

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

3° Congresso nazionale

**Le micotossine
nella filiera agro-alimentare e zootecnica**

Istituto Superiore di Sanità
Roma, 28-30 settembre 2009

RIASSUNTI

A cura di
Carlo Brera, Marina Miraglia, Emanuela Gregori e Viviana Renzi
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare

ISSN 0393-5620
ISTISAN Congressi
09/C6

Istituto Superiore di Sanità

3° Congresso nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare e zootecnica. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 28-30 settembre 2009. Riassunti.

A cura di Carlo Brera, Marina Miraglia, Emanuela Gregori e Viviana Renzi
2009, x, 104 p. ISTISAN Congressi 09/C6

Il Congresso si propone di evidenziare sia i principali aspetti correlati alle ricadute di carattere sanitario, agronomico, industriale e diagnostico derivanti dalla contaminazione da micotossine nei prodotti della filiera agro-alimentare, sia i principali risultati ottenuti in ambito scientifico derivanti dai progetti di ricerca nazionali e transnazionali. L'evento si rivolge pertanto a tutti i ricercatori ed agli operatori del sistema alimentare e mangimistico, con l'auspicio di fornire, attraverso le proprie esperienze ed i propri contributi relativi allo svolgimento delle attività operative e gestionali, uno scenario quanto più rappresentativo del problema delle micotossine nel nostro Paese. Ciò al fine di valutare le attività correttive da effettuarsi in via preventiva per limitare l'impatto sanitario di questi contaminanti sulle produzioni, sugli animali ed infine sulla salute pubblica. Infine, gli argomenti trattati in questo Congresso saranno orientati sia alla diffusione di informazioni scientifiche in grado di tutelare il consumatore italiano, sia alla individuazione di eventuali ed urgenti necessità di informazioni ancora mancanti da acquisire nell'ambito dei futuri progetti di ricerca, sia infine all'acquisizione degli strumenti operativi in grado di garantire una maggiore competitività sul mercato europeo ed internazionale.

Parole chiave: Micotossine, Analisi del rischio, Progetti di ricerca, Alimenti

Istituto Superiore di Sanità

3th National Congress. Mycotoxins in food chain. Istituto Superiore di Sanità. Rome, September 28-30, 2009. Abstract book.

Edited by Carlo Brera, Marina Miraglia, Emanuela Gregori and Viviana Renzi
2009, x, 104 p. ISTISAN Congressi 09/C6 (in Italian and in English)

The Congress is aimed at focusing on the main aspects related to the different outputs derived from sanitary, agronomic, industrial and diagnostic implication regarding mycotoxin contamination in agri-food chain products and from the existing research projects promoted at national and transnational level. Therefore, this event is addressed to all the researcher and stakeholders of the food and feed chain, with the auspices that through their own experiences and contributions, an exhaustive information on operating and managerial activities to be implemented to control as much as possible mycotoxin contamination in food and feed products, is achieved. This approach would contribute to limit 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 Congress can help the dissemination of scientific information related to safeguarding the Italian consumer to the exposure of such toxic substances, the individuation of emerging needs to be included in the ongoing research projects and to achieve better competitiveness in the European and international markets.

Key words: Mycotoxins, Risk analysis, Research projects, Foodstuffs

Responsabili scientifici: Marina Miraglia, Carlo Brera

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

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

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

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

© 2009 Istituto Superiore di Sanità (Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma)

INDICE

Programma	iii
Note per la consultazione	x
Lecture plenarie e Comunicazioni orali	1
Poster	47
Indice degli autori	101

PROGRAMMA

Lunedì 28 settembre

08.30 Registrazione dei partecipanti

09.00 Indirizzo di benvenuto

Enrico Garaci
Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità

Agostino Macri
Direttore del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare,
Istituto Superiore di Sanità

Tema della giornata:

LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO DA MICOTOSSINE

Prima sessione

PROGETTI DI RICERCA: RISULTATI RAGGIUNTI E NECESSITÀ FUTURE

Moderatori: Agostino Macri, Vittorio Silano

Lecture plenarie

09.30 *Il ruolo del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali
nella ricerca scientifica sulle micotossine*
Romano Marabelli

10.00 *Valutazione del rischio da micotossine in alimenti e mangimi: analisi
critica dei risultati ottenuti dai progetti di ricerca nazionali ed europei*
Marina Miraglia

Comunicazioni orali

10.30 *Nuovi approcci per la valutazione del rischio da micotossine*
Francesca Debegnach

10.50 Intervallo

11.15 *Valutazione dell'esposizione della popolazione italiana alla Ocratossina A
nel cacao e nel cioccolato*
Carlo Brera

11.35 *Micotossine ed autismo*
Maria Elisabetta Raggi, Barbara De Santis

12.00 Discussione

12.30 Intervallo e discussione poster

Seconda sessione

GLI EFFETTI DELLE MICOTOSSINE SULLA SALUTE DELL'UOMO E DEGLI ANIMALI

Moderatori: Eugenia Dogliotti, Gianfranco Piva

Lecture plenarie

13.30 *L'attività dell'EFSA nella valutazione del rischio da micotossine*
Anna Castoldi

14.00 *Meccanismi molecolari e quadro epidemiologico delle micotossine nell'uomo*
Maria Rosaria Carratù

14.30 *Gli effetti delle micotossine sulla salute degli animali da reddito*
Carlo Nebbia

15.00 Intervallo

Comunicazioni orali

15.20 *Livelli di Ocratossina A nel siero di campioni di popolazione molisana*
Amedeo Pietri

15.40 *Interferenza sull'espressione di geni Dlx5 in ratti esposti ad Ocratossina*
Alberto Ritieni

16.00 *Valutazione in vitro dell'esposizione alle micotossine sullo stato ossidativo
di linfociti del bovino da latte*
Pier Paolo Danieli

16.20 *Effetto tossico della Fumonisina B₁ sugli spermatozoi equini: analisi della vitalità,
produzione di ROS, stabilità della struttura cromatinica e motilità*
Fiorenza Minervini

16.40 Discussione

Terza sessione

ASPETTI ECONOMICO-COMMERCIALI DELLE MICOTOSSINE E LORO IMPATTO SULLA PRODUZIONE NAZIONALE

Moderatore: Giovanni Di Genova, Enrico Costa

Comunicazioni orali

- 16.50 *Cereali: dinamiche di mercato e fattori di rischio. Il caso delle micotossine*
Andrea Villani, Gianni Baccarini
- 17.10 *Innovazioni agronomiche e gestione efficiente del frumento duro (Triticum durum
desf.) per la salvaguardia e la valorizzazione della filiera italiana*
Michele Pisante
- 17.30 *Valutazione comparativa dell'incidenza di micotossine fra le pratiche
di produzione di mais convenzionale, biologico e biotecnologico*
Barbara De Santis
- 17.50 *La prevenzione del rischio da micotossine ed il controllo per la sicurezza
alimentare da parte delle imprese attive nel commercio agricolo dei cereali*
Teresa Babuscio
- 18.10 *Discussione e chiusura della giornata*

Martedì 29 settembre

Tema della giornata:

LA GESTIONE DEL RISCHIO DA MICOTOSSINE

Prima sessione

LA GESTIONE DEL RISCHIO DA MICOTOSSINE DA PARTE DEL SETTORE PUBBLICO E PRIVATO

Moderatori: Roberto Deserti, Valerio Marchioni

Lecture plenarie

- 09.00 *Il controllo ufficiale delle micotossine in Italia*
Silvio Borrello
- 09.30 *Piano Nazionale Alimentazione Animale (pluriennale) 2009-2011:
criteri e strategie*
Gaetana Ferri

Comunicazioni orali

10.00 *Recenti sviluppi della normativa nazionale e comunitari
in materia di micotossine*
Elvira Cecere

10.20 *Quadro normativo ed andamento dei controlli in Italia per gli anni 2005-2008*
Carmelo Cicero

10.40 Intervallo

Lecture plenarie

11.00 *Il settore primario quale punto iniziale della gestione
della contaminazione da micotossine*
Rolando Manfredini

11.30 *L'attenzione del settore della trasformazione alla contaminazione da micotossine*
Daniele Rossi

Comunicazioni orali

12.00 *Possibilità di controllo biologico delle infezioni da Fusarium del mais ed effetto
sulla contaminazione da Fusarium tossine*
Roberto Causin

12.20 *Controllo Ufficiale delle micotossine in derrate alimentari di provenienza
extraeuropea in ingresso dal porto di Ravenna*
Davide Verna

12.40 Discussione

13.00 Intervallo e discussione poster

Seconda sessione

Progetti di ricerca: risultati raggiunti e necessità future

Moderatori: Elena Brugna, Marina Carcea

Lecture plenarie

14.45 *La ricerca italiana ed europea per la gestione del rischi nella filiera agro-alimentare*
Gianfranco Piva

15.15 *Il ruolo del MIPAF nella ricerca italiana per la gestione delle micotossine*
Marina Montedoro

Comunicazioni orali

- 15.45 *Progetto interregionale MICOCER: "Valutazione e controllo della contaminazione da micotossine nelle produzioni cerealicole nazionali"*
Maria Grazia D'Egidio
- 16.05 *Progetto interregionale MICOCER: "Monitoraggio dei livelli di Deossinivalenolo nella granella di frumento duro (Triticum durum desf.)"*
Gabriella Aureli
- 16.25 Intervallo
- 17.40 *Percorsi produttivi per prevenire la contaminazione da Deossinivalenolo nel frumento tenero*
Massimo Blandino
- 18.00 *Percorsi produttivi per prevenire la contaminazione da micotossine nel mais*
Amedeo Reyneri
- 18.20 *Esiti di un monitoraggio quinquennale sulla presenza di micotossine nei cereali del Veneto*
Emma Tealdo
- 18.40 *Il Gruppo di Lavoro Micotossine (GLM) in Italia ed in Europa*
Enrico Costa
- 19.00 Discussione e chiusura della giornata

Mercoledì 30 settembre

Tema della giornata:

LA DIAGNOSTICA DELLE MICOTOSSINE

Prima sessione

PROGETTI DI RICERCA: RISULTATI RAGGIUNTI E NECESSITÀ FUTURE

Moderatori: Rosangela Marchelli, Amedeo Pietri

Lecture plenarie

- 09.00 *Come utilizzare i risultati ottenuti nei progetti di ricerca nazionali e valutazione delle prospettive future*
Carlo Brera

09.30 *La diagnostica delle micotossine: outputs di recenti progetti europei e prospettive future*
Angelo Visconti

Comunicazioni orali

10.00 *Analisi di Fumonisine B₁ e B₂ in farine di mais mediante tecnica HPLC/MS/MS e valutazione della loro tossicità su Vibrio fischeri*
Cecilia Bergamini, Paola Silingardi

10.20 *Sistemi diagnostici innovativi per la rivelazione e quantificazione di micotossine utilizzando Proteina MicroArray (Progetto Me.Di.T.A.)*
Marcello Gatti

10.40 Intervallo

11.00 *Sviluppo di un nuovo sistema immunolettrochimico per la determinazione del Deossivalenolo*
Daniela Romanazzo

11.20 *Electrochemical immunosensor method for the determination of type A-trichothecenes in breakfast cereals and cereal-based baby foods*
Silvia Vesco

11.40 *Sviluppo di metodi di analisi sensibili per le tossine T-2 ed HT-2 in cereali e prodotti derivati*
Michelangelo Pascale

12.00 Discussione

12.30 Intervallo e discussione poster

Seconda sessione

IL CONTRIBUTO NAZIONALE ALLA DIAGNOSTICA DELLE MICOTOSSINE

Moderatori: Michelangelo Pascale, Ivan Pecorelli

Lecture plenarie

13.30 *Laboratorio Nazionale di Riferimento. Un anno di attività*
Barbara De Santis

14.00 *Applicazione delle procedure di campionamento: a che punto siamo?*
Carlo Brera

Comunicazioni orali

- 14.30 *Campionamento dinamico di matrici vegetali importate mediante campionatore automatico di nuova generazione*
Gabriele Gandini
- 14.50 *Micotossine mascherate nella filiera dei cereali: un nuovo problema emergente*
Arnaldo Dossena
- 16.10 *Early detection of mycotoxigenic fungi and mycotoxins by different technical tools*
Alessandra Ricelli
- 16.30 *Determinazione simultanea di Aflatossine, Ocratossina A e tossine di Fusarium in cereali mediante purificazione su colonnine ad immunoaffinità multi anticorpo e LC-MS/MS*
Veronica M.T. Lattanzio
- 16.50 *Isotopi stabili di micotossine come materiali di riferimento per analisi con LC-MS/MS*
Alexandra Molinelli
- 17.10 *Materiali di Riferimento per la determinazione di micotossine e valutazione di contaminazioni fungine in prodotti alimentari*
Giovanna Zappa
- 17.30 Valutazioni finali e chiusura del Congresso

NOTE PER LA CONSULTAZIONE

Il presente libro raccoglie tutti i contributi presentati al Congresso. I lavori sono divisi in Letture plenarie, Comunicazioni orali e Poster.

Per comodità di consultazione, i riassunti delle Letture plenarie e delle Comunicazioni orali afferenti a tutte le giornate del Congresso, sono state raccolte secondo l'ordine del programma. I Poster sono presentati secondo i temi delle giornate del Congresso in ordine alfabetico del primo autore e sono contrassegnati da una lettera "P" seguita da un numero che ne indica la collocazione.

Alla fine del volume è incluso un indice degli autori.

Lecture plenary and Oral Communications

VALUTAZIONE DEL RISCHIO DA MICOTOSSINE IN ALIMENTI E MANGIMI: ANALISI CRITICA DEI RISULTATI OTTENUTI DAI PROGETTI DI RICERCA NAZIONALI ED EUROPEI

Miraglia M., Brera C., De Santis, B., Gregori, E.

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La valutazione del rischio rappresenta il punto iniziale del complesso e multifattoriale iter che va sotto il nome di analisi del rischio. Pertanto è proprio dalla accuratezza della valutazione del rischio che dipende l'appropriatezza di una serie di opzioni e di conseguenze che hanno risvolti sanitari, economici, commerciali e sociali. La ricerca relativa alla valutazione del rischio da micotossine ha finora principalmente seguito i canoni classici della integrazione tra caratterizzazione del pericolo e valutazione dell'esposizione. Anche se notevoli progressi sono stati effettuati per migliorare e rendere più flessibili i risultati di questo approccio, come nel progetto europeo SAFEFOOD, è ben riconosciuto che molte sono ancora le incertezze associate alla valutazione del rischio da micotossine tramite questo approccio e si è ancora ben lontani dal conoscere quale sia il reale effetto delle micotossine sulla salute dell'uomo e degli animali. L'approccio epidemiologico che studia diverse tipologie di biomarcatori è senza dubbio quello che è stato maggiormente oggetto di progetti di ricerca a livello europeo per la valutazione del rischio. Un rilevante esempio a tale riguardo è il progetto Europeo NewGeneris. Tuttavia il futuro della ricerca per la valutazione del rischio da micotossine potrebbe risiedere nell'impiego della tossico genomica. Questo approccio, non ancora sviluppato in Europa per le micotossine, potrebbe rappresentare la strada per determinare geni e *pathways* che sono attivati o soppressi durante il danno causato dalle micotossine e se l'organismo mostra una risposta conservativa allo stress. Infine sulla base della banca dati relativi all'anagrafe della ricerca effettuata dal progetto europeo SAFEFOODERA in questa presentazione verranno esaminate le quote di risorse dedicate alla ricerca per la valutazione del rischio da micotossine rispetto ad altri settori di questa tipologia di xenobiotici e saranno effettuate alcune considerazioni a riguardo.

NUOVI APPROCCI PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO DA MICOTOSSINE

Brera C., Debegnach F., De Santis B., Pannunzi E., Gregori E., Berdini C., Miraglia M.
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

I moderni approcci di valutazione del rischio presentano numerosi aspetti innovativi rispetto alla concezione tradizionale tra cui l'effetto sinergico che deriva dall'esposizione simultanea a più contaminanti e la possibilità, utilizzando modelli di calcolo sempre più versatili, di massimizzare gli *output* che si possono ottenere a partire dai database disponibili. Lo scopo principale del progetto Europeo *Safefoods - Promoting Food Safety Through a New Integrated Risk Analysis Approach for Foods* è stato quello di proporre una nuova visione della analisi del rischio che puntasse ad un approccio olistico, che guardasse all'alimento come fonte di rischi, ma anche di possibili benefici e non trascurando l'aspetto dei costi legati alla sua produzione e al suo consumo. In questo contesto il gruppo di lavoro 3 (WP3) - *Quantitative Risk Assessment of Combined Exposure to Food Contaminants and Natural Toxins*, ha agito con lo scopo di determinare l'impatto sulla salute dell'esposizione della popolazione europea ad una combinazione di contaminanti alimentari (pesticidi e micotossine) e tossine naturali. Al fine di effettuare il *modelling* integrato di esposizione ed effetto è stato sviluppato un modello probabilistico basato sull'approccio Monte Carlo (Monte Carlo Risk Assessment software - MCRA). In tale modello i database relativi a dati di incidenza, consumo ed effetto tossicologico vengono utilizzati simultaneamente per quantificare il rischio attraverso il margine di esposizione (MoE) e la valutazione della severità dell'effetto tossicologico. Il *modelling* per l'esposizione pan-europea ha comportato un imponente lavoro di armonizzazione dei database relativi ai consumi e ai dati di incidenza dei diversi Paesi coinvolti nel progetto. I database dei consumi infatti sono approntati con metodi diversi a seconda dei Paesi ma accomunati dal fatto di essere stati concepiti per finalità nutrizionistiche e non progettati *ad hoc* per la valutazione dell'esposizione. Un altro sforzo di armonizzazione è stato fatto al fine di poter ricondurre tutti i dati di incidenza e consumo alle materie prime in modo che ci fosse uniformità tra i vari *data set*. Il *modelling* per gli effetti tossici si è basato sull'uso del software PROAST per determinare la *Benchmark Dose* (BMD) di alcuni pesticidi, micotossine e tossine naturali. I calcoli effettuati dal software MCRA durante lo svolgimento del progetto rappresentano, allo stato attuale, una preziosa fonte di informazioni per poter individuare gli aspetti che richiedono ancora ulteriore armonizzazione al fine di poter fornire risposte utili per la gestione del rischio.

VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE DELLA POPOLAZIONE ITALIANA ALLA OCRATOSSINA A NEL CACAO E NEL CIOCCOLATO

Brera C., Iafrate E., De Santis B., Debegnach F., Miraglia M.
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'Ocratossina è una tossina prodotta da muffe del genere *Aspergillus* e *Penicillium*. Ha proprietà tossiche molto spiccate in quanto è stata classificata dall'*International Agency for Research on Cancer* (IARC) al gruppo 2B, potenzialmente cancerogena per l'uomo. Lo studio ha avuto come scopo quello di effettuare una valutazione del rischio del consumatore derivante dal consumo di prodotti di cacao e cioccolato. Al fine di garantire la massima rappresentatività dei campioni da analizzare, si è adottato il criterio di campionare i prodotti in sei punti vendita della Grande Distribuzione, selezionati nelle Regioni Lazio e Lombardia. I campioni prelevati (N=300) sono stati analizzati per il loro livello in OTA sulla base di un metodo di analisi precedentemente pubblicato dagli autori. La percentuale di campioni positivi è risultata essere pari al 30%. La concentrazione media di OTA nei campioni di cioccolato (N=260) è risultata pari a 0,18 µg/kg. Si ricorda che il limite massimo tollerabile previsto dalla Circolare del Ministero della Salute n. 10 del 9 giugno 1999 è pari a 0,5 µg/kg. Per quanto concerne i campioni di cacao in polvere (N=40) tutti i campioni sono risultati positivi, ma i livelli di contaminazione media sono risultati pari a 0,55 µg/kg, risultando pertanto ampiamente al di sotto del limite massimo tollerabile, fissato dalla Circolare a 2,0 µg/kg. Al fine di effettuare una stima della esposizione del consumatore, non essendo attualmente disponibile una fonte di dati ufficiali aggiornata si è ricorsi ai dati forniti dalla GfK-IHA Italia. Dai dati forniti, si rileva che i consumi medi annui oscillano tra i 100 e i 500 grammi a seconda della tipologia del prodotto e del gruppo di consumatori. Dalla correlazione tra dati di consumo e dati di contaminazione si rileva che l'esposizione media del consumatore è significativamente al di sotto (0,08%) della recente TWI (120 ng/kg pc/g). Per il cacao in polvere, sulla base del livello di contaminazione medio (0,55 µg/kg) ottenuto sui 40 campioni analizzati e del consumo stimato a 72 g annuo *pro capite* si ottiene un contributo che oscilla tra lo 0,01% e lo 0,02% della TWI a seconda della fascia di consumatori presi in esame.

MICOTOSSINE ED AUTISMO

Raggi M.E. (a), De Santis B. (b), Brera C. (b), Tsiolla Z. (b), Ciceri F. (a), Prantera E. (b), Miraglia M. (b)

(a) *Eugenio Medea, IRCCS, Bosisio Parini, Lecco*

(b) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

La sindrome autistica è un disordine neurocomportamentale caratterizzato da difficoltà nell'apprendimento, disturbi dell'attenzione, dell'attività e/o della socialità, con o senza ritardo mentale. Fino all'inizio degli anni ottanta l'incidenza dell'autismo contava 3-5 casi ogni 10.000 nascite, con variazioni dipendenti da criteri diagnostici, autori delle ricerche e posizione geografica. Almeno due terzi dei soggetti con autismo manifestava sin dai primi mesi i sintomi iniziali della sindrome. Meno di un terzo invece cominciava a mostrare regressione nella socialità, nel linguaggio e nel comportamento tra uno e due anni d'età. Le forme insorgenti come tali erano in leggera prevalenza rispetto a quelle regressive in un generale andamento epidemiologico costante e non elevato. Nel periodo 1980-85 l'incidenza dell'autismo è raddoppiata. I casi di cosiddetto autismo regressivo sono risultati pari a quelli con manifestazioni evidenti sin dai primi mesi di vita configurando l'ipotesi che ci fosse una condizione acquisita al di là degli errori congeniti e delle condizioni puramente genetiche. Dagli anni novanta entrambi i tipi di autismo sono risultati in netto aumento ma con forte prevalenza percentuale della forma regressiva, divenuta circa il 75% dell'incidenza totale, comunque cresciuta di 10 volte, fino a raggiungere i 30-35 casi su 10.000, con qualche rapporto locale indicante valori addirittura doppi.

Verosimilmente un tale incremento è in parte da attribuire a una maggiore sensibilità e a un miglioramento dei criteri diagnostici; tuttavia, esistono ormai evidenze sufficienti per attribuire un ruolo eziologico, anche se non esclusivo, ad alcuni fattori ambientali, dove con il termine ambiente si intende un contesto di vita che include in primo luogo l'alimentazione. Si sta profilando, dunque, un nuovo modello della malattia autistica che trasferisce l'attenzione dalla causa genetica verso fattori ambientali e verso l'alimentazione, tanto da porre l'autismo non più come una "condizione fissa", ma una "condizione dinamica" con caratteristiche scambiabili, dove si riconosce ampio spazio alla ricerca di miglioramenti e recuperi.

Poiché nel quadro clinico del gruppo dei pazienti presi in considerazione è stata evidenziata una anomala, ma fortemente significativa, presenza di alcuni anticorpi fungini (IgG specifiche allergologiche), si è configurata l'ipotesi della correlazione fra l'esposizione dei pazienti al fungo e alle micotossine e la malattia, supponendo quale possibile causa di degenerazione della manifestazione clinica dell'autismo, l'esposizione ai metaboliti fungini attraverso l'assunzione di alimenti contaminati.

Allo stato attuale delle conoscenze, questa è la prima volta in cui siero e urina di bambini autistici (gruppo di autistici) vengono analizzati e messi a confronto con siero e urina di parenti (fratelli) non autistici (gruppo di controllo) al fine di trovare una possibile correlazione fra il profilo del contenuto di micotossine con la malattia.

Lo studio si è focalizzato sulla ricerca di sfinganina e sfingosina (*biomarker* di esposizione alle Fumonisine), Zearalenone, α -zearalenolo, β -zearalenolo e gliotossina nei fluidi biologici dei gruppi di autistici per metterlo a confronto con il profilo del gruppo di controllo. A tal fine si sono messi a punto protocolli di estrazione dalle matrici indicate delle micotossine di interesse, e protocolli di analisi in UPLC-UV e UPLC-MS/MS. L'elaborazione statistica dei dati è stata realizzata con il test ANOVA.

L'ATTIVITÀ DELL'EFSA NELLA VALUTAZIONE DEL RISCHIO DA MICOTOSSINE

Castoldi A.F. (a), Heppner C. (a), Fabiansson S. (a), Benford D. (b)
(a) *European Food Safety Authority, EFSA, Parma*
(b) *Food Standards Agency, London, United Kingdom*

L'EFSA è l'ente di riferimento dell'Unione Europea (UE) per la valutazione e la comunicazione dei rischi esistenti ed emergenti associati alla catena alimentare. Il CONTAM *Panel* dell'EFSA si occupa del *risk assessment* di contaminanti alimentari e sostanze indesiderate quali composti tossici naturali, micotossine e residui di sostanze non autorizzate. Ad oggi il suddetto *Panel* ha pubblicato otto valutazioni scientifiche sui rischi da micotossine nell'alimentazione umana e animale, di cui tre inerenti alle Aflatossine (AF).

Le AF sono composti genotossici e cancerogeni frequentemente presenti in frutta secca, oli vegetali, cacao e mais. Nell'UE il livello massimo di AF totali (somma di AF B₁, B₂, G₁ e G₂) è regolato in alcuni alimenti dal 1998. Per mandorle, nocciole e pistacchi tale limite è pari a 4 µg/kg di AF totali. Per questi alimenti la Commissione del *Codex Alimentarius* (FAO/OMS) ha proposto nel 2006 di introdurre limiti massimi di AF totali superiori a quelli vigenti nell'UE. La Commissione Europea (EC) ha pertanto chiesto al CONTAM *Panel* di valutare se l'eventuale incremento da 4 a 8 o 10 µg/kg del limite massimo di AF totali in mandorle, nocciole e pistacchi comportasse un aumento del rischio per la salute dei consumatori. Il *Panel* ha stimato in 0,4-1,9 ng/kg peso corporeo (p.c.) l'ingestione giornaliera di AF in Europa e ha derivato per il cancro epatico un BMDL10 (ng/kg p.c. per die) di 170 nel ratto e 870 nell'uomo, e un BMDL1 di 78 (uomo). Gli esperti dell'EFSA hanno quindi calcolato i margini di esposizione (MOE: BMDL/esposizione alimentare stimata) per la popolazione generale, gruppi vulnerabili e forti consumatori. Secondo il CONTAM *Panel* l'eventuale aumento del limite massimo di AF totali a 8-10 µg/kg in mandorle, nocciole e pistacchi avrebbe un impatto minimo sull'esposizione alimentare, sul rischio di cancro e sulla stima dei MOE. Il *Panel* ha tuttavia sottolineato la necessità di ridurre al minimo l'esposizione ad AF attraverso ogni possibile fonte per i rischi genotossici e cancerogeni.

Nel 2009 il CONTAM *Panel* ha inoltre valutato se l'applicazione del limite di 10-anziché 4 µg/kg AF totali ad altri tipi di frutta secca (noci, arachidi, anacardi, ecc.) avesse un impatto avverso sulla salute dei consumatori. Per l'esposizione sono stati considerati circa 35.000 dati inviati da 20 Stati Membri nel 2006 relativi alla concentrazione di AF in varie derrate alimentari. Solo lo 0,5% della frutta secca presentava livelli di AF compresi tra 4-10 µg/kg, ad eccezione delle noci del Brasile (2,4%). Il *Panel* ha stimato che per la maggior parte della popolazione l'innalzamento a 10 µg/kg del limite massimo di AF totali in questi frutti determinerebbe un aumento dell'esposizione alimentare ad AF inferiore al 2% e non porrebbe a rischio la salute dei consumatori. Reiterando le conclusioni del parere scientifico del 2007 il *Panel* ha raccomandato la riduzione dell'esposizione al minimo possibile e la diminuzione del numero di alimenti altamente contaminati presenti sul mercato, indipendentemente dal genere alimentare di appartenenza.

