007;100:192-7.
7. Tenaglia H, Venturini E, Raffaelli R. *Linee guida per la validazione dei metodi analitici e per il calcolo dell'incertezza di misura- Accreditazione e certificazione*. Bologna: Agenzia Regionale Prevenzione e Ambiente dell'Emilia Romagna; 2003. (I Manuali ARPA)
8. Regolamento CEE/UE n. 401 del 23/02/2006 n. 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006. Metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale Unione europea* n. L70 del 09/03/2006.

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, Napoli

Introduzione

Negli ultimi anni, l'Unione Europea ha mostrato una crescente attenzione alla presenza di contaminanti organici negli alimenti. Le micotossine rappresentano una classe di sostanze di notevole interesse, perché, attraverso l'alimentazione degli animali, possono entrare nella catena trofica attraverso gli alimenti derivati.

Le aflatossine sono un gruppo di sostanze tossiche prodotte da alcuni ceppi delle muffe *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, in condizioni favorevoli di temperatura e umidità (1). L'aflatoxina B₁ è il composto più tossico e diffuso di questa classe di sostanze, ed è l'unico per cui sono stati fissati dei limiti di legge negli alimenti ad uso zootecnico (2). L'aflatoxina M₁ (AFM₁) è il principale metabolita dell'aflatoxina B₁ nei mammiferi, ed è secreta nel latte e nelle urine di animali alimentati con mangimi contaminati (3, 4). È una sostanza epatotossica classificata dalla IARC come genotossica, teratogena e carcinogena di classe 2B (5, 6). La AFM₁ è stabile ai trattamenti chimici, fisici e termici, e si ritrova nel latte e nei prodotti caseari derivati (7). La Commissione Europea ha stabilito un Limite Massimo di Residuo (LMR) di 0,05 ng/g nel latte (8), e raccomanda il controllo ufficiale del latte e dei prodotti derivati. A tale scopo sono utilizzati diversi metodi di screening (ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, strisce a flusso laterale) e di conferma, tra cui il più diffuso è basato sull'analisi HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) con rivelazione fluorimetrica. Il laboratorio di controllo ufficiale deve garantire competenza tecnica ed efficienza delle prestazioni analitica nell'esecuzione di queste analisi. A tale fine, la Commissione Europea ha stabilito che i laboratori ufficiali di controllo degli alimenti devono implementare un sistema di gestione per la qualità conforme alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 (9), accreditare le prove e partecipare a circuiti internazionalmente riconosciuti per il controllo qualità esterno (10, 11). In questo lavoro è descritto il procedimento per la validazione, accreditamento e controllo qualità esterno con partecipazione a *proficiency test* di un metodo di prova per l'analisi di conferma della AFM₁ nel latte; il metodo prevede la purificazione per immunoaffinità della micotossina e la determinazione mediante HPLC con rivelatore fluorimetrico (12). Per lo studio di validazione sono stati calcolati l'esattezza, la ripetibilità e la riproducibilità intra-laboratorio, a valori di 0,5, 1 e 1,5 il LMR. Inoltre, sono descritti i livelli di contaminazione determinati nel periodo 2002-2005 nel latte crudo e termicamente trattato di diverse specie prelevato in Campania e Calabria; in particolare, per la prima volta è riportato uno studio sui livelli di contaminazione nel latte di bufala.

Materiali e metodi

Purificazione del campione

Centrifugare $50,0 \pm 0,1$ g di latte a 3300 g e 4°C per 5 min ed eliminare il grasso; ripetere l'operazione. Lasciare il campione in congelatore a -18°C per 30 minuti. Filtrare su filtro a fascia nera. Caricare su colonna SPE di immuno-affinità (VICAM, Safefood, Italia) a 1 mL/min circa. Lavare la colonna con 3'3 mL acqua milliQ. Eluire con 2 mL di ACN:MeOH 3:2 v/v, portare a secco sotto vuoto la colonna e raccogliere tutto il liquido. Centrifugare a 3300 g e 4°C per 5 min.

Analisi HPLC

L'analisi HPLC è stata eseguita con rivelatore fluorimetrico (con una lunghezza d'onda di eccitazione di 360 nm e lunghezza d'onda di emissione di 440 nm) con la seguente miscela di fase mobile: acqua/ACN/MeOH 52/22/26 v/v, ad un flusso 1 mL/min.

Il volume di iniezione è stato pari a 100 µL.

Il Sistema HPLC Waters (pompa quaternaria 600E, autocampionatore 717 Plus, rivelatore a fluorescenza 2475) è stato usato con una colonna cromatografica Synergi Polar-RP 80 Å 4 mm 250 ' 4,6 mm (Phenomenex).

Validazione del metodo

Il metodo di prova è stato validato sia mediante studio intra-laboratorio che partecipando a *proficiency test*, secondo quanto suggerito dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025. Nello studio intra-laboratorio, sono stati analizzati campioni di latte non contaminati e fortificati a 0,025, 0,050 and 0,075 ng/g (corrispondenti rispettivamente a 0,5-, 1- and 1,5-volte il LMR), durante un periodo di 9 mesi. La ripetibilità è stata valutata analizzando 6 replicati per ogni livello di fortificazione; la riproducibilità intra-laboratorio è stata calcolata analizzando 6 replicati ad ogni livello di fortificazione e ripetendo in 3 diverse sessioni analitiche. Sono stati calcolati i recuperi medi ad ogni livello; la specificità è stata valutata analizzando 30 campioni di latte crudo, UHT e pastorizzato (provenienti da bovine, bufale, pecore e capre) non contaminati da AFM₁. Inoltre, sono stati calcolati il limite di quantificazione (*Limit Of Quantification*, LOQ) e la linearità della risposta del rivelatore. Il laboratorio ha partecipato a diversi *proficiency test* organizzati dal FAPAS e dal Progetto Trieste, dal giugno 2002 al dicembre 2005, e i risultati valutati in termini di z-score, calcolato dall'ente organizzatore del circuito.

Risultati

Lo studio di validazione ha permesso di definire le prestazioni analitiche del metodo. Il LOQ è 0,004 ng/g, la linearità in solvente è compresa tra 0,1-5,0 ng/mL, la linearità in matrice è compresa tra 0,004-0,200 ng/g. Il metodo è specifico per latte bovino, bufalino, ovi-caprino, sia crudo che termicamente trattato. I valori calcolati ad ogni livello di fortificazione per il recupero medio, la ripetibilità e la riproducibilità intra-laboratorio sono riassunti nella Tabella 1.

Tabella 1. Le prestazioni del metodo di prova

Livelli di fortificazione con AFM ₁ (ng/g)	Recupero medio (%)	Ripetibilità			Riproducibilità intra-laboratorio		
		SD (ng/g)	CV%	n	SD (ng/g)	CV%	n
0,025	95,7	0,0016	7,0	6	0,0021	8,4	18
0,050	96,0	0,0026	5,6	6	0,0046	9,6	18
0,075	97,0	0,0028	3,8	6	0,0031	4,2	18

Il laboratorio ha dimostrato l'efficienza e competenza tecnica nel tempo come mostrato dai risultati dei *proficiency test* (Tabella 2).

Tabella 2. I risultati della partecipazione ai *proficiency test*

Anno	<i>Proficiency test</i>	z-score del laboratorio
2002	Progetto Trieste	Soddisfacente (campione negativo)
2002	Progetto Trieste	-1,19
2003	Progetto Trieste	Soddisfacente (campione negativo)
2003	FAPAS	-1,2
2004	FAPAS	-0,1
2005	FAPAS	-1,6

Il metodo è stato utilizzato tra il 2002 e il 2005 per l'analisi di 552 campioni di latte bovino, bufalino e ovi-caprino. I campioni di latte crudo, UHT e pastorizzato sono stati prelevati da bovine, bufale, capre e pecore delle regioni Campania and Calabria, nell'ambito delle attività di controllo ufficiale. La AFM₁ è risultata presente in 248 campioni (44,9%), e in tutti i tipi di latte. In Figura 1 sono riportati, per ogni anno, i campioni pervenuti al laboratorio.

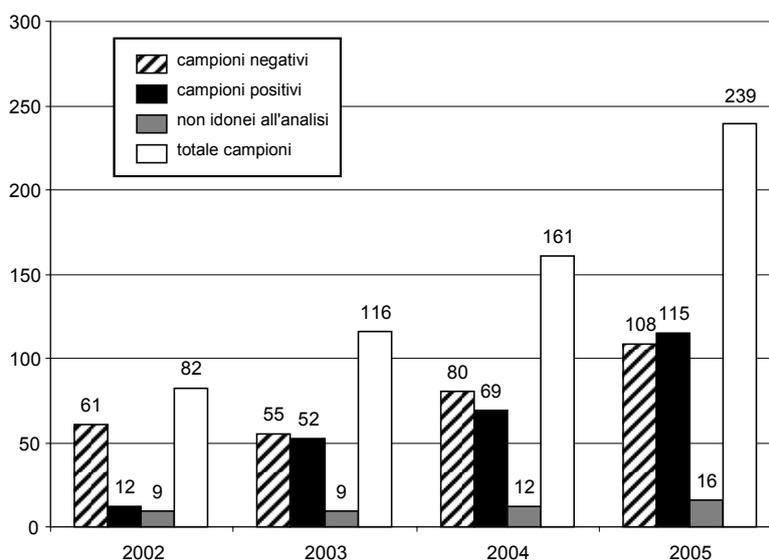


Figura 1. I campioni pervenuti al laboratorio e analizzati nel periodo 2002-2005

In Figura 2 è riportata la distribuzione dei livelli di contaminazione complessivi, per ogni anno.

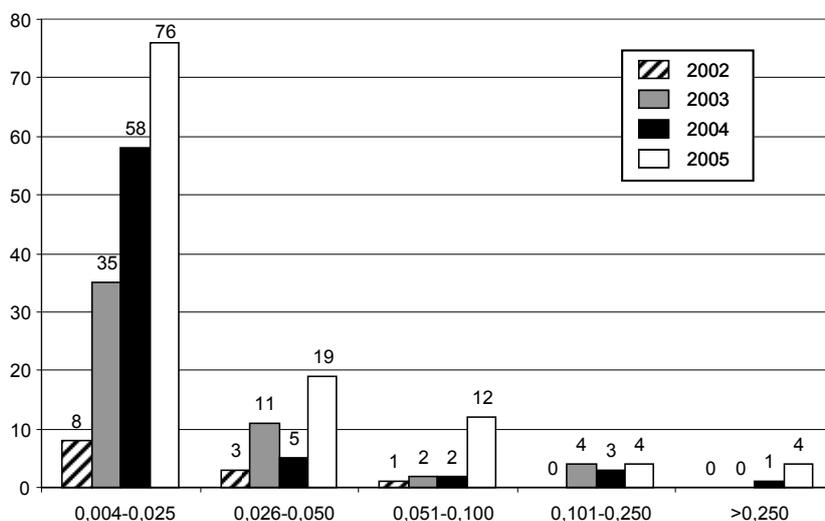


Figura 2 - La distribuzione dei livelli di contaminazione nei campioni di latte analizzati nel periodo 2002-2005

In Tabella 3 è riportata la distribuzione della contaminazione da AFM₁ per ogni tipo di latte, con i relativi intervalli di concentrazione. In Tabella 4 sono riportati i campioni non conformi per ogni anno e per ogni tipo di latte.

Tabella 3. Campioni contaminati per ogni tipologia di latte e per ogni anno e relativi intervalli di concentrazione di AFM₁, durante il periodo 2002-2005

Tipologia di latte		2002	2003	2004	2005
Latte di massa bovino	<i>Totale campioni</i>	20	42	59	114
	<i>Contaminati (%)</i>	3 (15,0%)	22 (52,4%)	33 (55,9%)	68 (59,6%)
	<i>Intervallo di concentrazione (ng/kg)</i>	7-14	6-244	6-770	4-1262
Latte bovino termicamente trattato	<i>Totale campioni</i>	9	11	23	50
	<i>Contaminati (%)</i>	5 (55,6%)	6 (54,5%)	15 (65,2%)	28 (56,0%)
	<i>Intervallo di concentrazione (ng/kg)</i>	4-64	4-20	6-29	5-88
Latte di massa bufalino	<i>Totale campioni</i>	43	47	59	58
	<i>Contaminati (%)</i>	4 (9,3%)	20 (42,6%)	18 (30,5%)	18 (31,0%)
	<i>Intervallo di concentrazione (ng/kg)</i>	4-39	4-43	5-23	4-676
Latte di massa ovi-caprino	<i>Totale campioni</i>	1	7	8	1
	<i>Contaminati (%)</i>	0 (0,0%)	4 (57,1%)	2 (25,0%)	1 (100%)
	<i>Intervallo di concentrazione (ng/kg)</i>	-	6-9	9-27	0-31 *

* 1 solo campione analizzato

Tabella 4. Campioni non conformi e loro percentuale relativa annuale, per tipologia di latte, durante il periodo 2002-2005

Tipologia di latte		2002	2003	2004	2005
Latte di massa bovino	<i>Totale campioni</i>	20	42	59	114
	<i>Non conformi (%)</i>	0	6 (14,3%)	6 (10,2%)	15 (13,2%)
Latte bovino termicamente trattato	<i>Totale campioni</i>	9	11	23	50
	<i>Contaminati (%)</i>	1 (11,1%)	0	0	3 (6,0%)
Latte di massa bufalino	<i>Totale campioni</i>	43	47	59	58
	<i>Contaminati (%)</i>	0	0	0	2 (3,4%)
Latte di massa ovi-caprino	<i>Totale campioni</i>	1	7	8	1
	<i>Contaminati (%)</i>	0	0	0	0

Le Tabelle e le Figure riportate sono parzialmente riprese da Gallo *et al.* (13).

Conclusioni

Il metodo validato è specifico, preciso e mostra elevata esattezza. La partecipazione ai circuiti inter-laboratorio con risultati soddisfacenti ($-2 \leq z\text{-score} \leq +2$) dà evidenza della competenza tecnica del laboratorio e del suo mantenimento nel tempo, che garantisce risultati affidabili. Il controllo per la presenza della AFM₁ nel latte è considerevolmente aumentato nel tempo. Negli ultimi 3 anni i livelli di contaminazione determinati sono diventati più alti, specialmente nel 2005, in tutti i tipi di latte. Più della metà dei campioni di latte di massa bovino sono risultati contaminati. Anche la percentuale di campioni di latte bovino termicamente trattato è elevata, ma in questo caso il numero di campioni prelevati appare alquanto limitato per valutare l'effettiva esposizione del consumatore alla contaminazione da AFM₁. Pochi campioni di latte ovi-caprino sono stati prelevati, nonostante il numero di positività relativamente alto.

Per la prima volta, sono presentati i risultati di un monitoraggio a lungo termine sui livelli di contaminazione da AFM₁ nel latte di bufala, eseguito nell'ambito del PNR. I dati indicano una larga diffusione della micotossina, anche se in misura inferiore rispetto al latte bovino.

Bibliografia

1. Semple RL, Frio AS, Hicks PA, Lozare JV. *Mycotoxin prevention and control in food grains*. FAO; Roma; 1989.
2. Unione Europea. Direttiva 2003/100/CE. Direttiva 2003/100/CE della Commissione del 31 ottobre 2003 che modifica l'allegato I della direttiva 2002/32/CE del Parlamento europeo e del Consiglio relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali. *Gazzetta Ufficiale della Unione Europea* L 285/33.
3. Applebaum RS, Brackett RE, Wiseman DW, Marth EH. Aflatoxin toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk products. A review. *J Food Protec* 1982;45:752.

4. Pruchase IFH, Steyn M. Estimation of aflatoxin M₁ in milk. *JAOAC Int* 1967;50;363.
5. IARC. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of large monographs*. Vol. 1. Suppl. 7. Lyon, France: IARC; 1987.
6. Wogan GN. Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. *Cancer Res* 1992; (Suppl.) 52; 2114s.
7. Lopez C, Ramos L, Ramadan S, Bulacio L, Perez J. Distribution of aflatoxin M₁ in cheese obtained from artificially contaminated milk. *Int J Food Microbiol* 2001;64:211.
8. Regolamento 466/2001/CE. della Commissione dell'8 marzo 2001 che definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee*, n. L 77/1, 2001.
9. UNI CEI EN ISO/IEC 17025. *Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura*. Milano: UNI; 2000.
10. Decisione 98/179/CE. 98/179/CE. Decisione della Commissione del 23 febbraio 1998 recante modalità d'applicazione per il prelievo ufficiale di campioni al fine della sorveglianza su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei prodotti di origine animale. *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* n. L 065 del 05/03/1998.
11. Decisione 2002/657/CE. Decisione della Commissione del 12 agosto 2002 che attua la direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* n. L 221, 17/8/2002.
12. Dragacci S, Gleizes E, Fremy JM, Candlish AG. Use of immuno-affinity chromatography as a purification step for the determination of aflatoxin M₁ in cheeses. *Food Addit Cont* 1995;12:59.
13. Gallo P, Salzillo A, Rossigni C, Urbani V, Serpe L. Aflatoxin M₁ determination in milk: method validation and contamination levels in samples from Southern Italy. *Ital J Food Sci* 2006; 18(3):267-75.

DETERMINAZIONE DELLE MICOTOSSINE: RISULTATI DEI *PROFICIENCY TEST* ORGANIZZATI A LIVELLO NAZIONALE DALL'ASSOCIAZIONE ITALIANA ALLEVATORI

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

Introduzione

Le micotossine, metaboliti secondari prodotti da alcune specie fungine, possono essere presenti praticamente in tutti gli alimenti. Costituiscono da sempre un problema di rilevante entità nel settore sanitario che riguarda la zootecnia nonché la clinica umana per tutti quei prodotti di derivazione animale e vegetale che entrano direttamente o indirettamente nella catena alimentare che riguarda l'uomo.

Gli effetti patogeni si possono manifestare per ingestione di una certa quantità di micotossina e sono generalmente piuttosto gravi.

Le conseguenze economiche sono rilevanti sia nel settore sanitario che in quello commerciale.

Quello delle micotossine, sebbene problema antico, negli ultimi anni ha suscitato un interesse sempre più grande nel mondo scientifico al punto che attualmente un numero elevato di paesi al mondo, oltre cento, è dotato di una legislazione per regolarne i contenuti minimi ammissibili nei prodotti destinati alla mangimistica, nel latte e derivati, nei prodotti destinati all'infanzia e, in generale, in una vasta gamma di generi destinati all'alimentazione umana.

Tali limiti, in alcuni casi piuttosto rigorosi, hanno reso sempre più necessaria l'attuazione di un sistema di autocontrollo della accuratezza analitica dei laboratori preposti all'esecuzione delle analisi per la determinazione dei contenuti delle tossine in questione.

Ruolo dell'Associazione Italiana Allevatori

L'Associazione Italiana Allevatori (AIA) è un Ente morale fondato nel 1944. L'AIA ha carattere tecnico economico. Essa si propone di attuare tutte le iniziative che possono utilmente contribuire ad un più rapido miglioramento del bestiame allevato e ad una più efficiente valorizzazione del bestiame stesso e dei prodotti da questo derivati. (art. 3 statuto AIA)

È presente sul territorio nazionale con 92 organizzazioni provinciali (Associazione Provinciale Allevatori, APA), 16 organizzazioni regionali (Associazione Regionale Allevatori, ARA), 36 organizzazioni nazionali per specie, razze e attività (Associazione Nazionale Allevatori, ANA).

Il Laboratorio Standard Latte dell'AIA, fondato nel 1990 con il contributo del Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali (MIPAAF), si occupa di progettazione, preparazione e distribuzione di materiali di riferimento nel settore lattiero caseario e più in generale in quello agroalimentare e di progettazione e organizzazione di prove interlaboratorio.

Tra i suoi clienti: 24 associazioni di allevatori, 135 industrie lattiero-casearie, 45 istituti pubblici, 43 laboratori privati.

Proficiency test sulle micotossine

Per quanto concerne la determinazione delle micotossine, il laboratorio dell'AIA nel 2003, in piena emergenza aflatossine, ha organizzato il primo *proficiency test* a livello nazionale sulla aflatossina M₁ nel latte. Da allora ha allestito in tutto 16 *proficiency test* sulle micotossine accrescendo il numero di analiti di interesse con la sequenziale introduzione dei circuiti interlaboratorio su aflatossina B₁ nel mais (già dal 2004), ocratossina A nel grano (maggio 2006) e nel vino (ottobre 2005), DON e zearalenone nel mais (ottobre 2006).

I Laboratori partecipanti sono Laboratori della Rete AIA (APA, ARA), Istituti Zooprofilattici Sperimentali, ARPA (Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente), Università, Centrali del Latte, Caseifici, Laboratori privati.

Mediamente per i *proficiency test* su aflatossine B₁ e M₁ il numero di partecipanti si aggira intorno a 50; intorno a 20 è stato il numero dei partecipanti per i più recenti circuiti interlaboratorio su OTA (ocratossina A), DON (deossinivalenolo) e zearalenone (Tabella 1).

Tabella 1. Partecipanti ai *proficiency test*

Matrice	Latte		Mais		Grano		Vino	
	M ₁		B ₁		OTA		OTA	
	ELISA	HPLC	ELISA	HPLC	ELISA	HPLC	ELISA	HPLC
nov. 2003	40							
dic. 2003	45	25						
apr. 2004	46	19						
ott. 2004	59	23	19	11				
mar. 2005	47	22	20	12				
ott. 2005	54	23	20	20			6	25
mag. 2006	48	27	14	19	8	9	2	14
ott. 2006	49	24	19	18	8	12	5	12

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; HPLC : *High Performance Liquid Chromatography*

Materiali e metodi

M₁ nel latte

Nell'ambito del *proficiency test* vengono distribuiti 4 campioni di latte a diverso contenuto di M₁ (range 20- 80 ppt).

La matrice è costituita da latte vaccino crudo che viene appositamente scremato in laboratorio, fortificato con una soluzione concentrata di M₁, smistato in provette di plastica e congelato per la distribuzione ai laboratori che utilizzano l'analisi in HPLC, smistato in provette di vetro scuro e liofilizzato per essere poi ricostituito al momento delle analisi con i metodi di screening.

Il latte in entrata viene sottoposto alle analisi di routine per la tipizzazione e analizzato per il contenuto in aflatossina dopo l'iniziale scrematura.

Può essere distribuito anche come campione naturale se contenente un titolo di aflatossina rappresentativo per gli scopi.

Il prodotto finito viene testato per la valutazione dell'omogeneità del lotto (test di Horwitz) essenziale caratteristica per la distribuzione nel circuito analitico.

Aflatossina B₁, DON e zearalenone nel mais

Per la aflatossina B₁ si allestiscono 4 campioni di farina di mais in bustine sigillate e sotto vuoto per una quantità di mais di 25 g (range 0-30 ppb). I campioni, partendo da una matrice negativa, vengono fortificati in laboratorio con una soluzione idroalcolica concentrata di aflatossina B₁ che viene erogata sui 25 g di mais di ciascuna confezione. L'omogeneità del lotto in questo caso viene misurata attraverso la determinazione della precisione di erogazione nel tempo dello strumento Dosimat utilizzato che ha fornito risultati più che soddisfacenti (scarto tipo < 0,005 dopo 50, dopo 100 e dopo 150 erogazioni di 200 µL di soluzione al 70% di MetOH).