MECCANISMI MOLECOLARI E QUADRO EPIDEMIOLOGICO DELLE MICOTOSSINE NELL'UOMO

Carratù M.R.

Dipartimento di Farmacologia e Fisiologia Umana, Università degli Studi, Bari

Le micotossine mostrano una notevole gamma di effetti biologici dovuti alla loro capacità di interagire con diversi organi e sistemi bersaglio. Le attività biologiche sono dovute ad interazioni delle micotossine con DNA, RNA, proteine funzionali, cofattori enzimatici, costituenti di membrana. Gli effetti tossici osservati raramente possono dare origine a fenomeni patologici di tipo acuto e il rischio maggiore risiede nel loro accumulo responsabile di micotossicosi croniche, patologie meno pericolose a breve termine, ma difficilmente diagnosticabili e con notevole impatto socio-economico. Attualmente sono note più di 300 micotossine, anche se la maggior parte delle ricerche è concentrata su Aflatossine, Ocratossine, Tricoteceni, Zearalenone, Fumonisine. Solo il 7% delle micotossine identificate si ritrovano negli alimenti a livelli significativamente elevati tali da costituire un pericolo per la salute umana. Va, altresì, sottolineato che l'analisi micologica non permette di quantificare il rischio tossico proprio di un prodotto alimentare, rischio che può essere quantificato solo attraverso l'analisi delle micotossine note o con test di tossicità. La relazione sarà orientata a fornire una panoramica delle patologie (e meccanismi patogenetici sottesi) ascrivibili alle principali micotossine anche in relazione alle aree geografiche a più elevato rischio.

GLI EFFETTI DELLE MICOTOSSINE SULLA SALUTE DEGLI ANIMALI DA REDDITO

Nebbia C.

Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Torino

In qualità di contaminanti pressoché ubiquitari delle materie prime con le quali vengono confezionati i mangimi destinati alle specie da reddito, le micotossine rappresentano un problema sanitario di primaria importanza. I moderni controlli di qualità e l'applicazione di standard internazionali per la coltivazione delle foraggere e la preparazione dei mangimi hanno in larga misura eliminato la comparsa di episodi intossicazionali a carattere epidemico. Tuttavia, la presenza di concentrazioni relativamente basse di varie micotossine condiziona in tali specie la comparsa di sindromi tossiche spesso insidiose e di difficile diagnosi, caratterizzate per lo più da un calo della produttività e da immunodepressione. Di particolare rilievo è la presenza di sinergismi fra diverse micotossine (ad es. DON+Zearalenone), non ancora ben documentata in tutte le specie, che determina sovente un notevole abbassamento dei valori soglia ritenuti *safe* riportati in letteratura per ciascuna micotossina. Di non secondaria importanza - anche se non espressamente oggetto di questa trattazione - sono inoltre gli aspetti legati alla sicurezza alimentare delle derrate derivanti dagli animali oggetto di contaminazione, in relazione agli obblighi imposti anche alla produzione primaria. I danni economici derivanti dalla comparsa di sindrome tossiche legate alla contaminazione da micotossine nei mangimi è difficilmente quantificabile; stime recenti condotte negli Stati Uniti tramite l'applicazione di modelli matematici hanno calcolato in 126.000-300.000 dollari le perdite "secche" animali dovute alle sole Fusariotossine, ma non hanno tenuto conto dei danni derivati dal calo delle produzioni zootecniche e/o dalla diminuita resistenza alle malattie infettive.

Nella presente relazione vengono prese in considerazione le principali micotossicosi delle specie in produzione zootecnica (bovini, suini, ovini, polli ed equidi), con particolare riferimento alle aflatossicosi, alle fusariotossicosi ed alle ocratossicosi. Ciascuna sindrome viene trattata focalizzando in particolare il rapporto fra biotrasformazione/tossicità, i meccanismi d'azione nelle suddette specie e le diverse sintomatologie cliniche riscontrate. Un breve cenno è infine riservato al carry over relativo alle produzioni animali.

LIVELLI DI OCRATOSSINA A NEL SIERO DI UN CAMPIONE DI POPOLAZIONE MOLISANA

Pietri A. (a), Bertuzzi T. (a), Rossi F. (a), Rastelli S. (a), Mulazzi A. (a), Di Giuseppe R. (b), Iacoviello L. (b)

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

(b) *Centro di Ricerca Giovanni Paolo II, Università Cattolica del Sacro Cuore, Campobasso*

L'Ocratossina A (OTA), prodotta principalmente da *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum* e *P. nordicum*, può essere presente in modo ubiquitario nella dieta; l'esposizione dell'uomo all'ingestione di OTA può verificarsi attraverso il consumo di alimenti sia di origine vegetale (cereali e derivati, frutta secca, caffè, cacao, spezie, vino), che animale (carne suina e derivati). L'escrezione della tossina dall'organismo umano risulta particolarmente lenta; studi hanno indicato un tempo di emivita nel sangue di 35,5 giorni. Per questa persistenza e per la presenza in diversi tipi di alimenti, la determinazione dell'OTA nel sangue rappresenta un parametro di valutazione del livello di esposizione per ogni individuo o per una determinata popolazione. Il livello di OTA può essere quindi correlato con alcuni alimenti della dieta e anche essere indicatore di patologie specifiche, soprattutto a carico del parenchima renale. Nell'ambito di una complessa ricerca sulla popolazione della Regione Molise effettuata in collaborazione con l'Università Cattolica di Campobasso, è stato determinato il livello di contaminazione da OTA in campioni di siero ematico, con lo scopo di studiare eventuali correlazioni con il comportamento alimentare e con parametri ematici indicatori della funzionalità epatica e renale. Sono stati prelevati campioni da 341 individui (154 uomini e 187 donne), di età compresa tra 38-48 anni, ai quali è stato chiesto di compilare un questionario sulle abitudini alimentari. Dopo estrazione dell'OTA dal siero con cloroformio e successiva partizione con una soluzione acquosa di bicarbonato, un'aliquota della fase acquosa è stata purificata attraverso colonna ad immunoaffinità. La determinazione di OTA è stata quindi effettuata mediante HPLC con rivelazione fluorimetrica. I limiti di rivelazione e di quantificazione sono risultati di 0,5 e 1 ng l⁻¹ e la percentuale di recupero del 93,3±3,6%. Per quanto riguarda i risultati dell'indagine, solo in 3 campioni non è stata riscontrata OTA (% positivi=99,1%), il 62% ha mostrato una concentrazione inferiore a 200 ng l⁻¹ e il 5,3% (n=18) una superiore a 500 ng l⁻¹ (val. massimo 2.918 ng l⁻¹); il valore medio è stato pari a 228±234 ng l⁻¹. I dati relativi agli uomini sono risultati statisticamente superiori (P<0,01) rispetto a quelli delle donne, con un valore medio rispettivamente di 271±303 e 193±147 ng l⁻¹. Considerando il comportamento alimentare in base ai questionari compilati, è stata riscontrata una correlazione positiva tra il livello di OTA ematico e il consumo di pasta, pane e di carne suina (principalmente salumi); si è osservata anche una correlazione negativa con il consumo di frutta. Riferendosi solo ai dati relativi alle donne, è stata invece rilevata una correlazione positiva con il consumo di formaggi stagionati. Infine, dai parametri ematochimici effettuati su 73 campioni, è stata riscontrata una correlazione significativa al 95% tra i livelli di OTA e Aptoglobina (indice di infiammazione) e la proteina C-reattiva (infiammazione epatica).

INTERFERENZA SULL'ESPRESSIONE DI GENI DLx5 IN RATTI ESPOSTI AD OCRATOSSINA A

Napoletano M. (a), Pennino D. (a), Morelli F. (a), Somma M.C. (b), Ritieni A. (b)

(a) *Istituto di Genetica e Biofisica, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Napoli*

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

L'Ocratossina A (OTA) è un derivato isocumarinico della fenilalanina prodotto da specie di *Aspergillus* e *Penicillium* e ritrovata in numerosi fonti tra cui i cereali, frutta secca, vino, caffè. L'OTA è teratogena in un ratti, topi, criceti, pulcino e, potenzialmente, anche nell'uomo. Nonostante che l'OTA sia teratogena, rilevata in campioni di plasma umano, con una emivita più lunga di quello riportato nei ratti e che i neonati sono più a rischio poche ricerche sono state note sui possibili rischi per lo sviluppo del feto umano. I difetti più comuni osservati nei topi esposti all'OTA in utero sono anomalie craniche come l'esencefalia, la microencefalia, l'ipoplasia delle mascelle, correlate alla dose e al momento della gestazione in cui la tossina è somministrata.

Il periodo di gestazione nei topi dove la sensibilità all'OTA è maggiore, è compreso tra il 6° e l'8° giorno, con una dose minima di 3 ppm per peso corporeo. Il nostro interesse è comprendere i geni bersaglio dell'OTA, con particolare interesse a quelli coinvolti nella differenziazione del cranio e della mascella. Per la corretta morfogenesi dei diversi segmenti dell'embrione sono necessari l'azione concertata di una famiglia altamente conservata di geni *omeobox Hox*. Nel topo, vi sono almeno sei geni DLX disposte come le coppie e situato vicino *Hox cluster* (Dlx1 e Dlx2 vicino HoxD; Dlx3 e Dlx7 vicino HoxB; Dlx5 e DLX6 vicino HoxC). L'espressione di Dlx5 differisce degli altri membri della famiglia perchè espresso anteriormente ad altri geni DLX.

VALUTAZIONE *IN VITRO* DELL'ESPOSIZIONE ALLE MICOTOSSINE SULLO STATO OSSIDATIVO DI LINFOCITI DEL BOVINO DA LATTE

Bernabucci U., Basiricò L., Danieli P.P., Ronchi B.
Dipartimento di Produzioni Animali, Università della Tuscia, Viterbo

L'esposizione alle micotossine, tanto per l'uomo quanto per le specie animali da reddito, può avere molteplici effetti alcuni dei quali riconducibili a processi d'immunosoppressione o immunomodulazione. La presenza di micotossine negli alimenti zootecnici, pertanto, può essere causa di riduzione del benessere animale con prevedibili ricadute negative, tanto sul livello produttivo che sulla qualità dei prodotti d'origine animale. Tra i possibili meccanismi attraverso i quali le micotossine possono indurre manifestazioni di tipo citotossico, di notevole interesse è quello imputabile allo stabilirsi di processi ascrivibili allo "stress ossidativo". Lo scopo del presente contributo è quello di valutare *in vitro* il potenziale ossidativo di quattro micotossine su un modello cellulare rappresentato da linfociti bovini (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC). Popolazioni di PBMC sono state isolate da campioni di sangue periferico, ottenuti da bovini in buono stato di salute, mediante centrifugazione in gradiente di densità ed incubate in presenza di livelli crescenti di Aflatossina B₁ (AFB₁): 0, 5 e 20 µg/ml; tossina T-2 (T-2): 0, 2,5 e 10 ng/ml; Vomitossina (DON): 0, 1 e 5 µg/ml; Fumonisin B₁ (FB₁): 0, 35 e 70 µg/ml. Per valutare gli effetti dei trattamenti con micotossine sullo stato ossidativo delle PBMC, sono stati analizzati i livelli di concentrazione dei metaboliti reattivi all'ossigeno (ROM), dei tioli intracellulari (SH), della malondialdeide (MDA) e l'espressione genica della superossidodismutasi (SOD) e glutatione perossidasi (GSH-Px). L'esposizione *in vitro* ad AFB₁ ha prodotto una riduzione nell'espressione della SOD e dei livelli di tioli intracellulari con, parallelamente, incrementi significativi di ROM e MDA. I livelli d'esposizione testati per la tossina T-2 hanno prodotto significativi decrementi dell'espressione genica di entrambi i sistemi enzimatici in studio (SOD e GSH-Px) oltre che del livello di tioli intracellulari con variazioni positive della concentrazione di MDA. Incrementi di MDA sono stati osservati anche nel caso del DON. Il trattamento *in vitro* con FB₁ ha manifestato riduzioni importanti nell'espressione della SOD e della GSH-Px accompagnati da un'incrementata produzione di *biomarkers* dello stress ossidativo: ROM e MDA. Tutte le micotossine saggiate hanno manifestato induzione dello stress ossidativo con modalità di tipo dose-dipendente. I risultati ottenuti consentono di individuare nel modello cellulare impiegato, PBMC isolate da sangue bovino, un idoneo e sensibile sistema per la valutazione del potenziale ossidante delle micotossine e dei connessi effetti citotossici a carico del sistema immunitario.

EFFETTO TOSSICO DELLA FUMONISINA B₁ SUGLI SPERMATOZOI EQUINI: ANALISI DELLA VITALITÀ, PRODUZIONE DI ROS, STABILITÀ DELLA STRUTTURA CROMATINICA E MOTILITÀ

Minervini F. (a), Lacalandra G.M. (b), Filannino A. (b), Garbetta A. (a), Nicassio M. (b), Dell'Aquila M.E. (b), Visconti A. (a)

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

(b) *Dipartimento di Produzione Animale, Università degli Studi, Bari*

La Fumonisina B₁ (FB₁) è una micotossina sintetizzata da funghi del genere *Fusarium* e principalmente ritrovata nel mais, ma anche presente in altri cereali. Nell'equino determina leuco-encefalomalacia a livelli nella dieta pari a 15-22 mg/Kg. Lo scopo del lavoro è stato di valutare la tossicità *in vitro* della FB₁ dopo esposizione degli spermatozoi equini in un intervallo compreso tra 30 minuti e 2 h con concentrazioni tra 0,09 e 15 µM. I parametri funzionali considerati sono stati l'analisi della vitalità (con il probe ioduro di propidio), stabilità della struttura cromatinica (con il probe arancio di acridina) e la produzione dei ROS (utilizzando il probe diacetato di fluoresceina) condotte con il citofluorimetro FACSCalibur (BD) e l'analisi della motilità utilizzando il CASA System (HTM-IVOS Sperm Analyzer v. 12.3). Si è osservata una riduzione (18%) sulla vitalità dopo esposizione per 2 ore a 35 µM. un aumento della produzione di ROS in un intervallo da 1,6 a 6,2 µM di FB₁. Non è stata ritrovata alcun danno sulla stabilità della struttura cromatinica dopo esposizione per 2 ore a fino a concentrazioni di 5 µM. Studi sono in corso per valutare questo effetto sulla stabilità, strettamente correlato alla capacità fertilizzante, a concentrazioni di FB₁ più elevate. L'effetto sulla motilità degli spermatozoi si è osservato maggiormente dopo esposizioni a 30 minuti e 1 h di 15 e 7,5 µM di FB₁.

I parametri coinvolti sono stati la motilità totale e la motilità progressiva che sono risultati diminuiti fino al 38%. L'analisi dei risultati ottenuti ha permesso di evidenziare la tossicità della FB₁ su cellule notoriamente molto resistenti come gli spermatozoi, anche a concentrazioni inferiori ai limiti massimi ammissibili per legge nei prodotti destinati all'alimentazione equina.

CEREALI: DINAMICHE DI MERCATO E FATTORI DI RISCHIO. IL CASO MICOTOSSINE

Villani A. (a), Baccharini G. (b)
(a) *AGER, Borsa Merci, Bologna*
(b) *Consorzio Quadra, Bologna*

Il mercato italiano dei cereali presenta peculiarità strutturali che lo rendono per alcuni versi unico nello scenario produttivo internazionale e comunitario. Per alcune importanti filiere, le necessità di importazione attivano cospicui flussi di prodotti provenienti dall'estero con percorsi sia via terra che marittimi. In chiave storica, le recenti campagne di commercializzazione dei cereali sono state - come a tutti noto - dominate da un'alta volatilità dei prezzi delle materie prime a livello mondiale e quindi nazionale. Lo scopo di questa relazione è quello di portare il traguardo dell'attenzione non solo sul "fenomeno prezzi" ma anche sul ruolo crescente giocato dai contaminanti - micotossine - come fattori del mercato in grado di influenzarne ed in qualche modo determinarne le dinamiche. Il doppio binario - per molti versi inedito - del rapporto fra mercato e micotossine, le conseguenze delle sue logiche sulla vita e sull'organizzazione delle aziende, può quindi costituire una chiave innovativa e pratica con cui affrontare il tema delle micotossine. Tutto ciò trova il fondamento in due fattori: la vicarietà sostanziale dell'uso dei cereali per l'alimentazione umana e zootecnica ed i diversi limiti di presenza delle micotossine fissati o raccomandati dal legislatore a seconda della destinazione d'uso; con la creazione di fatto, di due corsi contigui, non sempre "paralleli", ma con differenze economiche sostanziali. Ciò può valere anche all'interno della medesima destinazione d'uso ma in diverse filiere. Ne deriva un'ulteriore necessità di ragionamento: la ricerca del punto di contatto fra i "due mondi alimentari" rappresentato dai centri di stoccaggio che si trovano nella posizione delicata e focale di cerniera fra la produzione agricola primaria e la trasformazione industriale con la necessità di gestire ciò che arriva dal campo con le successive esigenze dell'industria. Fondamentale è pertanto la necessità di poter segregare i quantitativi di prodotto in entrata nei centri formando partite omogenee non solo per caratteristiche qualitative e tecnologiche ma anche - in certi anni e situazioni - per livello di contaminanti. Da qui, l'importanza di tentare di definire, partendo dall'esistente, controlli in accettazione efficaci e realisticamente praticabili in luoghi che, in fase di afflusso dei raccolti, hanno oggettive caratteristiche di complessità logistica e concitazione operativa.

INNOVAZIONI AGRONOMICHE E GESTIONE EFFICIENTE DEL FRUMENTO DURO (*TRITICUM DURUM* DESF.) PER LA SALVAGUARDIA E LA VALORIZZAZIONE DELLA FILIERA ITALIANA

Pisante M., Perilli P., Stagnari F.

Centro di Ricerca e Formazione in Agronomia e Produzioni Vegetali, Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università degli Studi, Teramo

Il frumento duro è il sistema colturale rappresentativo dell'agricoltura italiana e caposaldo dell'industria molitoria e pastaia, una delle primarie filiere agroalimentari *made in Italy*. Il comparto produttivo, pur occupando un ruolo importante nel panorama mondiale, ha fatto registrare in Italia una contrazione di circa il 30% delle superfici - da 1,6 mln di ettari del 2003 a 1,1 nel 2008 - indotta dalle avverse condizioni climatiche ma anche dall'eccessiva volatilità e riduzione dei prezzi a fronte di un rapido incremento dei costi di produzione. Malgrado questi effetti congiunturali, in alcuni areali produttivi ed in particolare le aree interne di media e alta collina, il frumento duro rappresenta la scelta colturale principale ed insostituibile. Tuttavia, per salvaguardare e valorizzare l'intera filiera occorre revisionare per ogni agroambiente appropriati sistemi integrati di gestione agronomica per raggiungere ed incrementare le rese produttive e nel contempo migliorare i parametri qualitativi, tecnologici e igienico sanitari, mentre l'industria di trasformazione dovrà innanzitutto impegnarsi a riconoscere una congrua premialità economica, da attribuire per lotti quantitativi minimi omogenei, con certificazione di origine geografica delle produzioni. Ma il vero cambiamento potrà realizzarsi solo allorché saranno concretamente differenziate le materie prime nazionali da quelle di importazione estera, per le potenziali e scongiurabili minacce di carattere igienico sanitario che potrebbero riversarsi sull'intera filiera italiana. Sulla base di queste fondamentali considerazioni, risulta evidente l'importanza che riveste l'integrazione delle pratiche agronomiche consolidate per i cerealicoltori (gestione del suolo, fertilizzazione azotata, controllo e gestione della flora infestante) con altre innovazioni per il monitoraggio, la diagnosi e le pratiche di difesa della vegetazione, necessarie per prevenire e contrastare problematiche derivanti da condizioni microclimatiche atipiche, sempre più frequenti negli ultimi anni, che possono determinare perdite di produzione e per diversi areali produttivi, in condizioni particolarmente predisponenti, anche il superamento dei limiti di alcuni contaminanti la granello di origine fungina, tali da impedirne la commercializzazione.

VALUTAZIONE COMPARATIVA DELL'INCIDENZA DI MICOTOSSINE FRA LE PRATICHE DI PRODUZIONE DI MAIS CONVENZIONALE, BIOLOGICO E BIOTECNOLOGICO

De Santis B., Brera C., Debegnach F., Pannunzi E., Gregori E., Berdini C., Miraglia M.
*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di
Sanità, Roma*

La prevenzione nella fase di campo è uno dei metodi per combattere la contaminazione da micotossine e gli operatori della filiera cerealicola vengono costantemente incoraggiati ad adottare buone pratiche per prevenire e ridurre la contaminazione da micotossine anche attraverso strumenti legislativi come la Raccomandazione della Commissione 2006/583/CE sul controllo e la gestione della contaminazione da *Fusarium* tossine nei cereali.

La scelta della varietà/ibrido più adatto alla natura del suolo, alle condizioni climatiche e alle pratiche agricole correnti può contribuire a ridurre o a proteggere il raccolto contro infezioni fungine. In questo contesto si colloca uno degli obiettivi del Progetto Europeo *Safefoods - Promoting Food Safety Through a New Integrated Risk Analysis Approach for Foods* (EU, 6 FP) in quanto si è proposto di verificare, attraverso uno studio comparativo, la risposta alla contaminazione da micotossine del mais coltivato ad agricoltura convenzionale, biologica e con l'uso di ibridi GM. I campi sperimentali a disposizione del progetto erano localizzati in diverse Regioni della Germania e a Landriano (PV) in Italia. Sul mais campionato nei diversi areali sperimentali sono state analizzate: Aflatossine (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂), Ocratossina A (OTA), Zearalenone (ZEA) e Fumonisin B₁ (FB₁) con una metodica multimicotossina (AOZF) in HPLC-FL; il Deossinivalenolo (DON) è stato analizzato in HPLC-UV.

L'andamento della contaminazione da micotossine del mais GM-Isogenico è stato seguito per i tre anni del Progetto (2004-2006) in Germania e per un anno (2005) in Italia. Il confronto fra la coltivazione biologica e quella convenzionale è stato realizzato sui raccolti degli anni 2004-2005 provenienti dalla Germania.

La valutazione comparativa della contaminazione da micotossine fra le diverse pratiche agricole, è stata condotta attraverso l'analisi statistica (*Analysis Multiple Correspondence Analysis, MCA e Cluster Analysis*) dei dati provenienti dalle 600 analisi effettuate. A tal fine sono stati generati due gruppi di dati: Database 1, dati raggruppati per il confronto fra la produzione agricola biologica e convenzionale; Database 2, dati raggruppati per il confronto fra la produzione di mais di varietà GM e l'isogenico corrispondente.

LA PREVENZIONE DEL RISCHIO MICOTOSSINE E IL CONTROLLO PER SICUREZZA ALIMENTARE DA PARTE DELLE IMPRESE ATTIVE NEL COMMERCIO AGRICOLO DI CEREALI

Babuscio T. (a), Picardat S. (b), Ticchiati V. (c), Segard M. (a)

(a) Comité du Commerce des Céréales, Aliments du Bétail, Oléagineux, Huile d'Olive, Huiles et Graisses et Agrofournitures, COCERAL, Bruxelles, Belgium

(b) Federation du Negoce Agricole, FNA, Paris, France

(c) Federazione Nazionale Commercianti di Prodotti per l'Agricoltura, COMPAG, Bologna

La ricerca agronomica contribuisce all'identificazione dei principali fattori che permettono di prevenire lo sviluppo delle fusariosi e, al contempo, di limitarne l'incidenza sui cereali grazie alla gestione integrata delle culture. Tali fattori chiave si concretizzano nella presenza di residui contaminati provenienti dalla raccolta precedente, nella scelta delle varietà resistenti alla fusariosi, nella rotazione delle culture e nel trattamento per mezzo di fungicidi adeguati. Ciononostante nessun metodo, se utilizzato da solo, può garantire l'immunità dalle fonti produttrici di micotossine: per questa ragione, un ampio ventaglio di ipotesi scientifiche è, oggi, disponibile al fine di modificare le tecniche di coltivazione e di condurre esperimenti sul campo. In tale quadro si inseriscono due ambiziosi progetti di ricerca attualmente in corso in Francia e nel Regno Unito.

Situantesi a monte e a valle delle imprese agricole, le imprese del commercio operanti nel settore dei cereali non solo consigliano gli agricoltori sulle tecniche ma propongono agli stessi l'utilizzazione di alcuni prodotti (dalle sementi ai prodotti fitofarmaceutici) modellati al fine di limitare lo sviluppo delle fusariosi e diffondendo, al tempo stesso, i risultati della ricerca scientifica. Grazie allo stretto legame con gli istituti di ricerca pubblici e privati, con le imprese produttrici di sementi e con le case fitofarmaceutiche, le imprese del commercio cerealicolo incoraggiano l'utilizzo delle buone pratiche agricole da parte degli imprenditori del settore al fine di prevenire il rischio sanitario ed il relativo costo economico a carico delle imprese agricole e di tutta la filiera; inoltre, nello stesso contesto, gli operatori del commercio impegnano le proprie responsabilità tecniche e commerciali *vis-a-vis* degli agricoltori, commercializzando, in seguito, le rispettive produzioni verso gli sbocchi industriali. Quindi, con il fine di garantirne la sicurezza fitosanitaria, le imprese del commercio controllano regolarmente il livello di contaminazione in micotossine riscontrabili nelle materie prime attraverso i protocolli standardizzati sul campionamento e le analisi rapide qualora esistenti. Qualora gli strumenti tecnici necessari all'applicazione della regolamentazione non siano disponibili, le imprese del commercio si rivolgono all'associazione di categoria affinché essa partecipi ai lavori di standardizzazione in seno al CEN ed ottenere, così, delle norme comuni all'interno dell'Unione europea che possano, nel contempo, facilitare il commercio intracomunitario.

In tale contesto, il sondaggio lanciato dal COCERAL, l'associazione che rappresenta, a livello europeo, le imprese del commercio nel settore dei cereali e oleaginosi, ai suoi propri

membri ha mostrato i dati seguenti: il 61% degli operatori oggetto di un controllo ufficiale hanno subito sanzioni. Tra loro, il 65% ha dovuto forzatamente ritirare e riprendere i beni già consegnati. Invece, nel caso di un controllo interno oppure nel caso di un reclamo da parte del cliente, soltanto il 2% degli operatori ha dovuto richiamare la propria merce. In entrambe le ipotesi, molto spesso, i costi non sono coperti dalle assicurazioni (86%). Sembra, inoltre, evidente che la differenza nei metodi di analisi e delle modalità di campionamento rappresenta una fonte d'incertezza ulteriore per gli operatori.

PIANO NAZIONALE ALIMENTAZIONE ANIMALE (PLURIENNALE) ANNO 2009-2011: CRITERI E STRATEGIE

Ferri G.

*Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e Sicurezza degli Alimenti,
Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario, Ministero del Lavoro,
della Salute e delle Politiche Sociali, Roma*

Il Ministero del Lavoro della Salute e delle Politiche Sociali, e nello specifico la Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario, emana ogni anno il Piano Nazionale di Sorveglianza e di Vigilanza Sanitaria sull'Alimentazione degli Animali; alla stesura collaborano gli Istituti Zooprofilattici Sperimentale in qualità di Laboratori Nazionali di Riferimento, e ovviamente l'Istituto Superiore di Sanità per quanto di competenza nel settore dei "contaminanti e sostanze indesiderabili" e quindi per le Micotossine per le quali è anche il Centro di Referenza Nazionale. Nell'anno 2009, il PNAA ha assunto valenza triennale, valido quindi per gli anni 2009, 2010 e 2011: esso si presenta suddiviso in tre sezioni principali: una parte generale descrittiva, una parte tecnica applicativa, una parte terza che raccoglie la modulistica le informazioni e gli approfondimenti di carattere pratico. Con la pubblicazione del Piano pluriennale vengono emanate disposizioni coerenti e complete per armonizzare l'organizzazione generale dei controlli ufficiali dei mangimi a livello territoriale, nonché le procedure e le azioni da intraprendere in caso di non conformità. L'obiettivo fondamentale del nuovo PNAA (2009-2011) è di assicurare, in accordo a quanto già stabilito dal Regolamento CE n. 178/2002 e dal Regolamento CE n. 882/2004, un sistema ufficiale di controllo dei mangimi lungo l'intera filiera alimentare al fine di garantire un elevato livello di protezione della salute umana, animale e dell'ambiente. In particolare, il Regolamento CE n. 882/2004 prevede che i controlli siano effettuati periodicamente, con frequenza appropriata, in base alla valutazione dei rischi tenendo conto della specie animale di destinazione del mangime, del numero e della tipologia delle aziende del settore dei mangimi, delle caratteristiche e dell'uso del mangime o di qualsiasi attività di trasformazione e/o operazione che possa influire sulla sicurezza dei mangimi. La programmazione dei controlli ufficiali nella filiera alimentare animale si basa essenzialmente su un'attività di sorveglianza, e un'attività di vigilanza per consentire la valutazione e l'evoluzione dei fenomeni per la successiva riprogrammazione dei controlli ufficiali. I programmi di sorveglianza e vigilanza, sono stati predisposti sulla base dei criteri suddetti dall'ex Ministero della Salute in collaborazione con i Centri di Referenza Nazionali ed i Laboratori Nazionali di Riferimento. I vari Centri di Referenza Nazionali ed i Laboratori Nazionali di Riferimento coordinano, le attività analitiche, gestionali ed avviano idonei circuiti interlaboratorio tra gli I.ZZ.SS. relative alle materie di propria competenza, utili per armonizzare le procedure e le prove di laboratorio.

RECENTI SVILUPPI DELLA NORMATIVA NAZIONALE E COMUNITARIA IN MATERIA DI MICOTOSSINE

Cecere E., Califano G.

Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, Roma

La normativa comunitaria fissa, con il Regolamento CE n. 1881/2006, i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari, stabilisce con il Regolamento CE n. 401/2006 i metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari, che variano con la matrice ed il contaminante, e definisce specifiche Raccomandazioni per prevenire e ridurre le contaminazioni attraverso l'applicazione di Buone Pratiche di coltivazione e/o di produzione. Partecipano al processo decisionale, insieme alla Commissione Europea, i 27 Paesi Membri dell'Unione europea, basandosi sulle valutazioni del rischio espresse dall'EFSA (*European Food Safety Authority*).

La Commissione Europea, inoltre, sostiene annualmente un confronto tecnico e gestionale con i Paesi extraeuropei nell'ambito del *Codex Committee on Contaminants in Foods* (CCCF), che si avvale delle valutazioni tossicologiche del JECFA. A tal riguardo, è necessario sottolineare l'accresciuta influenza delle decisioni Codex sulla normativa comunitaria a cui l'Unione Europea aderisce.

La normativa sulle micotossine è quindi materia in continua evoluzione sia per le nuove conoscenze scientifiche che per le ripercussioni che le misure adottate determinano negli scambi commerciali, anche con i Paesi terzi importanti produttori di materie prime.

La maggior parte dei limiti sono armonizzati e quanto ancora rimasto nazionale sta per essere progressivamente assorbito nel diritto comunitario. In particolare è in trattazione a livello nazionale la revisione dei tenori massimi nazionali di Ocratossina A nel cacao e nei prodotti a base di cacao. Le linee di attività del gruppo Esperti Contaminanti Agricoli del Comitato per la Sicurezza alimentare e la salute animale presso la D.G. SANCO riguardano tutti gli aspetti normativi sopraindicati. In particolare le novità, già avanti nella trattazione, consistono nei punti di seguito elencati:

- proposta di modifica del Regolamento CE n. 1881/2006 per quanto riguarda i tenori massimi di Aflatossine in mandorle, pistacchi, nocciole, per allinearli ai livelli Codex e in riso, semi oleaginosi e noci del Brasile;
- proposta di modifica del Regolamento CE n. 1881/2006 per quanto riguarda i tenori di Ocratossina A (OTA) nelle spezie e nella liquirizia, in base al parere EFSA del 2006 sull'OTA negli alimenti. Ancora in discussione i limiti di OTA per frutta secca diversa dalle uve secche, cacao, per prodotti a base di carne, per vini liquorosi e birra;
- proposta di modifica del Regolamento CE n. 401/2006 per quanto concerne gli aspetti di campionamento (peso dei campioni e il numero di campioni di laboratorio nel caso delle arachidi, della frutta a guscio e semi oleaginosi) per la ricerca delle Aflatossine;
- per i controlli ufficiali, proposta di un nuovo Regolamento a sostituzione dell'attuale Decisione della Commissione n. 2006/504/CE e che, tra l'altro, aggiorna la frequenza dei controlli all'importazione per i prodotti alimentari contenuti nella Decisione stessa.

QUADRO NORMATIVO ED ANDAMENTO DEI CONTROLLI IN ITALIA PER GLI ANNI 2005-2008

Cicero C.

*Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e Sicurezza degli Alimenti,
Direzione Generale della Sanità Animale e del Farmaco Veterinario, Ministero del Lavoro,
della Salute e delle Politiche Sociali, Roma*

La presenza delle micotossine nei mangimi è ormai considerato un problema sanitario che ha assunto negli ultimi anni una importanza di assoluto rilievo nei Paesi della Comunità Europea e anche in Italia.

Nella maggior parte dei casi l'Aflatossina B₁ è quella presente in maggior quantità, e sulla quale hanno focalizzato l'interesse i vari 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 dannosi sull'uomo.

Tuttavia negli ultimi anni si è posta l'attenzione anche sulle altre micotossine, i cui studi hanno evidenziato effetti negativi sugli animali e sull'uomo, non meno importanti dell'Aflatossina B₁, vedi ad esempio l'Aflatossina M₁ e M₂, l'Ocratossina A e B, lo Zearalenone, il DON e le Fumonisine.

Su richiesta della Commissione l'EFSA ha espresso una serie di pareri le cui conclusioni affermano che le micotossine (l'Ocratossina A e B, lo Zearalenone, il DON, le Fumonisine) hanno effetti tossici per varie specie animali.

La Commissione quindi ha emanato la Raccomandazione del 17 agosto 2006 nella quale sono indicati "valori di riferimento" per la presenza di DON, Zearalenone, Ocratossina A, Tossine T-2 2 HT-2 e Fumonisine in prodotti destinati all'alimentazione animale. La Raccomandazione pone un impegno agli SSMM e agli Operatori del settore dei mangimi ad aumentare e potenziare il controllo della presenza del DON, Zearalenone, Ocratossina A, Tossine T-2 2 HT-2 e Fumonisine B₁ e B₂ nei cereali destinati agli animali, con una attenzione particolare per la presenza delle micotossine nei sottoprodotti o nei prodotti secondari destinati all'alimentazione animale.

Si sottolinea infine che per quanto attiene i controlli ufficiali la Commissione ha emanato il Regolamento CE n. 152/2009 "che fissa i metodi di campionamento ufficiali degli alimenti per animali" e che in relazione alla concreta applicazione di tale Regolamento, a livello Nazionale, il Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali ha pubblicato in data 2 luglio 2009 le "linee guida" applicative alla cui stesura hanno partecipato:

- Laboratorio Nazionale di Riferimento per gli Additivi nei mangimi (CReAA-ISS);
- Laboratorio Nazionale di Riferimento per le Micotossine negli alimenti e mangimi (ISS);
- Laboratorio Nazionale di Riferimento per Diossine (PCDD/PCDF) e Policlorobifenili (PCB) in mangimi e alimenti destinati per uso umano (IZS Abruzzo e Molise).

POSSIBILITÀ DI CONTROLLO BIOLOGICO DELLE INFEZIONI DA *FUSARIUM* DEL MAIS ED EFFETTO SULLA CONTAMINAZIONE DA *FUSARIUM* TOSSINE

Causin R., Rasera R.

Sezione di Patologia Vegetale, Gruppo di Lavoro Micotossine, GLM, Dipartimento Territorio e Servizi Agro-Forestali, Facoltà di Agraria, Università degli Studi, Padova

In quantitativi non trascurabili della granella di mais prodotta nella Pianura Padana la contaminazione da *Fusarium* tossine raggiunge livelli che ne rendono difficoltosa l'utilizzazione per l'alimentazione umana e per alcuni impieghi zootecnici. La corretta applicazione delle Buone Pratiche Agricole (BPA), comprendenti anche una efficace lotta contro la piralide, rappresenta il primo e irrinunciabile intervento da attuare per contenere l'accumulo di queste micotossine. Tuttavia, in aree o annate in cui la pressione di malattia è molto forte o l'applicazione delle BPA viene impedita da fattori contingenti, la riduzione delle contaminazioni così ottenuta può non essere sufficiente. In questi casi, l'integrazione tra una corretta agrotecnica e interventi di controllo diretto delle infezioni da *Fusaria*, effettuati con mezzi chimici e/o biologici, può contribuire ad innalzare e rendere più stabile l'effetto positivo derivante dall'adozione delle BPA. La possibilità di utilizzare a questo scopo prodotti fitosanitari appartenenti alla categoria degli inibitori della sintesi dell'ergosterolo, è già stata dimostrata; in prove di campo realizzate nel 2008 in aree con alta pressione di malattia (provincia di Rovigo), la distribuzione di miscele di azoli in coincidenza con la fioritura femminile, ha consentito abbattimenti del tenore di Fumonisine variabili tra il 60% e il 90%. L'uso di mezzi chimici, però, comporta rischi e difficoltà che, seppur perfettamente tollerabili e gestibili, vanno comunque ridotti il più possibile. In questo ambito risultano molto interessanti le possibilità offerte dalla lotta biologica. L'impiego di Agenti di Biocontrollo (BCA), caratterizzato da basso rischio sia per l'ambiente, sia per la selezione di ceppi resistenti di patogeni, risulta particolarmente vantaggioso poiché i BCA possono agire sia abbassando il potenziale d'inoculo del patogeno, sia inducendo nell'ospite una resistenza traslocabile. Le potenzialità del controllo biologico nel contenere lo sviluppo dei *Fusaria* tossigeni nel mais sono state saggiate nel corso di un quadriennio di prove, con risultati in gran parte positivi ed incoraggianti. Diversi BCA, usati sia in trattamenti al seme, come induttori di resistenza, sia come antagonisti distribuiti alla fioritura femminile, hanno evidenziato, pur con differenze in relazione ad anno, località, tipo di BCA e strategia d'uso, riduzioni fino all'84% della colonizzazione da *F. verticillioides* e fino al 72% della contaminazione da Fumonisine.

CONTROLLO UFFICIALE DELLE MICOTOSSINE IN DERRATE ALIMENTARI DI PROVENIENZA EXTRAEUROPEA IN INGRESSO DAL PORTO DI RAVENNA

Ferrari M. (a), Guerrini A. (a), Verna D. (a), Scaroni I. (a), Strocchi V. (a), Calò L. (b),
Buonaiuto M. (b), Marrali G. (b), Patricelli R. (b), Perfetti R. (b)

(a) ARPA Emilia-Romagna, Ravenna

(b) Unità Territoriale di Ravenna, USMAF Bologna, Ravenna

Il porto di Ravenna è uno dei tredici punti di ingresso, presenti in Italia, per l'importazione sul territorio nazionale e comunitario di alimenti e mangimi provenienti da Paesi extraeuropei. L'Ufficio di Sanità Marittima, Aerea e di Frontiera (USMAF) di Bologna, Unità territoriale di Ravenna, esercita nell'ambito portuale ed aeroportuale funzioni di vigilanza sanitaria su passeggeri e merci di origine extra-europea. I laboratori di ARPA Emilia-Romagna operano a livello regionale per l'esecuzione di analisi finalizzate al controllo ufficiale di alimenti e bevande di origine vegetale. Attraverso il porto di Ravenna transitano prodotti alimentari di diversa natura, i principali sono: semi oleaginosi, frutta secca, spezie, cereali, frutta e verdura fresca, oli e grassi vegetali, prodotti trasformati. Su queste tipologie di derrate i parametri chimici più frequentemente ricercati sono: micotossine, residui di fitofarmaci, metalli pesanti, additivi e caratteristiche di composizione. In questo lavoro viene esaminato il flusso di alimenti potenzialmente soggetti a contaminazione da micotossine, provenienti da Paesi extraeuropei, negli anni 2001-08, prelevati da personale USMAF secondo le procedure definite dal Regolamento 401/2006/CE e conferiti ad ARPA Sezione Provinciale di Ravenna. Il laboratorio ARPA è dotato di due tipologie di apparecchiature in grado di processare fino a 10-30 kg di prodotto garantendo un elevato grado di omogeneizzazione: un mulino a coltelli per la macinazione a secco e un mixer verticale con testa disintegrante ad immersione per la macinazione a umido. La determinazione delle Aflatossine viene effettuata secondo quanto previsto dal metodo AOAC 999.07, soggetto ad accreditamento Sinal e ISS. Nel periodo considerato si è evidenziato un elevato rischio di contaminazione da Aflatossine in arachidi, nocciole, pistacchi e fichi secchi. Si sono osservate variazioni nei flussi delle diverse tipologie di merce. A partire dal 2002, in seguito all'applicazione delle direttive comunitarie per l'esecuzione delle attività di campionamento, si è registrato un aumento delle partite di merce non conformi e un aumento dei livelli di contaminazione. La percentuale di non conformità nelle arachidi è passata dall'1% nel 2001-02 fino al 20% nel 2006-08; dal 2005 i livelli massimi di AFB₁ nei campioni positivi sono aumentati da 10 a oltre 30 µg/kg. I campioni di nocciole risultano meno affetti da contaminazione, tuttavia a partire dal 2006 la percentuale di non conformità è aumentata dal 5 al 10%. Infine le concentrazioni di Aflatossine determinate nei tre campioni di laboratorio, appartenenti al medesimo campione globale, prelevato da una partita di merce contaminata presentano un'elevata variabilità. I dati osservati confermano le criticità legate all'eterogeneità della contaminazione da Aflatossine e il pesante impatto della fase di campionamento sul risultato analitico finale.

LA RICERCA ITALIANA ED EUROPEA PER LA GESTIONE DEL RISCHIO NELLA FILIERA AGRO-ALIMENTARE

Piva G. (a), Battilani P. (b), Pietri A. (a)

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

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

Si prevede che la popolazione mondiale nel 2050 aumenterà di 2,5 miliardi di persone. Per ridurre il problema della fame nel mondo, che affligge oltre un miliardo di persone, e per far fronte all'aumento della domanda in termini quantitativi e qualitativi, sarà necessario raddoppiare la produzione di alimenti. I previsti cambiamenti climatici possono indubbiamente modificare le previsioni e le modalità operative, soprattutto alla luce degli effetti che questi potranno avere anche sulla contaminazione da micotossine. A partire dagli anni sessanta, la presa di coscienza che le micotossine erano una fonte di pericolo per l'uomo e gli animali, ha stimolato in tutto il mondo una serie di ricerche ed ha indotto i governi di moltissimi paesi a fissare dei limiti massimi di presenza per le diverse materie prime e prodotti derivati. Per definire i criteri e le modalità per la valutazione del rischio, preso atto che si stima non esista un livello di *no effect* per le micotossine, sono state sviluppate ricerche finalizzate a:

- migliorare i metodi di analisi in termini di precisione, velocità e costi;
- identificare gli alimenti a maggior rischio e definire gli areali a maggiore suscettibilità;
- sviluppare procedure agronomiche che riducano il rischio di contaminazione sia nella fase di coltivazione che in quella di raccolta e post-raccolta;
- predisporre modelli previsionali a supporto della gestione dell'intera filiera;
- ridurre la biodisponibilità delle micotossine;
- aumentare la resistenza degli animali al danno biologico da micotossine;
- verificare le problematiche di *carry-over* e dei fattori che ne influenzano la variabilità;
- approfondire gli effetti della co-presenza di varie micotossine;
- definire la rilevanza delle micotossine "nascoste";
- mettere a punto trattamenti fisici ed eventualmente chimici per decontaminare/detossificare alimenti contaminati.

Alcuni esempi desunti da risultati di recenti ricerche possono essere particolarmente esplicativi, al fine di fornire elementi per la gestione del rischio delle filiere produttive.

PROGETTO INTERREGIONALE MICOCER: "VALUTAZIONE E CONTROLLO DELLA CONTAMINAZIONE DA MICOTOSSINE NELLE PRODUZIONI CEREALICOLE NAZIONALI"

D'Egidio M.G.

Unità di Ricerca per la Valorizzazione Qualitativa dei Cereali, CRA-QCE, Roma

Attualmente l'attenzione dei consumatori è sempre più orientata sia verso gli aspetti nutrizionali-salutistici che verso quelli legati alla sicurezza d'uso degli alimenti. I cereali rappresentano una fonte privilegiata di nutrienti e la sicurezza d'uso della materia prima costituisce un elemento imprescindibile della qualità. Tra i principali contaminanti delle colture cerealicole rivestono un ruolo di particolare importanza le micotossine, prodotti tossici del metabolismo secondario di alcuni funghi fitopatogeni.

Gli obiettivi del progetto MICOCER hanno riguardato la rilevazione di Deossinivalenolo nel frumento duro (*Triticum durum* desf.) e nel frumento tenero (*Triticum aestivum* L.), Deossinivalenolo, Zearalenone, Aflatossine e Fumonisine nel mais (*Zea mays* L.). La valutazione del grado di contaminazione delle produzioni cerealicole nazionali è stata effettuata attraverso l'individuazione di una rete rappresentativa di ambienti, condizioni colturali e di conservazione del prodotto. Altri obiettivi importanti hanno riguardato l'ottenimento di produzioni di mais e di frumenti a ridotto contenuto di composti tossici attraverso la definizione di percorsi produttivi efficaci e corretti, dal campo alla prima utilizzazione, e la creazione di una banca dati utilizzabile ai fini della prevenzione e della gestione del rischio di contaminazione.

PROGETTO INTERREGIONALE MICOCER: "MONITORAGGIO DEI LIVELLI DI DEOSSINIVALENOLO NELLA GRANELLA DI FRUMENTO DURO (*TRITICUM DURUM* DESF.)"

Aureli G. (a), Belocchi A. (a), Pascale M. (b), Amoriello T. (c), D'Egidio M.G. (a), Desiderio E. (a)
(a) *Unità di Ricerca per la Valorizzazione Qualitativa dei Cereali, CRA-QCE, Roma*
(b) *Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, ISPA, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari*
(c) *Direzione Centrale Attività Scientifica, Servizio Trasferimento e Innovazione, CRA, Roma*

La coltivazione del frumento duro, in Italia riveste un ruolo di primario interesse in quanto fornisce la materia prima all'industria di trasformazione per la produzione della pasta. L'area di coltivazione di questo tipo di cereale, tradizionalmente diffusa in particolare nel Meridione si è estesa negli ultimi anni anche in alcune zone del Centro-Nord dove le condizioni agro-climatiche consentono il raggiungimento di elevati livelli produttivi. Fra gli aspetti qualitativi del frumento duro assumono una particolare importanza le caratteristiche igienico-sanitarie del prodotto in merito alla presenza ed alla diffusione di metaboliti tossici come, ad esempio, le micotossine di origine fungina. Fra queste ultime il Deossinivalenolo (DON), prodotto da alcune specie di funghi del genere *Fusarium*, è la micotossina di più frequente riscontro nel frumento. Nell'ambito del Progetto MICOCER è stata svolta un'attività di monitoraggio a livello nazionale sui livelli di contaminazione da DON nel triennio 2006-2008. Tale azione ha riguardato sia aziende agricole e centri di stoccaggio (1.087 campioni) sia campi sperimentali (1.643 campioni). In particolare, il monitoraggio presso le aziende agricole ha fornito un quadro aderente alla realtà agricola nazionale, mentre quello relativo ai campi sperimentali appartenenti alla Rete di confronto varietale frumento duro ha permesso di effettuare un confronto dei dati, a parità di condizioni agronomiche applicate, sulla base delle tre principali variabili: anno di coltivazione, località e varietà. La scelta del metodo immunoenzimatico per l'analisi del DON ha tenuto conto, fra l'altro, dell'utilità di individuare i campioni positivi non solo per la presenza della micotossina stessa ma anche di composti ad essa correlati (es.: precursori acetilati, Nivalenolo, Fusarenone, ecc.) verso i quali è nota la caratteristica di cross-reattività del metodo. I livelli di DON determinati con metodo ELISA sono stati verificati anche per HPLC. Sulla base dei risultati ottenuti è possibile evidenziare la forte influenza soprattutto dell'ambiente di coltivazione e dell'andamento climatico. Sebbene vi sia, in generale, un diverso andamento nel grado di incidenza nell'accumulo di DON procedendo dalle zone del Nord verso quelle del Sud, dove i valori di DON in sono pressoché trascurabili, la valutazione del rischio di contaminazione deve tener conto soprattutto dell'ambiente inteso come microareale e cioè delle caratteristiche pedo-climatiche proprie delle singole zone di coltivazione. La scelta varietale, in funzione non solo delle caratteristiche agronomiche ma anche dell'adattabilità all'ambiente di coltivazione, rimane uno degli aspetti più importanti al fine di ottenere una materia prima con caratteristiche di elevata qualità.

PERCORSI PRODUTTIVI PER PREVENIRE LA CONTAMINAZIONE DA DEOSSINIVALENOLO NEL FRUMENTO TENERO

Blandino M. (a), Vanara F. (a), Reyneri A. (a), Pascale M. (b), Haidukowski M. (b), Corbellini M. (c), Scudellari D. (d)

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

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

(c) *CRA-SCV, S. Angelo Lodigiano, Lodi*

(d) *Filiera Grandi Colture e Sementi, CRPV, Imola, Bologna*

La fusariosi della spiga (FHB - *Fusarium Head Blight*) è una delle principali malattie del frumento; essa è causa di perdite produttive e soprattutto qualitative a seguito della contaminazione da Deossinivalenolo (DON). In questo contributo vengono presentati i risultati dell'applicazione di percorsi produttivi per il contenimento della contaminazione da DON nel frumento tenero. I dati riportati fanno parte del più ampio progetto interregionale MICOCER coordinato dal CRA-QCE, volto ad individuare le migliori strategie di prevenzione e controllo della contaminazione da micotossine nei cereali.

Dal 2005 al 2008 sono stati realizzati 4 campi sperimentali per il frumento tenero in Nord e Centro Italia, nelle località di Riva presso Chieri (TO), Imola (BO), San Angelo Lodigiano (LO) e Jesi (AN). In ogni località ed anno sono stati messi a confronto 2 *cultivar* a diversa suscettibilità (sensibile vs mediamente resistente), 2 gestioni dei residui (interramento a seguito dell'aratura vs presenza in superficie a seguito di minima lavorazione o semina su sodo) e 4 trattamenti fungicidi alla spigatura (testimone non trattato, impiego di principi attivi diversi: miscela di Prochloraz+Epossiconazolo, Metconazolo, miscela di Prochloraz+Epossiconazolo+Azoxytrobina). Per tutti i trattamenti a confronto si è proceduto a rilevare alla maturazione cerosa l'incidenza e la severità della fusariosi della spiga, utilizzando la scala di Parry (1995) e, alla raccolta, la produzione, il peso ettolitrico e il peso dei mille semi. I campioni di granella di ogni parcella sono stati analizzati per il contenuto in DON mediante analisi con metodica immunoenzimatica (test ELISA) e confrontati con analisi sul coacervo della singola ripetizione con metodica HPLC.

Un chiaro vantaggio produttivo è stato evidenziato con l'aratura (+14%) rispetto alla semina su sodo e a seguito del trattamento fungicida (+13%). I sintomi da FHB sono stati ridotti dall'interramento dei residui colturali (-33%), dall'impiego di una varietà mediamente resistente (-55%) e dal trattamento fungicida (-73%). La contaminazione da DON è risultata chiaramente correlata con la severità della FHB. Un percorso agronomico attento (*cultivar* mediamente resistente, aratura e lotta diretta con fungicidi in spigatura) ha in media ridotto di oltre il 98% il contenuto in DON rispetto ad un percorso altamente rischioso (*cultivar* sensibile, semina su sodo, nessun trattamento fungicida).

PERCORSI PRODUTTIVI PER PREVENIRE LA CONTAMINAZIONE DA MICOTOSSINE NEL MAIS

Blandino M. (a), Vanara F. (a), Reyneri A. (a), Colombari G. (b), Pietri A. (c)

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

(b) *Ente Regionale per i Servizi all'Agricoltura e alle Foreste, ERSAF, Regione Lombardia, Mantova*

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

La presenza di micotossine nei cereali è oggi un rilevante problema economico e sanitario. Negli ambienti temperati il mais è la coltura che richiede il livello di attenzione maggiore, in quanto può essere contaminato da più metaboliti prodotti da specie tossigene diverse. I dati riportati fanno parte del più ampio progetto interregionale MICOCER coordinato dal CRA-QCE, volto ad individuare le migliori strategie di prevenzione e controllo della contaminazione da micotossine nei cereali.

Nel triennio 2005-2007 sono stati allestiti due campi sperimentale in Piemonte a Carmagnola (TO) e a Vigone (TO) e uno a Mantova (MN). In ogni località, secondo un protocollo comune sono stati confrontati i seguenti trattamenti: 2 ibridi a diversa precocità e 4 combinazioni di tecniche agronomiche (epoca semina, investimento colturale, concimazione N e trattamento alla piralide) messe in combinazione secondo questo schema: (PR) percorso ad alto rischio, con semine tardive e investimenti colturali e concimazioni N elevate; (PM) percorso a medio rischio, con semine ordinarie e investimenti colturali e concimazioni N elevati; (PC) percorso corretto, con semine tempestive, investimenti colturali ridotti e concimazioni equilibrate; (PA) percorso attento, caratterizzata dalle scelte agronomiche della PC e dal trattamento insetticida contro la piralide del mais.

La severità dell'attacco della piralide è risultata essere più elevata nelle semine tardive rispetto alla semina ordinaria. Il trattamento insetticida ha consentito una riduzione media della percentuale di piante attaccate dall'insetto del 55%. I percorsi PM e PC hanno evidenziato in media una riduzione del 60% della severità degli ammuffimenti della spiga rispetto al PR. L'applicazione del protocollo PA ha permesso di ridurre del 87% la severità dei marciumi della spiga rispetto al PR. È stata evidenziata una riduzione media della contaminazione da Fumonisine rispettivamente di 2, 3 e 7 volte per PM, PC e PA rispetto alla PR, che in tutti gli ambienti ed anni ha manifestato le più alte contaminazioni per questa micotossina. Un aumento significativo della contaminazione da Deossinivalenolo è stato osservato per entrambi gli ibridi solo con le semine tardive. Le Aflatossine sono state ritrovate solo nella località più calda e con l'ibrido più precoce, risultando favorite da stress idrici. I dati di questa sperimentazione sottolineano come l'applicazione di Buone Pratiche Agricole può condurre efficacemente a un buon controllo delle principali micotossine da *Fusarium*.