Allo stesso modo si procede per la fortificazione del mais con DON e zearalenone di cui si distribuiscono due livelli di concentrazione. La quantità in g di mais allestita per campione è di 10 o 50 a seconda della metodica usata per la determinazione e la richiesta specifica del laboratorio interessato.

OTA nel grano

Vengono distribuiti 3 campioni a differente contenuto in Ota (range 0-20 ppb) anche questi fortificati in laboratorio partendo da una matrice negativa come già descritto sopra.

Si allestiscono campioni da 10 e da 50g.

OTA nel vino

Si distribuiscono 3 campioni fortificati in laboratorio partendo da una matrice negativa per ottenere una concentrazione che varia da 0 a 10 ppb

Risultati dei ring test

Elaborazioni statistiche

Le elaborazioni statistiche eseguite sui risultati analitici dei circuiti interlaboratorio vengono fornite ai laboratori partecipanti in riferimento al complesso delle metodiche utilizzate (ELISA e HPLC nella quasi totalità), alle singole metodiche e al metodo di screening e metodi complessivi confrontati con il metodo di riferimento. Complessivamente i laboratori partecipanti ricevono per ciascun analita cinque elaborazioni statistiche in modo da poter avere maggiori termini di confronto della propria accuratezza analitica e un quadro complessivo degli andamenti.

Il valore di riferimento è la media robusta epurata dai valori outliers (test di Grubbs e di Cochran).

I parametri forniti ai partecipanti comprendono lo z score complessivo calcolato sulla media generale di ciascun laboratorio, lo z score del laboratorio per singoli livelli di concentrazione, la dispersione intorno al valore di riferimento in base allo scarto tipo delle differenze dalla media robusta, la distanza euclidiana dall'origine degli assi cartesiani con il conseguente ordinamento dei laboratori, la rappresentazione delle medie e degli scarti tipo di ciascun laboratorio. Vengono calcolati la media generale, la ripetibilità (r), la riproducibilità (R), gli scarti tipo di ripetibilità e riproducibilità (sr e sR) e gli stessi sotto forma di scarti tipo relativi (RSDr e RSDR) sia complessivi che dei singoli livelli di analita.

Aflatossina M₁ nel latte

I dati più copiosi a disposizione sono quelli relativi ai *proficiency test* sulla M₁. Abbracciano un periodo di oltre 3 anni di osservazioni e ci permettono di fare una valutazione sull'andamento di ripetibilità e riproducibilità sia del metodo di screening che di quello di riferimento.

Inoltre da un confronto tra le due metodiche attualmente più utilizzate si evince una tendenza più o meno costante riguardante i valori della riproducibilità che risultano essere migliori, in base alla nostra esperienza, nel metodo di screening immunoenzimatico piuttosto che in quello di riferimento HPLC soprattutto intorno al valore limite per legge di 50 ng/kg (Figura 1 e 2).

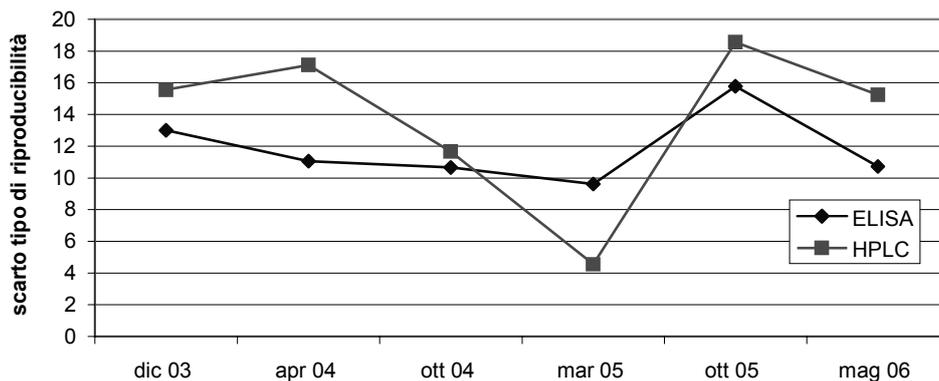


Figura 1. Scarto tipo di riproducibilità sul campione a livello di 50 ppt

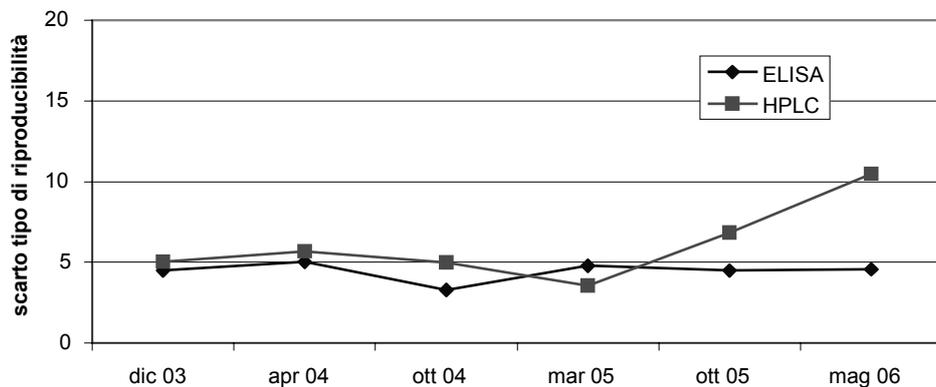


Figura 2. Scarto tipo di riproducibilità sul campione a livello di 25 ppt

Si può inoltre constatare che c'è una buona sovrapposizione dei valori di riferimento determinati con il metodo ELISA e con l'HPLC se si considerano le relative incertezze di misura (sR per livelli di concentrazione) tra le due metodiche. Tuttavia si osserva una lieve costante sovrastima del metodo di screening rispetto a quello di riferimento (Figura 3).

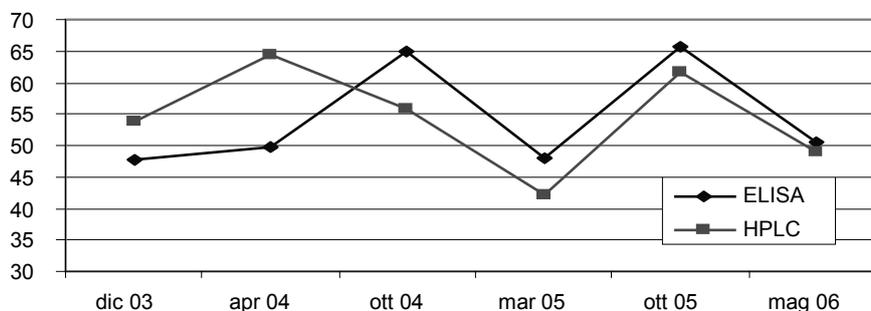


Figura 3. Confronto tra i valori di riferimento determinati con ELISA e HPLC (livello 50 ppt)

Aflatossina B₁ nel mais

I risultati delle elaborazioni dei quattro ring test degli ultimi due anni non evidenziano una tendenza costante di una metodica rispetto all'altra in relazione ai valori di riferimento, alla ripetibilità e riproducibilità (Tabella 2).

Tabella 2. Esempio di confronto valori di riferimento, sr e sR tra le due metodiche

Periodo	Valori di riferimento		Ripetibilità (sr)		Riproducibilità (sR)	
	HPLC	ELISA	HPLC	ELISA	HPLC	ELISA
mar. 2005	19,47	14,81	0,72	1,41	6,61	3,73
ott. 2005	14,82	14,42	0,51	1,12	4,52	5,41
mag. 2006	27,83	23,13	1,29	1,72	5,75	6,65
ott. 2006	13,20	14,73	0,75	0,71	3,05	5,90

DON e zearalenone nel mais

Per quanto riguarda queste due molecole è stato organizzato il primo *proficiency test* ad ottobre 2006, si riporta la sintesi dei risultati in Figura 4.

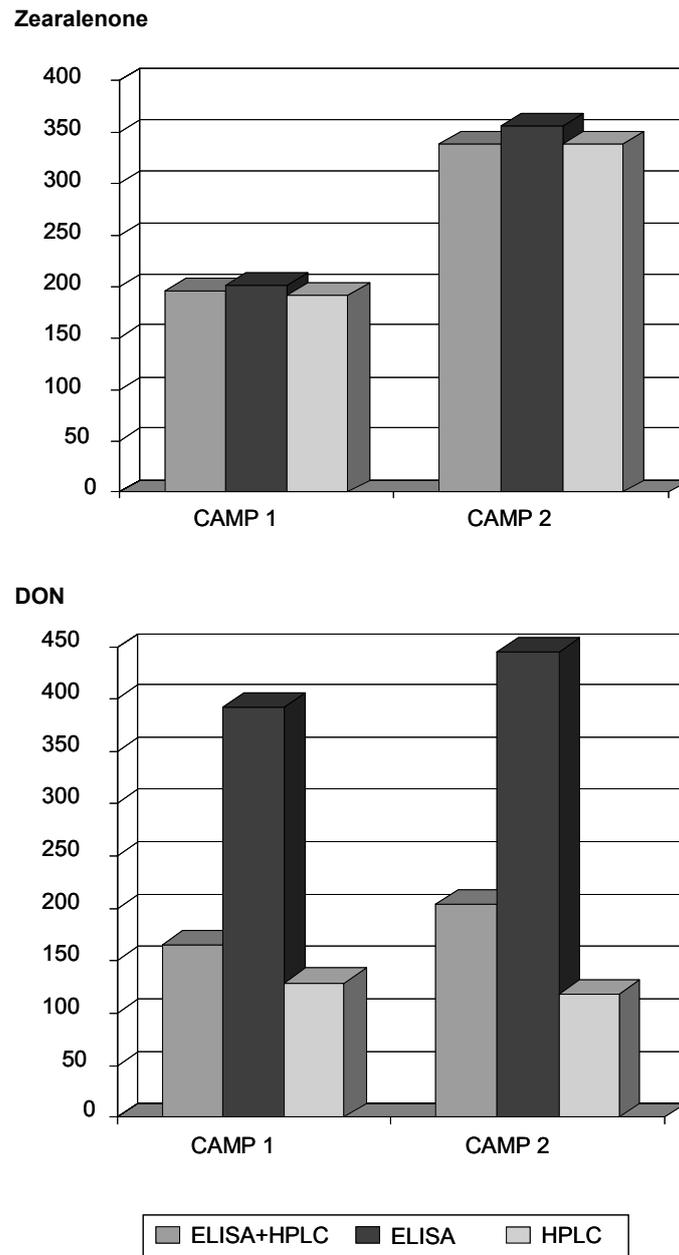


Figura 4. Risultati dei proficiency test di DON e zearalenone nel mais

OTA nel grano

Si riportano in Tabella 3 i dati ottenuti dalle elaborazioni dei due *proficiency test* sinora organizzati. Nell'ultimo risultano maggiormente sovrapponibili i valori di riproducibilità delle due metodiche.

Tabella 3. Confronto dei risultati delle due metodiche nei *proficiency test*

Periodo	Valori di riferimento		Ripetibilità (sr)		Riproducibilità (sR)	
	HPLC	ELISA	HPLC	ELISA	HPLC	ELISA
giugno 2006	6,66	4,71	0,32	0,48	2,40	3,85
	3,81	3,20	0,21	0,08	0,80	2,31
ottobre 2006	13,25	17,25	0,61	1,53	8,04	7,76
	8,29	9,03	0,21	2,08	3,85	3,94

OTA nel vino

I risultati riportati in Tabella 4 si riferiscono all'elaborazione complessiva delle metodiche ELISA e HPLC in quanto la quasi totalità dei laboratori ha partecipato con la metodica di riferimento.

Tabella 4. Risultati dei *proficiency test* test ocratossina A nel vino

Periodo	Valori di riferimento	Ripetibilità (sr)	Riproducibilità (sR)
ottobre 2005	1,58	0,12	0,66
	11,44	0,75	2,92
	4,29	0,37	1,43
maggio 2006	0,29	0,02	0,09
	3,39	0,20	1,23
	7,26	0,30	2,31
ottobre 2006	2,99	0,16	1,17
	6,16	0,19	2,25
	3,99	0,17	1,70

Conclusioni

I circuiti interlaboratorio organizzati dall'AIA hanno costituito nel settore lattiero-caseario un'esperienza di significativa validità in quanto hanno fornito dati relativi alla accuratezza analitica dei laboratori partecipanti non disponibili prima.

L'interesse dimostrato dai laboratori clienti nei riguardi dell'analisi delle micotossine, in questi ultimi anni, oltre a rispecchiare una situazione più vasta sul piano nazionale e internazionale ha costituito uno stimolo ad implementare i servizi forniti sinora dal Laboratorio dell'AIA che in tal senso opera con un'attenzione sempre crescente nei riguardi delle esigenze dei clienti stessi.

Attraverso le numerose elaborazioni statistiche eseguite 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.

Lo studio degli andamenti dei parametri suddetti, per quanto riguarda le molecole che interessano i più recenti *proficiency test*, necessita di una maggiore disponibilità di osservazioni.

In generale, 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 suggerendo la via della pianificazione di ulteriori *proficiency test*.

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

Luca Sillari, Enzo Casarini, Alberto Zaniboni, Kalinka Grozeva.
Controllo qualità Newlat srl, stabilimento "Giglio", Reggio Emilia

Scopo della ricerca

Sul cromatogramma dell'analisi HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) dell'aflatossina M₁ nel latte sono presenti due picchi corrispondenti ad altrettante sostanze.

Si trattadi due micotossine appartenenti entrambe al gruppo delle aflatossine, e cioè rispettivamente l'aflatossina M₂ e l'aflatossina M₁.

I due picchi escono sempre alla stessa distanza, e hanno ampiezze e altezze apparentemente proporzionate, rapporto che sembra venir meno in caso di problemi intervenuti nel corso dell'analisi.

Lo scopo di questo lavoro è valutare numericamente questo rapporto M₁/M₂, e verificare se è possibile sfruttarlo per monitorare il buon funzionamento dell'HPLC.

Osservazione del cromatogramma

Nelle condizioni strumentali utilizzate, il picco dell'aflatossina M₂ appare dopo circa 6,3 minuti mentre quello dell'aflatossina M₁ dopo circa 8,6 minuti.

Le Figure che seguono mostrano meglio di ogni spiegazione come si possono presentare le due sostanze sul cromatogramma.

Nel primo caso (Figura 1) i due picchi si presentano stretti e ben definiti, l'altezza della traccia dell'M₁ è circa 2 volte l'altezza dell'M₂. Nel secondo invece (Figura 2), ur rimanendo alla stessa distanza, i picchi tendono a presentarsi più schiacciati ma soprattutto ad avere la stessa altezza. Il primo grafico è quello che in base all'esperienza si può ritenere regolare, mentre il secondo è associato mad analisi non ottimali.

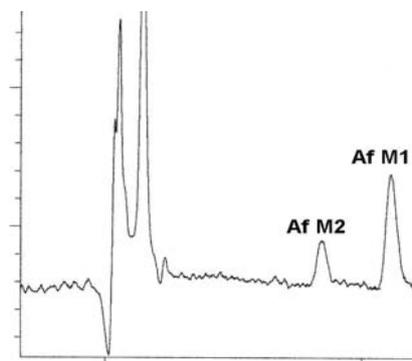


Figura 1. Esempio di cromatogramma regolare

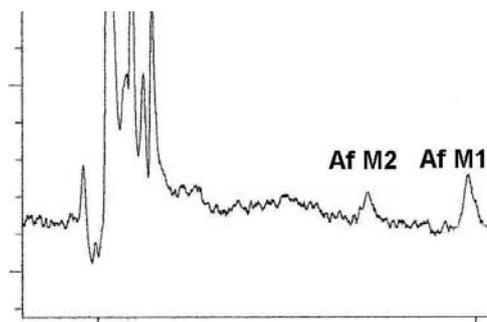


Figura 2. Esempio di cromatogramma irregolare

Partendo da quest'osservazione, si cerca un valore, se esiste, del rapporto M_1/M_2 , che sia possibile utilizzare come indicatore per valutare l'analisi.

Materiali e metodi

Per questo studio sono stati utilizzati i dati delle analisi di routine effettuate da Newlat srl su latte crudo e pastorizzato trattato nello stabilimento Giglio di Reggio Emilia nel periodo compreso tra settembre 2003 e giugno 2006.

Il periodo in questione è stato scelto perché caratterizzato da una serie di condizioni molto varie sia dal punto di vista stagionale, sia dal punto di vista strumentale.

Si parte dall'autunno 2003, che tutti ricordano come un periodo critico caratterizzato da un elevato grado di contaminazione del latte in seguito all'estate eccezionalmente calda e secca, per passare poi al 2004 e al 2005 e alla prima metà del 2006, periodi in cui non si hanno avuto sostanziali variazioni dalla norma.

Dal punto di vista strumentale, è stato possibile valutare la risposta in funzione di alcune variazioni e migliorie apportate allo strumento nel corso del tempo. Infatti benché la metodica dell'analisi non sia cambiata allo strumento sono stati sostituiti in tempi diversi la colonna e il fluorimetro.

Per l'estrazione sono state utilizzate 2 tipi di colonnine ad immunoaffinità: Vicam tipo Afla M_1 , e Rhone tipo Easy extract.

Calcolo del rapporto M_1/M_2

Il rapporto (M_1/M_2), non deve essere legato alla calibrazione dello strumento, ma alla sola lettura del fluorimetro in funzione di ciò che arriva all'occhio del rivelatore.

La calibrazione non può dare questa informazione perché si hanno 2 rette di taratura che vengono necessariamente calibrate in maniera autonoma, perdendo la possibilità di essere confrontate.

Il rapporto (M_1/M_2) si calcola perciò come rapporto tra le aree dei picchi sul cromatogramma: la costanza di questa grandezza è indice di buon funzionamento dell'HPLC, di un buon recupero, di una buona manualità e assenza di errori sistematici o accidentali.

Risultati

Su tali dati sono stati calcolati: la media $m(M_1/M_2)$, la deviazione standard $DS(M_1/M_2)$, il coefficiente di correlazione $r(M_1/M_2)$, il coefficiente di variazione $v(M_1/M_2)$ (definito come rapporto fra la deviazione standard e la media).

Il coefficiente di correlazione $r(M_1/M_2)$ tra le due variabili M_1 ed M_2 assume valori sempre compresi tra 0 e +1; questo indica che le due micotossine sono legate da una relazione di tipo lineare crescente.

Il coefficiente di variazione del rapporto $v(M_1/M_2)$ 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

La media (M_1/M_2) è pari a 3,51 punti nell'arco del periodo preso in esame.

La Tabella 1 mostra la media relativa a tutto il periodo dello studio, la media mensile e i relativi scarti, il coefficiente di correlazione $r(M_1/M_2)$ e le varie configurazioni dello strumento.

Tabella 1. Riepilogo generale dei dati

Data	M_1/M_2			$R(M_1/M_2)$ Coefficiente correlazione	Colonne di immuno- affinità	Fluorimetro	Colonna HPLC
	media mensile	media	scarto				
set-03	3,89	3,51	-0,38	0,83	Vicam	Hitachi F-1050	Vecchia
ott-03	4,59	3,51	-1,08	0,81	Vicam	Hitachi F-1050	Vecchia
nov-03	3,92	3,51	-0,41	0,81	Vicam	Hitachi F-1050	Vecchia
dic-03	3,46	3,51	0,05	0,94	Rhone	Hitachi F-1050	Vecchia
gen-04	3,47	3,51	0,04	0,84	Rhone	Hitachi F-1050	Vecchia
feb-04	3,35	3,51	0,16	0,84	Rhone	Hitachi F-1050	Vecchia
mar-04	3,17	3,51	0,34	0,47	Rhone	Hitachi F-1050	Vecchia
mag-04	3,13	3,51	0,38	0,41	Rhone	Hitachi F-1050	Vecchia
giu-04	3,81	3,51	-0,3	0,36	Rhone	Hitachi F-1050	Vecchia
lug-04	3,6	3,51	-0,09	0,81	Rhone	Hitachi F-1050	Vecchia
ago-04	3,3	3,51	0,21	0,68	Rhone	Hitachi F-1050	Vecchia
set-04	4,61	3,51	-1,1	0,87	Rhone	Hitachi F-1050	Vecchia
ott-04	3,91	3,51	-0,4	0,95	Rhone	Hitachi F-1050	Vecchia
gen-05	3,33	3,51	0,18	0,74	Rhone	Hitachi F-1050	Vecchia
feb-05	2,58	3,51	0,93	0,82	Rhone	Hitachi F-1050	Vecchia
mar-05	2,69	3,51	0,82	0,74	Rhone	Hitachi F-1050	Vecchia
apr-05	2,68	3,51	0,83	0,44	Rhone	Hitachi F-1050	Vecchia
mag-05	2,64	3,51	0,87	0,55	Rhone	Hitachi F-1050	Vecchia
giu-05	3,04	3,51	0,47	0,19	Vicam	Hitachi F-1050	Vecchia
lug-05	3,38	3,51	0,13	0,9	Vicam	Hitachi F-1050	nuova
ago-05	3,01	3,51	0,5	0,85	Vicam	Hitachi F-1050	nuova
ott-05	3,91	3,51	-0,4	0,99	Vicam	Hitachi F-1050	nuova
nov-05	3,54	3,51	-0,03	0,99	Rhone	Hitachi F-1050	nuova
dic-05	3,48	3,51	0,03	0,71	Vicam	Hitachi F-1050	nuova
gen-06	4,67	3,51	-1,16	0,97	Vicam	Shim. Rf 10 AXL	nuova
feb-06	3,77	3,51	-0,26	0,94	Vicam	Shim. Rf 10 AXL	nuova
mar-06	3,14	3,51	0,37	0,95	Rhone	Shim. Rf 10 AXL	nuova
apr-06	3,63	3,51	-0,12	0,96	Rhone	Shim. Rf 10 AXL	nuova
mag-06	3,53	3,51	-0,02	0,92	Rhone	Shim. Rf 10 AXL	nuova
giu-06	3,99	3,51	-0,48	0,81	Rhone	Shim. Rf 10 AXL	nuova

Definizione dei valori di riferimento

Definiamo alcuni valori di riferimento per la media $m(M_1/M_2)$, un range di valori per il rapporto (M_1/M_2) , un valore limite per il coefficiente di correlazione $r(M_1/M_2)$ al fine di fissare criteri di valutazione che permettano di utilizzare il rapporto (M_1/M_2) .

Considerando il valore medio del rapporto (M_1/M_2) e cioè $m(M_1/M_2) = 3,51$, si calcolano gli scarti delle medie mensili da questo valore.

Si vede che in massima parte (nel 77% dei casi), il valore di tali scarti sta dentro un intervallo compreso in $m(M_1/M_2) \pm 0,5$. Ritenendo accettabile tale differenza, si individua un range all'interno del quale si considera regolare la variazione del rapporto (M_1/M_2) , e cioè $m(M_1/M_2) \pm 0,5$ vale a dire $3,01 < (M_1/M_2) < 4,01$.

Per il coefficiente di correlazione $r(M_1/M_2)$ si deve tenere presente che più il valore si avvicina ad 1 maggiore è la correlazione tra le grandezze.

Alla luce di considerazioni sulla ottimale capacità di separazione della colonna, suffragate come si vedrà in seguito dai dati raccolti, si è stabilito che il valore $r(M_1/M_2) = 0,7$ è il limite al di sotto del quale si può pensare a qualche problema allo strumento.