ESITI DI UN MONITORAGGIO QUINQUENNALE SULLA PRESENZA DI MICOTOSSINE NEI CEREALI DEL VENETO

Tealdo E. (a), Barcarolo R. (a), Gambetta S. (a), Causin R. (b), Rasera R. (b), Bonini Baraldi A. (c), Checchetto F. (c), Padoan M. (c)

(a) *Veneto Agricoltura, Istituto per la Qualità e le Tecnologie Agroalimentari, Vicenza*

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

(c) *Centro Meteorologico di Teolo, Unità Operativa di Agrobiometeorologia, Dipartimento Regionale per la Sicurezza del Territorio, Agenzia Regionale per la Prevenzione e Protezione Ambientale del Veneto, ARPAV, Pordenone*

Il crescente interesse verso le problematiche sulla sicurezza alimentare e la recente emanazione di norme che fissano limiti sui tenori di micotossine negli alimenti ha reso necessario investigare sull'entità di queste sostanze soprattutto in relazione alle infezioni dei cereali causate da funghi del genere *Fusarium*.

La Regione del Veneto, in cui si produce circa un terzo del mais nazionale, ha avviato nel 2004 un programma di monitoraggio per valutare la diffusione ed il livello di contaminazione da micotossine nei cereali e i fattori agronomici e agrometeorologici che possono avere maggior influenza sul fenomeno.

Nella presente relazione vengono riportati i risultati del monitoraggio quinquennale relativi alla diffusione delle micotossine (Aflatossina B₁, Fumonisine B₁ + B₂, Tricoteceni A e B, Zearalenone e Ocratossina A) nei cereali veneti. L'Aflatossina, pur essendo rilevabile in tutti gli anni d'indagine, ha raggiunto livelli di attenzione solo nelle annate più calde e asciutte; anche i Tricoteceni e lo Zearalenone sono stati rilevati solo sporadicamente ed ancor meno presente è risultata l'Ocratossina. Il mais veneto, invece, è risultato contaminato da Fumonisine, con una tendenza a crescere nel tempo e, sulla base delle citate normative, una parte importante di esso deve essere esclusa dall'impiego nell'alimentazione umana e da quella delle specie più sensibili come suini, conigli ed equini. I dati relativi alla contaminazione da Fumonisine sembrano poter essere messi in relazione all'andamento e alle diverse condizioni climatiche e ambientali della Regione; la possibilità che vi siano aree caratterizzate da un maggior rischio per la presenza di Fumonisine nel mais viene discussa.

IL GRUPPO DI LAVORO MICOTOSSINE (GLM) IN ITALIA ED IN EUROPA

Pizzolato G., Costa E.

Gruppo di Lavoro Micotossine, GLM, Bologna

La problematica della contaminazione da micotossine delle derrate alimentari risulta molto complessa da gestire poiché la stessa matrice di provenienza diversa può presentare livelli di contaminazione e micotossine differenti. Questo dipenderà, oltre che dalla applicazione di una corretta tecnica di produzione e conservazione, dalle caratteristiche dell'areale di produzione e dall'andamento climatico verificatosi durante il ciclo produttivo che potrebbero essere stati favorevoli allo sviluppo di un fungo micotossigeno piuttosto che ad un altro o a nessuno. Per poter gestire correttamente la problematica, non solo per tutelare la salute umana, obiettivo fondamentale della legislazione alimentare della Comunità Europea, ma anche per limitare gli effetti negativi che esse hanno sul comparto zootecnico è indispensabile effettuare un'analisi del rischio che parta dalla sua valutazione. Per questi motivi la Commissione contaminanti della Comunità Europea (DG-SANCO) promuove periodici incontri con esperti, operatori del settore, enti di ricerca, rappresentanti degli stati membri, con lo scopo di individuare e monitorare la presenza di micotossine nelle produzioni europee, valutarne l'effetto sulla salute umana ed animale e le possibilità di controllo stabilendo, per alcune di esse, livelli massimi di presenza. Il GLM, attivo dal 2003 e costituito ufficialmente il 24 aprile 2008, ha partecipato continuamente e attivamente agli incontri della Commissione contaminanti realizzando, attraverso i contributi degli associati, ricercatori di enti pubblici (Università, CRA, CNR, ISS) e tecnici di strutture che operano nel comparto cerealicolo, diversi documenti in cui non solo si sono sintetizzati i risultati ottenuti da piani di monitoraggio nazionale e regionale ma anche di ricerche volte a valutare l'effetto dell'applicazione di buone pratiche agricole e buone pratiche di produzione sulla contaminazione dei cereali. Ultimo intervento europeo del GLM è stato al Sesto *Fusarium* Forum, tenutosi a Bruxelles lo scorso febbraio, in cui si è discussa la possibilità di introdurre limiti per le tossine T-2 e HT-2 e si è verificato quale sia l'impatto sul settore cerealicolo dell'introduzione dei limiti e raccomandazioni sulla presenza delle *Fusarium* tossine. A livello nazionale, anche attraverso una rete strutturata di relazioni, sono stati organizzati numerosi incontri informativi e formativi volti a favorire un continuo aggiornamento degli operatori del settore alimentare, fondamentale al fine di gestire correttamente il rischio di contaminazione da micotossine, mettendo in atto opportune procedure. Tutti i documenti fin'ora realizzati sono disponibili all'indirizzo internet: www.glmicotossine.it.

LA DIAGNOSTICA DELLE MICOTOSSINE: OUTPUTS DI RECENTI PROGETTI EUROPEI E PROSPETTIVE FUTURE

Visconti A.

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

Il sistema di allarme rapido europeo (RASFF) vede le micotossine al primo posto tra i diversi contaminanti per numero di notifiche di superamento dei limiti massimi consentiti nelle derrate alimentari all'importazione. L'uso di metodi di analisi standardizzati e armonizzati per il controllo delle micotossine nei prodotti alimentari garantisce uniformità e affidabilità nella valutazione del rischio di esposizione a questi contaminanti naturali. La ricerca a livello europeo concentra notevoli sforzi in progetti dedicati allo sviluppo e validazione di metodiche analitiche per la determinazione di micotossine. Il CEN (Comitato Europeo di Normazione), sin dai primi anni '90, si occupa della standardizzazione dei metodi di analisi delle micotossine. Con il mandato M 383 la Commissione Europea ha recentemente incaricato il CEN di standardizzare 10 metodi per l'analisi di micotossine in alimenti, con particolare riferimento agli alimenti per l'infanzia. La *Food Standards Agency* (UK), autorità britannica di sicurezza alimentare che rappresenta l'Inghilterra nelle negoziazioni con la Commissione Europea, ha recentemente finanziato un progetto di ricerca che aveva come obiettivo lo sviluppo di metodi di analisi sensibili per la determinazione delle tossine T-2 e HT-2 nei cereali e nei prodotti processati. Attualmente c'è una crescente richiesta di metodiche di *screening* validate che siano non solo semplici, economiche e rapide, ma che consentano anche la determinazione simultanea di diversi contaminanti. Su questo particolare settore si è concentrata la ricerca Europea svolta nell'ambito di svariati progetti del sesto e settimo programma quadro in cui specifici *Work Packages* sono dedicati alle micotossine, con particolare attenzione alle tossine di *Fusarium*. Nel corso del progetto *BioCop* (FP6) è stato introdotto e sviluppato il concetto dell'analisi multiresiduale applicato alle metodiche rapide, ovvero della possibilità di rivelare più contaminanti in una singola analisi, utilizzando tecnologie innovative quali strip test, citometria a flusso, biosensori ottici ed elettrochimici. Il progetto CONFIDENCE (FP7) si propone invece di migliorare e soprattutto rendere applicabili le tecnologie sviluppate in *BioCop*. L'obiettivo primario del progetto è quello di fornire procedure semplificate di preparazione del campione e metodiche rapide validate per i cereali. Lo sviluppo di metodiche multiresiduali, basate sull'utilizzo della cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa, e la validazione di test rapidi sono previsti nelle attività del progetto *MycoRed* (FP7), che ha come obiettivo generale lo sviluppo di strategie per ridurre la contaminazione da micotossine nelle filiere alimentari. Un gruppo di lavoro sulle micotossine è operativo anche nella Rete di Eccellenza MoniQA (FP6) che si occupa dell'armonizzazione e standardizzazione di metodi analitici per il controllo degli alimenti. Anche in questo contesto particolare attenzione è rivolta alle metodiche rapide.

ANALISI DI FUMONISINE B₁ E B₂ IN FARINE DI MAIS MEDIANTE TECNICA HPLC/MS/MS E VALUTAZIONE DELLA LORO TOSSICITÀ SU *VIBRIO FISCHERI*

Bergamini C. (a), Romagnoli B. (a), Ferrari M. (a), Colacci A. (a), Silingardi P. (b), Morandi E. (b)

(a) *Riferimento Analitico Regionale, RAR, Alimenti, OGM e Biosicurezza, Sezione Provinciale di Bologna, ARPA Emilia-Romagna, Bologna*

(b) *Centro Tematico Regionale, CTR, Cancerogenesi Ambientale, Sezione Provinciale di Bologna, ARPA Emilia-Romagna, Bologna*

Il progetto MITICA (*Microarray e Proteomica: Tecnologie per l'Identificazione di Contaminanti negli Alimenti*) si focalizza sullo sviluppo di strumenti diagnostici innovativi per la rapida identificazione di classi di contaminanti chimici in matrici alimentari e si avvale del contributo scientifico di 5 unità operative, tra cui il CTR Cancerogenesi Ambientale, che coordina il progetto, ed il RAR Alimenti, OGM e Biosicurezza. Nell'ambito dell'attività scientifica è stata studiata la contaminazione da Fumonisine B₁ e B₂ nella matrice mais, valutando sia la loro presenza nelle farine mediante tecnica HPLC/MS/MS che il loro effetto tossico su *V. fischeri*. I campioni di farine di mais sono stati prelevati dalle AUSL della Regione Emilia-Romagna secondo la procedura del Regolamento CE n. 401/2006. Il 90% dei campioni di farine di mais, complessivamente circa 70, hanno presentato contaminazione da Fumonisine totali anche ad alti livelli, un 11% con valori compresi tra 1.000 e 2.000 µg/kg ed un altro 10% superava i 2.000 µg/kg.

Le Fumonisine sono state estratte, dalla farina di mais con un miscela di acqua/metanolo e il filtrato, diluito con PBS, è stato purificato su colonnine di immunoaffinità Fumoniprep® e l'eluato analizzato in HPLC/MS/MS mediante tecnica electrospray in ionizzazione positiva (ES⁺). Lo spettrometro di massa utilizzato è un triplo-quadrupolo Quattro Micro™ API (Waters, Milliford, MA, USA). I parametri di massa sono stati ottimizzati mediante infusione di una soluzione standard di una miscela di FB₁ e FB₂ alla concentrazione, di 1 µg/ in acetonitrile/acqua (50/50). Per quanto riguarda la FB₁ e FB₂, sono stati scelti rispettivamente i frammenti con m/z 334 e m/z 336, per la quantificazione, e m/z 352 e m/z 318, per la conferma. Il range di linearità è compreso tra: 10-500 ng/mL per FB₁ e 3-150 ng/mL per FB₂. LDR: 30 ng/g per FB₁ e 6 ng/g per FB₂. La percentuale di recupero R=98±2% per entrambe FB₁ e FB₂. Il metodo analitico viene periodicamente controllato mediante la partecipazione al FAPAS® *Proficiency Test* dal 2007.

La tossicità di FB₁ e FB₂ è stata valutata utilizzando il *Microtox toxicity test system* su *Vibrio fischeri* (ceppo NRRL B11177). Il trattamento simultaneo dei batteri luminescenti con FB₁ e FB₂ ha indotto un effetto sinergico significativo rispetto alla tossicità di ogni singola molecola. Abbiamo inoltre sviluppato una slide per lo studio dell'espressione genica di *V. fischeri*, proprietaria, e stiamo attualmente caratterizzando la risposta sinergica osservata a livello trascrizionale.

MIUR - FISR 2003. Contract no. 2982Ric.

SISTEMI DIAGNOSTICI INNOVATIVI PER LA RIVELAZIONE E QUANTIFICAZIONE DI MICOTOSSINE UTILIZZANDO PROTEINA *MICROARRAY* (PROGETTO Me.Di.T.A.)

Gatti M.
Neutron SpA, Modena

Il progetto Me.Di.T.A. ha ideato, progettato e realizzato originariamente sistemi diagnostici del tipo Proteina *Array* quantitativi in grado di determinare la presenza e la concentrazione di micotossine in matrici alimentari. Le micotossine verso le quali è stato sviluppato il sistema sono Aflatossina M₁, Aflatossine B/G Totali (B₁, B₂, G₁, G₂), Ocratossina A, Fumonisina B₁, Zearalenone, Tossine T-2 ed HT-2, Deossinivalenolo (DON/Vomitossina). Il sistema diagnostico è basato su un *microchip array* di tipo competitivo fissato su un supporto funzionalizzato (*slide*) di vetro su cui gli anticorpi specifici antitossina sono legati covalentemente mentre la rivelazione fluorimetrica è ottenuta grazie alla funzionalizzazione con coloranti reattivi alle lunghezze d'onda laser tipo ATTO 647. Il sistema ha dimostrato di rispondere ottimamente in termini di linearità di risposta, sensibilità ed accuratezza sfruttando soprattutto la molteplicità di rivelazione posizionale propria dei sistemi *array*.

SVILUPPO DI UN NUOVO SISTEMA IMMUNOELETTROCHIMICO PER LA DETERMINAZIONE DEL DEOSSINIVALENOLO

Romanazzo D., Vesco S., Volpe G., Ricci F., Moscone D., Palleschi G.

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università degli Studi Tor Vergata, Roma

Il Deossinivalenolo (DON) è una micotossina appartenente al gruppo B dei Tricoteceni. La sua presenza nei prodotti agricoli continua ad essere un problema mondiale a causa dell'azione tossica esercitata su microrganismi, piante, animali e umani. In questo lavoro si riporta lo sviluppo di un saggio immunomagnetico enzimatico di *screening* ELIME (*Enzyme Linked ImmunoMagnetic Electrochemical assay*) per la rivelazione del DON in matrici alimentari a base di cereali finalizzato ad elevare l'efficienza del classico metodo ELISA. A tale scopo l'immobilizzazione dei bioreagenti è eseguita su microsferi magnetiche (IMBs) accoppiate all'uso di elettrodi *screen printed* e a un potenziostato multicanale portatile (PalmSens). Il saggio immunomagnetico elettrochimico sfrutta la selettività degli anticorpi, la sensibilità della rivelazione elettrochimica, la maneggevolezza degli elettrodi *screen-printed* e la possibilità di concentrare le particelle magnetiche sulla superficie del trasduttore di segnale elettrochimico.

I risultati ottenuti hanno mostrato un limite di rivelabilità pari a 63 ng/ml e un intervallo di lavoro compreso tra 100 ng/ml e 4.500 ng/ml. L'analisi di campioni sperimentalmente e naturalmente contaminati, il cui trattamento non prevede alcuna procedura di purificazione, conferma l'efficacia del metodo come rapido *screening* per rivelare la presenza di DON in matrici alimentari a base di cereali destinate al consumo diretto.

Il costo, il tempo di analisi e la possibilità di eseguire analisi *in situ* fanno sì che gli immunosensori elettrochimici possano rappresentare un valido supporto ai metodi di analisi classici usati per la determinazione dei Tricoteceni.

Questo lavoro di ricerca si colloca nell'ambito di un Progetto Europeo Integrato denominato *BioCop*. Obiettivi del progetto sono lo studio e lo sviluppo di metodi innovativi analitici per la determinazione di numerosi contaminanti chimici negli alimenti, allo scopo di migliorare la qualità e la sicurezza dei prodotti destinati al consumo diretto.

ELECTROCHEMICAL IMMUNOSENSOR METHOD FOR THE DETERMINATION OF TYPE A-TRICHOHECENES IN BREAKFAST CEREALS AND CEREAL-BASED BABY FOODS

Vesco S., Romanazzo D., Ricci F., Volpe G., Moscone D., Palleschi G.

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università degli Studi Tor Vergata, Roma

Within the EC-funded integrated project *BioCop*, an electrochemical immunosensor method was developed for the determination of T-2 and HT-2 toxins in cereals and cereal-based foods. A test portion is extracted with acetonitrile/water (86/14). The sample extract is centrifuged and purified, using a Mycosep® column, and dried under nitrogen flow. The residue is resuspended and diluted in PBS buffer at the moment of the analysis. The total amount of HT-2 and T-2 toxins is quantified by a competitive ELIME-array (Enzyme-Linked-Immuno-Magnetic-Electrochemical-array) method. The method was in-house validated and yielded the following recovery characteristics. For breakfast cereals: Recovery for sample spiked with T-2/HT-2 toxins at 200 ng/g: 104%; Recovery for test portion naturally contaminated with T-2/HT-2 toxins at 80 ng/g sample: 125%. For maize-based baby foods: Recovery for sample spiked with T-2/HT-2 toxins at 20 ng/g: 106%; Recovery for test portion naturally contaminated with T-2/HT-2 toxins at 21 ng/g sample: 123%. Matrix effects hardly occurred. Currently the method is undergoing interlaboratory pre-validation to establish preliminary within- and between-laboratory precision data in several *BioCop*-partner laboratories. A full collaborative study is planned to be undertaken in 2010.

SVILUPPO DI METODI DI ANALISI SENSIBILI PER LE TOSSINE T-2 E HT-2 IN CEREALI E PRODOTTI DERIVATI

Pascale M. (a), Lippolis V. (a), Lattanzio V.M.T. (a), Solfrizzo M. (a), Visconti A. (a), Hazel C. (b), Patel S. (b), Briggs J. (c)

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

(b) *Premier Analytical Services, Premier Foods, The Lord Rank Centre, High Wycombe, Buckinghamshire, United Kingdom*

(c) *Food Standards Agency, Aviation House, London, United Kingdom*

Le tossine T-2 e HT-2 sono micotossine prodotte da alcune specie di *Fusarium* (principalmente *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae*, *F. poae*, *F. acuminatum*) che, in condizioni ambientali favorevoli (clima freddo o condizioni umide di stoccaggio), possono colonizzare i cereali, in particolare avena, orzo, frumento e mais. Sui mammiferi, queste micotossine hanno effetti tossici acuti e la tossina T-2 è stata dimostrata essere un potente inibitore della sintesi delle proteine, della sintesi di DNA e RNA, ed indurre effetti ematotossici, immunosoppressivi e dermatotossici. Numerose indagini hanno rivelato la presenza di queste tossine in vari cereali e prodotti derivati destinati al consumo umano. I metodi di analisi attuali non sono sufficientemente sensibili per valutare correttamente l'esposizione dei consumatori alle tossine T-2 e HT-2.

La *Food Standards Agency* (UK) ha recentemente finanziato un progetto di ricerca che aveva come obiettivo lo sviluppo di metodi di analisi sensibili per la determinazione delle tossine T-2 e HT-2 nei cereali e nei prodotti processati, con un limite di quantificazione (LOQ) per la somma delle due tossine di 8 µg/kg (rapporto segnale/rumore=10).

Differenti tecniche cromatografiche e procedure di purificazione degli estratti sono state studiate nell'ambito del progetto. Le attività di ricerca hanno permesso di mettere a punto tre metodi di analisi con un LOQ <8 µg/kg per la determinazione delle tossine T-2 e HT-2 in cereali e prodotti trasformati: un metodo GC-MS con purificazione dell'estratto su colonna SPE a base di carbone attivo, un metodo HPLC-FD con purificazione su colonna ad immunoaffinità contenente anticorpi specifici per le tossine T-2 e HT-2 e un metodo LC/MS-MS con purificazione su colonna SPE OASIS® HLB. I metodi sviluppati sono stati validati per orzo, mais, avena e frumento e per alcuni prodotti di cereali trasformati (pasta, pasta integrale, prodotti per colazione a base di frumento e avena, snack a base di mais), prodotti selezionati sulla base dei modelli di consumo nel Regno Unito. I valori di recupero e di ripetibilità dei metodi rispettano i criteri stabiliti dalla Commissione Europea per l'accettazione di un metodo di analisi per le tossine T-2 e HT-2 (Regolamento CE n. 401/2006). I metodi sviluppati potrebbero essere applicati per indagini epidemiologiche al fine di una corretta valutazione del rischio tossicologico connesso all'ingestione di prodotti a base di cereali contaminati da tossine T-2 e HT-2.

LABORATORIO NAZIONALE DI RIFERIMENTO. UN ANNO DI ATTIVITÀ

Brera C., De Santis B., Gregori E., Debegnach F., Pannunzi E., Berdini C., Miraglia M.
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Il Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare DSPVSA (ex Centro Nazionale per la Qualità e per i Rischi Alimentari) è stato designato Laboratorio Nazionale di Riferimento per le Micotossine (LNR-Micotossine) dal Ministero della Salute in ottemperanza al Regolamento 882/2004. L'LNR-Micotossine opera principalmente con la finalità di formare ed informare le strutture laboratoristiche che operano sul territorio nazionale relativamente alle attività di controllo ufficiale effettuate sugli alimenti e sui mangimi per il controllo delle micotossine. È inoltre compito dell'LNR-Micotossine lo sviluppo di attività legate alla valutazione del rischio da micotossine derivante dal consumo di alimenti e mangimi. L'LNR-Micotossine collabora con il CRL *Mycotoxin (Community Reference Laboratory, JRC-Geel)* e con gli LNR degli altri Stati Membri Europei partecipando alle riunioni plenarie che organizza periodicamente il CRL *Mycotoxin*. L'LNR-Micotossine ha svolto la propria attività nei settori di seguito elencati.

Accreditamento. Al fine di fornire prestazioni e risultati di laboratorio qualificati e riconosciuti in ambito nazionale e internazionale, l'LNR-Micotossine opera in base allo sviluppo di una politica della qualità conforme alla norma UNI-CEI-EN-ISO/IEC 17025, ed è accreditato con il n. 0665 da parte del SINAL (Sistema Nazionale Accreditamento Laboratori).

Standardizzazione metodiche e ring trial. Nell'ambito dello sviluppo di attività finalizzate alla diffusione di strumenti diagnostici utili ai fini del controllo ufficiale, l'LNR-Micotossine ha organizzato uno studio di validazione interlaboratorio per la determinazione in HPLC dell'Ocratossina A in campioni di prosciutto crudo. Attraverso la distribuzione di un questionario finalizzato all'ottenimento di informazioni tecniche dai laboratori, l'LNR sta valutando la possibilità di organizzare studi di validazione o *Proficiency Testing* in base alle priorità delle applicazioni (matrice/micotossina) indicate dagli stessi laboratori. Dietro il coordinamento del CRL *Mycotoxin*, il Laboratorio ha partecipato a *Proficiency Testing* organizzati per i soli LNR (analisi del Deossinivalenolo nei cereali, dell'Ocratossina A nei mangimi, della T-2 e dell'HT-2 nella farina di cereali, della Ocratossina A nelle spezie, delle Aflatossine nel burro di arachidi). Al fine di operare in conformità alla norma UNI-CEI-EN-ISO/IEC 17025 per l'assicurazione della qualità del dato analitico, il Laboratorio partecipa regolarmente ai programmi del FAPAS® (*Central Science Laboratory, Sand Hutton, York, UK*). Per l'anno 2008/2009 il Laboratorio ha partecipato ai circuiti per l'analisi dell'Ocratossina A in *baby food*, nella paprika, nel caffè e nel vino; delle Aflatossine nel mais e nei mangimi; del Deossinivalenolo nella farina di grano.

Sorveglianza. Nell'anno 2009 l'LNR-Micotossine ha portato a termine uno studio per valutare la contaminazione da Ocratossina A in prodotti commerciali a base di cacao.

APPLICAZIONE DELLE PROCEDURE DI CAMPIONAMENTO: A CHE PUNTO SIAMO?

Brera C., De Santis B., Miraglia M.

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La contaminazione da micotossine negli alimenti e mangimi è riconosciuta, sia in ambito scientifico che legislativo, come prioritaria in termini di sicurezza alimentare. Le autorità competenti, nell'ambito delle attività ufficiali di controllo in materia di alimenti, garantiscono l'applicazione congruente dei tenori massimi adottando modalità di campionamento conformi ai Regolamenti comunitari vigenti (401/2006 e 152/2009). Senza l'applicazione di opportuni piani di campionamento è altamente probabile incorrere in errate valutazioni non solo nell'ambito del controllo ufficiale, dove le ricadute hanno implicazioni di ordine legale/amministrativo, ma anche nell'ambito della sorveglianza sanitaria dove i dati devono riflettere il livello di protezione della salute umana, animale e dell'ambiente. Le difficoltà che si riscontrano per la determinazione delle micotossine nascono dalla natura estremamente eterogenea della contaminazione che obbliga ad osservare, all'atto del prelievo del campione, una serie di procedure tese a garantire la caratteristica principale che un campione prelevato da una massa deve possedere, la rappresentatività. Per una sostanza o materiale eterogeneamente distribuiti in una derrata alimentare, come nel caso delle micotossine, studi effettuati su basi statistiche hanno evidenziato che l'errore attribuibile al campionamento, misurato come varianza, dà un contributo di gran lunga superiore a quello della preparazione del campione e della analisi. Pertanto, il campionamento ideale dovrebbe essere predisposto sulla matrice non trasformata, possibilmente nella fase del raccolto, dovrebbe prediligere, quando possibile, una modalità di campionamento dinamico con prelievi di campioni elementari in automatico, predisporre la raccolta di un elevato numero di campioni elementari calcolato in funzione della grandezza del lotto/partita, e prevedere la macinazione del sottocampione con mulini che garantiscano un particolato fine (20 mesh o 0,75 mm) e l'omogeneizzazione per mezzo della formazione dello slurry (miscela di acqua e campione). Ad ogni modo, ogni standardizzazione di procedura di campionamento dovrebbe essere guidata al fine di ridurre la variabilità tenendo conto delle esigenze in termini di costi e fattibilità. Poiché ogni fase ha costi diversi, è importante valutare il contributo di ogni fase nella ottimizzazione delle risorse per produrre buoni piani di campionamento e per migliorare la qualità dei controlli.

CAMPIONAMENTO DINAMICO DI MATRICI VEGETALI IMPORTATE MEDIANTE CAMPIONATORE AUTOMATICO DI NUOVA GENERAZIONE

Gandini G. (a), Daffinà A. (a), Attili G. (b), Talleri M. (c), Peppi O. (a)
(a) PIF Bologna, Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, Bologna
(b) PIF Venezia, Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, Venezia
(c) Ditta Metaltecnica, Montale di Castelnuovo Rongone, Modena

Il Regolamento CE 882/2004 prevede che i mangimi importati nel territorio comunitario siano sottoposti dagli Stati membri a controlli ufficiali regolari, sulla base di un piano di controllo nazionale pluriennale e della valutazione del rischio.

Antecedentemente alla emanazione dei regolamenti del cosiddetto "pacchetto igiene", il Ministero della Salute, con il Dlgs. 223/2003, ha fissato i criteri per l'organizzazione dei controlli ufficiali nel settore dell'alimentazione animale, dettando disposizioni sì che devono essere effettuati, da parte degli uffici periferici del Ministero Posti di Ispezione frontaliere (PIF), all'atto della importazione dei prodotti destinati all'alimentazione animale di origine vegetale, minerale compresi gli additivi.

Nel piano di controllo nazionale pluriennale, riferito al triennio 2009-2011, il Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, Direzione Generale Sanità Animale e Farmaco Veterinario, ha dedicato una specifica sezione al controllo delle contaminazioni da agenti chimici e biologici da effettuarsi sulle partite di prodotti, destinati all'alimentazione animale, provenienti di Paesi terzi.

I campioni ufficiali devono essere prelevati, manipolati ed etichettati, conformemente alle pertinenti norme comunitarie al fine di garantirne la validità dal punto di vista giuridico ed analitico. Le dimensioni delle partite, le procedure ed i tempi di sbarco, le difficoltà di accesso alle stive delle navi ed il problema della sicurezza sui luoghi di lavoro, non sempre consentono al personale che effettua i campionamenti di operare nel pieno rispetto dei criteri di rappresentatività del campionamento ufficiale. Per le motivazioni sopra richiamate, si tende a privilegiare il campionamento sistematico cioè fatto ad intervalli regolari durante lo scarico della partita cosiddetto "campionamento dinamico".

Il Regolamento CE 152/2009 "che fissa i metodi di campionamento e di analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali" (determinazione dei costituenti, degli additivi e dei contaminanti esclusi pesticidi e microorganismi) prevede che il prelievo dei campioni di alimenti in flusso possa essere effettuato con dispositivi meccanici autorizzati.

Sulla base della nostra esperienza personale, che deriva dalla attività di scarico degli alimenti per animali presso i porti di Ravenna e Venezia, è stato realizzato un modello di campionatore automatico che risponde alle esigenze connesse con le attività di scarico e con i principi fissati dalle pertinenti norme in materia di campionamento.

MICOTOSSINE MASCHERATE NELLA FILIERA DEI CEREALI: UN NUOVO PROBLEMA EMERGENTE

Dossena A., Dall'Asta C., Galaverna G., Sforza S., Marchelli R.
Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università degli Studi, Parma

Le micotossine nascoste sono forme mascherate delle micotossine non rivelabili dai comuni metodi di analisi e generate da attività metaboliche delle piante infettate o dagli effetti dei processi di trasformazione degli alimenti. Il problema è stato per la prima volta affrontato alla metà degli anni '80 in seguito all'osservazione che, in alcuni casi di micotossicosi animali indotte in particolare da *Fusarium* tossine (Tricoteceni, Zearalenone, Fumonisine), le sintomatologie cliniche non erano correlate con il basso contenuto di micotossine ritrovato nel corrispondente mangime. L'elevata e inaspettata tossicità poteva quindi essere attribuita alla presenza di forme coniugate non rivelabili della micotossina in esame che, in condizioni gastriche, potevano rilasciare la forma nativa. Il processo di detossificazione messo in atto dalle piante prevede, nel caso di micotossine apolari come Tricoteceni e Zearalenone, la coniugazione con gruppi più polari come zuccheri, amminoacidi o solfati e il successivo stoccaggio dei coniugati nei vacuoli (compartimentalizzazione): sono stati identificati sia Zearalenone-4-glucoside che Deossivalenolo-3-glucoside in frumento naturalmente contaminato da *F. graminearum*. Un ruolo importante nei fenomeni di mascheramento è svolto anche dal processo tecnologico, in particolare nei derivati da cereali. Infatti, l'energia meccanica e termica fornita durante il processo può indurre alcune trasformazioni a carico delle micotossine: in particolare, le Fumonisine possono reagire con macrocostituenti quali zuccheri, proteine o grassi. Le forme idrolizzate, ma ancora tossicologicamente attive delle tossine, possono poi essere liberate a seguito della digestione. In campioni contaminati le Fumonisine nascoste sembrano essere legate alla frazione proteica delle prolamine e delle glutenine. Inoltre, nei prodotti derivati da mais spesso si evidenzia una maggiore incidenza della contaminazione da forme legate rispetto alle forme libere. Questo problema è rilevante per quei consumatori che basano la loro alimentazione in particolare su tali prodotti (celiaci). Un altro importante effetto da considerare è la possibilità che forme nascoste non identificate nella materia prima si liberino per effetto del processo tecnologico. Recentemente, è stato infatti evidenziato un aumento del livello di contaminazione da DON e NIV in frumento a seguito dei processi di lavorazione, evento che apre uno scenario completamente nuovo da affrontare in termini di valutazione della sicurezza degli alimenti.

EARLY DETECTION OF MYCOTOXIGENIC *FUNGI* AND MYCOTOXINS BY DIFFERENT TECHNICAL TOOLS

Fanelli C. (a), Fabbri A.A. (a), Reverberi M. (a), Caputo D. (b), Nascetti A. (c), De Cesare G. (b), Bonifazi G. (e), Serranti S. (e), Ricelli A. (d)

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

(b) *Dipartimento di Ingegneria Elettronica, Università di Roma Sapienza, Roma*

(c) *Dipartimento di Ingegneria Aerospaziale ed Astronautica, Università di Roma Sapienza, Roma*

(d) *Istituto di Chimica Biomolecolare, Roma*

(e) *Dipartimento di Ingegneria Chimica Materiali Ambiente, Università di Roma Sapienza, Roma*

Mycotoxins are secondary metabolites hazardous for animal and human health. Most of them are regulated by EU legislation due to their carcinogenic, mutagenic, immune suppressive and toxic effects. Up to date their control has been attempted both by using preventive strategies and detoxification approach. Even if a full control of mycotoxin biosynthesis has not been achieved, prevention seems to be the election choice and an useful tool to limit their diffusion. The preventive strategy includes the early detection of the presence of both mycotoxigenic *fungi* and mycotoxins in foodstuffs. This strategy can be carried out by different devices and technologies. In our study we have used image spectrometry and molecular biology tools for detecting *in vivo* fungal contamination. The image spectrometry is able to early detect the presence of toxigenic *fungi* and to distinguish them from the non toxigenic mycoflora on maize seeds, by using powerful statistical analysis, when fungal contamination is not detectable by observation. Molecular biology methods, based on suitable extraction procedures and SYBR green real-time PCR amplifications with the use of specie-specific *primers*, have been set to early detect minimal quantity (1-5 conidia) of different mycotoxigenic *fungi*, such as *Aspergillus flavus*, *A. carbonarius* and *Penicillium expansum* in several matrices. Moreover, Ochratoxin A and Aflatoxin B₁ have been detected by amorphous silica photosensor array. This technique using very simplified and rapid extraction procedures, has allowed to detect OTA from red wine contaminated at 2 ppb.

DETERMINAZIONE SIMULTANEA DI AFLATOSSINE, OCRATOSSINA A E TOSSINE DI *FUSARIUM* IN CEREALI MEDIANTE PURIFICAZIONE SU COLONNINE AD IMMUNOAFFINITÀ MULTI ANTICORPO E LC-MS/MS

Lattanzio V.M.T. (a), Solfrizzo M. (a), Della Gatta S. (a), Powers S. (b), Visconti A. (a)
(a) *Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, ISPA, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari*
(b) *Vicam Group of Waters Technology Corp, Milford, MA, USA*

Il Regolamento della Commissione Europea (EC n. 1881/2006 e 1126/2007) stabilisce i livelli massimi ammissibili delle principali micotossine (Aflatossine, Ocratossina A, Fumonisine, Zearalenone e Deossinivalenolo) nei cereali e prodotti derivati. I limiti per le tossine T-2 e HT-2 sono attualmente in discussione e saranno emanati a breve. Per assicurare il rispetto della legislazione e per proteggere il consumatore è necessario quindi disporre di metodiche analitiche robuste ed affidabili per la determinazione di micotossine nelle varie matrici agroalimentari.

Recentemente abbiamo sviluppato un metodo accurato e riproducibile per l'analisi simultanea di Aflatossine (B₁, B₂, G₁, G₂), Ocratossina A, Fumonisine (B₁, B₂), Tricoteceni (Deossinivalenolo, tossina T-2, tossina HT-2) e Zearalenone in cereali. Per ottenere una elevata efficienza di estrazione per tutte le 11 micotossine, aventi differente polarità e struttura chimica, è stato sviluppato un nuovo approccio basato su una doppia estrazione con tampone fosfato a pH 7,4 e una miscela metanolo/tampone fosfato (70:30, v/v). Per la purificazione degli estratti sono state utilizzate con successo nuove colonnine ad immunospecificità contenenti 6 diversi anticorpi. La separazione e rivelazione di queste micotossine è stata effettuata mediante cromatografia liquida-spettrometria di massa/massa (LC-ESI-MS/MS). È stato inoltre valutato l'effetto matrice sulla ionizzazione degli analiti con un test statistico (*t* test) che determina la significatività della differenza di pendenza tra le rette di calibrazione ottenute con soluzioni standard preparate in fase mobile e in estratti di cereali purificati su colonnina ad immunospecificità.

Le caratteristiche del metodo in termini di recuperi, ripetibilità e linearità sono state valutate in mais, frumento e orzo, a livelli di contaminazione intorno ai limiti di legge per ogni micotossina considerata. Le percentuali di recupero (valutate a tre livelli di contaminazione) variano da 70 a 114% in mais, da 71 a 105% in frumento e da 61 a 98% in orzo, con deviazioni standard relative inferiori al 16%. I limiti di rivelabilità (calcolati ad un rapporto segnale/rumore pari a 3) sono compresi tra 0,2 a 5,2 µg/kg. I valori di recupero e di ripetibilità del metodo sono conformi ai criteri stabiliti dal CEN (*European Committee for Standardization*) e riportati nel Regolamento CE (EC n. 401/2006) per l'accettazione di metodi analitici per la determinazione delle varie micotossine in esame.

ISOTOPI STABILI DI MICOTOSSINE COME MATERIALI DI RIFERIMENTO PER ANALISI CON LC-MS/MS

Molinelli A. (a), Häubl G. (a), Freudenschuss M. (b), Krska R. (a)

(a) Christian Doppler Laboratory for Mycotoxin Research, Center for Analytical Chemistry, Department for Agrobiotechnology, IFA-Tulln, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Tulln, Austria

(b) Biopure Referenzsubstanzen GmbH, Technopark 1, Tulln, Austria

L'uso della spettrometria di massa per la detezione di micotossine in chimica analitica è uno strumento di grande utilità. Oggigiorno, i metodi di analisi LC-MS/MS permettono la determinazione di più di 100 tossine in una singola volta. Non di meno, le interferenze provenienti dalle componenti della matrice possono risultare in una differente ionizzazione dei analiti analizzati in un campione, se lo si compara a materiali di riferimento (standard calibranti) che risultano in segnali di intensità differenti. Il cosiddetto "effetto matrice" può limitare l'applicazione della spettrometria di massa come detettore nella cromatografia liquida. Questi effetti matrice possono essere superati aggiungendo un Standard Interno (IS) al campione, che si comporta in maniera simile al analita e pertanto può correggere le perdite che occorrono durante la preparazione del campione e l'effetto di soppressione di ioni nella fonte MS. Gli isotopi stabili, analoghi alle micotossine naturali, sono i miglior IS per le tossine. Bisogna però notare che le sostanze deuterate comportano sempre il rischio di scambio H/D in solventi protici, e dunque di alterazione del tempo di ritenzione relativo alla tossina naturale. In più, l'utilizzo di micotossine parzialmente marcate, frequentemente contengono un ammontare considerevole di isomeri "leggeri", che portano a picchi di massa che interferiscono con gli isotopi delle micotossine naturali. Dunque, sostanze che sono state completamente sostituite con il ^{13}C possono essere considerate come il miglior standard interno per la quantificazione da LC-MS/MS e GC-MS/MS.

Nel nostro lavoro, dimostreremo in pratica l'uso di isotopi stabili di micotossine come materiali di riferimento per correggere le fluttuazioni che possono occorrere durante l'estrazione, il *clean-up*, la separazione cromatografica e l'ionizzazione del campione. Risultati dimostrano che gli isotopi stabili di micotossine sono adatti a un'accurata analisi LC-MS/MS di micotossine nei cereali.

MATERIALI DI RIFERIMENTO PER LA DETERMINAZIONE DI MICOTOSSINE E LA VALUTAZIONE DI CONTAMINAZIONI FUNGINE IN PRODOTTI ALIMENTARI

Gatti R., Lamberti I., Mosiello L., Zappa G., Zoani C.

Dipartimento Biotecnologie Agroindustria e Protezione della Salute, ENEA, Roma

I Materiali di Riferimento (RM) rappresentano, per la gran parte delle misure chimiche e biologiche, l'elemento chiave per garantire la comparabilità e l'affidabilità dei risultati. Nel settore alimentare i RM trovano impiego nella taratura, nella validazione dei metodi, nei *Proficiency Testings* (PT) e nell'applicazione delle procedure per il calcolo dell'incertezza. Per quanto riguarda la problematica delle micotossine nei prodotti alimentari, i RM ed in particolare i Materiali di Riferimento Certificati (CRM) sono indispensabili per garantire l'accuratezza dei risultati e per effettuare adeguate valutazioni di incertezza nell'ambito delle verifiche di conformità. Nel presente lavoro si esamina dettagliatamente la produzione mondiale di RM per questo settore, considerando sia i CRM inclusi nella Banca Dati COMAR che le altre sostanze pure ed i *Quality Control* disponibili sul mercato. Dopo una breve descrizione degli impianti ENEA specificatamente dedicati alla produzione di RM per il settore agroalimentare, si esaminano le diverse tipologie di RM potenzialmente realizzabili con detti impianti, evidenziando la possibilità di preparare nuovi - in termini di matrice o di specifiche proprietà - RM e RM con caratteristiche innovative. Vengono approfondite in particolare le problematiche legate alla stabilità delle matrici, le problematiche di riferibilità nelle valutazioni della contaminazione fungina e quelle connesse alla valutazione dell'incertezza delle misure.

Poster

P1 EVOLUZIONE DELLE *FUSARIUM* TOSSINE NELLA FILIERA CEREALICOLA: COMPORTAMENTO DEL DON DURANTE LA PANIFICAZIONE INDUSTRIALE

Bergamini E. (a), Suman M. (b), Dall'Asta C. (c), Dossena A. (c), Marchelli R. (c)

(a) *Spinner 2013, Consorzio Spinner, Villa Gandolfi Pallavicini, Bologna*

(b) *Food Science & Research Labs, Barilla SpA, Parma*

(c) *Dipartimento di Chimica Organica ed Industriale, Università degli Studi, Parma*

Le micotossine prodotte da *Fusarium* rappresentano un serio problema nella filiera cerealicola, in quanto il fungo attacca specialmente frumento, orzo, mais e riso sia durante la crescita in campo che in seguito ad eventuali inefficaci operazioni di stoccaggio ed essiccamento post-raccolta. Negli ultimi anni la Comunità Europea ha frequentemente espresso opinioni in riguardo, fissando limiti, regolamenti e linee guida volti a ridurre la contaminazione da Tricoteceni nelle materie prime e negli alimenti: in particolare la legislazione Europea (Regolamento 1881/2006) ha stabilito limiti massimi di contaminazione da Deossinivalenolo (DON), rispettivamente a 750 µg/Kg sulla farina ed a 500 µg/Kg sul pane. Pochi studi hanno finora esaminato la diminuzione della contaminazione da *Fusarium* tossine durante i processi industriali, con riferimento ai fattori di processo presenti nella pratica industriale. In particolare, descrivere il comportamento del DON durante la panificazione è molto difficile, soprattutto in seguito ai complessi cambiamenti chimico-fisici che intervengono nella trasformazione delle materie prime in prodotto finito. Nel presente lavoro è stata studiata l'influenza che hanno i parametri di lievitazione e di cottura sulla concentrazione di DON, partendo da farina naturalmente contaminata ed utilizzando un impianto pilota per condurre reali prove di panificazione, quindi passare allo studio del processo industriale. La quantificazione del DON sulle matrici di panificazione è stata condotta utilizzando la Cromatografia Liquida ifenata alla Spettrometria di Massa tramite ionizzazione a pressione atmosferica (HPLC-ESI-MS/MS, utilizzati diversi analizzatori, a Trappola Ionica lineare e a Triplo Quadrupolo). Sfruttando inoltre le potenzialità di un Disegno Sperimentale opportunamente pianificato, è stato possibile studiare la complessità del sistema analizzato generandone un modello descrittivo che presenta buona capacità esplicativa e predittiva; la modellizzazione ha identificato la fase di cottura (variabili tempo e temperatura in aumento) come fondamentale per minimizzare l'incremento naturale del DON libero durante la panificazione. Infine, sono stati ottenuti risultati preliminari in riguardo alla contaminazione da Deossinivalenolo-3-β-D-glucopiranoside (considerata la forma mascherata principale del DON) ed alla relativa conversione durante il processo. È infatti plausibile assumere che, le forme coniugate delle micotossine normalmente sfuggono ai comuni metodi di determinazione dei Tricoteceni, ma probabilmente rilasciano i relativi precursori tossici in seguito ad idrolisi, con conseguente incremento della problematica relativa alle filiere alimentare e mangimistica.

P2 VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DI MICOTOSSINE NASCOSTE NEI CEREALI MEDIANTE DIGESTIONE GASTROINTESTINALE SIMULATA

Dall'Asta C., Falavigna C., Galaverna G., Dossena A., Marchelli R.
Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università degli Studi, Parma

Le micotossine mascherate sono derivati delle micotossine coniugati con gruppi polari o associate a macrocostituenti degli alimenti solitamente non rivelabili con le comuni tecniche di analisi. È stato recentemente dimostrato che le più comuni forme mascherate del Deossinivalenolo e dello Zearalenone nei cereali sono i relative glucosidi, mentre la natura chimica delle forme mascherate delle Fumonisine non è ancora stata chiarita del tutto. Alcuni studi riportano la presenza di forme legate delle Fumonisine negli alimenti processati, come corn flakes o tortillas. Più recentemente, le Fumonisine nascoste sono state ritrovate anche in alimenti poco processati (es. farina, pane, pasta) o in granella di mais, suggerendo quindi una possibile interazione tra le tossine *target* e componenti macromolecolari dell'alimento come amido o proteine. Le forme nascoste sono solitamente rivelabili mediante uno *step* di idrolisi alcalina e potrebbero essere rilasciate nell'alimento durante i trattamenti tecnologici oppure in condizioni di digestione gastrica, causando quindi una maggiore esposizione rispetto a quella stimata mediante i comuni metodi di analisi. In questo studio, è stato applicato un modello di digestione *in vitro* sia a granelle di mais e frumento che a prodotti derivati al fine di valutare la reale presenza di micotossine nascoste potenzialmente rilasciabili dalla matrice esposta all'azione idrolitica enzimatica e, quindi, di stimare la bioaccessibilità di tali composti in seguito ad ingestione. Le condizioni gastrointestinali sono state simulate mediante l'applicazione di 3 *step* digestivi in grado di riprodurre i processi che avvengono nella bocca, nello stomaco e nel duodeno. Gli esperimenti di digestione simulata sono stati applicati sia a campioni contenenti Fumonisine nascoste, che a prodotti contaminati con Deossinivalenolo-3-glucoside e Zearalenone-4-glucoside per verificare il possibile rilascio delle forme native durante la digestione.

P3 CONTAMINAZIONE DA OCRATOSSINA A E TRICOTECENI DI BISCOTTI PRELEVATI AL DETTAGLIO

Pietri A. (a), Bertuzzi T. (a), Agosti B. (a), Donadini G. (b)

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

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

Nell'attuale situazione europea, i due principali rischi da micotossine per il frumento e i derivati riguardano la presenza di Ocratossina A (OTA), prodotta principalmente da *Penicillium verrucosum* e da *Aspergillus ochraceus*, e di fusariotossine, quali i Tricoteceni (TCT), soprattutto di tipo B, prodotti da *Fusarium culmorum* e *F. graminearum*. Tra i TCT, quello che riveste la maggior importanza per diffusione e livello è il Deossinivalenolo (DON). Per l'OTA, è stato fissato dalla Comunità Europea un limite di 3 µg/kg per i prodotti derivati dai cereali; per il DON è in vigore un valore massimo di 500 µg/kg per i prodotti da forno e i cereali da colazione. Nella presente ricerca è stato effettuato un monitoraggio sulla contaminazione da OTA e da alcuni TCT (DON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON, NIV, HT-2 e T-2) di campioni di biscotti di 5 diverse marche italiane. Per ogni marca, i campioni sono stati acquistati a cadenza mensile per un anno (periodo 2007-2008); una marca era presente solo in punti vendita Hard Discount. Dopo macinazione dei campioni con griglia da 1 mm, estrazione e purificazione attraverso colonna di immunoaffinità, la determinazione di OTA è stata effettuata mediante HPLC con rivelazione fluorimetrica. È stata utilizzata una colonna *Luna Phenyl-Hexyl (Phenomenex)* e, come fase eluente, una miscela H₂O:CH₃CN=65:35. I TCT, dopo purificazione con colonna *Myco-Sep* e derivatizzazione (formazione di trimetilsilileteri), sono stati determinati mediante GC-MS. I limiti di rivelazione e di quantificazione sono risultati di 0,02 e 0,05 µg kg⁻¹ per OTA, di 2 e 5 µg kg⁻¹ per i TCT di tipo B e di 10 e 20 µg kg⁻¹ per quelli di tipo A. I metodi hanno fornito percentuali di recupero tra il 90 e il 95%, con una buona ripetibilità. La contaminazione sia di OTA che di TCT è risultata bassa, sempre molto inferiore ai limiti di legge. Per OTA, la percentuale di campioni positivi è stata del 53,3% ed il valore più elevato è risultato pari a 0,74 µg kg⁻¹. La percentuale di campioni aventi una contaminazione da OTA superiore a 0,50 µg kg⁻¹ (limite per *baby foods*) è stata del 5,0%; il valore medio è stato pari a 0,15±0,18 µg kg⁻¹. Tra i TCT, il DON è risultato presente nel 93,3% dei campioni, mentre gli altri TCT non sono mai stati rilevati. Il valore più elevato è stato 278 µg kg⁻¹, la percentuale dei campioni aventi una concentrazione di DON superiore a 200 µg kg⁻¹ (limite per *baby foods*) è risultata pari a 3,3% (2 campioni); il valore medio è stato 39±49 µg kg⁻¹. Non sono state osservate differenze statisticamente significative tra le diverse marche considerate.

P4 CONTAMINAZIONE INDIRECTA E DIRETTA DA OCRATOSSINA A DI CARNI E SALUMI TIPICI

Pietri A., Bertuzzi T., Gualla A., Morlacchini M., Piva G.
Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza

L'Ocratossina A (OTA) è una micotossina prodotta su molti substrati alimentari, principalmente da *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum* e *P. nordicum*. L'OTA può essere presente nei prodotti carnei o per contaminazione indiretta dovuta ad una dieta contaminata somministrata agli animali o, nel caso di prodotti stagionati, per contaminazione diretta causata da muffe, che si sviluppano durante il periodo di stagionatura. In Italia, è in vigore un limite massimo di contaminazione da OTA nei prodotti carnei pari a 1 µg kg⁻¹ (Circolare del Ministero della Sanità n. 10 del 09/06/1999); la necessità di fissare un limite è stata espressa anche dalla Comunità Europea, che ha incluso questi prodotti tra quelli da regolamentare (Regolamento CE 1881/2006). Obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare l'entità dei due tipi di contaminazione su alcuni prodotti carnei freschi e stagionati, per stabilire quale può essere più rilevante. Una prova sperimentale della durata 14 giorni è stata condotta su 24 suini *Large White* suddivisi in 4 gruppi di 6 soggetti ciascuno. Un gruppo è stato alimentato con un mangime non contaminato (gruppo T0), gli altri con diete naturalmente contaminate da OTA a diversi livelli: 42 (gruppo T1), 83 (T2), e 171 µg kg⁻¹ (T3). Al termine del periodo sperimentale, per ogni animale le porzioni muscolari e adipose sono state lavorate per la preparazione di salami, pancette, coppe e prosciutti crudi secondo i rispettivi Disciplinari di Prodotti Tipici. I prodotti sono stati successivamente stagionati in tre impianti industriali per tempi diversi: 50 giorni per i salami, 4, 6 e 14 mesi rispettivamente per le pancette, le coppe e i prosciutti. Dai tessuti muscolari, adiposi e dai prodotti stagionati sono stati prelevati campioni di 200 g per la determinazione dell'OTA; per i prosciutti l'analisi è stata condotta sia su un campione relativo alla parte interna, sia su uno prelevato 1 cm sotto la superficie. L'estrazione di OTA è stata effettuata mediante digestione enzimatica del campione con pancreatina; dopo purificazione dell'estratto con colonna di immunoaffinità, l'OTA è stata determinata tramite HPLC con rivelazione fluorimetrica. I valori di OTA relativi al tessuto muscolare hanno indicato una contaminazione superiore a 1,00 µg kg⁻¹ per i gruppi T2 (valore medio 1,27 µg kg⁻¹) e T3 (2,23 µg kg⁻¹); più bassi sono risultati quelli relativi al tessuto adiposo. Le concentrazioni rilevate per le pancette sono risultate analoghe ai tessuti di partenza. I salami e le coppe hanno evidenziato un aumento di OTA superiore a quello atteso per il loro calo in peso; inoltre l'OTA è stata riscontrata anche in alcuni campioni del gruppo T0. Per i prosciutti, i valori relativi ai campioni interni sono risultati analoghi ai corrispondenti tessuti muscolari; nei campioni esterni sono stati invece osservati livelli di contaminazione assai variabili (<0,03-314 µg kg⁻¹) e molto più elevati rispetto ai corrispondenti interni, con 10 campioni su 24 che hanno evidenziato una contaminazione superiore a 10 µg kg⁻¹. Questi risultati indicano come la crescita di muffe ocratossigene durante la stagionatura può aumentare sensibilmente la concentrazione di OTA nei prodotti stagionati, in modo nettamente più rilevante rispetto alla contaminazione dei mangimi.

P5 AFLATOSSINA M₁ NEL LATTE: DISTRIBUZIONE TRA I PRODOTTI DELLA TRASFORMAZIONE CASEARIA TIPO GRANA

Pietri A. (a), Bertuzzi T. (a), Mulazzi A. (a), Piva G. (a), Pecorari A. (b), Gambini G. (b), Nocetti M. (b)

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

(b) *Consorzio del Formaggio Parmigiano Reggiano, Reggio Emilia*

Sono state condotte alcune mini-caseificazioni per la produzione di formaggio tipo grana, allo scopo di studiare la ripartizione dell'Aflatossina M₁ nei diversi prodotti. Lo studio ha previsto, per 5 giorni non consecutivi, la raccolta di latte ottenuto da alcune vacche alimentate il giorno precedente con mais naturalmente contaminato da Aflatossina B₁ (AFB₁). Il latte di ogni mungitura è stato quindi utilizzato per due differenti processi di trasformazione casearia, per un totale di 10 caseificazioni; queste sono state eseguite su scala ridotta, utilizzando 20-25 l di latte. L'analisi per la determinazione di AFM₁ è stata eseguita nel latte intero, nella crema di affioramento, nel latte di caldaia, nella cagliata, nel siero, nel siero cotto, nella ricotta, nel burro e nel latticello, con l'obiettivo di valutare i fattori di arricchimento e le distribuzioni percentuali della tossina nei principali prodotti lattiero-caseari destinati al consumo umano.

Dopo estrazione e purificazione con colonna ad immunoaffinità, l'analisi è stata effettuata mediante HPLC con rivelazione fluorimetrica. Le concentrazioni di AFM₁ nei campioni di latte intero erano comprese tra 27 e 460 ng kg⁻¹. Dopo il processo di scrematura, le concentrazioni del latte di caldaia sono risultate molto simili a quelle del latte intero; la distribuzione media percentuale, calcolata come rapporto fra le quantità di AFM₁, è stata del 90±9% nel latte scremato e solo dell'1,6±0,6% nella panna (con un bilancio di massa pari a 92±9%). Nel processo di caseificazione, la resa media è stata pari al 7,5%; le cagliate hanno evidenziato concentrazioni di AFM₁ tra 82 e 1.699 ng kg⁻¹, con un fattore di arricchimento medio pari a 3,6±0,5. Con un bilancio di massa medio vicino al 90%, la distribuzione percentuale media di AFM₁ è stata pari al 27±3% nella cagliata e al 60±4% nel siero. Il siero è stato quindi utilizzato per la produzione della ricotta; il fattore di arricchimento medio è risultato pari a 2,1±0,9. La distribuzione percentuale nella ricotta, pari a 5±3%, è risultata piuttosto bassa, evidenziando come la tossina presente nel siero rimanga prevalentemente nel siero cotto. Infine, l'ultima parte del processo ha previsto l'impiego della panna per la preparazione del burro. L'AFM₁ nel burro è risultata presente solo negli ultimi 4 processi (con le concentrazioni nel latte di partenza più elevate); sia il fattore di arricchimento che la distribuzione percentuale sono risultati molto bassi, pari rispettivamente a 0,2±0,3 e a 9±14%. In conclusione, ipotizzando per il latte intero una concentrazione di 100 ng kg⁻¹, le concentrazioni medie di cagliata, siero, ricotta e burro risultano rispettivamente di 348, 60, 123 e 21 ng kg⁻¹.