Tenendo presente che questi parametri derivano da uno studio preliminare, si possono tuttavia definire dei valori di riferimento per il rapporto (M_1/M_2) : si tratta del valore medio $m(M_1/M_2) = 3,51$ in un range compreso tra $3,01 < (M_1/M_2) < 4,01$, e del coefficiente di correlazione $r(M_1/M_2) > 0,7$.

Variabili dell'analisi

Tre sono i fattori che possono influenzare l'analisi e quindi il rapporto (M_1/M_2) : il tipo di strumento, la stagionalità, il tipo di colonnine per l'estrazione.

Bisogna valutare il peso che queste variabili possono avere sul rapporto (M_1/M_2) e capire se lo facciano variare sensibilmente.

Influenza dello strumento: iniziamo prima di tutto a valutare la situazione in cui si operava con lo strumento vecchio secondo i dati in Tabella 1.

Osservando gli scarti dalla media si vede che si mantengono prevalentemente entro il range indicato del $\pm 0,5$, fino al mese di febbraio 2005. Da questa data in poi e fino al mese di giugno 2005 gli scarti aumentano superando abbondantemente il valore di $0,5$.

La stessa cosa si può dire per il coefficiente di correlazione, che si mantiene quasi costantemente su valori al di sotto di $0,7$ fino al mese di marzo 2005 e per il periodo fino a giugno 2005.

Questi risultati hanno fatto sorgere il dubbio che la colonna fosse ormai vecchia e in via di esaurimento, e che avesse perso la capacità di separare adeguatamente l'aflatossina M_1 dalla M_2 .

In seguito al cambio della colonna i valori sono tornati nei limiti assunti come riferimento con in più una notevole diminuzione del valore degli scarti e un aumento del coefficiente di correlazione.

Questo comportamento è segno evidente che il rapporto (M_1/M_2) era influenzato dalle prestazioni della colonna, e a riprova di ciò si aggiunge il fatto che i anche risultati dei ring tests seguenti sono stati nettamente migliori, e non si è più dovuto ricorrere a continue calibrazioni.

Dal mese di gennaio 2006 è stato sostituito anche il fluorimetro.

Anche in questo caso i valori del rapporto (M_1/M_2) rientrano pienamente nei limiti fissati e si riscontra in più un ulteriore innalzamento del coefficiente di correlazione, imputabile quasi certamente alla maggior sensibilità del nuovo fluorimetro.

Alla luce di queste considerazioni, si può affermare quindi che il tipo di strumento o la sua configurazione non hanno influenza sul valore del rapporto (M_1/M_2), mentre ne hanno le prestazioni dell'apparato nel caso in cui non siano ottimali per un cattivo funzionamento.

Stagionalità: se si escludono i mesi da febbraio a giugno 2005, quelli in cui si è visto che lo strumento aveva problemi alla colonna, l'andamento è anche in questo caso regolare e rispetta nei valori i limiti individuati.

In particolare non si riscontrano altri casi in cui sia il valore medio del rapporto (M_1/M_2), sia il coefficiente di correlazione r (M_1/M_2) siano fuori standard, perciò si può affermare che anche l'andamento stagionale, non influenza in maniera sostanziale il rapporto M_1/M_2 .

Si riscontrano è vero altri valori non in standard, ma non sono direttamente collegabili all'andamento stagionale essendo presenti lungo tutto il periodo di osservazione.

Non sembrano nemmeno essere legati a particolari condizioni strumentali sempre per la loro distribuzione casuale.

In mancanza di ipotesi certe a riguardo, e potendo escludere eventi accidentali o particolari condizioni anomale, conviene attenersi al principio, in attesa di avere ulteriori dati, per cui è indice di un problema l'aver i due parametri contemporaneamente fuori standard.

Il tipo di colonnina usata per l'estrazione: sono state usate colonnine di due tipi Vicam e Rhone, ma non sono stati osservati fenomeni associabili a quest'alternanza.

Tale lettura dei dati conferma che i valori di riferimento individuati per il rapporto (M_1/M_2) sono rappresentativi, e che si riesce a mettere in evidenza le sue variazioni legate al funzionamento dello strumento.

Fattori che influenzano negativamente l'analisi

Escludendo il fattore stagione, il tipo di strumento e di colonnine, ciò che può far variare il rapporto (M_1/M_2) è un evento accidentale legato a malfunzionamenti o errori dell'operatore.

Di seguito sono riportati alcuni esempi legati ad errori di manualità in cui si possono trovare variazioni dai valori di riferimento e caratterizzati da un cromatogramma in cui i due picchi tendono ad avere la stessa altezza.

Un caso relativamente frequente è quello in cui la percolazione del latte attraverso la colonnina sia troppo rapida, così da perdere l'aflatossina M_1 e avere un picco più basso del normale.

Nella fase di eluizione del campione dalla colonnina è possibile che il campione non sia sgrassato adeguatamente, perciò succede che al rivelatore arrivi un alto rumore di fondo tale da nascondere la M_2 : questo fatto non permette di capire se anche per l' M_1 è successa la stessa cosa e quindi se c'è il rischio di sottostimare il valore reale.

In taluni casi, in presenza di latti particolarmente grassi o mal sgrassati, può rivelarsi utile lavare la colonnina con acqua calda perché il grasso ne ha intasato il setto contenente l'anticorpo.

Con questa operazione viene lavato via completamente il grasso ma anche l'aflatossina M_2 , tanto che il picco non compare più nemmeno sul cromatogramma; rimane presente solo quello dell' M_1 ma con il rischio che l'acqua calda possa aver dilavato anche quella, portando a sottostimare il risultato.

In generale il non rispetto delle raccomandazioni del produttore delle colonnine di estrazione, in particolare una eccessiva velocità di passaggio del campione sono fonti di errore in questo senso.

Variazioni nella composizione dell'eluente influiscono largamente, non solo facendo variare il tempo di ritenzione ma riducendo la capacità di separare le sostanze dando origine al cromatogramma in cui i picchi si presentano alla stessa altezza.

Conclusioni: come utilizzare in pratica il rapporto M_1/M_2

Il modo più semplice e intuitivo per valutare la correttezza di un'analisi semplicemente utilizzando il rapporto M_1/M_2 è valutare l'altezza relativa dei due picchi.

Se l'altezza relativa dei due picchi è praticamente identica, significa che è intervenuto un qualche problema durante l'analisi che ha portato alla cattiva separazione delle due sostanze.

Se invece non si evidenziano variazioni ma si vuole monitorare il funzionamento del proprio strumento allora è bene calcolare la media e il coefficiente di correlazione.

In questo modo con un semplice calcolo alla fine della sessione d'analisi, o di un periodo di tempo che può essere ad esempio settimanale o mensile, si può avere un parametro per valutare il funzionamento di tutto l'apparato.

In questo modo si escludono in maniera semplice e con una certa sicurezza, problemi che non si evidenziaerebbero macroscopicamente ma che potrebbero portare ad avere un risultato costantemente falsato.

VALUTAZIONE DEL CONTENUTO DI OCRATOSSINA A IN CAMPIONI DI VINO SICILIANO

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

Introduzione

Le contaminazioni degli alimenti in micotossine sono state segnalate e studiate ormai da lungo tempo come elementi di rischio per la salute dell'uomo e degli animali. Dai diversi studi effettuati è emersa la presenza di micotossine in svariate matrici alimentari utilizzate nell'abituale dieta umana e come mangimi per gli animali. Da questa breve premessa si evidenzia la gravità e la complessità del problema, che implica la necessità di azioni volte a minimizzare, fino ad annullare, il tenore di tali sostanze. Zimmerli e Dick (1), in un lavoro pubblicato nel 1996, segnarono per la prima volta la presenza di ocratossina A anche nei vini e nei succhi d'uva, prodotti merceologici che sembravano immuni da tale contaminazione in quanto l'acidità del vino era ritenuta una difesa nei riguardi dei microrganismi patogeni.

La Comunità Europea ha individuato con il regolamento (CE) N. 123/2005 del 26 gennaio 2005 il limite di legge, che definisce il tenore massimo ammissibile di ocratossina A (OTA) nei vini. Tale limite, applicato ai prodotti a partire dalla vendemmia 2005, è di 2 ppb.

L'OTA, come riportato ampiamente in bibliografia è una micotossina ad azione nefrotossica, teratogena, immunosoppressiva e carcinogena negli animali e nell'uomo. Tale tossina è prodotta da funghi del genere *Penicillium* (*P. verrucosum*) e *Aspergillus* (*A. ocraceus*), in particolare i *Penicillium*, produttori OTA, crescono bene in un largo intervallo di temperatura (4-31°C), gli *Aspergillus* nell'intervallo 12-39°C. I Paesi del bacino del Mediterraneo e in particolare le regioni del Sud Italia come Puglia, Sicilia e Calabria, per le loro condizioni climatiche, sono a rischio per alti contenuti di OTA nelle uve e nei suoi derivati, anche se con forti differenze da un'annata all'altra.

Il CoRiBiA (Consorzio di Ricerca sul Rischio Biologico in Agricoltura), Ente di diritto pubblico della Regione Siciliana, che persegue senza fini di lucro, lo sviluppo e la salubrità dell'agricoltura siciliana, ha intrapreso una ricerca, che tra i suoi primi obiettivi ha quello di verificare il "rischio di contaminazione da OTA" dei vini rappresentativi delle produzioni enologiche del territorio regionale, sia per le annate antecedenti alla Direttiva Europea (n. 123/2005), che per quelle successive al 2005. Inoltre, poichè non è noto, il rischio di contaminazione in campo nei grappoli d'uva in relazione ad ambienti differenti della Sicilia; il Consorzio, a partire dalla vendemmia 2006, sta analizzando campioni di mosto d'uva provenienti da zone con condizioni viticole diverse. Questa indagine, che sarà portata avanti almeno per tre produzioni, ha il fine di verificare se e quali zone della Sicilia sono effettivamente a rischio di contaminazione.

Inoltre a scopo conoscitivo sono stati analizzati alcuni campioni di vino liquoroso siciliano, che per la tipologia di vinificazione si ipotizza contengano un livello di ocratossina A molto più elevato rispetto ai vini ottenuti per vinificazione tradizionale.

Materiali e metodi

Per verificare il contenuto di OTA nei prodotti vinicoli siciliani, sono stati analizzati 428 campioni di vini tra bianchi e rossi, di cui 388 erano prodotti commerciali e 40 prodotti non imbottigliati. I campioni appartenevano alle vendemmie 2003, 2004 e 2005, ad eccezione dei 40 campioni non ancora commercializzati, che erano unicamente dell'anno 2004. I vini provenivano dalle province siciliane di Palermo, Ragusa, Catania, Enna, Siracusa e Trapani.

Si trattava di 347 vini monovarietali per le uve Nero d'Avola, Syrah, Merlot, Nerello Mascalese, Perricone, Cabernet Sauvignon, Chardonnay, Inzolia, Grillo, Grecanico, e di 81 blend per le varietà indicate sopra. È stato anche valutato il contenuto di OTA in 40 campioni di vino liquoroso siciliano tipo Passito di Pantelleria, Moscato di Pantelleria, Malvasia di Lipari. I campioni sono stati conservati a temperatura ambiente e sono stati analizzati appena aperti. Ogni campione è stato analizzato in doppio e il valore di ocratossina A è stato corretto per il recupero.

Come metodologia di analisi abbiamo utilizzato il metodo di Brera *et al.* (2), a cui abbiamo apportato una modifica nella fase di lavaggio della colonnina di immunoaffinità. In particolare abbiamo lavato utilizzando unicamente PBS e non PBS e acqua. Per la fase di purificazione del campione sono state utilizzate delle colonnine di immunoaffinità ochraprep con un sistema automatizzato ASPEC della Gilson. La successiva fase analitica è stata effettuata con sistema HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), con rivelatore spettrofluorimetrico (333 nm EC- 460 nm EM). Per la quantificazione è stata costruita una curva di calibrazione con coefficiente di correlazione >0,999. Il recupero medio percentuale del metodo era compreso tra l'85% al 95%. Il limite di rivelazione era di 0,01 ng/mL di vino.

In Figura 1 è riportato il cromatogramma dell'ocratossina A in un campione di vino Nero d'Avola.

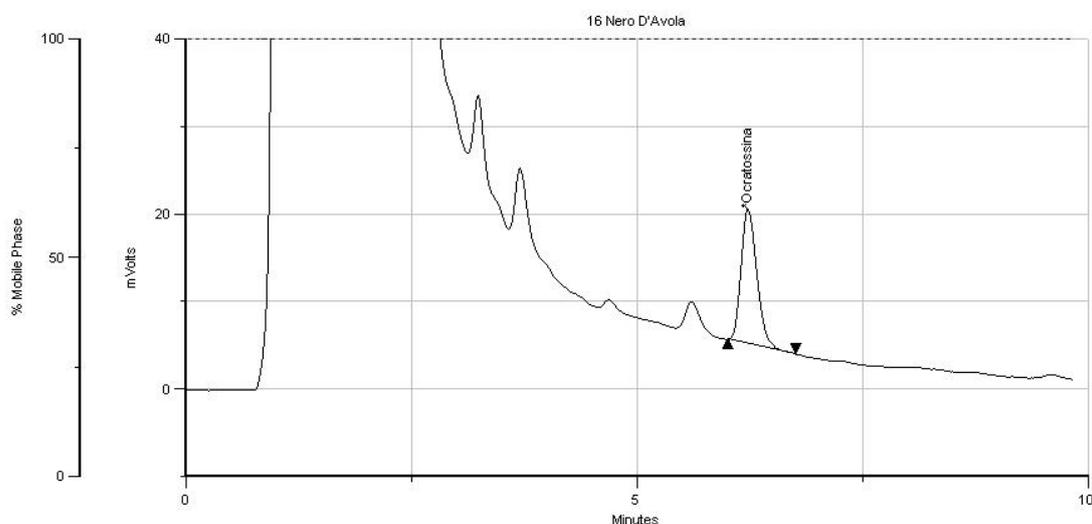


Figura 1. Cromatogramma dell'OTA in un campione di vino Nero d'Avola

Nella Figura 2 è riportata la retta di taratura (0,02-2,5 ng/mL) con $r^2 > 0,999$.

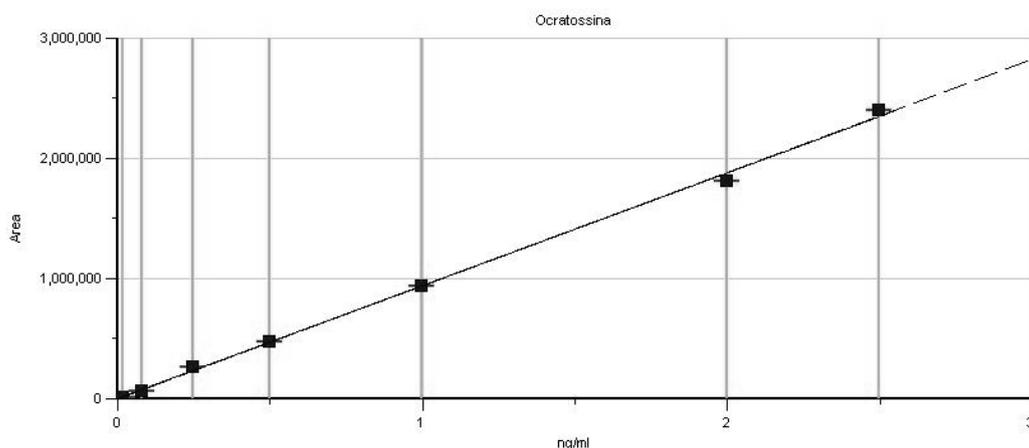


Figura 2. Retta di calibrazione per l'OTA (0,02-2,5 ng/mL)

Risultati e conclusioni

Nella Tabella 1 sono riportati i valori minimi e massimi di OTA per tutti i 428 campioni in relazione alla differente vinificazione (rossi, bianchi e liquorosi); nella Tabella 2 sono riportati i vini, escluso i liquorosi, in relazione alle varietà dei vitigni.

Tabella 1. Contenuto di OTA ($\mu\text{g/L}$) in campioni di vini (numero totale 428)

Tipologia di campioni siciliani	Campioni analizzati (n.)	Vendemmia (anno)	Valore \pm DS	
			minimo	massimo
Vini prelevati in Azienda (non imbottigliati)	40	2004	0,01 \pm 0,001	0,39 \pm 0,02
Vini bianchi (commerciali)	154	2003, 2004, 2005	0,01 \pm 0,001	0,70 \pm 0,01
Vini rossi (commerciali)	234	2003, 2004, 2005	0,01 \pm 0,002	1,15 \pm 0,01
Vini liquorosi	50	2003, 2004, 2005	0,05 \pm 0,01	1,12 \pm 0,01

Tabella 2. Contenuto di OTA ($\mu\text{g/L}$) in campioni di vini per vitigno

Tipologia di campioni siciliani	Campioni analizzati (n.)	Vendemmia (anno)	Valore \pm DS	
			minimo	massimo
Nero d'Avola	101	2003, 2004, 2005	0,01 \pm 0,002	1,15 \pm 0,01
Merlot	26	2003, 2004, 2005	0,03 \pm 0,001	0,23 \pm 0,01
Cabernet Sauvignon	23	2003, 2004, 2005	0,03 \pm 0,001	0,55 \pm 0,01
Syrah	26	2003, 2004, 2005	0,02 \pm 0,001	0,43 \pm 0,01
Altrimonovarietali Bianchi	23	2003, 2004, 2005	0,02 \pm 0,001	0,70 \pm 0,01
Altrimonovarietali Rossi	15	2003, 2004, 2005	0,01 \pm 0,001	0,30 \pm 0,01
Grillo	34	2003, 2004, 2005	0,01 \pm 0,001	0,37 \pm 0,01
Inzolia	29	2003, 2004, 2005	0,02 \pm 0,001	0,93 \pm 0,02
Chardonnay	30	2003, 2004, 2005	0,01 \pm 0,001	0,20 \pm 0,01
Blend di bianchi	38	2003, 2004, 2005	0,01 \pm 0,001	0,47 \pm 0,01
Blend di rossi	43	2003, 2004, 2005	0,02 \pm 0,001	0,76 \pm 0,01

361 dei 428 campioni di vino sono risultati positivi all'ocratossina A. Mentre per 67 dei 428 l'ocratossina A è risultata al di sotto del limite di rivelazione (*Limit Of Detection*, LOD = 0,01 ng/mL). In percentuale il 16% dei campioni è risultato non contaminato (Figura 3). In particolare la percentuale dei campioni positivi all'ocratossina A per la vendemmia 2005, anno da cui è entrata in vigore la restrizione è risultata minore rispetto all'anno 2003, ma sostanzialmente la stessa dell'anno 2004.

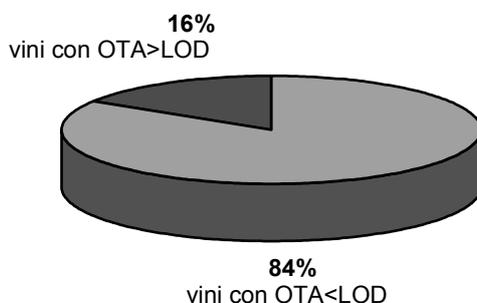


Figura 3. Contenuto medio percentuale di OTA nei vini (2003-2005)

Il valore massimo di OTA determinato è stato pari a $1,15 \pm 0,01$ $\mu\text{g/mL}$.

Mediamente tutti i campioni di vino positivi all'OTA, avevano un contenuto al di sotto del limite di legge (2 ppb) e quindi inferiore all'ADI (*Acceptable Daily Intake*) 5 ng/kg peso corporeo/giorno.

I risultati ottenuti dai vini con ocratossina A sono confortanti in quanto la contaminazione non è eccessiva, ma dimostrano che ancora non è stato eliminato il rischio di una possibile contaminazione.

Bibliografia

1. Zimmerli B, Dick R. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assesement. *Food Affit. Contam.* 1996;(6):655-68.
2. Brera C, Miraglia M, *et al.* Automated HPLC Method for the Determination of Ochratoxin A in Wine Samples. *J Liquid Chromatography & Related Technologies* 2003;26:119-33.

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

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

Introduzione

Le attuali tecnologie rendono disponibile una vasta scelta di metodiche applicabili 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 si dovrebbe poter considerare *fit for purpose* (1), ovvero, commisurata allo scopo. Questi aspetti rivestono particolare importanza quando vengano richieste metodiche non distruttive, semplice preparazione del campione e, possibilmente flessibilità di impiego. Tali necessità sono frequenti nelle realtà di campo, ad esempio nelle fasi di screening delle materie prime. Ulteriore importanza di metodiche caratterizzate dalla possibilità di analizzare un elevato numero di campioni in tempi brevi e 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".

Il naso elettronico viene definito come uno "Strumento costituito da un gruppo di sensori elettrochimici con specificità parziale alle molecole da analizzare associato ad un sistema di analisi in grado di riconoscere l'odore proveniente dalla frazione volatile di matrici semplici e complesse" (2). Tali proprietà rendono il naso elettronico uno strumento estremamente versatile e a basso costo di esercizio, indicato quindi anche come metodo rapido ed economico di controllo della qualità delle derrate alimentari.

Nell'esperienza descritta si è voluta verificare, in modo preliminare, la capacità di un naso elettronico nel discriminare tra campioni di mais (*Zea mais*) naturalmente contaminati e campioni non contaminati da aflatoSSine. A tale scopo l'approccio sperimentale è stato impostato impiegando una selezione di 28 campioni di mais nazionale, naturalmente contaminati da aflatoSSine. Dopo analisi tramite naso elettronico, i dati ottenuti sono stati esaminati statisticamente con tecniche chemometriche con l'intento di valutare la capacità della procedura adottata nel discriminare tra campioni positivi e negativi alla presenza di aflatoSSine.

Materiali e metodi

Per l'esperienza in oggetto sono stati impiegati 28 campioni di mais (*Zea mais*) nazionale macinato. Ciascun campione è stato frazionato in campioni analitici omogenei conservati a -20°C. Nella prima fase della sperimentazione il contenuto naturale in aflatoSSine totali di ciascun campione è stato stimato tramite saggio immunoenzimatico (limite di rilevabilità pari a 1ppb e 3ppb in ranges di concentrazione di 1-20ppb e 4-40ppb rispettivamente). I risultati di tale analisi sono stati considerati di riferimento per l'impostazione della successiva analisi

tramite naso elettronico (*Electronic Nose*, EN). Tre aliquote di 3g per ciascun campione, sono state chiuse ermeticamente in *vial* da 12 mL. Lo spazio di testa di ciascuna *vial* è stato quindi sottoposto ad analisi tramite EN PEN2 (Air sense Analytics GmbH, Sherwin, Germania), dotato di 10 sensori (1- W1C Aromatic1, 2 – W5S Broadrange, 3 – W3C Aromatic2, 4 - W6S Hydrogen, 5 - W5C Aromatic-aliphatic, 6 - W1S Broad- methane, 7 - W1W Sulphur-organic, 8 - W2S Broad-alcohol, 9 - W2W Sulphur-chloride, 10 - W3S Methane-aliphatic) di tipo MOS (Semiconduttori ad Ossidi di Metallo) ed equipaggiato con autocampionatore e arricchitore/desorbitore EDU2 (Air sense Analytics GmbH, Sherwin, Germania).

Le fasi dell'analisi hanno compreso: equilibratura a temperatura ambiente dei campioni dopo chiusura ermetica delle *vial* tramite tappo settato, riscaldamento tramite fornello-agitatore, adsorbimento e desorbimento termici tramite arricchitore/desorbitore EDU2, sottomissione dello spazio di testa proveniente dai campioni ai 10 sensori MOS dell'EN, registrazione delle curve ottenute dallo strumento, analisi dei dati ottenuti tramite tecniche chemometriche utilizzando il software statistico SAS (3). Allo scopo di definire le impronte olfattive meglio caratterizzanti matrice e micotossine, le fasi del protocollo elencate sono state ripetute più volte, apportando variazioni relativamente alla durata di equilibratura, riscaldamento, adsorbimento, desorbimento, contatto con le celle dei sensori dello spazio di testa trattato, relativamente alla temperatura di riscaldamento, adsorbimento, desorbimento e relativamente a flusso di adsorbimento, desorbimento e di camera. Di volta in volta la qualità dei dati forniti dai diversi protocolli è stata verificata tramite analisi chemometrica. Prima di sottoporre i dati ottenuti dallo strumento a qualunque genere di modello statistico, questi sono stati pretrattati secondo la formula $R(j)=[R(j)-R0(j)/R0(j)]$, dove $R(j)$ indica il valore di resistenza elettrica dello specifico sensore e $R0(j)$ la resistenza elettrica della corrispondente "baseline" (4, 5). Ciò consente di confrontare campioni acquisiti in sedute diverse.

L'analisi statistica dei dati ha compreso *Principal Component Analysis* (PCA) in matrice di correlazione ed *Cluster Analysis* come approcci all'esplorazione dei dati. Successivamente è stato impiegato un modello classificativo tipo *Linear Discriminant Analysis* (LDA). Le analisi sono state svolte tramite il software statistico SAS (SAS, Cary, NC USA, 2001).

Risultati e discussione

I risultati del saggio immunoenzimatico, relativi ai 28 campioni di mais, hanno evidenziato la presenza di 9 campioni negativi e 19 positivi. In funzione di tali risultati i campioni sono stati suddivisi in due classi: campioni positivi e campioni negativi alla presenza di aflatossine.

Al fine di mettere a punto i parametri strumentali dello schema analitico con EN più efficaci nel discriminare tra campioni positivi e negativi, come sopra indicato, sono state considerate come riferimento le analisi ottenute da ciascun campione dal saggio immunoenzimatico e applicate ripetutamente PCA e analisi dei cluster (grafici ed risultati d'analisi non riportati). Al termine di tale fase preliminare è stato selezionato un protocollo di acquisizione dell'impronta olfattiva della durata totale di 26 minuti.

I risultati finali hanno mostrato, attraverso il *loading plot* (non riportato graficamente) della PCA, come i sensori n. 2 (W5S - Broadrange) e n. 7 (W1W - Sulphur-organic) dell'EN si siano dimostrati i più efficaci nel discriminare fra positività e negatività. Il successivo score plot, derivante ancora dalla PCA, mostra graficamente la separazione dei due gruppi di campioni effettuata utilizzando la risposta dei due sensori citati (Figura 1).

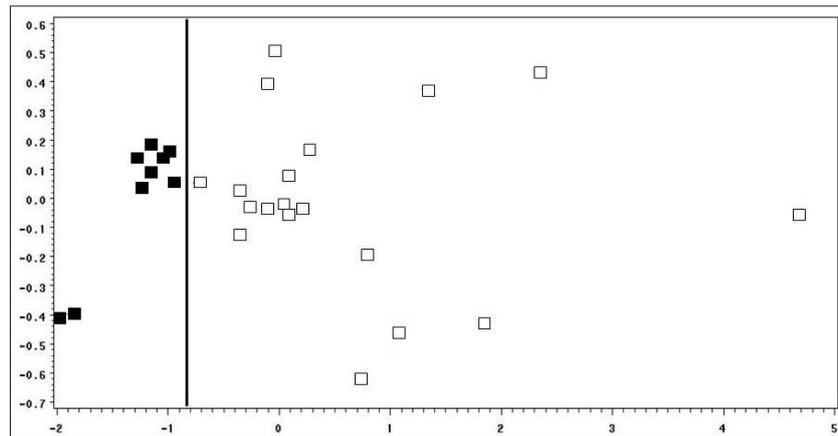


Figura 1. Score plot dalla PCA: sul lato sinistro del grafico sono posizionati i campioni negativi (simboli quadrati pieni), separati dai campioni positivi (cornici quadrangolari), posti sul lato destro

Il modello impiegato ha permesso di spiegare, attraverso la prima componente principale, il 96,21% della variabilità totale dei dati.

Ulteriormente, l'analisi dei cluster (metodo "Average linkage") è stata utilizzata allo scopo di verificare se, nella naturale struttura dei dati, ovvero senza fornire indicazioni a priori relativamente alle due classi d'appartenenza dei campioni, esistessero cluster separati tra campioni positivi e negativi. L'analisi, impostata con l'uso dei sensori n. 2 e n. 7 ha confermato la presenza di un cluster riferibile ai soli campioni negativi e separato da quelli relativi ai campioni positivi (Figura 2).

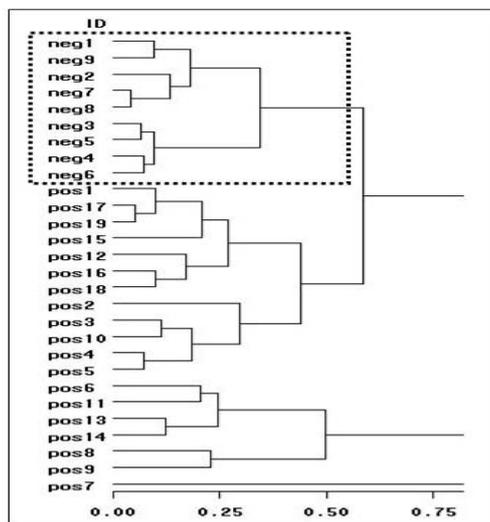


Figura 2. Dendrogramma relativo alla Cluster Analysis (il cluster relativo ai soli campioni positivi è circoscritto con tratteggio)

I dati sono infine stati analizzati mediante l'impostazione di un modello classificativo in grado di assegnare ciascun campione ad una delle due classi. Nello specifico è stata impiegata una LDA (Tabella 1) i cui risultati indicano come tutti i campioni siano stati correttamente classificati.

Tabella 1. Risultati della LDA

Classi	Numerosità totale (28)	Campioni classificati correttamente
NEG (AFLA = 0 analitico)	9	9
POS (AFLA > 0 analitico)	19	19

Conclusioni

Il naso elettronico, abbinato ad analisi chemometrica dei dati generati, si è dimostrato in grado di classificare correttamente campioni di mais naturalmente contaminati da aflatossine in relazione alla presenza/assenza delle micotossine stesse.

Con una durata per singola analisi di circa 30 minuti e una minima preparazione del campione, l'analisi tramite naso elettronico si conferma metodica di screening rapida e flessibile per la valutazione qualitativa dei prodotti destinati all'alimentazione sia umana che animale.

Bibliografia

1. Larsen JC, Josephine Hunt J, Perrin I, Ruckebauer P. Workshop on trichothecenes with a focus on DON: summary report. *Toxicology Letters* 2004;153:1-22.
2. Gardner JW, Bartlett PN. A brief history of electronic noses. *Sensors and Actuators B* 1994;18(1-3):210-1.
3. SAS Institute. *SAS/STAT*. User's Guide, Version 8. Cary, NC, U.S.A; 1999.
4. Brudzewski K, Osowski S, Markiewicz T. Classification of milk by means of an electronic nose and SVM neural network. *Sensors and Actuators B* 2004;98:291-8.
5. Brudzewski K, Osowski S, Markiewicz T, Ulaczyk J. Classification of gasoline with supplement of bio-products by means of an electronic nose and SVM neural network. *Sensors and Actuators B* 2006;113:135-41.

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 (b), Tommaso Lombardi (b), Adriano Marocco (c)
 (a) *Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura, Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Bergamo*
 (b) *Syngenta Seeds SAS Saint-Sauver (Francia) e Casalmorano (CR)*
 (c) *Istituto di Agronomia generale e Coltivazioni erbacee, Università Cattolica del S. 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 (1, 2). Inoltre, è stata applicata per stimare il contenuto in ergosterolo e in micotossine nella granella dei cereali (3) (4). In un nostro precedente lavoro, è stata valutata l'applicabilità della spettroscopia NIR per quantificare i funghi micotossigeni e 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* (5). In questo lavoro, si estende l'analisi a 728 linee pure di mais, rappresentative dei *breeding group* "Stiff Stalk" e "non Stiff Stalk", infettate artificialmente con isolati di *F. verticillioides*. 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.

Nel 2005, sono state allevate in campo 728 linee pure di mais di Syngenta Seeds appartenenti al *breeding group* "Stiff Stalk" (393 linee) e "non Stiff Stalk" (335 linee). Le spighe sono state infettate artificialmente con isolati di *F. verticillioides* impiegando la tecnica "pin-bar". Sulle spighe raccolte è stato valutato il grado di infezione fungina e i valori sono stati riferiti ad una scala percentuale di infezione (DSR, *Disease Severity Rating*) da 1 (0%, no infezione) a 5 (76-100% di cariossidi per spiga con infezione visibile) (6).

Le fumonisine B₁, B₂ e B₃ sono state determinate in HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) con il metodo proposto da Shephard *et al.* (7).

Per l'analisi NIR, i campioni sono stati divisi in due gruppi: 350 campioni sono stati utilizzati per lo sviluppo delle calibrazioni, la restante parte è stata usata per testare la bontà dei modelli di calibrazione sviluppati. L'analisi NIR è stata condotta utilizzando uno spettrofotometro modello 6500 (VIS/NIR) (della FOSS NIRSystems, Inc, Silver Spring, MD, USA) con rivelatore da 400 a 2500 nm. Il software per l'acquisizione degli spettri, l'elaborazioni matematiche e statistiche era fornito con lo strumento dalla *Infrasoft International* (ISI Port Matilda, PA, USA). Le equazioni di calibrazione sono state sviluppate usando il software WINISI Versione 1.5 Infracsoft International (ISI Port Matilda, PA, USA). Le migliori equazioni per ciascun parametro sono state selezionate usando la radice quadrata del più basso errore di validazione incrociata (*Root-Mean-Square Error of Cross-Validation*, RMSECV) come una misura della capacità di predizione del modello; questo parametro consente di avere informazioni sia sulla precisione che sull'accuratezza del modello (8). Sono state sviluppate equazioni di calibrazione utilizzando sia la granella che la farina di mais.

L'infezione media da *Liseola* sulle spighe è stata di 2,9 con valori minimi e massimi, rispettivamente, di 1,2 e 5,0. La distribuzione dell'infezione da *Liseola* si è approssimata alla normale (Figura 1).

Un andamento simile è stato rilevato per la produzione di fumonisina B₁ (Figura 2) in cui il 70% circa dei campioni aveva una concentrazione di FB₁ compresa tra 0 - e 100 mg/kg con un valore medio di 82,9 mg/kg.

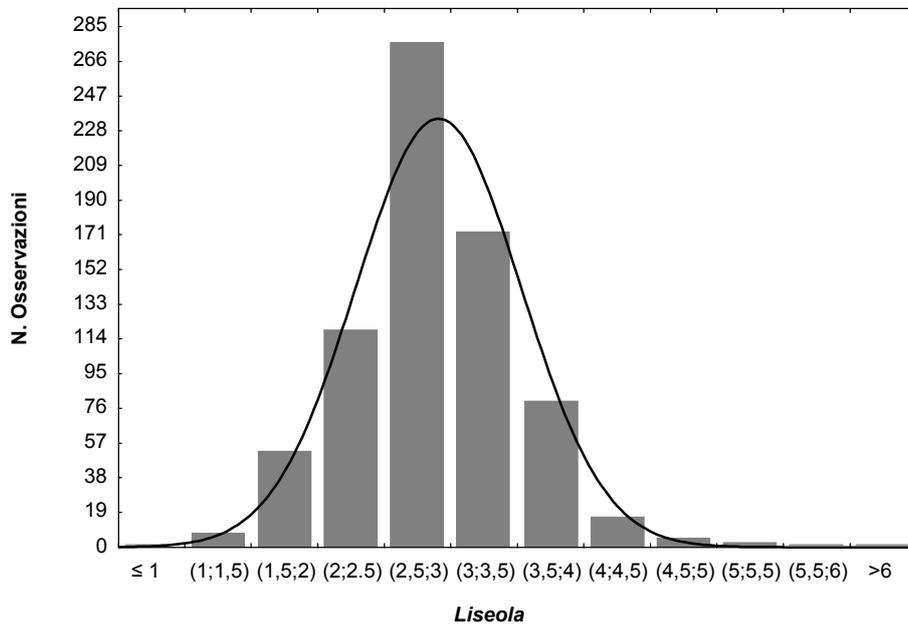


Figura 1. Distribuzione di *Liseola* in campioni di granella di mais

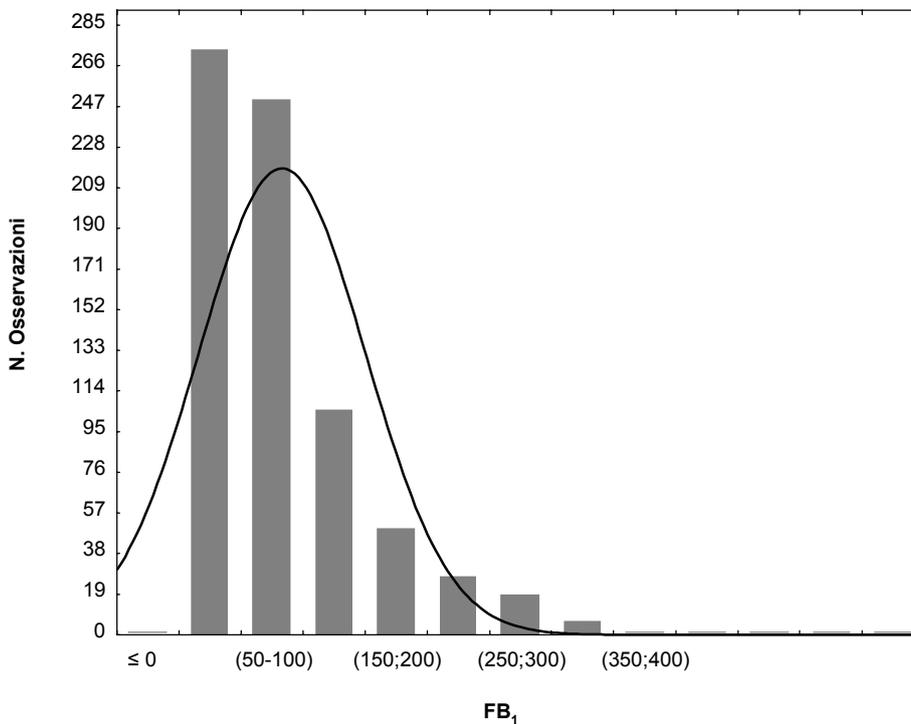


Figura 2. Distribuzione di fumonisina B₁ in campioni di farine di mais

Pochi campioni hanno raggiunto livelli di FB₁ superiori a 500 mg/kg. Il contenuto medio delle tossine FB₂ e FB₃ è stato, rispettivamente, di 22,8 e 7,2 mg/kg. I valori delle deviazioni standard relative a FB₁, FB₂ e FB₃ hanno evidenziato un'ampia variabilità per i contenuti delle singole fumonisine misurate nelle farine di mais con valori, rispettivamente di 66,8, 20,5 e 6,5. La variabilità riscontrata nei materiali utilizzati in questo studio, ha consentito di sviluppare un modello predittivo NIR per determinare la concentrazione delle tre principali fumonisine prodotte in seguito alle infezioni da *Liseola*.

Nel caso delle farine di mais, i parametri statistici dei modelli sviluppati per le fumonisine ed espressi in termini di coefficiente di calibrazione (R²) ed errore standard di calibrazione (SEC) sono stati compresi, rispettivamente tra 0,71 e 0,81 e tra 2,5 e 25,2. Per la validazione dei modelli, i parametri misurati quali, il coefficiente di correlazione di validazione incrociata (r²) e l'errore di validazione incrociata (SECV) hanno fatto registrare, rispettivamente, valori pari a 0,76 e 28,0 e 0,68 e 2,67 e per FB₁ ed FB₃. Il confronto con il modello precedentemente sviluppato da Berardo *et al.* (5) è stato possibile solo per la fumonisina B₁, la tossina presente in maggiore quantità nei materiali infettati da *Liseola*. I coefficienti di calibrazione (R²) per i due modelli sono stati superiori a 0,8 mentre, l'errore di calibrazione è risultato pari 12,8 nel primo modello e 25,2 nel secondo. La maggiore incidenza di quest'ultimo deriva dal maggior numero di campioni impiegati per lo sviluppo dell'equazione di calibrazione. Sono stati sviluppati i modelli di calibrazione relativi al contenuto in fumonisina B₂, B₃ e in fumonisine totali. Le statistiche relative sono state dello stesso ordine di grandezza di quelli ottenuti per la fumonisina B₁ e sono stati, rispettivamente, 0,78, 0,71 e 0,80 per il coefficiente di calibrazione R² e 7,05, 2,52 e 34,6 per l'errore di calibrazione. L'affidabilità di questi ultimi modelli è stata saggiata utilizzando la tecnica della validazione incrociata ed è risultata di pari magnitudine del modello precedentemente sviluppato con valori di correlazione e errore standard di validazione incrociata pari, rispettivamente, a 0,75, 0,68 e 0,77 e a 7,59, 2,7 e 37,4, per FB₂, FB₃ e fumonisine totali.

Per i campioni sotto forma di granella, sono stati sviluppati analoghi modelli di calibrazione anche se i parametri statistici ottenuti sono stati inferiori a quelli riferiti alle farine. I modelli sono utilizzabili comunque per attività di selezione o per discriminare fra partite di mais infette e non infette. I valori dei parametri delle equazioni di calibrazione, espressi come R² e errore standard di calibrazione, sono stati, rispettivamente, di 0,68, 0,63 e 0,69 e di 7,53, 2,4 e 35,8 per FB₂, FB₃ e fumonisine totali.

Non è stato possibile il confronto fra i modelli per la determinazione dell'incidenza delle infezioni fungine perché nel modello precedentemente sviluppato è stato impiegato un metodo di identificazione specifico per *F. verticillioides* (5) mentre, in questo lavoro si è utilizzata una scala arbitraria basata sull'osservazione delle cariossidi con segni visibili di infezione.

I risultati ottenuti con questa e con la precedente indagine, indicano che la metodologia NIR può essere utilizzata per monitorare il livello di infezione e contaminazione da funghi in post-raccolta per individuare, con buona attendibilità, le partite contaminate da fumonisine al di sopra di determinati livelli. Si presta, inoltre, ad essere utilizzata nell'attività di miglioramento genetico per la selezione di materiali genetici resistenti ad attacchi di funghi tossigeni.

BIBLIOGRAFIA

1. Siesler HW, Ozaki Y, Kawata S, Heise HM. *Near-Infrared Spectroscopy*. Weinheim: Wiley-VCH; 2002.
2. Togersen G, Isaksson T, Nilsen BN, Bakker E A, Hildrum KI. On-line NIR analysis of fat, water and protein in industrial scale ground meat batches. *Meat Sci* 1999;51:97-102.

3. Dowell FE, Ram MS, Seitz LM. Predicting scab, vomitoxin, and ergosterol in single wheat kernels using near-infrared spectroscopy. *Cereal Chem* 1999;76:573-6.
4. Kos G, Lohninger H, Krska R. Development of a method for the determination of *Fusarium* fungi on corn using mid-infrared spectroscopy with attenuated total reflection and chemometrics. *Anal Chem* 2003;75:1211-7.
5. Berardo N, Pisacane V, Battilani P, Scandolara A, Pietri A, Marocco A. Rapid detection of kernel rots and mycotoxins in maize by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005;53:8128-34.
6. Reid LM, Hamilton RI, Mather DE. Screening maize for resistance to Gibberella ear rot. Agriculture and Agri-Food Canada, Technical Bulletin Eastern Cereal and Oilseed Research Centre, 1996-5E.
7. Shephard GS, Sydenham EW, Thiel PG, Gelderblom WC. A Quantitative determination of FB₁ and FB₂ by HPLC with fluorescence detection. *J Liq Chromatogr* 1990;13:2077-87.
8. Martens H, Dardenne P. Validation and verification of regression in small data sets. *Chemometrics Intell Lab Syst* 1998;44:99-122.

STABILITÀ DELLE AFLATOSSINE M₁ ED M₂ CON DERIVATIZZAZIONE MEDIANTE ACIDO TRIFLUORO-ACETICO. IMPLICAZIONI SULLA PERFORMANCE D'ANALISI IN HPLC-FL

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

Introduzione

Le aflatossine AFM₁ e AFM₂ sono sostanze tossiche prodotte dal metabolismo animale delle specie chimiche parentali, le omonime della serie "B", in condizioni d'esposizione (1-3). Le due molecole posseggono diverso comportamento in fluorescenza dovuto alla differente struttura chimica. Infatti, le aflatossine del gruppo 2 presentano una maggiore risposta in fluorescenza rispetto a quelle del gruppo 1 (4). Pertanto, l'impiego del detector fluorimetrico per la rivelazione e la quantificazione di queste ultime ai bassi livelli imposti per la tutela della salute pubblica, ne richiede la modificazione in forme chimiche maggiormente fluorescenti. Nel presente contributo sono riportati i risultati relativi allo studio sul comportamento delle AFM₁ e AFM₂ in seguito al trattamento di derivatizzazione pre-colonna utilizzando acido trifluoroacetico (TFA), per la cui esecuzione non sono richiesti in laboratorio particolari dispositivi e implementazioni del sistema HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) in uso. Obiettivo principale dello studio è stata la valutazione delle performance di metodo per la determinazione di AFM₁ e AFM₂ per HPLC-FL a fase inversa in vista di possibili applicazioni all'analisi di routine del latte bufalino.

Materiali e metodi

La separazione in isocratica delle due aflatossine è stata effettuata impiegando come fase stazionaria una colonna Sinergy Fusion 150 mm x 4,3 mm, 4 µm (Phenomenex, Torrance CA, USA). Per lo sviluppo del metodo, è stato utilizzato un sistema SpectraSYSTEM (ThermoQuest, Inc.) composto da: degasatore a membrana SCM100, pompa miscelazione in bassa pressione P4000, auto-campionatore AS3000, dotato di scomparti termostatabili per i campioni e per la colonna separativa, e un fluorimetro FL3000. La gestione del sistema, l'analisi e l'archiviazione dei cromatogrammi sono state condotte utilizzando il software ChromQuest 4.0 (ThermoQuest, Inc.). La derivatizzazione pre-colonna, è stata eseguita secondo il metodo proposto da Beebe & Tagahaschy (1980). Per le prove di stabilità sono state preparate repliche standard in alcol metilico grado HPLC (Fluka, Svizzera) contenenti AFM₁ e AFM₂ in purezza (Supelco, Bellefonte PA, USA) nel rapporto 1:1. Dopo essiccazione entro microtubi da 1,5 mL alla temperatura di 37±1°C e sotto leggera corrente d'azoto, sono stati aggiunti 200 µL di TFA (Sigma-Alfrich, Germania). La reazione di derivatizzazione è stata condotta per 15 min a temperatura ambiente e al buio. Dopo eliminazione del TFA in eccesso sotto corrente d'azoto, i campioni sono stati ripresi in 1,0 mL di fase mobile e 50 µL sono stati iniettati in HPLC. Tutte

le prove sono state effettuate in triplice replica. Le condizioni di lavoro del metodo ottimizzato sono riassunte in Tabella 1.