P6 DISTRIBUZIONE DEL DEOSSINIVALENOLO DURANTE IL PROCESSO DI MOLITURA DEL FRUMENTO TENERO

Vanara F., Blandino M., Mancini M.C., Reyneri A.
Dipartimento di Agronomia, Selvicoltura e Gestione del Territorio, Università degli Studi, Torino

La presenza di Deossinivalenolo nel frumento e nei suoi derivati è di interesse per gli effetti che l'ingestione di questo metabolita tossico può avere sull'uomo e gli animali. In particolare, l'elevato consumo di farine di frumento pone l'attenzione sulla possibilità di superare il TDI per questa tossina. Inoltre, le esigenze qualitative del frumento in funzione della destinazione d'uso delle farine, obbliga i molini all'approvvigionamento di materia prima da areali a diverso rischio di contaminazione da *Fusarium* spp. produttrici di DON. La lavorazione del frumento presso i molini prevede un'accurata pulizia della granella in ingresso e il successivo condizionamento per 12 ore prima della macinazione. L'obiettivo di questa ricerca è stato la valutazione della distribuzione del Deossinivalenolo presente nella granella nei prodotti e sottoprodotti della lavorazione per la produzione di farine 00. L'indagine è stata condotta presso il Molino Tavano di Andezeno (TO), produttore di farine a diversa destinazione (industria dolciaria, panificazione). La metodica di campionamento ha previsto il prelievo di campioni elementari e la formazione del campione globale secondo le modalità e le quantità previste dal Regolamento CE 401/2006 sul campionamento delle micotossine nei cereali. La granella è stata seguita lungo le fasi di pulizia e condizionamento, prelevandola ad ogni passaggio successivo per un totale di 4 tipologie di campioni (granella a inizio lavorazione, dopo la prima pulitura, dopo il condizionamento e dopo il riposo e la seconda pulitura). I prodotti campionati nel corso della lavorazione sono stati individuati seguendo il principio di prelevare tutte le frazioni di interesse commerciale che nel loro insieme possano ricostruire la granella di origine: farina, farinaccio, crusca, cruschetto e germe. I dati dei 3 lotti analizzati confermano quanto già riportato in letteratura, il contenuto di DON è inferiore al frumento di partenza per la farina (circa 60% del grano a inizio macinazione), mentre aumenta nelle frazioni contenenti il pericarpo e l'aleurone (farinaccio, crusca e cruschetto). Grazie al bilancio di massa complessivo della distribuzione del DON, basato sui valori reali delle rese di macinazione, possiamo affermare che circa il 40% di questa tossina arriva nell'endosperma della cariosside, mentre la restante parte si concentra nelle porzioni esterne.

P7 LA LINEA GUIDA DEGLI IIZZSS PER LA VALIDAZIONE INTRA-LABORATORIO DEI METODI DI PROVA DI CONFERMA DELLE MICOTOSSINE NEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE

Annunziata L. (a), Biancardi A. (b), Biancotto G. (c), Chessa G. (d), Gallo P. (e), Muscarella M. (f), Pecorelli I. (g), Rosso A. (h), Spatola R. (i), Ubaldi A. (l)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, Teramo

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

(c) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Padova

(d) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari

(e) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Napoli

(f) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia

(g) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

(h) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, della Liguria e della Valle d'Aosta, Asti

(i) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo

(l) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma

I laboratori di chimica degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali hanno redatto una linea guida per la validazione dei metodi di analisi di conferma delle micotossine negli alimenti di origine animale, per definire un approccio armonizzato in conformità alla normativa vigente. I metodi di prova per la determinazione delle micotossine devono rispettare i requisiti previsti dal Regolamento n. 401/2006/CE, e Regolamento n. 1881/2006/CE, inoltre devono essere validati determinando le prestazioni analitiche indicate nel Regolamento n. 882/2004/CE, allegato III. La linea guida rappresenta un approccio integrato, e prevede anche alcuni criteri di rendimento opzionali definiti dalla Decisione 2002/657/CE.

La linea guida descrive, tra l'altro:

- i criteri di rendimento generali di un metodo di prova;
- i criteri di rendimento per la rivelazione mediante spettrometria di massa;
- i criteri di rendimento ed altri requisiti per la determinazione di un analita utilizzando la LC con tecniche di rivelazione UV/Vis a scansione totale o fluorimetrica.

Ai fini della validazione del metodo di prova, la linea guida descrive i parametri da calcolare e le relative modalità, con particolare riferimento a:

- individuazione dei livelli di validazione;
- precisione, esattezza o recupero, specificità del metodo;
- il limite di rivelazione (LOD) e il limite di quantificazione (LOQ);
- la capacità di rivelazione ($CC\alpha$);
- la stabilità;
- la robustezza per variazioni lievi;
- la funzione di idoneità.

P8 DEOSSINIVALENOLO (DON) NEL FRUMENTO DURO (*TRITICUM DURUM* DESF.): CONFRONTO FRA COLTURA CONVENZIONALE E BIOLOGICA

Aureli G., Quaranta F., Amoriello T., Melloni S., Desiderio E., Fornara M., D'Egidio M.G.
Direzione Centrale Attività Scientifica Servizio Trasferimento e Innovazione, CRA, Roma

Il frumento duro è suscettibile agli attacchi di funghi del genere *Fusarium* il cui metabolismo secondario può essere responsabile della formazione di pericolose micotossine come il Deossinivalenolo (DON). I livelli di sicurezza richiesti nella catena alimentare impongono come imprescindibile prerequisito sanitario il marcato contenimento della presenza di questi metaboliti tossici nei prodotti destinati al consumo. La crescente diffusione del metodo di coltivazione biologico anche per il frumento, con l'impossibilità di ricorrere a fitofarmaci per il controllo dei funghi patogeni, aveva paventato una maggiore presenza di micotossine. Per valutare il reale grado di contaminazione da DON nel grano duro è stata impostata una ricerca biennale (2006-07 e 2007-08) in cui la tecnica di coltivazione biologica è stata messa a confronto con quella convenzionale. Le prove sono state svolte in otto località (quattro al Centro e quattro al Sud), impiegando in tutti gli ambienti le stesse sei varietà. I livelli medi di contaminazione sono risultati in generale molto contenuti e, ad eccezione di un unico campione, decisamente lontani dalla soglia (1.750 ppb) fissata dal Regolamento CE 1881/2006. L'effetto dell'areale è quello predominante sulla contaminazione, con un peso di oltre il 40% sul totale; l'anno e il metodo di coltivazione sono risultati altresì importanti, influenzando per il 30 e il 20%, rispettivamente; mentre la scelta varietale è quella che ha avuto il minor effetto (10% ca.). Se però si considerano le interazioni a due vie tra i fattori considerati, il metodo di coltivazione risulta non significativo, mentre la componente anno rimarcherebbe il proprio peso visto che le uniche interazioni significative (anno x areale e anno x varietà) sono quelle in cui è presente. I risultati ottenuti nelle quattro località meridionali (media 19 ppb) confermano una presenza insignificante di micotossine in questo areale particolarmente vocato, mentre al Centro (media 112 ppb) soprattutto nell'anno più favorevole al DON (2008) in alcune località e per le varietà più sensibili i valori di contaminazione si sono innalzati, sebbene a livelli mediamente non allarmanti. Il metodo biologico ha fatto registrare valori di DON più bassi rispetto al convenzionale (medie di 36 e 96 ppb, rispettivamente), sia nelle località del Sud dove l'attacco è generalmente modesto, ma anche al Centro, dove può rappresentare un potenziale pericolo. A livello varietale, pur essendo scarso l'effetto delle *cultivar* sulla contaminazione, Cresco di ciclo tardivo (media 28 ppb) e Claudio di ciclo medio (media 41 ppb) sono risultate le meno sensibili soprattutto nel 2008 nelle località del Centro dove più frequenti sono state le fusariosi. In questo areale il gruppo delle varietà precoci ha evidenziato valori significativamente più alti. Del resto queste *cultivar* sono state selezionate per gli ambienti meridionali, dove la fusariosi è meno diffusa e nei quali non si sono evidenziate differenze significative tra genotipi.

P9 EFFETTI DELLE AFLATOSSINE SUGLI ASPETTI PRODUTTIVI NELLA BUFALA MEDITERRANEA ITALIANA

Auriemma G., Grazioli G., Baculo R., Sarubbi F.
*Istituto per il Sistema Produzione Animale in Ambiente Mediterraneo, Consiglio Nazionale
delle Ricerche, Napoli*

Il mais (*Zea Mays*) è un cereale che ha assunto, a livello mondiale, una diffusione e un'importanza crescenti. Gran parte del mais coltivato in Italia (82%) è destinato all'alimentazione degli animali ad interesse zootecnico; se a questa percentuale si aggiunge la quota del 3,7% di mais utilizzato come sottoprodotto dell'industria dell'amido, si raggiunge un valore dell'86%. La granella e l'insilato di mais sono la fonte energetica per eccellenza nell'alimentazione dei ruminanti per cui la presenza di Aflatossina rappresenta un serio problema.

Gli autori hanno investigato sull'effetto della presenza di Aflatossine B₁ nell'insilato di mais, sugli aspetti produttivi e metabolici nella bufala mediterranea italiana.

Il campione di insilato è stato prelevato immediatamente dopo aver effettuato un taglio fresco sulla superficie. I vari sub-campioni sono stati miscelati in modo da ottenere un campione finale omogeneo e rappresentativo dell'intera massa insilata.

Si è proceduto alla determinazione della composizione chimico-nutrizionale, al contenuto in acidi grassi volati, ammoniaca, pH, potere tampone e di Aflatossina B₁.

Nelle aziende in cui il campione di alimento è risultato contaminato si è proceduto al controllo degli aspetti produttivi e qualitativi del latte proveniente dalle bufale che avevano ingerito tale alimento, oltre ai prelievi di sangue per la valutazione dei parametri ematochimici rappresentativi dei principali metabolismi.

Nel 73,3% delle aziende è stata registrata una presenza di muffe e lieviti. I valori di Aflatossine B₁ dosate e calcolati sul totale delle razioni somministrate hanno oscillato tra 2,81 a 4,72 ppb.

I parametri quanti-qualitativi del latte (kg latte prodotto, % grasso e proteine e contenuto in cellule somatiche) non sono risultati essere influenzati dalla presenza di Aflatossine nella razione. Gli acidi grassi del latte bufalino sono variati in funzione dello stato di lattazione, ma certamente non sono risultati influenzati dalla presenza di Aflatossine, anche se l'aumento degli acidi grassi a lunga catena, in particolare del C_{18:1} ha portato a ipotizzare che nel corso della lattazione ci sia stato un bilancio energetico negativo al quale l'animale ha risposto con una maggiore mobilizzazione dei grassi di deposito. I parametri ematici sono risultati essere entro i valori fisiologici.

Possiamo concludere che scarsi sono stati i livelli di micotossine nelle diete somministrate ai bufali sottoposti ad indagine sperimentale, e la dove presenti non hanno causato cambiamenti nei parametri zootecnici considerati. Le differenze significative riscontrate tra le aziende sono risultate essere imputabili più a condizioni manageriali diverse tra le aziende considerate che ad inquinamento da micotossine.

P10 SISTEMA DI MIETITREBBIATURA E DECONTAMINAZIONE DELLA GRANELLA DI MAIS DA FUMOSININE

Blandino M., Reyneri A.

Dipartimento di Agronomia, Selvicoltura e Gestione del Territorio, Università degli Studi, Torino

La richiesta di una maggiore sicurezza alimentare e di caratteristiche tecnologiche elevate si è già tradotta in una domanda di mercato più diversificata, che deve essere considerata come opportunità per gli operatori più attenti e orientati alla produzione di cereali di elevata qualità. In questo quadro l'adozione di Buone Pratiche Agricole, impostate per limitare lo sviluppo delle specie fungine responsabili della produzione di micotossine, e di Capitolati di fornitura più stringenti in merito all'integrità e alla purezza delle granelle, comporta l'adozione di sistemi di mietitrebbiatura più attenti.

Due sono i vantaggi ottenibili da una più efficace trebbiatura: un più elevato grado di pulitura permette di effettuare una prima decontaminazione del prodotto; una riduzione delle fessurazioni dei tegumenti e delle rotture della cariosside rallenta lo sviluppo delle muffe tossigene nel post raccolta e aumenta l'efficacia delle azioni di pulitura.

Per valutare e quantificare questi vantaggi, in collaborazione con CNH Italia, sono state poste a confronto in 2 località (Pavia e Cuneo): 3 tipologie di mietitrebbie (convenzionale, convenzionale di nuova generazione, assiale); 2 ibridi (con granella a frattura farinosa o compatta); 2 momenti di raccolta (umidità della granella del 32-36% e del 22-24%). Dopo un'attenta regolazione sono stati prelevati campioni al momento dello scarico del prodotto valutando per la granella: le rotture, il *cracking* (fessurazioni), la presenza di granella striminzita e di impurità, nonché la contaminazione di micotossine delle diverse frazioni.

I principali risultati hanno messo in luce: la maggiore percentuale di rotture negli ibridi a frattura farinosa e ad alta umidità di raccolta, le più frequenti fessurazioni a bassa umidità di raccolta con ibridi a frattura compatta. In tutte le condizioni operative saggiate con la mietitrebbia assiale si sono ottenuti significative riduzioni delle rotture e delle fessurazioni. In conclusione, dalla ricerca è emerso un chiaro contributo dei sistemi di trebbiatura assiali sul controllo delle micotossine.

La tipologia di mietitrebbia deve quindi essere considerata con attenzione nel quadro delle Buone Pratiche Agricole richieste per accrescere la sicurezza alimentare e le caratteristiche tecnologiche dei cereali.

P11 EFFETTO DELL'APPLICAZIONE DI INSETTICIDI E FUNGICIDI SUL CONTENUTO IN MICOTOSSINE NELLA GRANELLA DI MAIS

Blandino M. (a), Vanara F. (a), Reyneri A. (a), Pizzolato G. (b), Pietri A. (c)

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

(b) *Gruppo di Lavoro Micotossine, GLM, Bologna*

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

L'adozione di Buone Pratiche Agricole, che limitino lo sviluppo delle specie fungine responsabili dei marciumi della spiga nel corso della maturazione, può contribuire al controllo delle principali micotossine del mais. Una protezione ulteriore potrebbe essere conseguita con la lotta diretta per contrastare l'infezione delle specie fungine tossigene, che, nel mais, avviene principalmente attraverso le sete fiorali o veicolata dall'attività di insetti fitofagi, quali la piralide o la sesamia. Lo scopo di questa sperimentazione, condotta nell'ambito di un'iniziativa del Gruppo di Lavoro Micotossine (GLM), è stato quello di verificare gli eventuali vantaggi applicando mezzi di lotta diretta mediante l'applicazione di fungicidi. Nella campagna 2008 sono stati allestiti quattro campi sperimentali a Carmagnola (TO), Vigone (TO), Mantova e Rovigo. In ogni località sono stati confrontati su 2 ibridi a diversa precocità i seguenti trattamenti: (T1) testimone non trattato, (T-2) trattamento insetticida contro la piralide del mais (s.a. alfa-cipermetrina) alla maturazione latte, (T3) trattamento insetticida alla maturazione latte e doppio trattamento fungicida (s.a. prothioconazolo+tebuconazolo) all'emissione delle sete e ad inizio maturazione cerosa. Alla raccolta le spighe sono state ispezionate per la severità dell'attacco di piralide e del marciume e la granella è stata analizzata con metodiche HPLC per il contenuto in Fumonisina B₁+B₂, Deossivalenolo (DON), Zearalenone, Aflatossina B₁+B₂+G₁+G₂, tossine T-2 e HT-2. Il trattamento insetticida ha consentito una riduzione media della severità dell'attacco di piralide e del marciume della spiga rispettivamente del 52% e 58%. L'applicazione del fungicida non ha ridotto la severità degli ammuffimenti rispetto all'applicazione del solo insetticida. Il trattamento insetticida ha confermato l'azione preventiva esercitata nei confronti della contaminazione da Fumonisine, con una riduzione media del 63% rispetto al testimone non trattato. Al contrario il contenuto in DON è risultato in media del 34% superiore, mentre non si sono osservate differenze significative per il contenuto in Zearalenone. Il doppio trattamento fungicida ha permesso una chiara riduzione di tutte le principali tossine prodotte da specie del genere *Fusarium*: la contaminazione da Fumonisine, DON e Zearalenone è risultata rispettivamente del 26%, 44% e 75% inferiore a quella registrata con l'applicazione del solo insetticida. Nessun campione è risultato contaminato da Aflatossine o tossine T-2 e HT-2.

P12 DEOSSINIVALENOLO, ZEARALENONE E LORO METABOLITI NELLA FILIERA DEI CEREALI

Dall'Asta C., Galaverna G., Falavigna C., Dossena A., Marchelli R.
Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università degli Studi, Parma

Negli ultimi anni è chiaramente emerso che, in prodotti alimentari contaminati da micotossine, possono essere presenti insieme alle forme native delle micotossine molti composti correlati generati dal metabolismo della pianta o dal processo tecnologico. Questi derivati (micotossine mascherate) hanno generalmente caratteristiche chimiche molto diverse e non sono determinabili con le metodiche analitiche di *routine*. Nonostante ciò, queste forme possono liberare per idrolisi le forme native durante i processi di trasformazione o durante i processi digestivi oppure contribuire con una loro tossicità intrinseca alla tossicità globale. Questo fenomeno è in particolare correlato alle micotossine da *Fusarium* (Tricoteceni, Zearalenone, Fumonisine). Come processo di detossificazione le piante sono in grado di convertire Tricoteceni e Zearalenone in derivati più polari mediante coniugazione con zuccheri, ammino acidi o gruppi solfato, per compartimentalizzarli nei vacuoli: Zearalenone-4-glucoside e Deossinivalenolo-3-glucoside sono stati ritrovati in frumento naturalmente contaminato da *F. graminearum*. Analizzando diversi campioni di frumento naturalmente e artificialmente inoculati con *Fusarium* è stato ritrovato Deossinivalenolo-3-glucoside in concentrazione fino al 30% di quella del Deossinivalenolo, sottolineando l'importanza del contributo di queste forme alla contaminazione globale. Interessante risulta, inoltre, valutare il loro destino durante i processi tecnologici. È stato rilevato, ad esempio, un significativo aumento del contenuto di micotossine e delle loro forme glicosilate nella fase di maltazione durante la produzione della birra. Effettuando la maltazione di campioni di frumento contaminati, abbiamo riscontrato un notevole incremento delle forme acetilate del Deossinivalenolo e dello Zearalenone rispetto al frumento di partenza, probabilmente imputabili all'attivazione di processi enzimatici durante la germinazione in grado di modificare la struttura delle micotossine o di renderle maggiormente estraibili e, quindi, disponibili in seguito a rilascio da forme legate o da interazioni particolarmente forti con i macrocomponenti della matrice. I risultati sottolineano l'importanza di studiare approfonditamente questi fenomeni, anche perchè in questi casi la valutazione della contaminazione delle materie prime può non essere sufficiente per garantire la sicurezza del prodotto finito

P13 CAPACITÀ DI *TRICHODERMA HARZIANUM* DI INDURRE RESISTENZA IN MAIS LIMITANDO L'INFEZIONE DA *FUSARIUM VERTICILLIOIDES* E L'ACCUMULO DI FUMONISINE NELLA GRANELLA

Ferrigo D., Scopel C., Causin R.

Dipartimento del Territorio, Sistemi Agro-Forestali, Università degli Studi, Legnaro, Padova

Fusarium verticillioides è probabilmente il fungo maggiormente responsabile delle contaminazioni da Fumonisine nel mais prodotto in Italia. Alcune specie del genere *Trichoderma* sono in grado di indurre resistenza e sono considerate un valido metodo di biocontrollo verso alcuni funghi fitopatogeni. Nel nostro studio i ceppi *T22* e *T39* di *T. harzianum* sono stati saggiati per la loro capacità di ridurre l'infezione e l'entità delle lesioni causate da *F. verticillioides* in un ibrido di mais commerciale. A 15 giorni dal trattamento al suolo con *Trichoderma* le radici di mais risultavano ampiamente colonizzate dallo stesso, in seguito tali piante hanno mostrato una riduzione delle lesioni da *F. verticillioides* del 65% e del 59% per i ceppi *T22* e *T39* rispettivamente. La riduzione delle lesioni è risultata associata ad una netta diminuzione dei tessuti necrotizzati e dal ristabilirsi in maniera più rapida delle normali condizioni fisiologiche delle piante. Si è visto inoltre che *T. harzianum* è risultato in grado di abbattere parzialmente la carica endofitica di *F. verticillioides* riducendo in questo modo una delle potenziali fonti di infezione. Tali osservazioni sono state confermate da prove effettuate in pieno campo che hanno mostrato una diminuzione del quantitativo di micotossine nella granella. Le analisi di alcuni marcatori enzimatici coinvolti in SAR e ISR hanno mostrato come in presenza di *Trichoderma* le risposte all'infezione risultano differenti rispetto al testimone non trattato, in più tramite *real-time* PCR è stata monitorata per 96 ore la cinetica di accumulo dei trascritti dei principali enzimi coinvolti confermando l'avvenuta induzione di resistenza. Questi risultati mostrano come *Trichoderma harzianum* possa essere usato efficacemente come strumento di biocontrollo in mais contro *Fusarium verticillioides*.

P14 RICERCA DI AFLATOSSINA B₁ IN CONSERVE ALIMENTARI CONTENENTI FARINA DI ANACARDI

Ferro M. (a), Terzano L. (b)

(a) Dipartimento Provinciale di Genova, ARPAL, Genova

(b) Struttura Complessa Igiene degli Alimenti e della Nutrizione, ASL I Imperiese, Imperia

La noce di anacardo, originaria di Paesi tropicali, è un prodotto a rischio per lo sviluppo, nelle fasi di coltivazione, raccolta e stoccaggio, di muffe produttrici di micotossine. La farina di anacardi viene utilizzata dalle aziende alimentari in prodotti quali il pesto di basilico alla genovese in sostituzione o in aggiunta agli altri ingredienti tipici della ricetta originaria (i pinoli e le noci comuni).

Nel dicembre 2007 a seguito di controlli operati dai carabinieri del NAS presso importatori di Genova sono pervenute diverse segnalazioni di non conformità relative a farina di anacardi di origine vietnamita risultata contaminata per Aflatossina B₁ e/o totali oltre limiti previsti dal Regolamento CE 1881/06; poiché nella Provincia di Imperia sono presenti numerose aziende alimentari a carattere artigianale o piccolo industriale che producono pesto e altre salse sotto forma di conserve, potenziali utilizzatrici di tale ingrediente, a partire dal 2008 è stata introdotta nel piano di controllo annuale del nostro servizio una sezione dedicata alla verifica della presenza di Aflatossina B₁ e totali nel pesto ligure ed in eventuali altre salse contenenti anacardi. Ad oggi sono stati prelevati 26 campioni fra pesto (20) e salse di noci (6) di cui 22 presso aziende locali e 4 presso aziende non presenti sul nostro territorio; in questi prodotti la farina di anacardi risulta presente in proporzione variabile dal 4% al 34% circa.

I campioni sono stati analizzati dal laboratorio del Dipartimento ARPAL di Genova in cromatografia liquida ad alta risoluzione previa purificazione in colonna di immunoaffinità. I dati rilevati sui 26 campioni analizzati mostrano una incidenza di contaminazione per le Aflatossine (limite di rilevazione pari a 0,015 µg/kg) pari all'85% con un valore massimo di 1,6 µg/kg per l'Aflatossina B₁ e 2,5 µg/kg per la somma di Aflatossina B₁, B₂, G₁ e G₂; il 38% dei campioni presenta un *range* di contaminazione per Aflatossina B₁ compreso fra 0,1 e 0,5 µg/kg ed il 19% valori superiori a 0,5 µg/kg.

Si evidenzia come all'aumentare della quantità di farina di anacardi utilizzata aumentino le probabilità di riscontrare una contaminazione da Aflatossine (in particolare B₁) nel prodotto finito.

La farina di anacardi utilizzata dalle aziende controllate risulta di origine brasiliana o vietnamita. Non risulta che la Commissione Europea abbia stabilito condizioni particolari per l'importazione di farina di anacardi proveniente dal Vietnam o dal Brasile a causa del rischio di contaminazione da Aflatossine.

P15 MONITORAGGIO IN CAMPO DELLA FUSARIOSI DELLA SPIGA DI FRUMENTO DURO E DELL'ACCUMULO NELLE CARIOSIDI DI MICOTOSSINE CORRELATE, NELLE MARCHE

Flamini L. (a), Talevi S. (a), Pizzichini L. (a), Ritieni A. (b), Moretti A. (c)

(a) ASSAM, Servizio Fitosanitario Regionale, Ancona

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

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

La coltivazione di frumento duro nelle Marche rappresenta una delle colture più importanti per quanto riguarda la produzione agricola regionale con i suoi 120.000 ettari, per una produzione media di circa 4,5 tonnellate per ettaro. La fusariosi della spiga di frumento è causata da un complesso di specie fungine appartenenti al genere *Fusarium*, fra le quali le principali sono *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* e *F. poae*. Ognuna di queste specie è in grado di produrre un profilo specifico di metaboliti tossici sia per le piante, sia per l'uomo e gli animali. Fra questi, sono importantissimi i Tricoteceni, potenti inibitori della sintesi proteica, la cui presenza nel frumento duro e prodotti derivati è regolata a livello di Unione Europea da severi limiti di contaminazione. Per quattro anni, dalla stagione 2005 a quella 2008, sono stati monitorati circa 10 campi di frumento duro sparsi nella Regione, in zone caratterizzate da un'ampia gamma di condizioni pedo-climatiche. Per ogni campo, i dati hanno incluso la presenza e la quantificazione nella cariosidi al raccolto di DNA delle specie di *Fusarium* sopra citate, l'analisi dei Tricoteceni, e i parametri climatici quali umidità relativa, temperatura e precipitazioni, dall'infiorescenza al raccolto. Dai dati di campo, abbiamo ottenuto indicazioni importanti sulla prevalenza e sulle interazioni delle diverse specie coinvolte nella fusariosi. Fra le indicazioni più importanti, abbiamo individuate in *F. poae* la specie più frequentemente presente nelle spighe, nei quattro anni mentre *F. graminearum* è stata la specie più frequente in particolare negli anni in cui le condizioni climatiche più fredde e piovose hanno determinato un aumento della fusariosi. La contaminazione da micotossine è stata molto altalenante in funzione delle condizioni climatiche con particolari picchi nel 2008. In particolare, comunque, alcuni campi hanno mostrato una contaminazione molto elevata di Deossinivalenolo e Nivalenolo, con valori a volte al di sopra dei limiti massimi consentiti dalla Unione Europea; inoltre, anche di T-2 e HT-2, per le quali l'Unione Europea è in procinto di fissare dei limiti di contaminazione del frumento, erano spesso frequenti a livelli vicini ai limiti in discussione. Infine, i dati ottenuti hanno evidenziato che il rischio accumulo micotossine nel frumento duro nelle Marche può divenire alto quando si determinano particolari condizioni climatiche e deve essere costantemente tenuto sotto controllo.

P16 INFLUENZA DEL SUOLO SULLA PRODUZIONE DI OCRATOSSINA A LUNGO LA FILIERA VITIVINICOLA

Gebbia N., Monte M., Aiello G., Calderone A., Cannizzaro F., Curione A., Lo Giudice A., Montalbano M., Oliveri F., Crosta L.

Consorzio di Ricerca sul Rischio Biologico in Agricoltura, CoRiBiA, Palermo

Tra i contaminanti biologici dei prodotti vegetali e zootecnici le micotossine rivestono un ruolo di estrema importanza per la salute umana. Nella filiera vitivinicola i generi responsabili della produzione di Ocratossina A (OTA) sono *Aspergillus* e *Penicillium*. Tra il genere *Aspergillus*, la specie *A. carbonarius* è il principale agente di contaminazione da OTA nelle Regioni meridionali, dove le condizioni pedo-climatiche ne favoriscono lo sviluppo. In letteratura sono riportati gli effetti negativi dell'OTA sulla salute umana, quali l'azione neurotossica, nefrocancerogena, teratogena, e immunodepressiva. L'obiettivo della ricerca è stato quello di studiare gli effetti del terreno sulla resistenza/sensibilità della vite all'attacco del fungo ocratossigeno *A. carbonarius* e sulla produzione di OTA lungo la filiera vitivinicola. La seguente ricerca è stata condotta su due siti sperimentali con situazioni pedologiche differenti, nello specifico il contenuto di calcare è la variabile considerata, e la *cultivar* a bacca rossa "Nero d'Avola", innestata sullo stesso portinnesto, è stata individuata per la prova. Il microclima dei due ambienti è stato caratterizzato recependo i dati dalle stazioni del servizio agrometeorologico della Regione Sicilia. Per rilevare le caratteristiche chimico-fisiche del terreno ci si è avvalsi di analisi pedologiche di *routine*. Sulle piante, sono stati valutati visivamente i sintomi clorotici e sulle foglie sono state effettuate le analisi chimiche per determinare le diverse concentrazioni di elementi minerali. Sulle piante non clorotiche, per annullare l'effetto della luce, manualmente si è proceduto alla creazione di uguali livelli di esposizione dei grappoli; a tal fine sono stati effettuati rilievi di caratterizzazione della chioma (metodo dei contatti o del *Point Quadrat*). Il campionamento dei grappoli è stato condotto a partire dall'invaiaatura. Alla raccolta sono state effettuate le micro-vinificazioni su cento chilogrammi di uva per replica. I campioni di uva e di mosto, distinto per tesi, sono stati destinati all'indagine quali-quantitativa della presenza/assenza di OTA e a quella molecolare, volta all'identificazione dell'*Aspergillus carbonarius*. Dalle analisi effettuate sulle uve si evince che la concentrazione di Ocratossina A risulta maggiore nelle uve provenienti dal vigneto con una dotazione di calcare del suolo superiore. I risultati sul mosto prima e sul vino dopo, hanno comunque evidenziato la presenza di OTA in concentrazioni molto al di sotto del limite di legge (2 ppb). La concentrazione di OTA è stata altresì correlata al contenuto in stilbeni.

In conclusione si evidenzia sulle uve una correlazione positiva tra la contaminazione fungina, confermata dall'analisi molecolare, e il contenuto di calcare attivo sul suolo.

P17 EFFICACIA DI FUNGICIDI A BASE DI PROTIOCONAZOLO CONTRO LA FUSARIOSI DELLA SPIGA DEL FRUMENTO E L'ACCUMULO DI DEOSSINIVALENOLO NELLE CARIOSSIDI

Haidukowski M. (a), Pascale M. (a), Visconti A. (a), Pancaldi D. (b), Risi C. (c), Balestrazzi R. (c)

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

(b) *Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare, DIPROVAL, Università degli Studi, Bologna*

(c) *Bayer CropScience, Milano*

La "fusariosi della spiga" del frumento è una sindrome causata principalmente da funghi del genere *Fusarium* e *Microdochium* che, in condizioni ambientali favorevoli, possono colonizzare la pianta durante il proprio ciclo produttivo arrecando gravi danni sia di tipo quantitativo che qualitativo alla produzione. Inoltre alla malattia è spesso associata la presenza nelle cariossidi del Deossinivalenolo (DON), una micotossina prodotta da *F. culmorum* e *F. graminearum* che causa effetti neurotossici ed immunotossici nei mammiferi ed è responsabile di sindromi emetiche e anoressiche negli allevamenti zootecnici. Il Protioconazolo è un fungicida sistemico ad ampio spettro d'azione, appartenente alla classe dei triazolintioni, in grado di controllare varie patologie dei cereali, migliorandone la produzione, sia quantitativamente che qualitativamente. Allo scopo di valutare l'efficacia dei trattamenti di difesa in campo con fungicidi a base di Protioconazolo sull'incidenza e gravità della fusariosi della spiga del frumento, sulle rese di produzione e l'accumulo di DON nelle cariossidi, sono state effettuate diverse prove sperimentali nel corso di quattro annate agrarie consecutive (dal 2004 al 2008). Le prove sono state effettuate su due varietà di frumento tenero (Blasco e Serio) e due varietà di frumento duro (Saragolla e San Carlo) in diverse aree cerealicole del Nord di Italia. La sperimentazione è stata condotta su frumento inoculato artificialmente in campo con una miscela di isolati di *F. graminearum* e *F. culmorum*, noti agenti causali della fusariosi della spiga. I trattamenti con i fungicidi contenenti Protioconazolo hanno ridotto significativamente in tutte le *cultivar* testate sia l'incidenza e la gravità della malattia (fino al 70%), sia il contenuto di DON nelle cariossidi (fino al 90%) e hanno incrementato la produzione da 0,5 a 6,0 t ha⁻¹ (media 2,0 t ha⁻¹) rispetto al testimone inoculato e non trattato con fungicidi e rispetto ai trattamenti con Tebuconazolo o con una miscela Ciproconazolo+ Procloraz.

P18 FATTORI INFLUENTI SULLO SVILUPPO FUNGINO NELLA GRANELLA DI MAIS: EFFETTO DELLA TEMPERATURA SU UMIDITÀ E WATER ACTIVITY DURANTE LA MATURAZIONE

Maiorano A., Mancini M.C., Reyneri A.

Dipartimento di Agronomia, Selvicoltura e Gestione del Territorio, Università degli Studi, Torino

La crescita dei funghi tossigeni e la sintesi delle micotossine nella granella di mais sono influenzati dalla temperatura e dalla disponibilità di acqua delle cariossidi durante il processo di maturazione. Normalmente, durante la maturazione, il parametro più comunemente utilizzato e il più facile da reperire per descrivere la presenza di acqua nelle cariossidi è l'umidità della granella. Questo parametro è facile da ottenere ma non descrive sufficientemente la disponibilità di acqua per i funghi tossigeni, disponibilità che invece è meglio descritta dalla *water activity* (a_w). La relazione esistente tra il contenuto d'acqua e la a_w a temperatura e pressione costanti si chiama isoterma di sorbimento. Questa è una relazione che dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche del substrato. Ne consegue che ogni substrato ha una sua isoterma caratteristica. Conoscere l'isoterma, significa poter sapere a temperatura ed umidità noti, se esistono le condizioni di a_w per lo sviluppo fungino. Tale relazione varia però con la temperatura. L'escursione di temperatura estiva a cui è sottoposta la spiga di mais durante la maturazione (15-40°C), può quindi far variare giornalmente questa relazione. Questa ricerca ha avuto come obiettivi: i) osservare il rapporto tra l'umidità e la a_w durante la maturazione della granella; ii) determinare le isoterme di sorbimento per il mais a 15, 25 e 40°C; iii) analizzare l'effetto della temperatura sulle isoterme di sorbimento; iv) sviluppare un algoritmo per calcolare la a_w in qualsiasi condizione di umidità e temperatura compresa nel *range* 15-40°C. Durante la campagna 2007, campioni di mais (3 ripetizioni) sono stati raccolti due volte la settimana da due campi in Piemonte, a partire dal 60% di umidità della granella fino al 17%. La a_w è stata analizzata entro 10 minuti dalla raccolta. Gli stessi campioni sono poi stati essiccati in stufa per la determinazione del contenuto di umidità. Sei diversi modelli matematici sono stati confrontati per descrivere le isoterme di sorbimento. Il modello di Clausius-Clapeyron è stato invece utilizzato per descrivere la relazione tra temperatura e isoterme. La ricerca ha permesso di: i) determinare le isoterme di sorbimento per la granella di mais a 15°C, 25°C e 40°C attraverso il modello di Chung-Pfost che è risultato essere il migliore tra i sei analizzati; ii) analizzare la relazione tra temperatura, umidità e a_w per la granella di mais e di poter quindi calcolare la a_w in qualsiasi condizione di temperatura e umidità con il modello di Clausius-Clapeyron; iii) sviluppare un algoritmo per il calcolo della a_w utilizzabile in modelli di simulazione della crescita fungina nella granella di mais.

P19 STUDIO PRELIMINARE DI UN SISTEMA DI DECONTAMINAZIONE DELL'OCRATOSSINA A SUI PRODOTTI DI SALUMERIA

Pincioli T. (a), Passerò E. (b), Chiesa L.M. (a), Cantoni C. (a), Biondi P.A. (b)

(a) *Laboratorio di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Milano*

(b) *Laboratorio di Biochimica degli Alimenti, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Milano*

Le ocratossine sono un importante gruppo di micotossine tra cui la più rilevante è l'Ocratossina A (OTA). L'OTA è il prodotto del metabolismo secondario di miceti dei generi *Aspergillus* e *Penicillium* e ha effetti epatotossici, nefrotossici, teratogenetici e cancerogenetici. Muffe produttrici di OTA sono in grado di svilupparsi su molti alimenti, soprattutto in fase di conservazione e stagionatura (cereali, frutta secca, caffè, cacao, spezie, liquirizia, vino, birra) e sulla superficie dei salumi. In Italia, per quanto riguarda i prodotti carnei, la Circolare del Ministero della Sanità n. 10 del 9 giugno 1999 ha fissato il limite massimo di 1 µg/kg di OTA nella carne suina e prodotti derivati.

In questa ricerca preliminare sono stati analizzati salami provenienti dal Nord Italia per la rilevazione e la quantificazione di OTA nel budello e nella parte edibile a cuore del prodotto. Per ogni produttore è stato analizzato un campione tal quale ed un campione sottoposto a spazzolatura meccanica. Il procedimento analitico ha seguito la metodica descritta da Chiavaro (2002). I campioni, di budello e parte edibile prelevata a cuore, sono stati estratti con una soluzione di metanolo e bicarbonato di sodio; l'estratto è stato diluito con PBS contenente 0,01% di Tween 20 e filtrato; successivamente l'OTA è stata isolata con colonna di immunoaffinità (Ochratest, VICAM).

La quantificazione di OTA è stata eseguita tramite HPLC con rivelazione fluorimetrica e standardizzazione esterna; la curva di calibrazione è risultata lineare nell'intervallo 0,4-50 ppb e il limite di rivelazione (LOD) è risultato di 0,2 ppb.

Il livello di contaminazione più basso rilevato sul budello è risultato inferiore a LOD mentre quello più alto è risultato di 146 ppb. Il livello medio di contaminazione dei budelli non spazzolati è risultato essere elevato (58 ppb), mentre quello dei budelli spazzolati decisamente più basso (11 ppb).

È stato possibile verificare che il contenuto di OTA nel budello viene ridotto tramite la spazzolatura del 60-90%. Da lavori precedenti si evidenzia che è possibile diminuire del 100% la contaminazione da OTA, utilizzando idonee spazzolatrici meccaniche che utilizzino anche un sistema di lavaggio ad acqua e aspirazione.

Le analisi a cuore del prodotto hanno rivelato un livello di contaminazione sempre inferiore al valore di LOD; questo dimostra che l'OTA presente sulla superficie del budello non è stata in grado di penetrare all'interno del prodotto. Per i campioni analizzati viene dunque rispettato il limite della Circolare Ministeriale di 1 µg/kg.

P20 MONITORAGGIO DELLA PRESENZA DI DEOSSINIVALENOLO (DON) NELLA GRANELLA DI FRUMENTO TENERO

Plizzari L. (a), Scudellari D. (b), Cattaneo M. (a), Corbellini M. (a), Brandolini A. (a), Pascale M. (c), Desiderio E. (d)

(a) CRA-SCV, S. Angelo Lodigiano, Lodi

(b) CRPV, Filiera Grandi Colture e Sementi, Imola

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

(d) CRA-QCE, Roma

Allo scopo di monitorare la contaminazione da micotossine nei cereali, è stato avviato un apposito progetto di ricerca di durata triennale (2005-2008) denominato "Valutazione e controllo della contaminazione da micotossine nelle produzioni cerealicole nazionali - MICOCER", coordinato dal CRA-QCE di Roma. Nell'ambito di tale Progetto, nel biennio 2006-2007 è stata allestita una rete di monitoraggio per la presenza di Deossinivalenolo (DON) in frumento tenero nel Centro-Nord Italia che ha consentito di analizzare 1.267 campioni. In seguito all'andamento climatico della primavera 2008, che ha favorito massicci attacchi di fusariosi, è stato ritenuto opportuno effettuare anche per l'annata agraria 2007-08 circa 200 analisi, inizialmente non previste all'interno del progetto.

I livelli di DON sono stati determinati con metodo ELISA e verificati per HPLC. I risultati hanno garantito la buona affidabilità dei dati ottenuti con ELISA.

I campioni che hanno mostrato un contenuto di DON inferiore a 18,5 ppb (parti per miliardo), limite di rilevabilità del metodo ELISA sono stati considerati come negativi. I risultati del monitoraggio effettuato sulla granella nel 2005-06 mostrano una limitata incidenza di contaminazione da DON e un livello medio di contaminazione dei campioni positivi pari a 190 ppb, un valore largamente inferiore al limite massimo di 1.250 ppb fissato dall'UE. I risultati relativi alla stagione 2006-07 evidenziano un quadro simile a quello della stagione precedente, con un livello medio di contaminazione dei campioni positivi pari a 245 ppb. In entrambi gli anni pochissimi campioni hanno presentato un livello di contaminazione superiore a 1.250 ppb.

Relativamente al terzo anno di monitoraggio (annata agraria 2007/2008), a causa delle sfavorevoli condizioni atmosferiche la quasi totalità dei campioni dell'areale Nord sono risultati positivi, con un livello medio di contaminazione dei campioni positivi pari a 1.126 ppb.

In conclusione è possibile affermare che nel biennio 2005-2007 l'incidenza della contaminazione da DON è stata generalmente bassa, con valori quasi sempre al di sotto dei limiti legislativi citati in precedenza. Ben più grave è invece risultata la situazione dell'annata agraria 2007-08 con livelli medi di contaminazione prossimi o uguali al 100% e valori massimi di DON spesso superiori al limite di 1.250 ppb negli areali del Nord; tale limite non è invece stato mai raggiunto negli areali dell'Italia centrale.

P21 1999-2009: AFLATOSSINA M₁ NEL LATTE, UN PROBLEMA RISOLTO?

Sillari L., Casarini E., Zaniboni A., Grozeva K.
Newlat Spa, Stabilimento Giglio, Reggio Emilia

Nel 1999 Newlat iniziò ad elaborare un piano aziendale di gestione del rischio Aflatossine, mediante analisi di *ruotine* sul latte in entrata e intervento diretto sugli allevatori il cui prodotto non fosse conforme. In occasione del 1° Congresso Nazionale sulle Micotossine tenutosi a Roma presso l'Istituto Superiore di Sanità nel 2004, Newlat presentò un lavoro dal titolo "Aflatossina M₁ nel latte, un problema risolvibile" in cui si illustrava questo piano di controllo, e l'ottimo risultato che diede durante l'episodio di grave contaminazione verificatosi durante la stagione 2003-2004.

Oggi dopo 10 anni di monitoraggio delle micotossine nel latte, è possibile fare un bilancio dell'attività svolta, capire come sia cambiato l'approccio degli operatori della filiera nei confronti del problema e in quale misura la contaminazione interessi ancora il prodotto.

All'inizio, infatti, la questione è stata affrontata in maniera piuttosto disomogenea dagli operatori (nonostante il rispetto del vincolo di legge), ma dopo la crisi del 2003-2004 c'è stata una notevole evoluzione in fatto di attenzione e sensibilità al problema, che ha favorito un notevole sviluppo tecnico e gestionale che ha influito positivamente sulla qualità del prodotto finito. Leggendo i dati raccolti da Newlat, considerando ad esempio il limite di concentrazione di 20 ppt di Aflatossina M₁ adottato come standard aziendale al di sopra del quale interviene presso gli allevatori per limitare la contaminazione, si è passati da una percentuale sul totale di campioni analizzati del 40% nel periodo tra il 1999 e il 2003, al 63% nel biennio 2007-2008. Valutando invece la percentuale sul totale di campioni con valori superiori a 40 ppt (soglia di attenzione in quanto il limite di legge è 50 ppt), si nota che si è partiti nel 1999 con una percentuale di circa il 10%, fino ad arrivare nel biennio 2007-2008 a valori prossimi all'1%, i più bassi fino ad ora.

Alla luce di questi dati si può concludere che 10 anni di lavoro hanno permesso a Newlat non solo di controllare il fenomeno della contaminazione dell'Aflatossina M₁ nel latte, ma di incrementarne notevolmente la qualità fornendo un prodotto altamente sicuro.

Essendo Newlat un'azienda largamente presente sul mercato, si può dire che con il lavoro svolto abbia contribuito, assieme anche agli altri operatori della filiera, a far sì che il problema Aflatossina M₁ nel latte sia passato dall'essere un'emergenza ad essere un fenomeno sotto controllo.

P22 INDAGINE SUL LIVELLO DI CONTAMINAZIONE DA TRICOTECENI IN CEREALI MINORI, FINALIZZATA ALLO SVILUPPO DI UN SISTEMA INTEGRATO PER IL CONTROLLO DELLE FUSARIOSI DELLA SPIGA

Terzi V. (a), Morcia C. (a), Faccioli P. (a), Spini M. (a), Faccini N. (a), Biselli S. (b), Germeier C.U. (c), Herrmann M.H. (d), Polisenska I. (e)

(a) CRA-GPG, Genomics Research Centre, Fiorenzuola d'Arda, Piacenza

(b) Eurofins Analytik GmbH, Hamburg, Germany

(c) Julius Kuehn Institute, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Breeding Research on Agricultural Crops, Quedlinburg, Germany

(d) Julius Kuehn Institute, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Breeding Research on Agricultural Crops, Groß Lüsewitz, Sanitz, Germany

(e) Agrotest Fyto, Ltd, Kromeriz, Czech Republic

La presenza di *Fusaria* tossigeni e delle relative micotossine in prodotti cerealicoli è influenzata da una serie di fattori, che comprendono, oltre alle peculiarità climatiche delle macroaree, all'andamento stagionale, ai sistemi di produzione agricola, alle pratiche agronomiche, ai processi di raccolta-condizionamento-stoccaggio ed al tipo di trasformazione-utilizzazione anche le caratteristiche genetiche della specie e della varietà cerealicola coltivata. Le diverse attività di monitoraggio per il controllo del problema sono state focalizzate, tra i cereali a paglia, in particolare sui frumenti. Tuttavia interessante appare la valutazione per contenuto in Tricoteceni in altre specie cerealicole, quali orzo, avena e triticale. Nell'ambito dei progetti MICOCER ed AveQ attività di monitoraggio su di un alto numero di accessioni di queste specie sono state realizzate sia sul territorio nazionale che europeo.

P23 DETERMINAZIONE DI TRICOTECENI A E B IN CEREALI MEDIANTE GC-MS E IONIZZAZIONE CHIMICA POSITIVA

Barcarolo R., Tealdo E.

Veneto Agricoltura, Istituto per la Qualità e le Tecnologie Agroalimentari, Thiene, Vicenza

La determinazione analitica dei Tricoteceni è di grande interesse analitico. Generalmente per la misura simultanea dei Tricoteceni A e B viene utilizzata la cromatografia liquida accoppiata con spettrometria MS/MS. Pur se molto efficace e sensibile la tecnica risulta costosa e non sempre disponibile nei laboratori. La GC-MS, in particolar modo accoppiata con la ionizzazione chimica, si è dimostrata una valida alternativa a costo decisamente inferiore nei confronti della LC-MS/MS. Viene proposto un metodo GC-MS/PCI che permette la misura di Nivalenolo, DON, 15 ac. DON, 3 ac. DON, T-2 ed HT-2 con campi di misura differenziati in relazione alle concentrazioni normalmente presenti nei cereali (DON a livello di mg/kg, DON metaboliti intorno a 10-100 µg/kg e T-2/HT-2 tra 1-50 µg/kg). Il campione finemente macinato viene estratto con una miscela 84:16 di acetonitrile/acqua, agitato per 1 ora e filtrato. Il *clean up* viene effettuato mediante assorbimento su colonne Mycosep 227 (Romer) e 2 ml di estratto vengono trasferiti in vial da 4 ml ed evaporati mediante azoto a 50°C in un sistema chiuso che evita l'ingresso di aria. La acilazione viene ottenuta mediante aggiunta di 1 ml di soluzione 95:5 toluene/acetonitrile contenente 2 mg/ml di trietilamina (*scavenger*) e 40 µl di Anidride Trifluoroacetica (TFAA). Dopo reazione per 25' a 80°C, si effettua un lavaggio con 1 ml di tampone fosfato 1M a pH 6 e la fase contenente i trifluoro derivati, dopo concentrazione, è pronta per la misura strumentale. La misura GC-MS viene effettuata mediante ionizzazione chimica con ioni positivi che permette di diminuire la frammentazione dei derivati con incremento quindi di sensibilità e di specificità. Nella Regione di eluizione del DON viene automaticamente diminuita la tensione dell'elettromoltiplicatore in modo da potere contemporaneamente trattare campioni contenenti anche 10 mg/kg di DON e contaminazione residua da T-2/HT-2 a livello di µg/kg. La linearità si è dimostrata buona per tutte le molecole considerate, mentre lo *step* più critico è risultato essere la fase di acilazione che richiede, per poter avvenire con buona riproducibilità, la dissoluzione dell'estratto mediante un opportuno solvente.

P24 SVILUPPO ED APPLICAZIONE DI UN NUOVO ELISA PER L'ANALISI DI SCREENING DELL'OCRATOSSINA A NEL CIOCCOLATO

Bastiani E. (a), Iafrate E. (b), Gombac F. (a), Perrotta M. (a), Tarantino C. (a), Pellis V. (a), Brera C. (b)

(a) Euroclone SpA, Milano

(b) Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'Ocratossina A (OTA A) è un metabolita secondario prodotto da funghi appartenenti per lo più ai generi *Aspergillus* e *Penicillium*. L'OTA ha attività nefrotossica, teratogena, immunosoppressiva e cancerogena. Molti sono gli alimenti interessati dalla contaminazione da parte di questa micotossina (cereali, caffè, frutta secca, vino, spezie ecc.) tra cui anche il cacao. Con la Circolare n. 6 del 28/11/2003 (GU 286 10/12/003) in Italia, viene fissato il limite massimo ammissibile a 0,5 µg/kg per l'Ocratossina A nel cioccolato.

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di sviluppare e di fare una prima valutazione di un sistema ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) competitivo adatto allo *screening* dell'OTA A nel cioccolato. Per poter determinare la presenza di OTA A al limite imposto dalla legislazione italiana, il nuovo sistema ELISA è stato messo a punto a partire da un test già disponibile, modificando il design del saggio in modo da ottenere un aumento di capacità di rilevazione e di sensibilità. In questo nuovo ELISA è stata impiegata una fase solida ottenuta adsorbendo gli anticorpi specifici anti Ocratossina A direttamente ai pozzetti di una micropiastra. Durante il test, le soluzioni standard di OTA A ed i campioni vengono addizionati alla fase solida. Dopo una breve incubazione, viene aggiunto il coniugato enzimatico (OTA-HRP). La competizione avviene tra l'OTA libera e quella legata all'enzima per gli stessi siti di legame degli anticorpi specifici. Dopo una fase di lavaggio per rimuovere tutto ciò che non si è legato alla fase solida in maniera specifica, si procede a rilevare l'attività enzimatica per aggiunta di un substrato cromogeno. Il segnale ottenuto misurando l'assorbanza a 450 nm è inversamente proporzionale alla concentrazione di Ocratossina A. Per la preparazione dei campioni è stata valutata un'estrazione veloce in tampone bicarbonato/PEG in confronto ad una purificazione su IAC.

Grazie all'intervallo di quantificazione ottenuto per il nuovo ELISA (0,010-1,28 ng/ml), il test sviluppato si candida ad essere idoneo all'analisi dell'OTA nel cioccolato e comunque si dimostra potenzialmente in grado di soddisfare la richiesta analitica di monitorare la presenza della micotossina a basse concentrazioni anche in altre matrici (ad esempio *baby food*). I dati preliminari ottenuti suggeriscono che una procedura rapida di preparazione del campione può essere applicata con successo a campioni di cioccolato con contenuto di cacao $\leq 35\%$. Per campioni con contenuto di cacao $\geq 35\%$ è richiesta una purificazione su IAC in modo da renderli idonei all'analisi in ELISA.

P25 ANALISI MULTIRESIDUO DI MICOTOSSINE IN CEREALI PER LA PRIMA COLAZIONE E BABY FOOD CON TECNICA HPLC/FLUORIMETRO E HPLC/MS/MS

Bergamini C., Romagnoli B., Ferrari M.

Riferimento Analitico Regionale, RAR, Alimenti, OGM e Biosicurezza, Sezione Provinciale di Bologna, ARPA Emilia-Romagna, Bologna

Nel controllo ufficiale dei cereali destinati alla alimentazione umana sono previsti limiti per diverse classi di micotossine, è quindi necessario sviluppare dei metodi analitici multiresiduo che permettano di estrarre e quantificare con una sola colonna più micotossine contemporaneamente, inoltre, in vista dei prossimi limiti di legge, si è reso necessario validare un metodo per la determinazione di T-2 ed HT-2.

Per l'estrazione simultanea di Aflatossine ed Ocratossina A sono state utilizzate le colonne di immunoaffinità AlfaOchra-Vicam, gli estratti sono stati analizzati in HPLC/Fluorimetro come previsto nei metodi AOAC, accreditati SINAL. Il range di linearità è compreso tra: 0,1-20 ng/mL per OTA, 0,1-4 ng/mL per AFB₁ e AFG₁, 0,03-1,5 ng/mL per AFB₂ e AFG₂. Gli LDR sono 0,05 µg/kg per OTA e AFB₁ e AFTot. Il R% varia da 90-100% per OTA e 75-95% per AFB₁ e AFTot, sono stati valutati in campioni contaminati artificialmente a livelli corrispondenti ai limiti di legge: 0,5 e 4,0 µg/kg per OTA, 0,1 e 2 µg/kg per AFB₁ e AFTot.

Per la ricerca di DON, ZEA, T-2 ed HT-2 sono state impiegate le colonne di immunoaffinità DTZ (R-Biopharm) gli eluati analizzati in HPLC/MS/MS (Quattro MicroTM API, Waters) mediante tecnica di ionizzazione electrospray in modalità MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), passando da ESI⁻ per DON e ZEA a ESI⁺ per T-2 e HT-2. Per l'ottimizzazione dei parametri di massa è stata utilizzata una miscela contenente DON 4 µg/ml, ZEA 2,5 µg/ml, e T-2 e HT-2 2 µg/ml in metonolo/acqua (5mM acetato di ammonio). Sono stati scelti rispettivamente per DON e ZEA i frammenti con m/z 295 e m/z 160 per la quantificazione e m/z 295 e m/z 132 per la conferma. Per T-2 e HT-2 i frammenti con m/z 305 e m/z 263 per la quantificazione e per la conferma con m/z 215 per entrambi. Il range di linearità del metodo è compreso tra: 40-800 ng/mL per il DON, 10-260 ng/mL per lo ZEA e 8-200 ng/mL per le T-2 e HT-2. Gli LDR sono 50 µg/kg per DON, 6 µg/kg per ZEA, 3 µg/kg per T-2 e 8 µg/kg per HT-2.

Il recupero percentuale è stato calcolato ad una concentrazione, per ogni micotossina, corrispondente al tenore massimo permesso nei cereali prima colazione (livello alto) e nei *baby food* (livello basso). In entrambi i casi, i recuperi sono uguali al 70% per DON e ZEA e al 100% per T-2 e HT-2. I parametri di validazione ottenuti rientrano nei limiti richiesti dal Regolamento CE 401/2006.