Tabella 1. Condizioni di lavoro in HPLC-FL ottimizzate per la separazione delle aflatossine AFM₁ e AFM₂ con derivatizzazione pre-colonna

Parametro	Caratteristiche tecniche
Fase mobile	Binaria: MetOH/H ₂ O (30:70)
Fase stazionaria	C18 con Gruppo Polare Incorporato
Flusso	1,8 mL/min (3200 psi)
Temperatura colonna	60°C ± 0,5°C
Temperatura porta-campioni	0°C ± 0,5°C
Rivelazione	λ _{ex} = 360 nm; λ _{em} = 440 nm, PMT=1000V, Rise Time: 10 s

Risultati e discussione

Il metodo HPLC ottimizzato ha consentito l'eluizione delle due tossine adeguatamente risolte nell'arco di 7 min (media±DS: t_R AFM₁= 2,45±0,10 min, t_R AFM₂= 5,28±0,13 min) (Figura 1).

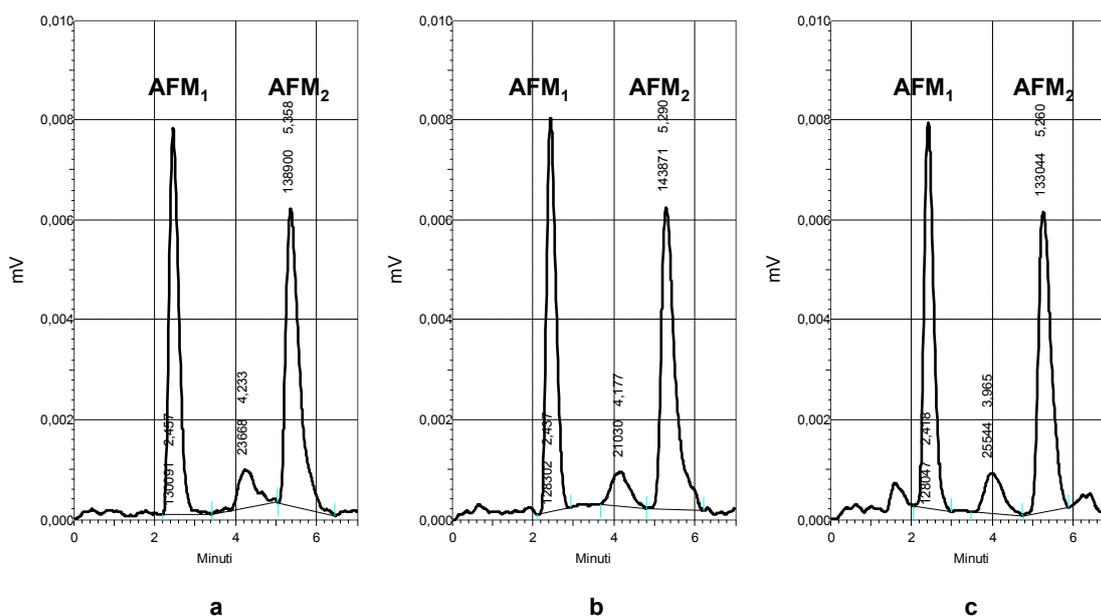


Figura 1. Cromatogrammi di corse effettuate a diversi tempi dalla derivatizzazione con TFA: a) 2 min, b) 45 min e c) 90 min. I tempi si riferiscono ad inizio acquisizione del cromatogramma

Rispetto all'AFM₁ nativa, il derivatizzato con TFA (AFM_{2a}) ha presentato un tempo di ritenzione mediamente inferiore (-59%) e un segnale di intensità quasi doppia (+194%). In Tabella 2 sono riassunti i parametri cromatografici determinati in accordo con Kirkland (5) riferiti alle due tossine e stimati a 90 min dalla derivatizzazione.

In prove di stabilità effettuate con gli standard mantenuti a 0°C, è stata osservata una buona ripetibilità per oltre un'ora dalla derivatizzazione (Figura 2): CV pari a 1,96% per il segnale dell'AFM₁ e 2,08% per quello l'AFM₂.

Tabella 2. Parametri cromatografici secondo Kirkland ($t_0=0,81$ min); la risoluzione (Rs) è stata calcolata rispetto a picchi interferenti prossimi ai segnali target

Parametro	AFM ₁	AFM ₂
t_R (min)	2,35	5,18
$t_R' = t_R - t_0$ (min)	1,54	4,37
$k_f = t_R'/t_0$	1,90	5,39
$Rs = 2 \cdot \frac{t_{R'2} - t_{R'1}}{W_1 - W_2}$	0,72	0,90

t_R = tempo di ritenzione, t_0 = tempo di d'eluzione per il picco non ritenuto, k_f fattore di capacità, w_i = ampiezza del picco alla linea di base.

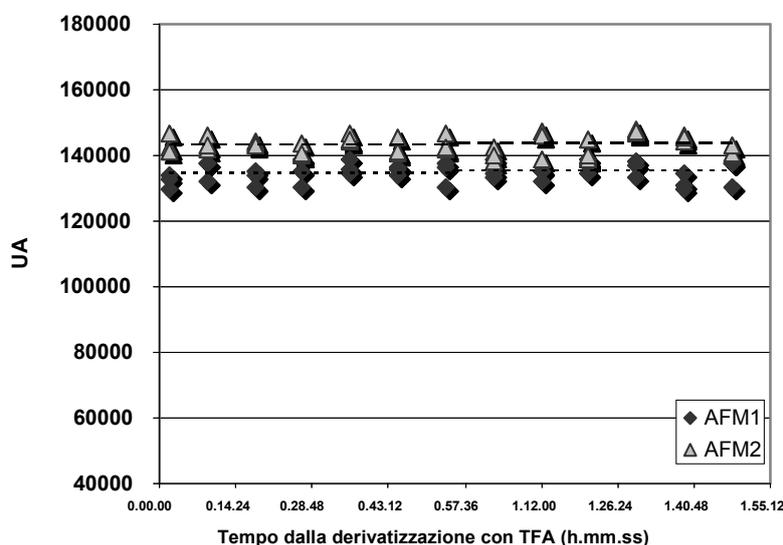


Figura 2. Prove di stabilità condotte in triplicato fino a 108 min dalla derivatizzazione con TFA

Il mantenimento della fluorescenza nell'intervallo tra trattamento di derivatizzazione e rivelazione, è un requisito fondamentale per consentire l'automazione del processo analitico. Nel nostro caso, il metodo sviluppato consente di predisporre ed eseguire sequenze d'analisi per 10-12 campioni, preventivamente derivatizzati, senza penalizzarne in modo significativo il recupero.

La relazione lineare tra area del picco e concentrazione per le due tossine nell'intervallo compreso tra 78 pg e 2.500 pg all'iniezione, è risultata soddisfacente (Figura 3). Mediante prove in triplicato effettuate su campioni di latte bufalino fortificati nel range 0,0012-0,0781 µg/kg, pre-trattati con *clean-up* d'immuno-affinità (IAC Vicam, Watertown, MA-USA), sono stati stimati limiti di rilevabilità (*Limit Of Detection*, LOD) e di quantificazione (*Limit Of Quantification*, LOQ) (6) pari rispettivamente a 0,001 µg/kg e 0,003 µg/kg per entrambe le tossine.

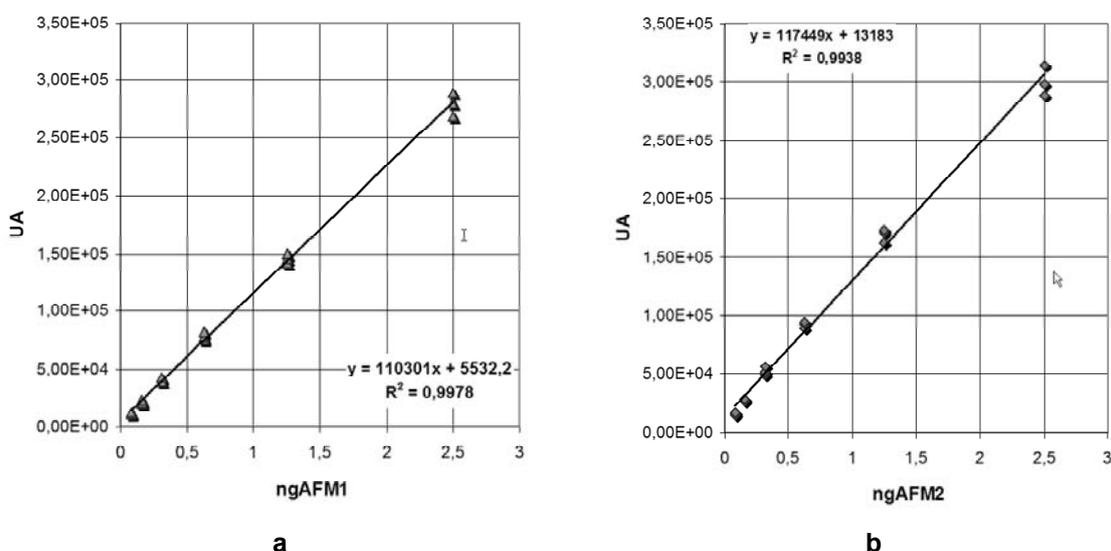


Figura 3. Verifica della linearità in calibrazione: a) AFM₁ e b) AFM₂

Conclusioni

Il metodo cromatografico sviluppato, è risultato idoneo per l'analisi delle tossine AFM₁ e AFM₂ in campioni di latte di bufala e si caratterizza per tempi d'esecuzione ridotti, buone prestazioni e buona riproducibilità nel tempo. Tali condizioni rendono possibili procedure di routine per il controllo di qualità su elevato numero di campioni, in tempi ridotti e con adeguato grado d'affidabilità senza particolari implementazioni del sistema HPLC, necessarie nel caso di tecniche di derivatizzazione post-colonna.

Bibliografia

1. Wogan GN. Metabolism and biochemical effects of aflatoxins. In: Goldblatt LA (Ed.). *Aflatoxin-scientific background, control and implications*. New York: Academic Press; 1969. p. 151-86.
2. Groopman JD, Busby WF, Donahue PR, Wogan GN. Aflatoxins as risk factors for liver cancer: An application of monoclonal antibodies to monitor human exposure. In: Harris CC (Ed.). *Biochemical and molecular epidemiology of cancer*. New York: Alan R. Liss, Inc.; 1986. p. 233-56.
3. Wogan GN. Aflatoxins as human liver carcinogens. *Hepatology* 1999;30:573-5.
4. Beebe R, Tagahashy DM. Determination of aflatoxin M1 by high-pressure liquid chromatography using fluorescence detection. *J Agric Food Chem* 1980;28(2):481-2.
5. Kirkland JJ. *Modern practice of liquid chromatography*. New York: Wiley; 1971. p. 161.
6. DIN Norma 32645. *Chemical analysis; decision limit; detection limit and determination limit; estimation in case of ripetibility; terms, methods, evalutaion*. Berlin: Deutsches Institut fur Normung e.V.; 1996.

CONTAMINAZIONE DA OCRATOSSINA A: 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, Bari*

Introduzione

La richiesta di maggiori informazioni sulle caratteristiche qualitative che garantiscono la sicurezza dei prodotti alimentari, ha portato verso una maggiore attenzione a quelle sostanze che possono risultare dannose per la salute come metalli pesanti, residui di fitofarmaci, pesticidi e negli ultimi anni anche alle micotossine.

La determinazione dei livelli di dette sostanze negli alimenti e il calcolo delle loro ingestioni, non sempre è sufficiente a stimare l'esposizione, che rappresenta la prima fase della valutazione del rischio d'intossicazione. Le variabili che possono influire nella valutazione del rischio sono numerose (diluizione della sostanza nella dieta, metabolizzazione, escrezione, ecc.) e difficilmente controllabili in maniera adeguata. Un metodo alternativo e più attendibile per la valutazione dell'esposizione è l'uso degli indicatori biologici, ad esempio per l'ocratossina A (OTA), la concentrazione nel sangue.

Nell'ultimo decennio la presenza di OTA, già nota in diverse matrici alimentari, è stata riscontrata anche nei derivati dell'uva. Sono state eseguite analisi più approfondite sul contenuto di questa tossina nel vino, in quanto è stato ipotizzato che questo potesse concorrere in modo significativo a raggiungere e/o superare la dose giornaliera ammissibile. Monitoraggi fatti su vini prodotti in Italia hanno evidenziato la presenza, in alcune aree, di contaminazione da OTA relativamente elevate, in particolare nelle regioni del Sud (1, 2), in una di queste aree è stato effettuato il nostro studio. Questo è stato finalizzato a fornire indicazioni su possibili correlazioni tra consumi ed esposizione, per verificare l'eventuale criticità del vino. A tal fine è stato selezionato e studiato un gruppo di popolazione abituale consumatore di vino, ne è stata valutata l'esposizione determinando la concentrazione di OTA nel sangue, le ingestioni conseguenti al consumo di questa bevanda (concentrazione del vino) e le escrezioni (concentrazioni nelle urine).

Materiali e metodi

Campionamento

L'area oggetto dello studio è stata suggerita dal monitoraggio sui livelli di concentrazione nel condotto dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS) per conto del MIPAF (Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, che ha evidenziato in alcune aree del sud Italia livelli di concentrazione di OTA nel vino relativamente alti. In una di queste aree, particolarmente vocata alla produzione vitivinicola, interessa la zona circostante la città di Barletta in provincia di Bari, dove al fine di selezionare un gruppo di popolazione abituale consumatore di vino e residente nell'area è stata avviata una collaborazione con il locale ospedale. Sono stati intervistati circa

500 soggetti e mediante l'uso di questionari sulle abitudini di vita e sui consumi alimentari, in particolare di vino, sono stati selezionati 150 soggetti apparentemente sani di ambo i sessi, di età compresa tra i 25 e 65 anni, che hanno espresso positivamente il consenso informato alla partecipazione allo studio. Di tutti i soggetti sono stati raccolti campioni di sangue, urine e vino nel biennio 2004-2005.

Metodo di analisi

L'analisi dei campioni è stata effettuata seguendo il metodo di Brera *et al.* (3), a cui sono state apportate alcune modifiche. Il metodo prevede:

- Estrazione/purificazione (*clean-up*)
Un mL di campione viene addizionato con 14 mL di PBS, 10 mL di questa soluzione vengono fatti passare in una colonnina di immuno-affinità (IAC), precedentemente attivata con PBS: Dopo passaggio della soluzione contenente il campione, si eseguono due lavaggi, con PBS e acqua, si eluisce il campione con una soluzione di metanolo e acido acetico (98:2) e si porta a secco sotto flusso di azoto. Il residuo secco ottenuto viene ripreso con 1 mL di fase mobile e iniettato in HPLC.
- Determinazione in HPLC
L'analisi quantitativa dell'OTA è stata eseguita mediante cromatografia liquida ad alta risoluzione con rivelatore spettrofluorimetrico (FLD).

Per le condizioni cromatografiche è stata utilizzata una fase mobile costituita da AcCN:H₂O:AcCH₃COOH (60:49:1) (v/v), flusso 1 mL/min, colonna Waters Symmetry C18, mentre per la rivelazione lunghezze d'onda utilizzate a 333 nm per l'eccitazione e 470 nm per l'emissione. La molecola dell'OTA è naturalmente fluorescente e quindi non necessita di derivatizzazioni.

Risultati e discussioni

I livelli di OTA trovati nei campioni di vino, consumati dai soggetti presi in esame nel nostro lavoro, si trovano per un 80% compresi tra 0,2-2 ng/mL, il rimanente 20% ha dei valori che oscillano tra 2-5 ng/mL. Solamente un campione ha dato un valore di 8 ng/mL e comunque il valore medio ottenuto (1,53 ng/mL) e l'intervallo dei valori determinati compreso tra 0,2 ng/mL e 8,06 ng/mL, sono in accordo con altri dati di bibliografia (4, 5). In linea generale i campioni con i valori relativamente più alti sono quelli di vini prodotti artigianalmente e tra questi anche campioni di vini bianchi.

Sulla base della distribuzione dei valori di concentrazione determinati nel sangue dei soggetti è stata effettuata una suddivisione, in bassa (<0,28 ng/mL), media (0,28-0,34 ng/mL) e alta esposizione (>0,34 ng/mL). I soggetti sono distribuiti in queste tre classi rispettivamente in ragione del 29%, 43%, 27%. Le concentrazioni delle urine sono risultate comprese tra 0,3 ng/mL e 1,47 ng/mL con un valore medio di 0,43 ng/mL (Figura 1).

Tenuto conto che lo scopo del nostro studio è quello di verificare se il vino è l'alimento critico per l'esposizione all'OTA, è stata effettuata un'elaborazione dei dati sperimentali ottenuti, con quelli raccolti tramite intervista sui consumi di alimenti e bevande, mediante l'uso di due questionari opportunamente a tal fine approntati.

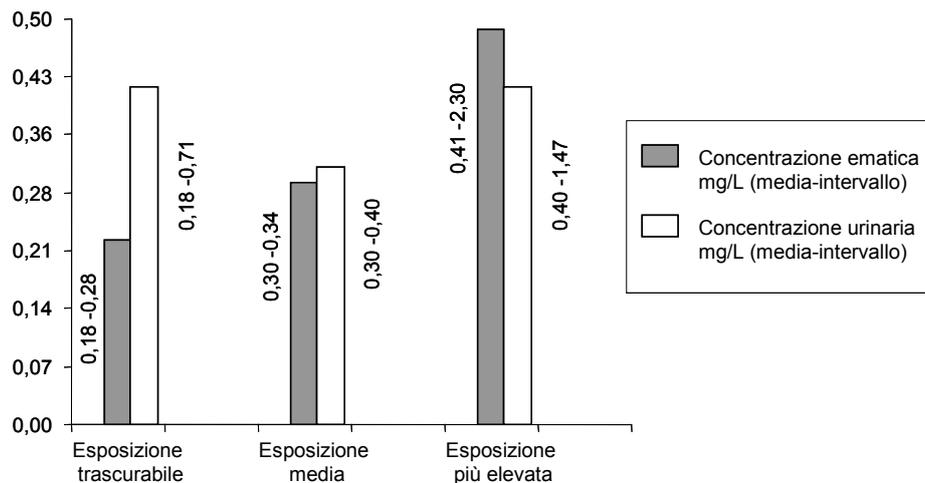


Figura 1. Concentrazione di OTA nei fluidi biologici

Per quanto riguarda il consumo di vino in particolare, sono state raccolte informazioni sulla quantità giornaliera consumata, la frequenza settimanale di consumo, il tipo di preferenza del vino (bianco o rosso), e la provenienza (se da commercio o da autoconsumo). Tali variabili, insieme con la variabile riportante i valori di esposizione, ricodificati in esposizione bassa (0,10-0,25), esposizione media (0,25-0,34), esposizione alta (>0,34), sono state inserite in un modello di Analisi Statistica Multivariata (6) allo scopo di individuare eventuali relazioni esistenti tra le abitudini di consumo di vino e i livelli di esposizione all'OTA. È stata applicata l'Analisi delle Corrispondenze Multiple (ACM) attraverso il software SAS 2 (7), una metodologia che, analizzando più variabili simultaneamente, ha l'obiettivo di evidenziare le possibili tendenze associative e individuare in tal modo alcuni profili dei soggetti attraverso una rappresentazione grafica delle modalità delle variabili stesse.

Si è scelto di rappresentare le relazioni tra le variabili considerate attraverso i primi due assi fattoriali che sono i più rappresentativi dei dati in quanto insieme spiegano il 38,4% della variabilità complessiva (Figura 2).

Si sono potuti evidenziare due profili di soggetti contrapposti: da un lato coloro che preferiscono il vino rosso, lo consumano giornalmente e presentano un livello di esposizione media all'OTA; l'altro profilo è rappresentato da coloro che preferiscono il vino bianco, lo consumano qualche volta a settimana e presentano un livello basso di esposizione all'OTA. Interessante è anche la contrapposizione tra coloro che consumano vino proveniente dall'autoconsumo e coloro che consumano vino proveniente dal commercio: i primi si avvicinano di più al profilo costituito dai consumatori giornalieri di vino rosso, i secondi si associano maggiormente all'altro profilo emerso. Da notare inoltre che al primo profilo si associa il consumo giornaliero di 1 o 2 bicchieri di vino, mentre un consumo medio-alto (da 3 bicchieri a mezzo litro di vino) si associa sia all'autoconsumo sia ad un alto livello di esposizione all'OTA.

Anche se dall'analisi statistica sono emersi dati che lasciano intravedere tali interessanti andamenti, i valori calcolati, delle ingestioni dovuti al vino (Figura 3), confrontati con la concentrazione di OTA trovata nel siero e con i dati delle escrezioni non permettono di definire il vino l'alimento critico per questa tossina, infatti come si può notare dai grafici (Figura 1, Figura 3), le alte ingestioni corrispondono a basse esposizioni e alte escrezioni e viceversa.

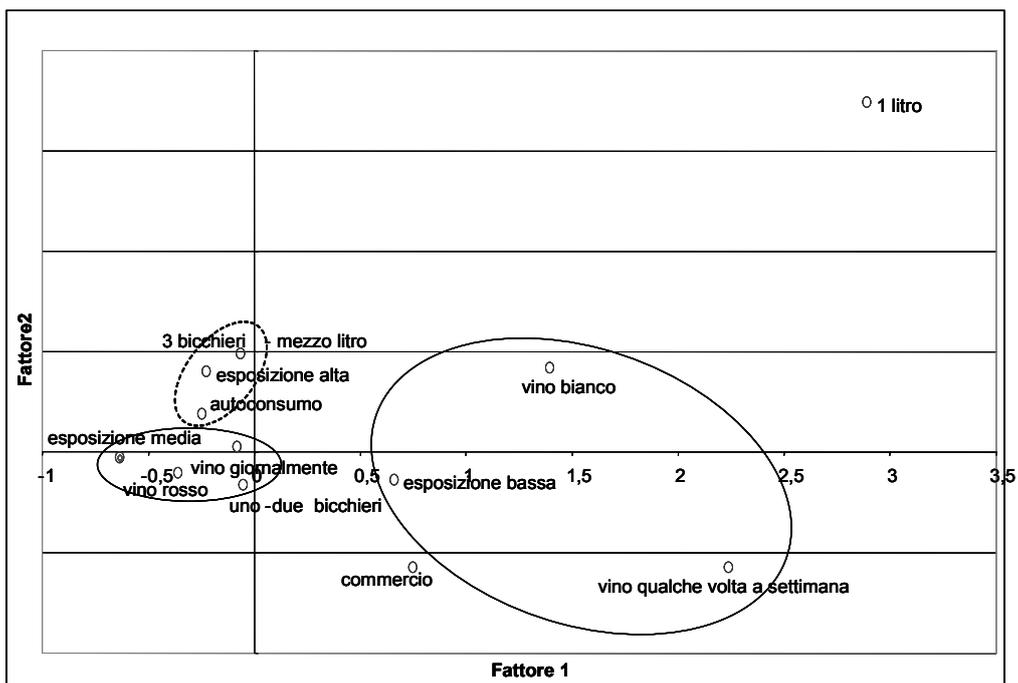


Figura 2. Consumo di vino: profili dei soggetti evidenziati attraverso l'analisi delle corrispondenze

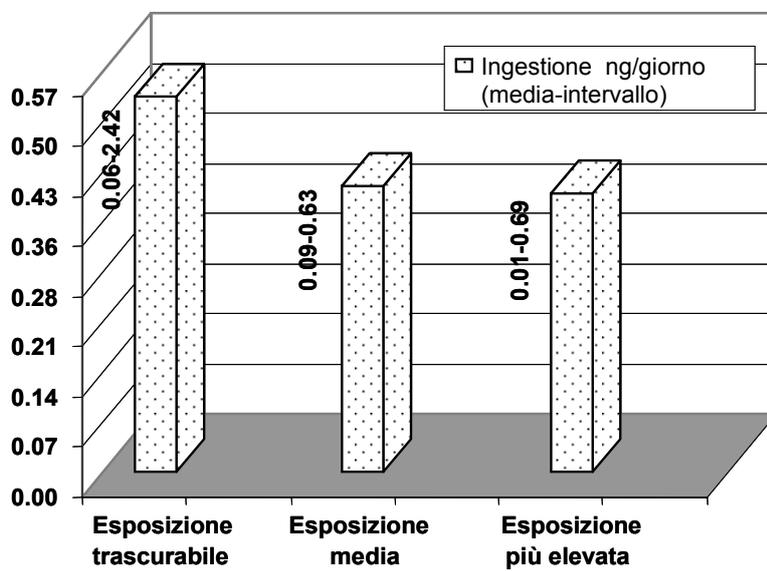


Figura 3. Livelli di ingestione

Conclusioni

Il consumo di vino non sembra condizionare l'esposizione all'OTA nei soggetti studiati. Resta il fatto che nell'area considerata è presente una contaminazione dovuta a questa tossina, come è evidenziato dai livelli di concentrazione determinati nel sangue e nelle urine del gruppo di popolazione studiato. Sarebbe perciò opportuno disporre di dati sui consumi di altri alimenti, che permettano di effettuare un'elaborazione analoga a quella del consumo di vino, ed evidenziare il contributo positivo o negativo che questi alimenti possono dare all'esposizione da OTA.

Anche i risultati di altri gruppi di ricerca sui livelli di esposizione della popolazione in regioni italiane dove la contaminazione del vino da OTA non è presente, o è significativamente minore rispetto a quella determinata nell'area studiata, confermano l'opportunità di approfondire la ricerca per valutare i livelli di OTA negli altri alimenti che costituiscono la dieta, in modo da poterne individuare le fonti principali.

Bibliografia

1. Pietri A, Bertuzzi T, Pallaroni L, Piva G. Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. *Food Additive and Contaminants* 2001;18:647-654.
2. Bertolino L, Gianpiccolo G, Caggia C, Ferri G, Russo C. Determinazione dell'ocratossina A nei vini meridionali. *Industrie delle Bevande* 2000; XXIX, ottobre; 473-483.
3. Brera C, Grossi S, De Santis B, Miraglia M. Automated HPLC Method for the Determination of Ochratoxin A in Wine Samples. *Journal of Liquid Chromatography & related Technologies* 2003;26(1):119-33.
4. Palli D, Miraglia M, Saieva C, Massala G, Cava E, Colatosti M, Corsi A, Russo A, Brera C. Serum levels of ochratoxin A in healthy adults in Tuscany: correlation with individual characteristics and between repeat measurements. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1999;8:265-9.
5. Brera C, Debegnach F, Minardi V, Pazzaglini B, Miraglia M. Valutazione della esposizione alla ocratossina A in campioni di siero di donatori sani. In: Miraglia M, Brera C (Ed.). *Atti 1° Congresso nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 29-30 novembre 2004*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2005. (Rapporto ISTISAN 05/42). p. 53-58.
6. Fabbris L. *La statistica multivariata*. Milano: Mcgrow-Hill; 1997.
7. SAS Institute Inc. *SAS Procedure Guide*. NC USA: Cary; 1990.

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

Jeanne Lai, Carlo Nachtmann, Monica Gramaglia, Monica Dalla Mutta, Marina Rastelli, Lucia Decastelli
Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

Introduzione

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).

Tra le micotossine più conosciute e studiate per gli effetti nocivi sulla salute dell'uomo, ricordiamo la famiglia delle aflatossine (prodotte soprattutto dal fungo *Aspergillus*), delle ocratossine (prodotte dai funghi appartenenti al genere *Aspergillus* e *Penicillium*) e la patulina (prodotta dal fungo *Penicillium*), la famiglia delle *Fusarium*-tossine di cui fanno parte gli zearalenoni, fumonisine e tricoteceni (prodotti dal fungo *Fusarium*).

Le micotossine possono essere elaborate in diverse fasi del ciclo produttivo di un alimento: può verificarsi una infestazione fungina diretta della derrata o la contaminazione può avvenire in fase di lavorazione, trasporto o stoccaggio del prodotto.

È possibile avere la presenza contemporanea di più tossine derivate da funghi diversi nella stessa derrata. La presenza visibile di ammuffimenti è sempre indice di deterioramento della qualità e di probabile presenza di micotossine, mentre la mancanza visibile di ammuffimenti non ne garantisce l'assenza.

Le aflatossine, e in particolare l' M_1 ed M_2 , possono ritrovarsi nel latte e nei suoi derivati in seguito all'ingestione da parte degli animali produttori, di mangimi contaminati con aflatossina B_1 e B_2 . Questi animali trasformano la tossina B_1 assunta con l'alimento in M_1 .

L'aflatossina B_1 è stata classificata dallo IARC (*International Agency for Research on Cancer*) come "sostanza sicuramente cancerogena" per uomo e animali ed è stata inserita nel gruppo 1, mentre la M_1 è stata inserita nel gruppo 2B "possibile agente cancerogeno per l'uomo". Nell'uomo è in grado di determinare forme di intossicazione acuta in seguito all'ingestione di alte dosi di cereali contaminati, con danni localizzati soprattutto a carico del fegato, e forme croniche che si osservano in seguito all'assunzione di dosi ridotte per tempi prolungati. L'aflatossina B_1 ha anche azione mutagena e teratogena se assunta a dosi elevate per lungo tempo.

La normativa riguardante le aflatossine negli alimenti ad uso zootecnico pone infatti particolare attenzione alla aflatossina B_1 (D.Lvo 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.

Qui di seguito viene mostrato il monitoraggio in entrambe le regioni nel triennio 2004-2006.

Materiali e metodi

Nella regione Piemonte: nell'anno 2004 sono stati analizzati 876 campioni di latte crudo, 459 nell'anno 2005 e 93 nell'anno 2006 al 10/10/06.

Sono stati inoltre analizzati nell'anno 2004, 729 alimenti ad uso zootecnico; 570 nell'anno 2005; 224 nell'anno 2006 al 10/10/06.

Per quanto riguarda la situazione nella regione Valle d'Aosta nell'anno 2004 sono stati analizzati 296 campioni di latte crudo bovino, 45 nell'anno 2005 e 5 nell'anno 2006 al 10/10/06.

Sono stati inoltre analizzati 541 campioni di mangime nell'anno 2004, 75 nell'anno 2005 e 33 nell'anno 2006 al 10/10/06.

I prelievi sono stati effettuati dai Servizi Veterinari, secondo il Regolamento 466 del 2001 per il latte e secondo il Decreto Ministeriale del 20/04/1978.

L'analisi dei campioni previsti dai piani è stata effettuata con un primo screening in ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), successivamente i campioni che superavano i limiti di legge venivano analizzati in HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

Qui di seguito viene esposta la preparazione per il metodo di screening su latte e mangimi:

– *Latte*

50 mL di campione vengono preventivamente sgrassati mediante centrifugazione a 4000 rpm per 20' a + 5°C. Un'aliquota del surnatante è poi sottoposta a test ELISA.

– *Mangimi*

25 g di campione vengono opportunamente tritati ed estratti con una miscela di acetonitrile e acqua in rapporto 84:16 v/v. In seguito ad agitazione per 1 ora e sonicazione per 15 minuti, viene eseguita una filtrazione dei campioni su filtro di cellulosa Whatman n°1. Il filtrato viene poi purificato in apposite colonnine, le MycoSep 226 AflaZon + multifunctional columns (Tecna, prodotte da Romer Labs) e quindi sottoposto a test ELISA opportunamente diluito. Le MycoSep 226 sono colonnine impaccate di vari materiali adsorbenti (charcoal, celite e resine a scambio ionico): effettuano una purificazione multiresiduale e in particolare sono specifiche per la purificazione delle aflatoxine e zearalenone.

In seguito, i campioni di latte sono stati eseguiti con il kit ELISA Immunoscreen M₁ (Tecna) e i campioni di mangime sono stati eseguiti con il kit ELISA l'ImmunoscreenAFLA (Tecna).

In seguito a positività i campioni sia di latte sia di mangime sono stati sottoposti a metodica di conferma in HPLC.

Prima dell'analisi in HPLC sia i campioni di latte sia di mangime vengono purificati mediante cromatografia di immunoaffinità (IAC-Immuno Affinità Chromatography).

L'analisi cromatografica utilizza una colonna a fase inversa (C₁₈ - RP SELECT/B 250x4,6 mm Ø - 5µm) termostata alla temperatura di +35°C e una eluizione isocratica al flusso di 1 mL min⁻¹ con miscela Acqua/Acetonitrile/Metanolo (65/15/20 - v/v) per quanto riguarda il latte e Acqua/Metanolo (55/45 - v/v) per i mangimi.

Risultati

I risultati dei campionamenti effettuati per le regioni prese in esame sono espressi qui di seguito come andamento percentuale di non conformità nel triennio 2004-2006 (Figure 1-4).

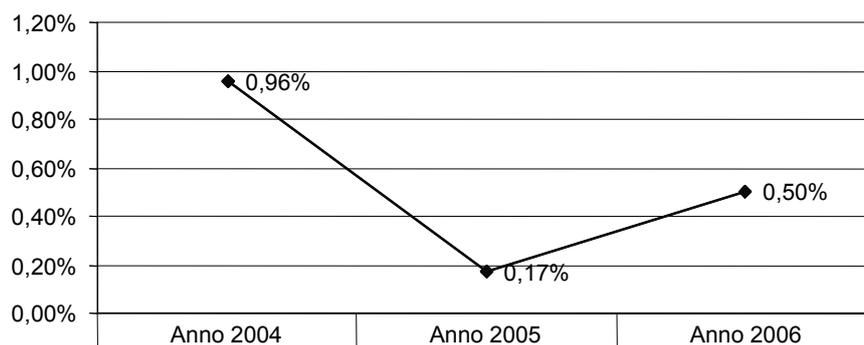


Figura 3. PIEMONTE: andamento (%) delle non conformità in alimenti ad uso zootecnico

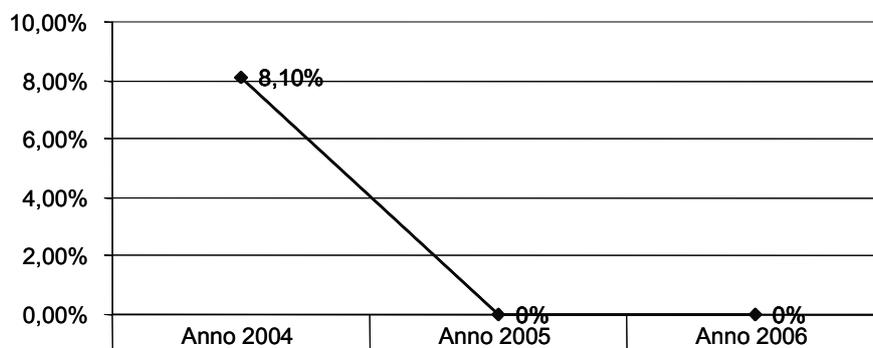


Figura 4. VALLE D'AOSTA: andamento (%) delle non conformità in alimenti ad uso zootecnico

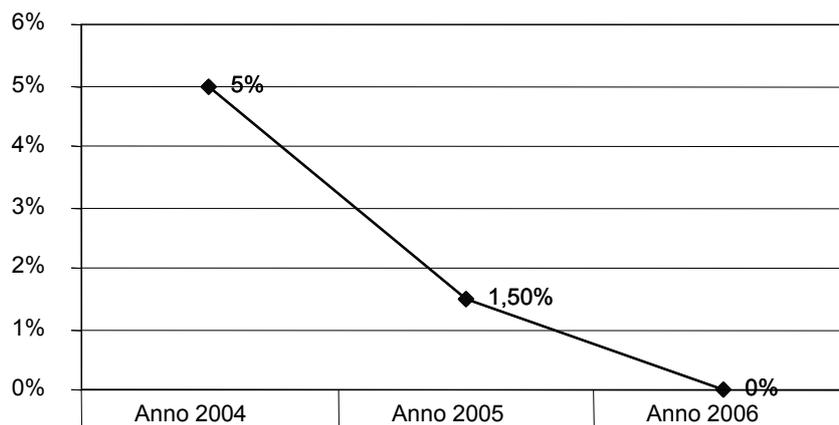


Figura 5. PIEMONTE: andamento (%) delle non conformità nel latte di massa

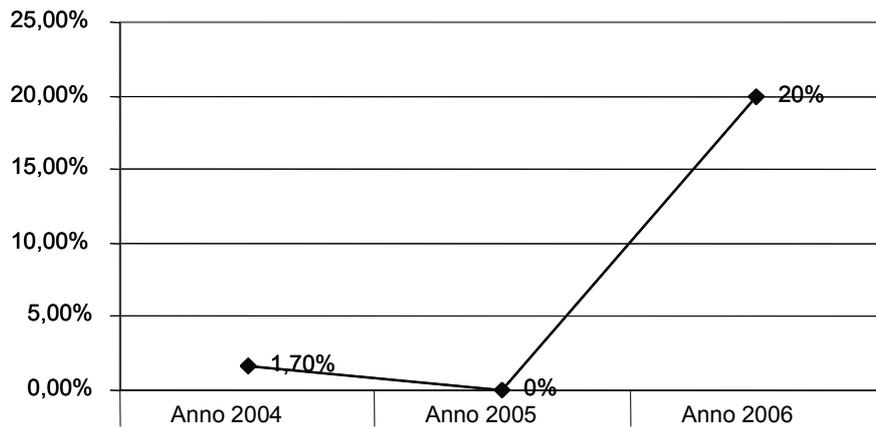


Figura 6. VALLE D'AOSTA: andamento (%) delle non conformità nel latte di massa

Conclusioni

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. L'alta percentuale di campioni non conformi di latte in Valle d'Aosta nel 2006 è dovuta al fatto che i campioni totali eseguiti ad oggi sono 5 di cui 1 (latte di capra) non conforme.

Bibliografia

1. Yannikuoris A. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research* 2002;51(2):81-99.
2. Sweeney MJ, Dobson DW. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology* 1998;43(3):141-58.

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 (a), Angelo Visconti (a)

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

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

Introduzione

Il deossinivalenolo (DON), noto anche come vomitossina, è una micotossina prodotta da *Fusarium culmorum* e *F. graminearum*, funghi patogeni parassiti dei cereali, in particolare del frumento e del mais (1). Tale micotossina è un inibitore della sintesi delle proteine, del DNA e del RNA, possiede elevata attività immunosoppressiva ed è la causa di diverse malattie in varie specie animali con caratteristiche manifestazioni di emesi (vomito) e rifiuto dell'alimento (2). Una recente indagine condotta dalla Comunità Europea nell'ambito del progetto SCOOP sulla valutazione del rischio per l'uomo dovuto all'esposizione a tossine prodotte da *Fusarium*, ha mostrato che il 57% degli 11.022 campioni analizzati era contaminato con DON. Di questi, 6.358 erano campioni di frumento e prodotti derivati con un'incidenza di contaminazione del 61% (3). La Commissione Europea ha recentemente emanato, con decorrenza 1 luglio 2006, i valori massimi ammissibili di DON in cereali e derivati (4).

Lo sviluppo di metodi analitici rapidi, sensibili e accurati per la determinazione di DON risulta essere di fondamentale importanza al fine di monitorare la presenza della tossina entro i livelli fissati dalla legislazione vigente e preservare la salute del consumatore alla sua esposizione. I metodi analitici più ampiamente utilizzati per la determinazione di DON in cereali sono metodi gascromatografici con rivelatore a cattura di elettroni (*Electron Capture Detector*, ECD) o spettrometro di massa (*Mass Spectrometry*, MS) e metodi HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) che utilizzano la determinazione UV o MS (5). Sebbene tali metodi analitici siano accurati, precisi e sensibili essi richiedono step preliminari di purificazione (*clean-up*), lunghi tempi di analisi, impiego di personale specializzato e sono costosi. Attualmente non esistono metodi ufficiali per la determinazione di DON ma, recentemente, è stato realizzato uno studio interlaboratorio per la validazione di un metodo HPLC/UV che prevede la purificazione del campione con colonnina ad immunoaffinità (6). Tale metodo è stato sottoposto al CEN (*European Committee for Standardization*) per un'eventuale adozione a livello europeo.

In letteratura sono riportati diversi metodi rapidi per la determinazione di DON che possono essere raggruppati in tre differenti classi: metodi ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), metodi immunocromatografici (*dipstick*) e metodi immunometrici basati su tecniche emergenti come la Risonanza Plasmonica di Superficie (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) o la Polarizzazione di Fluorescenza (*Fluorescence Polarization*, FP) (7). La FP è una tecnica analitica molto promettente, sebbene non ancora ampiamente diffusa in campo agroalimentare, che consente di studiare le interazioni molecolari in soluzione tra molecole fluorescenti (traccianti) e anticorpi specifici. Gli immunosaggi FP, pur possedendo notevoli vantaggi in termini di sensibilità, affidabilità, possibilità di automazione e facilità di utilizzo, solo

recentemente sono stati applicati alla determinazione di micotossine, quali aflatossine, ocratossina A, zearalenone, fumonisine, e deossinivalenolo, sebbene essi abbiano mostrato limiti di applicabilità all'analisi di cereali (8-11). In particolare, l'immunosaggio FP per la determinazione di DON in frumento, pur consentendo l'analisi rapida del campione, non possedeva accuratezza e precisione necessarie per una corretta quantificazione del contenuto di tossina (8).

Presso l'Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), è stato ottimizzato e validato un metodo rapido, basato sulla Polarizzazione di Fluorescenza, che consente la determinazione di DON in campioni di frumento duro, frumento tenero, semola e pasta (12).

Risultati e discussione

La FP è una misura dell'orientazione dell'emissione di fluorescenza ed è definita dall'equazione: $P = (I_v - I_h) / (I_v + I_h)$, dove I_v e I_h sono rispettivamente le intensità di fluorescenza misurate lungo l'asse verticale e orizzontale. La polarizzazione dipende dalla velocità di rotazione della molecola fluorescente in soluzione che a sua volta dipende dalla sua dimensione molecolare. L'immunosaggio FP consente di quantificare il DON sulla base di una competizione, in soluzione, tra la tossina e un suo derivato fluorescente (DON-FL, tracciante) nei confronti di un anticorpo monoclonale specifico alla micotossina (metodo competitivo diretto). Il DON-FL in soluzione ha un'elevata velocità di rotazione e una bassa polarizzazione, mentre l'associazione con l'anticorpo porta ad una velocità di rotazione più bassa e valori di polarizzazione elevati. La presenza di DON libero riduce la quantità di anticorpo che può legare il tracciante e riduce quindi la polarizzazione. Il valore della polarizzazione risulta così inversamente proporzionale al contenuto di DON in soluzione.

Il tracciante è stato sintetizzato attraverso la protezione delle funzionalità idrossiliche del DON in posizione C7 e C15 per reazione con l'acido 1-butilboronico, attivazione della funzionalità idrossilica in C3 per mezzo dell'1,1'-carbonildiimidazolo con contemporanea deprotezione e derivatizzazione con 4'-(aminometil)-fluoresceina. L'isolamento del tracciante è stato realizzato mediante sistema HPLC semipreparativa in fase inversa.

La curva di calibrazione dell'immunosaggio (Figura 1), ottenuta utilizzando soluzioni standard di DON a diverse concentrazioni comprese tra 12,5 e 2500 ng/mL, ha un valore di IC50 (concentrazione di DON richiesta per dare una risposta di polarizzazione del 50%) di 105 ng/mL.

È stata osservata una buona linearità (coefficiente di correlazione, $r=0,9968$) tra il valore di polarizzazione e il logaritmo della concentrazione di DON (espressa come ng/mL) nell'intervallo 25-500 ng/mL.

Il protocollo di analisi sviluppato per la determinazione di DON in campioni di frumento duro, frumento tenero, semola e pasta prevede l'energica agitazione (*blending*) del campione finemente macinato con tampone PBS per 2 minuti, la filtrazione e l'analisi mediante immunosaggio FP, senza alcuna purificazione dell'estratto. Il tempo complessivo di analisi è risultato inferiore a 15 minuti.

Al fine di valutare la possibile presenza di effetto matrice, è stata condotta l'analisi FP di campioni di 10 di varietà differenti di frumento duro e frumento tenero, risultati non contaminati da DON mediante analisi HPLC e di campioni contaminati artificialmente con la tossina a quattro diversi livelli (7,5, 10, 30 e 60 ng).

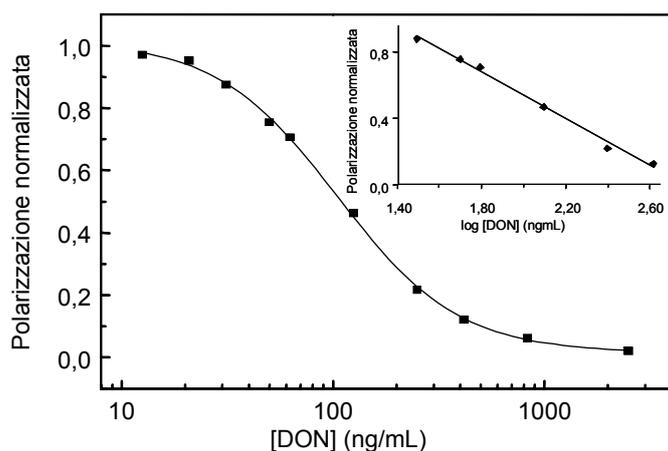


Figura 1. Curva di calibrazione ottenuta con soluzioni standard di DON nell'intervallo 12,5-2500 ng/mL [nel riquadro è riportato l'intervallo di linearità tra il valore di polarizzazione e il logaritmo della concentrazione di DON (25-500 ng/mL, $r = 0,9968$)]

Tali esperimenti, condotti analizzando diverse quantità di matrice (15, 30 e 60 mg), pur evidenziando una sovrastima del reale contenuto di DON nel campione hanno dimostrato che tale sovrastima è costante ed è direttamente riconducibile alla tipologia di matrice. La sovrastima media di DON ($n=150$) risulta essere di $0,27\pm 0,03$ $\mu\text{g/g}$ e $0,39\pm 0,06$ $\mu\text{g/g}$, rispettivamente per campioni di frumento duro e di frumento tenero. Uno studio analogo applicato a campioni di semola e pasta ha consentito di determinare il valore della sovrastima nella determinazione del contenuto di DON pari a $0,08\pm 0,01$ $\mu\text{g/g}$ per i campioni di semola, $0,04\pm 0,01$ $\mu\text{g/g}$ per i campioni di pasta. Risulta quindi necessario correggere i valori della concentrazione di DON nei vari campioni da analizzare sottraendo il relativo valore di sovrastima dovuta all'effetto matrice. È stata osservata una buona linearità della risposta del saggio FP nell'intervallo 0,10-2,00 μg di DON per g di matrice analizzata con un limite di determinazione pari a 0,08 $\mu\text{g/g}$ per tutte le matrici analizzate. Per campioni la cui concentrazione di DON risulta essere superiore a 2,00 $\mu\text{g/g}$ è necessario effettuare una opportuna diluizione dell'estratto.

Sono stati valutati, per il saggio FP, i valori di recupero di DON da campioni di frumento duro e tenero, semola e pasta e confrontati con quelli ottenuti per il metodo di riferimento HPLC/UV che prevede l'utilizzo di colonnine ad immunoaffinità per la purificazione del campione (6). I recuperi medi ottenuti per il metodo FP, a 4 diversi livelli di contaminazione nell'intervallo 0,25-1,75 $\mu\text{g/g}$ ($n=4$ repliche per livello), sono risultati rispettivamente del 98% per il frumento duro, 102% per la semola, 101% per la pasta, 101% per il frumento tenero con deviazioni standard minori del 5%. I recuperi medi ottenuti per il metodo HPLC sono risultati compresi tra 82% e 92%, con deviazioni standard minori del 10%.

I valori di recupero e di ripetibilità di entrambi i metodi, per tutte le matrici analizzate, rispettano i criteri stabiliti dal Commissione Europea per l'accettabilità di un metodo analitico per la determinazione di DON (13).

La validazione del metodo FP sviluppato è stata effettuata mediante l'analisi di 58 campioni di cariossidi di frumento duro, 22 campioni di semola, 26 campioni di pasta e 47 campioni di frumento tenero naturalmente contaminati e confronto con i risultati ottenuti con il metodo HPLC/UV di riferimento (6). Poiché i due metodi analitici prevedevano la medesima procedura estrattiva (tamponi PBS), l'estratto filtrato di ogni campione è stato sottoposto in parallelo ad

analisi FP senza alcuna purificazione e analisi HPLC/UV previa purificazione mediante colonnine ad immunoaffinità. È stata trovata una buona correlazione (coefficiente di correlazione, $r > 0,995$) tra le due metodiche analitiche messe a confronto per tutti i campioni analizzati (Figura 2).

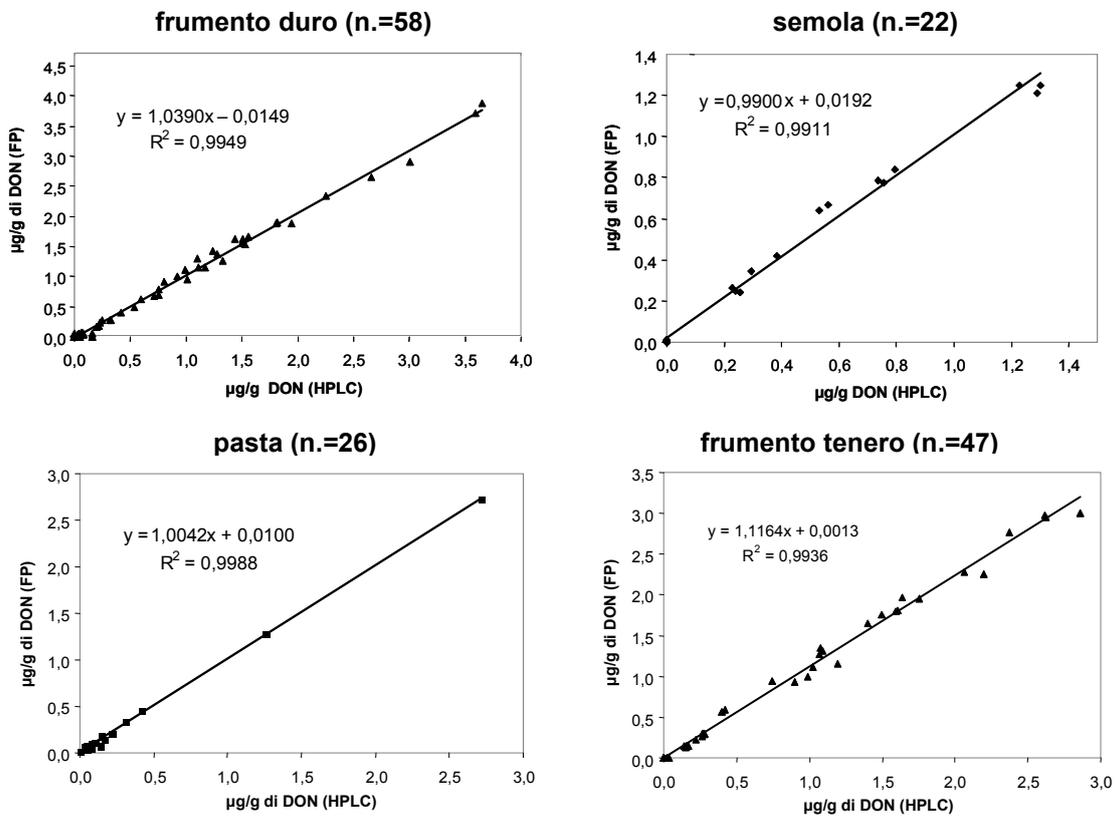


Figura 2. Curve di regressione lineare ottenute riportando il contenuto di DON determinato mediante analisi FP e HPLC/UV in campioni di frumento duro, frumento tenero, semola, pasta (i risultati sono stati corretti per i rispettivi valori di recupero medio)

È in fase di sviluppo la realizzazione di un sistema automatico ottenuto attraverso l'accoppiamento di un autocampionatore e di un lettore di polarizzazione di fluorescenza portatile gestito da PC con relativo software per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati. Tale sistema, nella sua versione finale, consentirà la determinazione rapida di DON in un elevato numero di campioni con notevoli vantaggi in termini di facilità di utilizzo da parte degli operatori nel controllo qualità.

Conclusioni

Il metodo FP per la determinazione di DON in frumento duro, frumento tenero, semola e pasta, risulta avere prestazioni in termini di rapidità (15 minuti), accuratezza (98-102%),

precisione (5%), sensibilità (0,08 µg/g) e intervallo di linearità (0,10-2,0 µg/g) comparabili se non in alcuni casi migliori a quelle relative al metodo HPLC/UV.

I costi contenuti dell'analisi e la possibilità di miniaturizzazione e automazione del sistema, lo rendono un utile strumento da utilizzare per un adeguato monitoraggio della contaminazione da DON nei prodotti della filiera del frumento ai livelli prossimi a quelli indicati dalla legislazione vigente.

Bibliografia

1. Ueno Y. *Trichothecenes - chemical, biological and toxicological aspects*. Tokyo: Kodansha; 1983.
2. Rotter BA, Prelusky DB, Pestka JJ. Toxicology of Deoxynivalenol (Vomitoxin). *Journal of Toxicology and Environmental Health* 1996; 48:1-34.
3. Schothorst, R, van Egmond H. Report from Scoop task 3.2.10. Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU members states. Subtask: trichothecenes. *Toxicology Letters* 2004;153:133-43.
4. Europa. Regolamento (CE) n. 856/2005 della Commissione del 6 giugno 2005 recante modifica al Regolamento Europeo (CE) n. 466/2001 riguardante le tossine di *Fusarium*. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea*, L 143/3, 7 giugno 2005.
5. Krska R, Baumgartner S, Josephs R. The state-of-the-art in the analysis of type-A and – B trichothecene mycotoxins in cereals. *Fresenius Journal Analytical Chemistry* 2001;371(3):285-99.
6. MacDonald SJ, Chan D, Brereton P, Damant A, Wood R. Determination of deoxynivalenol in cereals and cereal products by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: Interlaboratory study. *Journal AOAC International* 2005;88:1197-204.
7. Schneider E, Curtui V, Seidler C, Dietrich R, Usleber E, Märtlbauer E. Rapid methods for deoxynivalenol and other trichothecenes. *Toxicology Letters* 2004;153:113-21.
8. Maragos CM, Plattner RD. Rapid fluorescence polarization immunoassay for the mycotoxin deoxynivalenol in wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002;50:1827-32.
9. Nasir MS, Jolley ME. Fluorescence Polarization (FP) Assays for the Determination of Grain Mycotoxins (Fumonisin, DON Vomitoxin and Aflatoxins). *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 2003;6:267-73.
10. Maragos CM, Kim E. Detection of zearalenone and related metabolites by fluorescence polarization immunoassay. *Journal of Food Protection* 2004;67:1039-43.
11. Shim W, Kolosova AY, Kim Y, Yang Z, Park S, Eremin SA, Lee I, Chung D. Fluorescence polarization immunoassay based on a monoclonal antibody for the detection of ochratoxin A. *International Journal of Food Science & Technology* 2004;39:829-37.
12. Lippolis V, Pascale M, Visonti A. Optimization of a Fluorescence Polarization Immunoassay for rapid quantification of deoxynivalenol in durum wheat-based products. *Journal of Food Protection* 2006;69 (11):2712-9.
13. Europa. Regolamento (CE) N. 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea*, L 70/12, 9 marzo 2006.

RICADUTE DELLA CONTAMINAZIONE DA MICOTOSSINE SUL SETTORE DELLA TRASFORMAZIONE

Tullio Pandolfi
Italmopa, Roma

Strumenti normativi per garantire la sicurezza e la tutela dei consumatori

La legislazione europea relativa ai prodotti alimentari ha, tra gli obiettivi principali, quello di proteggere i consumatori. La tutela della salute e la sicurezza alimentare costituiscono gli assi portanti del Libro bianco adottato dalla Commissione nel gennaio 2000.

Con la direttiva 93/43 del 14 giugno 1993 – recepita in Italia dal DL.vo 26/5/1997, n. 155 – è stato introdotto l'obbligo di applicazione di un sistema di autocontrollo secondo i principi dell'HACCP (*Hazard Analysis Critical Control Point*), da parte delle aziende alimentari.

L'HACCP è un sistema che consente di identificare specifici pericoli e quindi di prevedere misure preventive ed eventuali misure correttive per il loro controllo.

Le imprese alimentari devono individuare, nelle loro attività, ogni fase che potrebbe rivelarsi critica per la sicurezza degli alimenti, e devono inoltre garantire che siano individuate, applicate, mantenute e aggiornate le opportune procedure di sicurezza.

Tra il 1993 e il 1999 i settori alimentari hanno elaborato, a livello nazionale, i propri Manuali di corretta prassi igienica: nel 1999 sono entrate in vigore le prescrizioni del DL.vo 155/1997.

Negli stessi anni, a livello comunitario, è stato adottato il Reg. n. 315/93 dell'8 febbraio 1993 che stabilisce procedure comunitarie relative ai contaminanti nei prodotti alimentari.

Sulla base di questo Regolamento, si comincia a disciplinare la materia delle micotossine con il Reg. n. 1525/98 (aflatossina B₁ e aflatossine totali).

Tra il 2001 e il 2005 vengono adottati a livello comunitario i seguenti provvedimenti:

- Reg. CE n. 466/2001 (che fissa i tenori massimi di taluni contaminanti (micotossine e metalli pesanti) nelle derrate alimentari);
- Reg. CE n. 178/2002 (che sancisce l'obbligo della rintracciabilità);
- Reg. CE n. 852/2004 (sostituisce la dir. 93/43) (sull'igiene dei prodotti alimentari);
- Reg. CE n. 183/2005 (sull'igiene dei mangimi).

Il Reg. CE n. 466/2001 all'art. 1 stabilisce che tutti i prodotti indicati negli allegati, devono rispettare i limiti massimi previsti dalla regolamentazione comunitarie in materia di tenori massimi di contaminanti nei prodotti alimentari (micotossine e metalli pesanti).

Il Reg. CE n. 178/2002 all'art. 11 stabilisce invece che gli alimenti importati nella Comunità per esservi immessi sul mercato, devono rispettare le pertinenti disposizioni della legislazione alimentare o le condizioni riconosciute almeno equivalenti dalla Comunità.

Lo stesso Regolamento, all'art. 18, sancisce il principio della "Rintracciabilità" in base gli operatori del settore alimentare e dei mangimi devono essere in grado di individuare chi abbia fornito loro un alimento, un mangime, un animale destinato alla produzione alimentare o qualsiasi sostanza destinata o atta a entrare a far parte di un alimento o di un mangime.

Il Reg. CE n. 852/2004 (All. I parte III “Produzione primaria” - Parte A – Requisiti generali in materia di igiene per la produzione primaria e le operazioni associate) stabilisce che gli operatori devono tenere e conservare in modo appropriato e per un tempo adeguato le registrazioni relative alle misure adottate per il controllo dei pericoli. Inoltre, devono mettere a disposizione delle autorità competenti e degli operatori che ricevono i prodotti, a loro richiesta, le pertinenti informazioni contenute in tali registrazioni.

In questi anni l’approccio comunitario al tema della sicurezza alimentare è diventato un approccio sistematico, in particolare sul tema dei contaminanti disciplinati con Regolamento comunitario: micotossine, metalli pesanti, residui di prodotti fitosanitari.

Si è registrato inoltre, un maggior coinvolgimento di tutti gli attori della filiera (rintracciabilità ai fini della sicurezza alimentare) poiché ogni operatore è responsabile per il segmento di propria competenza.

L’impegno di Italmopa in tema di sicurezza alimentare

Con un impegno costante Italmopa svolge un’attività di informazione e sensibilizzazione sull’evoluzione della regolamentazione comunitaria e nazionale in materia di igiene e contaminanti nei prodotti alimentari.

Nel marzo 1991 Italmopa ha organizzato un Convegno sul controllo di qualità nell’industria molitoria, incentrato sul controllo della qualità, intesa sia in senso tecnologico, sia in termini di sicurezza dei prodotti.

Nella sessione dedicata alla qualità igienico-sanitaria, è stato affrontato il tema della contaminazione da metalli pesanti e micotossine, della contaminazione microbica, del controllo dei pesticidi sulla materia prima (frumento) e sui prodotti trasformati.

L’Italmopa, quale rappresentante dell’industria molitoria italiana, consapevole della responsabilità che ad essa compete quale settore cerniera tra i fornitori di frumento e rilevanti comparti dell’alimentazione, ha anticipato la cosiddetta tracciabilità a monte del molino, promuovendo l’istituzione, su base volontaria, del “Passaporto cereali” (giugno 1998).

Si tratta di uno strumento atto a consentire un monitoraggio costante della materia prima nella fase di accettazione, in quanto consiste nella richiesta del rilascio, da parte dei fornitori, di una dichiarazione su eventuali trattamenti con antiparassitari effettuati sul cereale in fase di conservazione post-raccolta.

In fase di applicazione, in ambito aziendale, dei sistemi di autocontrollo secondo i principi HACCP, è emersa la necessità di disporre di informazioni più dettagliate relative ad altri parametri di contaminazione chimica e biologica (micotossine, muffe e insetti) considerati rilevanti, per il settore cerealicolo, dal punto di vista igienico-sanitario.

L’Italmopa ha coordinato un team di esperti per redigere il Manuale di corretta prassi igienica per l’industria molitoria (ottobre 1998). Esso costituisce uno strumento operativo di riferimento per l’applicazione, nell’ambito delle singole aziende del settore molitorio, dei principi generali di igiene e del sistema HACCP (identificazione punti critici nel processo di macinazione del grano e predisposizione di un sistema per il loro controllo).

L’adozione dei Regolamenti comunitari sui contaminanti e sull’igiene – richiamati in precedenza – ha reso necessario un aggiornamento del Manuale di corretta prassi igienica per l’industria molitoria. A tal fine, è attualmente la lavoro, con il coordinamento della struttura di Italmopa, il team di esperti di aziende associate che ha curato la realizzazione della prima versione del Manuale.

Le principali modifiche previste riguardano: maggiori garanzie da parte dei fornitori sulla conformità della materia prima a quanto richiesto dalla normativa; inserimento di una sezione

dedicata ai sottoprodotti della macinazione; inserimento delle Linee guida Italmopa in una sezione dedicata alla rintracciabilità (ex art. 18 Reg. CE n. 178/2002); revisione delle schede di riferimento per l'analisi dei pericoli e per lo sviluppo del sistema HACCP; aggiornamento dei riferimenti normativi.

In particolare, nella scheda di accettazione della materia prima è stata aggiornata la lista dei pericoli (contaminanti), sono stati revisionati i CCP precedentemente individuati, sono state ampliate le garanzie di conformità della materia prima da parte dei fornitori (obblighi derivanti dalla regolamentazione comunitaria).

L'obiettivo è quello di riaffermare il concetto di "filiera" secondo il quale tutti i soggetti coinvolti sono responsabili della salubrità della materia prima frumento e quindi della conformità di quest'ultima alla normativa di cui ai Regolamenti CE n. 178/2002, 852/2004 e 466/2001.

L'Italmopa ha predisposto le Linee guida per l'applicazione della rintracciabilità nell'industria molitoria (ottobre 2003) con lo scopo di mettere a punto uno strumento metodologico per l'applicazione, nell'industria molitoria, della rintracciabilità ai fini della sicurezza alimentare, conformemente a quanto previsto dall'art. 18 Reg. CE n. 178/2002.

Trattandosi di Linee guida, esse costituiscono un riferimento di carattere generale, la cui applicazione dovrà essere oggetto di adattamento da parte delle Aziende alle proprie, specifiche realtà.

Nel febbraio 2006 l'Italmopa ha organizzato un Convegno sul tema "L'applicazione della rintracciabilità ai fini della sicurezza alimentare nell'industria molitoria". A parlare di rintracciabilità sono stati chiamati due esperti della materia: l'Avv. Giuseppe Durazzo – Professore di diritto alimentare all'Università di Parma – che ha affrontato il tema della "Rintracciabilità e sicurezza alimentare. La normativa comunitaria (artt. 18 e 19 Reg. CE n. 178/2002)", e il Dr. Silvio Borrello – Direttore Generale della Sicurezza degli Alimenti e della Nutrizione del Ministero della Salute – che ha illustrato le "Linee Guida del Ministero della Salute sulla rintracciabilità degli alimenti e dei mangimi per fini di sanità pubblica", messe a punto per fornire indicazioni unitarie ad operatori e organi di controllo per un'applicazione uniforme della legislazione in Italia.

ANALISI DEL RAPPORTO EMATICO SFINGANINA/SFINGOSINA 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

Introduzione

L'impiego delle basi sfingoidi sfinganina (Sa) e sfingosina (So) e soprattutto del rapporto Sa/So ha assunto un ruolo importante come *biomarker* indicatore di intossicazioni da fumonisine.

In numerosi lavori condotti sull'uomo e su animali sono stati utilizzati diversi protocolli di estrazione e di analisi in HPLC per determinare i livelli di Sa e So in campioni di sangue, urina, rene e fegato (1-9).

I metodi maggiormente impiegati per la determinazione delle basi sfingoidi sono quelli proposti da Castegnaro *et al.* (1998) e Solfrizzo *et al.* (1997).

Il metodo di estrazione proposto da Castegnaro presenta dei limiti di estrazione per il sangue e le urine di bovino. Per la risoluzione dei limiti estrattivi sono stati applicati alcuni accorgimenti al fine di ottenere un protocollo di estrazione più efficiente per i campioni di sangue bovino. Inoltre sono stati sviluppati alcuni accorgimenti di analisi in RP-HPLC per migliorare la sensibilità di risposta dei segnali Sa e So.

Materiali e metodi

Estrazione basi sfingoidi da campioni di sangue di bovino

I campioni di sangue di bovino sono stati sottoposti ad estrazione con solventi organici. 500 µl di campione sono stati trasferiti in tubi da 10 mL contenenti 1 mL di metanolo (MetOH) grado HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), 1,5 mL di cloruro di potassio (KCl) 0,8% e 50 µl di idrossido di potassio (KOH) 1 M. Alla soluzione campione sono stati aggiunti 4 mL di acetato di etile grado HPLC (EtAC) come estraente.

La soluzione è stata posta in agitazione per 30 minuti a temperatura ambiente (*Room Temperature*, RT). Dopo la fase d'agitazione le provette sono state centrifugate a 3500 rpm per 15 minuti a RT. La fase surnatante contenente le basi sfingoidi è stata trasferita in provette da 3,5 mL e successivamente essiccata in un bagno termostato a 45°C in corrente di azoto.

Parallelamente, al trattamento dei campioni tal quale, sono state allestite prove per la determinazione dei recuperi percentuali su campioni fortificati con Sa e So a 4 ng/mL, 2 ng/mL e 1 ng/mL.

Determinazione delle basi sfingoidi Sa e So in RP-HPLC

Per il duplice scopo di sviluppo del metodo in RP-HPLC (analisi recupero e verifica del decadimento degli addotti OPA-Sa, OPA-So) e dell'analisi di campioni tal quale è stato necessario effettuare una doppia calibrazione su range differenti.

Per la prima calibrazione, la preparazione degli standard è stata eseguita partendo dalle basi sfingoidi D-eritrodeidro sfingosina o sfinganina 4 mg/mL in MetOH (Sigma-Aldrich, Milano), e sfingosina 2 mg/mL in MetOH (Sigma-Aldrich, Milano) ad ottenere cinque standard alla concentrazione finale, per base sfingoide, di 0,625 ng/mL, 1,25 ng/mL, 2,5 ng/mL, 5 ng/mL e 10 ng/mL.

L'analisi dei decadimenti è stata eseguita mantenendo gli addotti OPA-Sa e OPA-So alla temperatura costante di 0°C con autocampionatore termostato.

Per l'analisi dei rapporti sfinganina/sfingosina nei campioni di sangue bovino, sono stati preparati 4 standard alla concentrazione, per base sfingoide, di 0,0325 ng/mL, 0,0625 ng/mL, 0,125 ng/mL e 0,25 ng/mL. Standard, *spike* e campioni sono stati derivatizzati utilizzando una soluzione di Orto-ftalaldeide OPA (Sigma-Aldrich, Milano) con un rapporto derivatizzante/campione 7:1.

Il sistema RP-HPLC è stato settato impiegando una colonna Sinergy 4 μ Fusion-RP 60 150 x 4,60mm (Phenomenex, USA) termostata a 32°C. Come fase mobile è stata impiegata una miscela metanolo (MetOH) e acqua (H₂O) in rapporto 90:10. La corsa è stata eseguita in isocratica per i primi 13 minuti, seguita da un gradiente di 2 minuti fino a MetOH 100% e terminata con un secondo gradiente per 5 minuti fino a MetOH/H₂O 90:10, per un tempo totale di 20 minuti. Le lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione del detector fluorimetrico impiegato (Thermo Separation Products, Riviera Beach, FL, USA), sono state settate a 364 nm e 440 nm rispettivamente.

Risultati

Analisi e decadimento degli addotti OPA-Sa e OPA-So

Nella fase sperimentale per la determinazione delle basi sfingoidi Sa e So sono state testate le condizioni di analisi in HPLC e una colonna diversa da quella utilizzata nel lavoro di riferimento (Castegnaro *et al.*, 1998). I risultati ottenuti in numerose prove hanno sempre dato esito positivo e costante (Figura 1).

All'analisi in RP-HPLC sono stati rilevati due picchi a 7,4 minuti per la sfingosina (So) e 8,9 minuti per la sfinganina (Sa). I picchi rilevati per le basi sfingoidi sono risultati simmetrici e ben risolti (Figura 1a). Le percentuali di decadimento sono state analizzate partendo da uno standard di Sa a 2,5 ng/mL e uno per la base So a 2,5 ng/mL (Figura 1b).

Entro l'intervallo 0-240 min dalla derivatizzazione con OPA, i risultati delle concentrazioni e dei corrispettivi intervalli di tempo sono stati utilizzati per costruire una curva di decadimento. Il decadimento in percentuale al tempo di 240 minuti è risultato modesto: 4% per OPA-So e 6% per OPA-Sa rispetto al segnale degli addotti al tempo zero, mostrando un alta capacità di mantenimento del segnale delle basi sfingoidi alla temperatura di 0°C

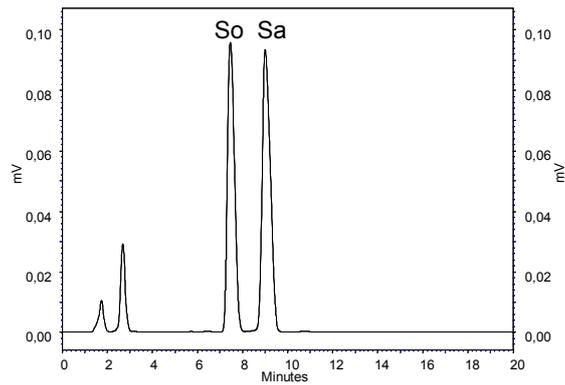


Figura 1a. Cromatogramma relativo a sfingosina (So) 5 ng/mL e sfinganina (Sa) 5 ng/mL

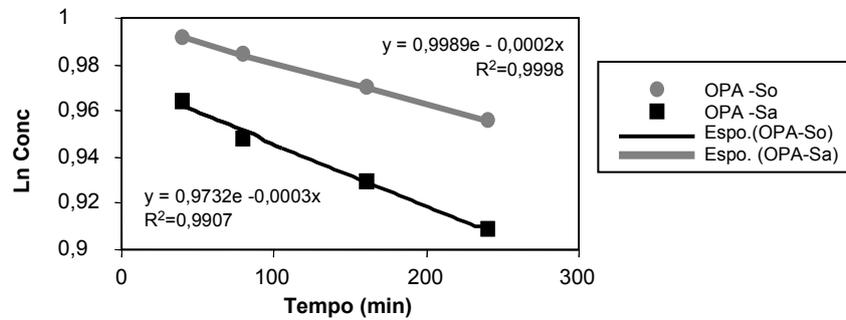


Figura 1b. Decadimento dei derivatizzati OPA-sfinganina (OPA-Sa) e OPA-sfingosina (OPA-So).

Prove di recupero per Sa e So

Le analisi di recupero delle basi sfingoidi Sa e So in campioni di sangue bovino hanno mostrato valori medi di recupero accettabili per i tre *spike* da 4ng/mL, 2ng/mL e 1ng/mL come Sa ed So (Tabella 1).

Tabella 1. Recuperi percentuali delle basi sfingoidi sfingosina (So) e sfinganina (Sa) per diverso livello di fortificazione (durata dell'estrazione 30 min)

Campione	Spike	Tempo	Recupero So (%)	Recupero Sa (%)
Sangue	4 ng/mL	30'	74	69
Sangue	4 ng/mL	30'	75	76
Sangue	2 ng/mL	30'	73	66
Sangue	2 ng/mL	30'	60	65
Sangue	1 ng/mL	30'	90	80
Sangue	1 ng/mL	30'	97	94

In particolare gli *spike* da 1 ng/mL mostrano una maggiore percentuale di recupero sui 500 μ l di sangue di bovino analizzato, mentre i recuperi per gli *spike* da 4ng/mL e 2ng/mL sono risultati essere inferiori. Il metodo di estrazione ha mostrato che le percentuali di recupero delle singole basi sfingoidi Sa e So non sono sempre uguali, ma possono differire da un minimo del 3% ad un massimo del 10%.

Determinazione delle basi sfingoidi Sa e So in campioni di sangue bovino

L'analisi dei campioni di sangue di bovino per la determinazione delle basi sfingoidi Sa e So sulla base della calibrazione per Sa e So nel range 0,0325-0,25 ng/mL.

Dati i bassi valori di concentrazione di Sa ed So rilevati in alcuni campioni di sangue bovino (Figura 2b), la loro rivelazione è stata possibile solo aumentando la sensibilità del detector (aumentando i valori di PMT voltage da 700 a 900 mv).

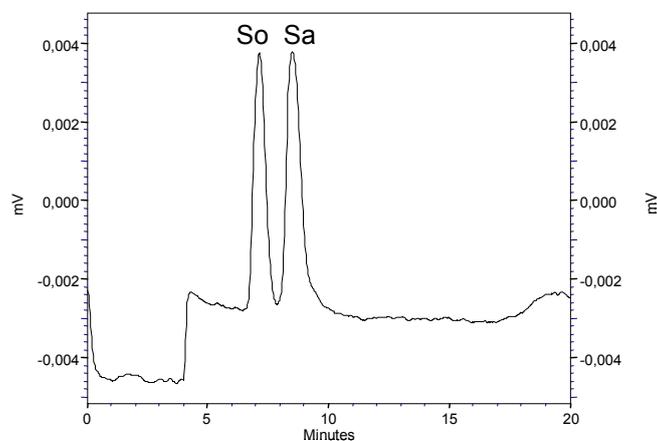


Figura 2a. Standard di sfingosina So e Sfingalina Sa (1 ng/mL)

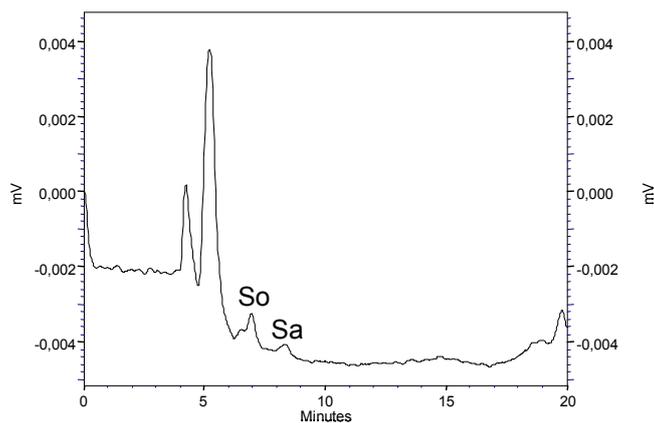


Figura 2b. Campione di sangue di bovino:
presenza di picchi So (0,098 ng/mL) e Sa (0,040 ng/mL)

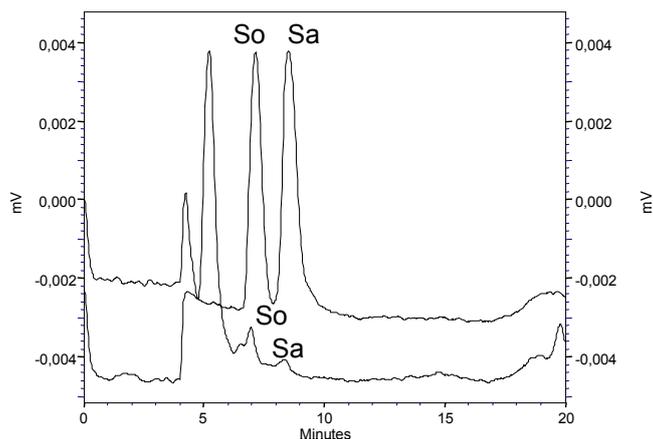


Figura 2c. Cromatogrammi sovrapposti di standard e campione a indicare la corrispondenza di posizione per Sa e So

Conclusioni

L'analisi degli OPA-adotto a condizioni di temperature mantenute costanti (0°C) ha evidenziato la possibilità di analizzare un ampio numero di campioni per tempi prolungati (240 minuti) senza penalizzare l'accuratezza della determinazione. La capacità di estrazione del metodo ha permesso di valutare la possibilità di ottenere un buon recupero per valori bassi di Sa e So (fino a 1ng/mL). Inoltre, aumentando la sensibilità del detector fluorimetrico (da 700 mv a 900 mv) è stato possibile valutare basse concentrazione di Sa e So in campioni di sangue di bovino. I risultati ottenuti indicano una possibilità applicativa del metodo per l'analisi del rapporto Sa/So, al fine di valutare effetti dell'esposizione cronica di ruminanti a fumonisine.

Bibliografia

1. Castegnaro M, Garren L, Galendo L, Gelderblom WCA, Chelule P, Dutton MF, Wild CP. Analytical method for the determination of sphinganine and sphingosine in serum as a potential biomarker for fumonisin exposure. *J Chromatography B* 1998;720: 5-24.
2. Riley RT, Hinton DM, Chamberlain WJ, Bacon CW, Wang E, Merrill AH Jr., Voss AK. Dietary Fumonisin B1 induces disruption of sphingolipid metabolism in Sprague-Dawley rats: A new mechanism of nephrotoxicity. *Nutrition, pharmacology and toxicology* 1994;594-603.
3. Sephard GS, van der Westhuizen L. Liquid chromatographic determination of the sphinganine/sphingosine ratio in serum. *J Chromatography B* 1998;710:219-222.
4. Solfrizzo M, Avantaggiato G, Visconti A. Rapid method to determine phinganine/sphinosine in human and animal urine as a biomarker for fumonisin exposure. *J Chromatography B* 1997;692:87-93.
5. Solfrizzo M, Visconti A, Avantaggiato G, Torres A, Chulze S. *In vitro* and *in vivo* studies to asses the effectiveness of cholestyramine as a binding agent for fumonisins. *Mycopathologia* 2000;151:147-53.

6. Solfrizzo M, Carratu MR, Avantaggiato G, Galvano F, Pietri A, Visconti A. Ineffectiveness of activated carbon in reducing the alteration of sphingolipid metabolism in rats exposed to fumonisin-contaminated diets. *Food and Chemical Toxicology* 2001;39:507-11.
7. van der Westhuizen L, Gelderblom WCA, Shephard GS, Swanevelder S. Disruption of sphingolipid biosynthesis in hepatocyte nodules: selective proliferative stimulus induced by fumonisin B1. *Toxicology* 2004;69-75.
8. Voss KA, Riley RT, Bacon CW, Meredith FI, Norred WP. Toxicity and sphinganine levels are correlated in rats fed fumonisins B1 (FB1) or hydrolyzed FB1. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 1998;5:101-4.
9. Wang E, Riley RT, Meredith FI, Merrill MA Jr. Fumonisin B1 consumption by rats causes reversible, dose-dependent increases in urinary phinganine and sphingosine. *Nutritional toxicology, American Society of Nutritional Science* 1999;214-20.

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

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

(a) CRA-Istituto Sperimentale per l'Enologia, SOP Barletta, Bari

(b) CRA-Istituto Sperimentale per l'Enologia, Asti

Introduzione

L'ocratossina A (OTA) è una micotossina prodotta da specie di funghi appartenenti principalmente ai generi *Aspergillus* e *Penicillium*. È stata ritrovata in diverse derrate alimentari, come i cereali, il caffè, il cacao, la birra e il vino (1-5).

L'OTA è classificata come una sostanza con probabile azione cancerogena per l'uomo (6) e un potente agente nefrotossico (7).

I numerosi studi e ricerche realizzate negli ultimi anni, nel settore vitivinicolo, hanno evidenziato come le contaminazioni occasionalmente riscontrate nei mosti e nei vini sono una conseguenza della presenza sulle uve di muffe secondarie.

A tal proposito sono state diffuse raccomandazioni sull'importanza nell'impedire o limitare lo sviluppo sulle uve dei funghi responsabili in primo luogo nei vigneti e nelle fasi successive che precedono la vinificazione (8).

Inoltre con il Regolamento n. 123/2005 della Commissione Europea (9) è stata fissata la quantità massima di OTA nei mosti e nei vini in 2 µg/L.

Presso il nostro Istituto, nell'ambito di un progetto di ricerca finanziato dal Ministero per le Politiche Agricole e Forestali, uno degli studi è stato indirizzato a valutare l'influenza del sistema di trasporto dell'uva dal vigneto alla cantina e del suo stoccaggio in attesa della pigiatura, in quanto possibili punti critici nel controllo della contaminazione da OTA.

In alcuni studi sullo sviluppo di muffe secondarie durante le fasi di appassimento delle uve sono stati ottenuti validi risultati caratterizzando e isolando le specie di funghi responsabili (10); in altri effettuati su mezzi sintetici simili alla composizione dell'uva si è indagato su alcuni fattori ambientali, quali la temperatura, il pH e l'attività dell'acqua a_w , in grado di influenzare sia la crescita che la produzione di OTA (11).

Nel presente lavoro vengono presentati i risultati di alcune prove sulle modalità di stoccaggio dell'uva prima della vinificazione.

Nelle regioni viticole meridionali, dove da alcuni anni si registrano proliferazioni di funghi tossigeni sulle uve, è prassi durante la vendemmia conferire le uve alle cantine mediante autocassoni di grandi portate. 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 arrivando a destinazione non prima di 48 ore dalla raccolta.

La sosta dell'uva, seppure tenuta in cassette, potrebbe contribuire ad aumentare il tasso di contaminazione, dove già presente.

Materiali e metodi

È stata realizzata una prova di stoccaggio di uve Trebbiano, Negroamaro e Merlot per alcuni giorni, mediante sosta delle stesse all'aperto e in cella frigo a 10°C.

Protocollo sperimentale uve Negroamaro e Merlot

Sono state utilizzate cinque cassette da 20 kg di uve di Negroamaro e cinque di Merlot, provenienti da zone a rischio;. Per ogni varietà veniva pigiata una cassetta all'arrivo, mentre le restanti fatte sostare, all'aperto e in cella frigo a 10°C, per uno e due giorni prima della pigiatura.

Protocollo sperimentale uve Trebbiano

Nove cassette di grappoli sani e perfettamente integri venivano "contaminati" con un uguale numero di grappoli ammuffiti raccolti in maniera differenziata nello stesso vigneto, una cassetta veniva pigiata per ottenere il mosto da considerare come testimone, quattro cassette conservate all'aperto, le altre quattro stoccate in cella frigo a 10°C.

Ogni giorno una cassetta di uva delle due tesi veniva pigiata e dopo rimescolamento standardizzato del mosto con le parti solide veniva prelevato il campione per l'analisi OTA.

I mosti ottenuti sono stati fatti fermentare in condizioni naturali, senza inoculo di lieviti secchi attivi, fino ad esaurimento degli zuccheri e i corrispondenti vini sfecciati dopo una settimana.

I mosti e i vini sono stati successivamente analizzati per il riscontro dell'eventuale OTA.

Analisi HPLC

Per la preparazione del campione sono state utilizzate colonnine di immunoaffinità (OchraTest - Vicam) seguendo la metodica validata e messa a punto da Visconti *et al.* (1999) (12).

Le condizioni cromatografiche sono:

- Strumentazione: HPLC Agilent HP serie 1100 con autocampionatore e detector FLD
- Colonna: Agilent PTH-AA 2.1 x 250 mm, 5µm
- Fase mobile: 48% acetonitrile + 52% Sodio acetato 4 mM/Ac. Acetico (19:1 v/v), in isocratica
- Flusso 0,3 mL/min.
- Temperatura colonna 40°C
- Volume di iniezione 30 µL
- Rivelatore spettrofluorimetrico: Eccitazione 330 nm, Emissione 460 nm
- LOD (*Limit Of Detection*) : 0.04 µg/L; LOQ: 0.10 µg/L

Risultati

I dati riportati in Tabella 1 evidenziano bassi valori di contaminazione iniziale.

Tuttavia è possibile osservare come le uve Merlot tenute in cella frigo per 2 giorni, rivelano un effetto di contaminazione sia nel mosto che nel vino, benché inizialmente non fosse stata riscontrata alcuna traccia di OTA, neppure dopo un giorno di stoccaggio all'aperto o in cella.

Le uve Negroamaro, al contrario, hanno fatto registrare un sensibile aumento del tenore di OTA, sia nei mosti sia nei vini ottenuti dalle uve fatte sostare in cella frigo uno e due giorni prima della vinificazione.

Tabella 1. Tenori di OTA ($\mu\text{g/L}$) riscontrati dopo stoccaggio delle uve a temperatura ambiente e a 10°C

Uve	Temperatura									
	All'arrivo		1° giorno		2° giorno		3° giorno		4° giorno	
	amb.	10°C	amb.	10°C	amb.	10°C	amb.	10°C	amb.	10°C
Negroamaro										
<i>mosto</i>	0,07	-	0,10	0,28	NR	0,68	-	-	-	-
<i>vino</i>	0,15	-	0,09	0,35	NR	0,63	-	-	-	-
Merlot										
<i>mosto</i>	NR	-	NR	NR	NR	0,15	-	-	-	-
<i>vino</i>	NR	-	NR	NR	NR	0,15	-	-	-	-
Trebbiano										
<i>mosto</i>	0,17	-	0,06	0,26	0,20	0,62	0,24	0,98	0,24	0,85
<i>vino</i>	0,33	-	0,16	0,28	0,15	0,82	0,29	0,96	0,19	0,58

NR. Non Rilevato

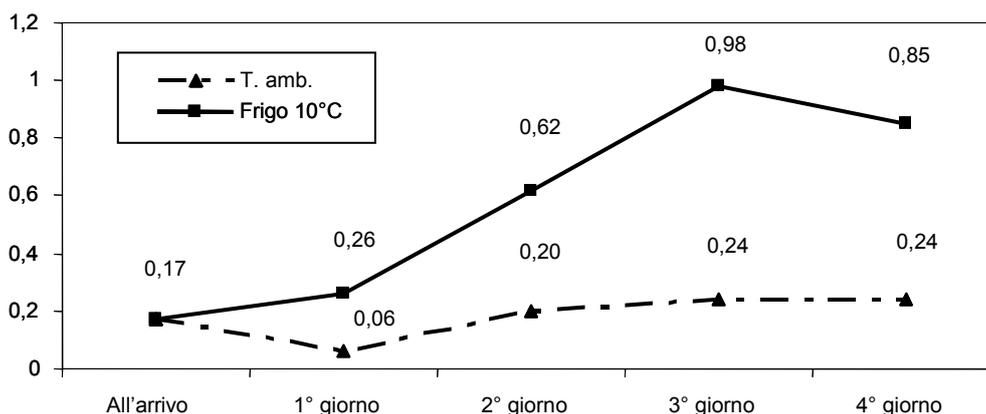


Figura 1. Tenori di OTA riscontrati nei mosti di uve Trebbiano in funzione del tempo a due diverse temperature di stoccaggio

Altrettanto è stato osservato per le uve di Trebbiano, ossia si riscontrano tenori di OTA progressivamente più alti all'aumentare dei tempi di sosta a temperatura di 10°C, mentre a temperatura ambiente l'aumento è trascurabile (Figura 1).

I risultati ottenuti nelle tre prove mostrano, dunque, un peggioramento qualitativo dei vini sotto l'aspetto sanitario, quando per motivi pratici o tecnici le uve vengono fatte sostare in cella frigo.

La temperatura e l'umidità sono fattori critici per la proliferazione dei funghi di qualsiasi genere, in particolare la loro crescita è favorita in un range di temperatura compreso tra 12-39°C (temperatura ottimale 29°C) e di umidità dell'aria tra 72-90% (13).

In queste prove non è stato possibile monitorare il grado di sviluppo delle muffe né accertare le specie predominanti che hanno portato ad un diverso grado di contaminazione tra uve conservate all'aperto e in cella frigo. Tuttavia è stata osservata una differenza importante e cioè che i grappoli tenuti ad una temperatura di 10°C erano costantemente ricoperti da un film di vapore acqueo (rugiada), a causa di un effetto di condensa all'interno della cella frigo per un valore di umidità assoluta uguale a quella di saturazione. I grappoli conservati a temperatura ambiente ed esposti al sole durante il giorno, erano invece sempre asciutti e probabilmente anche leggermente disidratati, con una conseguente diminuzione dell'acqua "libera" (a_w) negli acini.

L'aumento di OTA, paradossalmente più elevato a bassa temperatura si può pertanto imputare alle condizioni di umidità anche se questi risultati andrebbero confermati con ulteriori prove di stoccaggio, magari impiegando celle frigo in grado di evitare eventuali condense.

Conclusioni

Alla luce dei risultati ottenuti ci sembra opportuno segnalare come lo stoccaggio a basse temperature di uve occasionalmente contaminate può influire in modo negativo sulla sanità del vino, se le basse temperature non sono accompagnate da assenza di umidità.

Pertanto non si esclude una simile controindicazione sulle uve, sia quando vengono trasportate con camion-frigo in località lontane dalla zona di produzione, sia quando in cantina le uve vengono fatte sostare in celle a temperature basse per contenere la proliferazione della blastoflora naturale, prima di iniziare le operazioni di vinificazione.

Bibliografia

1. Trucksess MW, Giler J, Young K, White KD, Page SW. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley and coffee *JAOAC Int* 1999;82:85-9.
2. Festas I, Herbert P, Santos L, Cabral M, Bassos P, Alves A. Ochratoxin A in some portuguese wines: method validation and screening in port wine and vinho verde. *Am J Enol Vitic* 2000;51:150-4.
3. Romani S, Sacchetti G, Chaves C, Pinnavaia G, Dalla Rosa M. Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. *J Agric Food Chem* 2000;48:3616-9.
4. Sage L, Krivobok L, Delbos E, Seigle-Murandi F, Creppy E. Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. *J Agric Food Chem* 2002;50:1306-11.
5. Taniwaki MH, Pitt JL, Teixeira AA, Iamanaka BT. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *Int J Food Microbiol* 2003;82:173-9.
6. IARC Working Group, World Health Organisation. *Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans*. vol. 56. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 1993. p. 489-521.
7. Plestina R. Nephrotoxicity of ochratoxin A. *Food Additives and Contaminantes*, 1996;13: 49-50.
8. Office International de la Vigne et du Vin. Code de bonnes pratiques vitivinicoles en vue de limiter au maximum la presence d'ochratoxine A dans les produits issus de la vigne. *Resolution VIII-OENO 1/2005*. Paris 24 ottobre 2005.
9. Comunità Europea. Regolamento 2005/123/CE del 26 gennaio 2005. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* L 25/3, 28 gennaio 2005.

10. Pataraki M, Dekanea A, Lydakakis D, Magan N. Mycoflora dynamics in drying currants and sultana and effects on ochratoxin production. *International Workshop: "Ochratoxin A in grapes and wines: Prevention and control"* 20-21 Ottobre 2005, Marsala, Italia.
11. Sanchis V, Valero A, Ramos A. J, Marin S. Influence of mycoflora on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* at different environmental conditions. *International Workshop: "Ochratoxin A in grapes and wines: Prevention and control"* 20-21 Ottobre 2005, Marsala, Italia.
12. Visconti A, Pascale M, Centonze G. Determination of Ochratoxin A in wine and beer by immunoaffinity clean-up and HPLC analysis with fluorometric detection. *J Chromatogr A* 1999;864:89-101
13. Rousseau J, Blateyron L. Ochratoxine A dans les vins: pas de solutions curative sur vin, priorité à la maîtrise sanitaire au vignoble. *Rev des Œnol* 2002;104:14-6.

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

*Stampato da Litografia Chicca di Fausto Chicca
Via di Villa Braschi 143, 00019 Tivoli (Roma)*

Roma, settembre 2007 (n. 3) 22° Suppl.