P26 UTILIZZO DI UN PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE PER L'OCRATOSSINA A DAL PROSCIUTTO PER ANALISI IN ELISA E HPLC

Brera C. (a), Bastiani E. (b), Gombac F. (b), Perrotta M. (b), Tarantino C. (b), Pellis V. (b), Fasano F. (a)

(a) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Euroclone Spa, Milano*

L'Ocratossina A (OTA) è una micotossina prodotta da numerose specie fungine appartenenti ai generi *Penicillium*, principalmente diffuso nelle Regioni temperate, ed *Aspergillus*, presente nelle Regioni tropicali. Le micotossine come l'OTA si formano durante la crescita delle colture e si sviluppano in seguito, durante lo stoccaggio, grazie alle condizioni di umidità degli ambienti di lavorazione che sono favorevoli alla proliferazione di muffe. Le principali fonti di esposizione sono i cereali e i prodotti a base di cereali, le leguminose, il caffè, la birra, il succo d'uva, l'uva passita, il vino, i prodotti a base di cacao, le noci e le spezie. L'OTA è inoltre presente inoltre nei mangimi animali.

L'Ocratossina A ha un'attività essenzialmente nefrotossica. Le intossicazioni principali causate dall'Ocratossina A negli allevamenti zootecnici sono la nefropatia dei suini e la nefropatia aviaria entrambe associate al consumo di cereali contaminati da Ocratossina A. In dosi diverse può risultare anche immunotossica, cancerogena e genotossica e ad alte concentrazioni può causare comparsa di epatiti, enteriti e necrosi del tessuto linfatico. La tossina va ad accumularsi nei tessuti, rendendo potenzialmente tossiche e carcinogeniche anche le carni di animali che si siano nutriti di cibi contaminati. Tuttavia, l'OTA contenuta nella carne, nel latte e nelle uova degli animali alimentati con mangimi contaminati è stata considerata una fonte trascurabile per l'esposizione umana. Un altro fattore favorevole alla produzione di micotossine è, anche, il lungo periodo di maturazione/stagionatura di alcuni alimenti. Diverse specie di muffe sono in grado di metabolizzare tossine perché si sviluppano in prodotti stagionati per lunghi periodi come i salami e i prosciutti, sulla cui superficie sono state isolate specie di *Penicillium* e di *Aspergillus*. L'esposizione umana all'OTA è stata confermata attraverso l'individuazione della presenza di questa micotossina in campioni di sangue, urine e latte di soggetti sani.

L'esigenza, quindi, di identificare un metodo affidabile e semplice per rilevare la presenza di OTA nelle carni animali e soprattutto nei prodotti stagionati, quali ad esempio il prosciutto, è diventata sempre più cogente.

In questo studio è stato utilizzato un protocollo di estrazione che utilizza una miscela di metanolo e sodio carbonato. I campioni così estratti sono stati analizzati in ELISA e HPLC.

Lo studio ha confermato l'affidabilità del metodo di estrazione sia per analisi con metodi di *screening* (ELISA) che HPLC. L'intervallo di concentrazione entro cui i metodi sono stati testati è stato di 0,22 µg/kg (limite di quantificazione) e 2,4 µg/kg.

P27 SVILUPPO DI UN METODO UPLC/HPLC DI DETERMINAZIONE MULTIMICOTOSSINA NEI MANGIMI

Brera C., Berdini C., Pannunzi E., Debegnach F., De Santis B., Gregori E., Miraglia M.
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La filiera zootecnica è esposta alle contaminazioni da parte delle micotossine in due momenti distinti, in campo ad opera dei metaboliti delle specie fungine appartenenti al genere *Fusarium* e durante lo stoccaggio ad opera di quelli prodotti dai generi *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. La presenza di micotossine nelle produzioni zootecniche comporta un danno alla filiera su due fronti congiunti, da un lato a causa dello sviluppo di manifestazioni sub-acute e croniche, con conseguente perdita di peso dell'animale stesso e malattie degenerative; dall'altro, per effetto del *carry over* nei prodotti edibili, si ha una diretta esposizione del consumatore alle micotossine. La normativa comunitaria attualmente prevede per i mangimi, limiti di legge solamente per AFB₁ e OTA, mentre suggerisce dei livelli guida di contaminazione tollerabili per le altre micotossine.

All'interno del progetto MICORID è stato sviluppato un metodo di quantificazione multimicotossina rapido e accurato per la determinazione di diverse micotossine che possono essere presenti contemporaneamente sui mangimi: Aflatossina B₁, Ocratossina A, Fumonisin B₁ e B₂.

Il campione viene estratto con una miscela di metanolo-acetonitrile-acqua 25:25:50, filtrato e diluito con un tampone fosfato. Successivamente il campione viene centrifugato e purificato in colonnine di immunoaffinità (Afla-Ochra e Fumonisine, R-Biopharm Rhone) disposte a torre. Gli eluati vengono analizzati separatamente. Le Fumonisine sono quantificate in HPLC mediante derivatizzazione automatizzata precolonna con ortoftaldialdeide. Per la quantificazione di Aflatossina e Ocratossina A in un'unica corsa cromatografica, sono state messe a punto e confrontate le tecniche di separazione cromatografica UPLC e HPLC, entrambe con rivelazione spettrofluorimetrica.

Le *performances* della metodica UPLC consentono di rivelare le Aflatossine senza derivatizzazione post-colonna, diversamente dall'HPLC che necessita invece di derivatizzazione ad opera del PBPB (*Pyridinium Hydrobromide Perbromide*), e permettono di ridurre di circa l'80% i tempi cromatografici. Questo comporta un notevole aumento della rapidità nell'ottenimento del risultato dell'analisi e una consistente riduzione dei costi.

I valori di Recupero ottenuti sono rispettivamente: 80% per AFB₁, 99% per OTA, 109% per FB₁ e 104% per FB₂.

Il valori dei limiti di quantificazione in UPLC sono 0,04 e 0,5 µg/kg rispettivamente per l'AFB₁ e l'OTA. I limiti di quantificazione in HPLC sono 0,03 e 0,06 µg/kg rispettivamente per l'AFB₁ e l'OTA; e 210 e 300 µg/kg rispettivamente per la FB₁ e la FB₂.

Il metodo messo a punto è stato utilizzato per la quantificazione delle micotossine in mangimi di diversa composizione e destinazione d'uso. In nessuno dei mangimi analizzati è stato riscontrato un livello di contaminazione superiore ai limiti massimi consentiti.

P28 MESSA A PUNTO DI UN METODO IN HPLC PER LA DETERMINAZIONE DI AFLATOSSINE E OCRATOSSINA IN CAMPIONI DI PAPRICA E *BABY FOODS*

Brera C., Debegnach F., De Santis B., Pannunzi E., Gregori E., Berdini C., Miraglia M.
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La crescente frequenza delle analisi per la determinazione delle micotossine, effettuate per il controllo ufficiale e per il controllo interno delle aziende della filiera agro-alimentare, richiede la disponibilità di metodi robusti e versatili. In questo studio si presenta la messa a punto di un metodo per la determinazione simultanea delle Aflatossine e dell'Ocratossina A (OTA). Le matrici per le quali il metodo è stato validato sono i *baby foods* e la paprica. Per quanto riguarda i *baby foods* due differenti composizioni presenti sul mercato sono state prese in considerazione: le creme a base di mais e tapioca e le creme ai multicereali; tali matrici sono ingredientisticamente diverse e caratterizzate dalla esclusione di mais e tapioca. Il metodo è il medesimo per tutte le tipologie di matrice prese in esame. Il campione viene estratto con una miscela metanolo:acqua (80+20), filtrato, diluito con una soluzione tampone (PBS), centrifugato e purificato su colonna di immunoaffinità. Le tossine sono eluite con metanolo, separate e quantificate con un'unica corsa HPLC e rivelate con spettrofluorimetro. Nel caso delle Aflatossine la quantificazione spettrofluorimetrica è preceduta dalla derivatizzazione post-colonna mediante formazione del bromo derivato. Il metodo presenta come uniche differenze la quantità di campione pesata e il fattore di diluizione; tali differenze sono state adottate a causa dei diversi livelli di contaminazione che caratterizzano le due tipologie di matrice.

Il Regolamento 1831/2003 prevede per i *baby foods* un limite di 0,10 µg/kg per l'Aflatossina B₁ (AFB₁) e di 0,50 µg/kg per l'Ocratossina A. Per la paprica attualmente non sono stati definiti limiti di legge, tuttavia l'orientamento a livello comunitario è di adottare livelli massimi tollerabili pari a 5,0 µg/kg per AFB₁ e 10,0 µg/kg per le Aflatossine totali (AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂) e 15,0 µg/kg per l'OTA.

I parametri statistici del metodo soddisfano i requisiti indicati nel Regolamento 401/2006, i valori del fattore di recupero variano infatti per la AFB₁ dall'85 al 97% per le diverse matrici e i vari livelli di contaminazione presi in esame, mentre per l'OTA i valori del recupero variano tra il 67 e il 92%. I valori dello scarto tipo di ripetibilità relativo variano invece dal 2 al 10% sia per l'AFB₁ che per l'OTA. I valori dei limiti di rivelazione e quantificazione sono rispettivamente 0,017 e 0,080 µg/kg per l'AFB₁ e l'OTA sia nei *baby foods* che nella paprica. Per questa matrice sono state prese in esame anche le Aflatossine B₂, G₁ e G₂.

P29 SVILUPPO DI UN MODELLO PER LA VALUTAZIONE DI STRATEGIE PER IL CAMPIONAMENTO OTTIMALE DEGLI ALIMENTI ZOOTECNICI: APPLICAZIONE AL CASO DELLE MICOTOSSINE

Danieli P.P., Bernabucci U., Ronchi B.
Dipartimento di Produzioni Animali, Università della Tuscia, Viterbo

La rappresentatività del campionamento è un elemento cruciale per l'affidabilità dell'intera "filiera analitica". Infatti, da tempo, numerose organizzazioni internazionali hanno prodotto linee guida e regolamenti tesi a indicare le migliori strategie di campionamento in funzione dell'entità e tipologia delle partite, dei sistemi di trasporto e movimentazione degli alimenti. Le specifiche strategie di campionamento per la rilevazione della contaminazione da micotossine nelle partite di alimenti zootecnici, sono oggi normate dal Regolamento CE 152/2009, con entrata in vigore 26 agosto 2009. L'obiettivo del presente contributo è stato quello di modellizzare il processo di raccolta dei campioni elementari su automezzi per il trasporto di granelle alla rinfusa. Tale tipo di trasporto è ampiamente impiegato per la movimentazione di partite di modesta entità (fino a 30 t) di materie prime e mangimi su medie distanze. Nella modellizzazione effettuata con il pacchetto *object-oriented programming* Stella 8.0 (HPS Inc., USA), la partita è interamente suddivisa in Unità di Campionamento (SU), la cui numerosità dipende dalla tipologia di alimento (*e.g.* mais in granella), dalle dimensioni del mezzo di trasporto e dal tipo di strumento campionatore. Nella simulazione, quest'ultimo è stato definito di forma cilindrica e diametro idoneo per l'isolamento e raccolta di campioni elementari di diversa tipologia. Nella costituzione della partita, l'attribuzione del livello di concentrazione di micotossine ad ogni SU avviene secondo algoritmi che simulano la distribuzione non uniforme delle contaminazioni; il modello consente di variare sia il livello di eterogeneità che la contaminazione media della partita. Il campionamento viene simulato scegliendo in maniera sistematica un numero variabile di SU nel corso del processo di costituzione della partita. Nel presente lavoro sono considerati *output* del modello il livello medio di contaminazione dei campioni globali e lo scarto dal valore riferito alla partita. I risultati di numerose simulazioni su partite di mais costituite e campionate attraverso il modello, sono stati confrontati con le indicazioni di legge (Regolamento 152/2009) al fine di valutare la rappresentatività del campione globale ottenuto in funzione del livello d'eterogeneità e di contaminazione delle partite oltre che dello sforzo di campionamento. Per la disponibilità di molteplici opzioni atte a simulare situazioni pratiche estremamente diversificate, il modello proposto può rappresentare un valido sistema per individuare idonee strategie di campionamento (*e.g.* per l'autocontrollo) nel caso di contaminanti, come le micotossine, la cui diffusione nelle partite di alimenti alla rinfusa non segue pattern distributivi di tipo uniforme.

P30 DETERMINAZIONE DI DEOSSINIVALENOLO IN FRUMENTO MEDIANTE SPETTROSCOPIA FT-NIR

De Girolamo A., Lippolis V., Visconti A.

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

Il Deossinivalenolo (DON) è una micotossina con struttura tricotecenica prodotta da alcune specie di *Fusarium*, funghi fitopatogeni largamente diffusi nei cereali. Lo sviluppo di metodi analitici rapidi e sensibili per la determinazione di DON nei cereali risulta essere di fondamentale importanza al fine di monitorare i livelli di contaminazione negli alimenti e preservare la salute del consumatore. La spettroscopia infrarossa (IR) è una tecnica non distruttiva, rapida, poco costosa ed a basso impatto ambientale. Sono riportate diverse applicazioni della spettroscopia nel medio infrarosso (MIR) per la determinazione di DON nei cereali, mentre sono disponibili poche informazioni sull'applicazione della spettroscopia nel vicino infrarosso (NIR).

Recentemente sono state identificate le bande spettrali di assorbimento del DON nella Regione del NIR ed è stata valutata l'applicabilità della spettroscopia NIR a Trasformata di Fourier (FT) per la determinazione rapida del DON in campioni macinati di frumento. Sono stati sviluppati tre modelli di calibrazione per la determinazione semi-quantitativa del DON rispettivamente nel frumento duro, tenero e duro+tenero, applicando i modelli di regressione dei minimi quadrati parziali (PLS). La capacità di predizione dei modelli è stata valutata mediante la validazione esterna condotta su un secondo gruppo di campioni di frumento. I modelli fornivano una buona predizione del contenuto di DON nei campioni utilizzati in calibrazione (coefficiente di determinazione $r^2=0,71-0,83$), ed una discreta discriminazione tra i livelli bassi e quelli elevati di DON nei campioni utilizzati in validazione ($r^2=0,58-0,63$). Sono stati ottenuti valori simili dell'errore quadratico medio in calibrazione (RMSEC, 240-386 $\mu\text{g}/\text{kg}$), predizione (RMSEP, 306-379 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e validazione incrociata (RMSECV, 470-555 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

È stato inoltre sviluppato un modello qualitativo in grado di discriminare tra campioni di frumento "non contaminati" e campioni "contaminati". Il limite di *cut-off* del modello è stato fissato a 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di DON. Il modello ha classificato correttamente il 69% dei 65 campioni di frumento utilizzati in validazione. La maggior parte (75%) dei campioni non classificati correttamente possedeva livelli di DON vicini al limite di *cut-off*.

I risultati ottenuti nel presente lavoro indicano che la spettroscopia FT-NIR può essere utilizzata per la determinazione rapida e semi-quantitativa del DON a livelli inferiori ai limiti di legge stabiliti dalla Comunità Europea per il DON nel frumento non processato.

P31 RAPIDO RILEVAMENTO DI FUNGHI TOSSIGENI IN CARIOSSIDI DI ZEA MAYS ATTRAVERSO LA SPETTROSCOPIA DI IMMAGINE

Del Fiore A. (a), Reverberi M. (b), Ricelli A (c), De Rossi P. (a), Tolaini V. (b), Fabbri A.A. (b), Fanelli C. (b)

(a) *Dipartimento Biotecnologie, Agroindustria e Protezione della Salute, ENEA, Centro Ricerche Casaccia, Roma*

(b) *Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Roma Sapienza, Roma*

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

Le contaminazioni fungine rappresentano un grave problema per la filiera ceralicola. Alcune specie fungine, quali *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *Fusarium* spp, e *A. niger* possono produrre infatti, in idonee condizioni ambientali, micotossine, metaboliti secondari tossici per l'uomo e gli animali. Molti metodi sono stati utilizzati per misurare la contaminazione da funghi tossigeni e la presenza di tossine nei cereali. Recentemente, una particolare attenzione è stata rivolta a metodi basati sull'applicazione di tecniche analitiche non distruttive. L'obiettivo di questo lavoro è la realizzazione di un metodo analitico non distruttivo basato sulla spettroscopia di immagine per la rilevazione della contaminazione da funghi potenzialmente tossigeni (*A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. niger*) su cariossidi di mais. A questo scopo, è stato utilizzato un sistema analitico basato su uno spettrometro di immagine (Impector- SpecImTM-), operante nell'intervallo spettrale visibile-vicino infrarosso (400-1.000 nm). Le prove di analisi spettrale sono state condotte su miceli fungini derivanti da differenti ceppi fungini tossigeni (*A. parasiticus*, *A. flavus*, *A. niger*, *Penicillium expansum* e *F. graminearum*) e su differenti ibridi commerciali di mais inoculati artificialmente con le specie fungine di interesse analitico, oltre che su mais non contaminato artificialmente. I risultati ottenuti indicano che la spettroscopia di immagine permette in primo luogo di discriminare tra le differenti specie fungine, producendo uno specifico spettro (*spectral fingerprinting*) per ognuna di esse. Le specie fungine testate sono state inoculate su cariossidi di mais superficialmente sterilizzato e sottoposte giornalmente, per una settimana, ad analisi spettrale, allo scopo di monitorare la crescita fungina su mais. La variabilità dei dati delle serie di spettri ottenuti da tutti i campioni è stata confrontata utilizzando l'analisi delle componenti principali (PCA). I risultati delle analisi sono stati successivamente utilizzati per creare un modello per la identificazione della crescita fungina mediante l'analisi ANOVA sulle componenti principali. I risultati mostrano che l'analisi spettrale associata a quella statistica permettono di individuare rapidamente e precocemente la contaminazione con funghi potenzialmente tossigeni sulla base delle variazioni delle proprietà di riflettanza spettrale del mais. Tale metodo si dimostra efficace quando i metodi tradizionali non lo sono ancora e cioè 48 ore dopo l'inoculo con *Aspergillus niger* e 72 ore dopo l'inoculo con *Aspergillus flavus*.

P32 VALIDAZIONE SECONDO LA DECISIONE 657/2002/CE DI UN METODO DI SCREENING IN IMMUNOENZIMATICA PER LA DETERMINAZIONE DI ZEARALENONE NELL'ALIMENTAZIONE UMANA

De Pace R., Vita V.

Dipartimento di Chimica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia

Le micotossine sono sostanze tossiche prodotte dal metabolismo secondario di alcuni funghi o muffe. Possono avere un effetto dannoso a breve e/o a lungo termine sulle strutture cellulari e quindi sugli organi e sugli apparati. Effetti tossici più importanti: induzione di alcuni tipi di tumore e azione simil-estrogenica. Si calcola che il 40% dei decessi nei Paesi in via di sviluppo può essere collegato al consumo di derrate contaminate da micotossine. Questi metaboliti che variano enormemente nella loro struttura chimica, mostrano un considerevole intervallo di effetti biologici dovuti alla loro abilità di interazione con vari organismi e/o sistemi bersaglio. La contaminazione da micotossine nell'uomo avviene mediante passaggio da vegetali contaminati o da prodotti alimentari. La fissazione di limiti massimi ammissibili di Zearalenone, pertanto, trova giustificazione sia in motivi di carattere sanitario che nell'esigenza di fornire a organi di controllo e imprese alimentari un quadro preciso di riferimento normativo, Regolamento CE n. 1126/2007 della Commissione del 28 settembre 2007. Seguendo le indicazioni degli organismi europei sarebbe necessario disporre di metodi validati rapidi ed affidabili da utilizzarsi nell'ambito dei controlli ufficiali. È stata validata, quindi, una metodica in ELISA, secondo la Decisione 2002/657/CE, idonea alla rivelazione dello Zearalenone nei cereali a disposizione di tutti gli operatori del settore. Abbiamo valutato diversi parametri tra cui la specificità-errore Beta, la precisione e la robustezza. Il metodo viene tenuto sotto controllo con carte di controllo e *ring-test* organizzati dall'AIA. L'applicabilità del metodo è stata verificata su campioni prelevati in maniera ufficiale dagli organi competenti.

P33 IL NASO ELETTRONICO PER LA DETERMINAZIONE DELLA CONTAMINAZIONE DA DEOSSINIVALENOLO NEL FRUMENTO DURO: APPLICAZIONE NELLA *ROUTINE* AZIENDALE

De Palma D., Ventura V.
Laboratorio Prove, Molino Casillo SpA, Bari

La contaminazione da micotossine nel frumento e prodotti derivati rappresenta un aspetto legato alla sicurezza alimentare di notevole impatto sanitario ed economico. Con la pubblicazione ed i continui aggiornamenti dei regolamenti relativi alla presenza di sostanze indesiderabili negli alimenti, l'UE riconosce prioritaria la problematica della sicurezza alimentare e l'attività di controllo degli alimenti. In tale contesto ed 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, la necessità di metodi diagnostici rapidi ed adeguatamente validati per la determinazione della contaminazione da micotossine, in supporto ai metodi ufficiali di analisi, diventa sempre più urgente. I risultati ottenuti dallo sviluppo di un progetto di ricerca MIUR "Qualità e sicurezza del frumento duro e derivati: analisi chimica e nuovi indici diagnostici per la valutazione della contaminazione da micotossine e metalli pesanti" hanno evidenziato come le caratteristiche di impiego del naso elettronico permettano di poter considerare lo strumento adatto ad analisi di *screening* inseribile nella *routine* aziendale per il controllo della presenza di micotossine nelle materie prime. Nel presente lavoro vengono riportati i risultati relativi al trasferimento dei risultati del progetto di ricerca nell'ambito dell'attività del laboratorio aziendale di controllo qualità del frumento duro e derivati.

Nel periodo settembre-ottobre 2008 sono stati analizzati circa 200 campioni di frumento duro. Ciascun campione è stato analizzato per la presenza di DON tramite HPLC e tramite naso elettronico. Sulla base dei risultati ottenuti in HPLC, il naso elettronico è stato "addestrato" a riconoscere i campioni in base alla presenza/assenza della micotossina e a suddividerli in 3 classi: classe A (concentrazione di DON <50 ppb), classe B (concentrazione di DON tra 50 ppb e 1.750 ppb, che rappresenta il limite di legge) e classe C (contenuto di DON al di sopra del limite legislativo). I dati ottenuti dalla creazione del *data set* sono stati infine sottoposti ad analisi chemometrica utilizzando in forma esplorativa l'Analisi della Componente Principale (PCA) e le analisi discriminate (DFA).

I risultati ottenuti (parametri statistici) hanno dimostrato che il protocollo applicato, associato ad una adeguata analisi dei *data set* non solo consente di discriminare i diversi campioni in funzione della presenza/assenza della micotossina, ma ne permette anche una classificazione con un tasso di riconoscimento intorno all'80%.

L'attività iniziata nel 2008 è stata implementata nel 2009. Attualmente il nose viene utilizzato come *screening* rapido sul frumento duro con un totale di campioni analizzati di 60/70 ogni giorno. Di tutti i campioni analizzati con il nose, solo quelli classificati come B e C, vengono poi analizzati con l'HPLC.

P34 METODOLOGIE DIAGNOSTICHE MOLECOLARI AI FINI DEL RAPIDO RILEVAMENTO IN BACCA D'UVA DEL FUNGO TOSSIGENO *A. CARBONARIUS*

De Rossi P. (a), Reverberi M. (b), Ricelli A. (c), Del Fiore A. (a), Tolaini V. (b), Fabbri A.A. (b), Fanelli C. (b)

(a) *Dipartimento Biotecnologie, Agroindustria e Protezione della Salute, ENEA, Centro Ricerche Casaccia, Roma*

(b) *Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Roma Sapienza, Roma*

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

Alle micotossine appartengono numerosi metaboliti secondari con attività tossica per gli animali superiori, prodotti in idonee condizioni microclimatiche da funghi microscopici e filamentosi che colonizzano gli alimenti. L'Ocratossina A (OTA) risulta la principale micotossina segnalata nell'uva e nei suoi derivati, essa ha proprietà nefrotossiche, carcinogene, teratogene ed immunodepressive. Responsabili della presenza di questo metabolita nelle uve sono principalmente funghi appartenenti al genere *Aspergillus* sezione Nigri (aspergilli neri) la cui presenza provoca marciume negli acini di *Vitis vinifera*. Tra le specie appartenenti a questo genere *Aspergillus carbonarius* mostra il più alto potenziale in ocratossigenicità in uva. Per la diagnosi precoce della contaminazione fungina i metodi molecolari, basati sull'uso della PCR usando *primer* specie-specifici, sono considerati una buona alternativa rispetto ai tradizionali metodi diagnostici, data la loro alta specificità e sensibilità. Lo scopo di questo studio è quello di individuare un sistema che consenta il rilevamento il più possibile tempestivo della presenza di *A. carbonarius* direttamente sull'acino d'uva al fine di contribuire a realizzare un rapido ed efficace controllo della contaminazione da fungo. A tal fine in questo lavoro è stata messa a punto una tecnologia che utilizza la tecnica di PCR e *real-time* PCR per la discriminazione di *A. carbonarius*. In particolare sono stati sviluppati due set di *primer* specie-specifici sulla base della Regione ITS (*Internal Transcribed Spacer*), noti per il loro utilizzo negli studi filogenetici, e sulla base di sequenze parziali del gene codificante per la polichetide sintasi, enzima responsabile della biosintesi dell'Ocratossina A. Alle condizioni testate in questo lavoro i *primer* individuati sono risultati essere specifici nei confronti del solo *A. carbonarius* sia *in vitro* che *in vivo* ed entrambi i *primer* hanno dimostrato la capacità di rilevare la presenza del fungo anche quando l'ispezione allo stereomicroscopio non lo permetteva. Inoltre l'uso della *real-time* PCR ha dimostrato di migliorare le prestazioni di 100 o di 1.000 volte rispetto alla PCR classica rendendo possibile l'individuazione della presenza del fungo 18h prima di quanto sia individuabile con la PCR classica. I risultati ottenuti mostrano come le tecniche molecolari messe a punto in questo lavoro rappresentino un contributo concreto alla prevenzione dalla contaminazione fungina permettendo di individuare la presenza del fungo direttamente da bacca d'uva tal quale quando altri metodi ispettivi non lo permettono.

P35 CELER AFLA B₁: UN ELISA VELOCE E PRATICO, PER LA DETERMINAZIONE DI AFLATOSSINA B₁ NELLE DERRATE ALIMENTARI

Diana F., Bacer V., Puppini B., Persic L., Paleologo M.
Tecna Srl, Area Science Park, Trieste

Le Aflatossine B₁, B₂, G₁ and G₂ sono metaboliti tossici e cancerogeni delle muffe *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, che possono contaminare svariate derrate alimentari e mangimi.

Celer AFLA B₁ è un immunosaggio competitivo diretto per la determinazione quantitativa di Aflatossina B₁ in cereali, frutta a guscio e frutta secca, e in matrici complesse come germe di mais e mangimi, senza necessità di ulteriori purificazioni degli estratti metanolici. Considerati i livelli massimi di contaminazione di Aflatossina B₁ previsti per i mangimi (100/2003/EC) e per il cibo destinato all'alimentazione umana (2174/2003/EC), il presente saggio, con il suo intervallo di misura (1-40 ppb), è particolarmente adatto allo scopo.

Gli studi di validazione sono stati condotti con materiali sia fortificati che naturalmente contaminati e certificati, come mais, germe di mais, mangimi, uvetta, fichi secchi, pistacchi, nocciole ed arachidi.

Il limite di dosaggio, inteso come valore medio di B/B₀ di 20 campioni negativi meno due deviazioni standard (LOD secondo GIPSA FGIS Program Notice 04-15), è risultato minore di 1 ppb per tutte le matrici analizzate, indicando che il test è altamente specifico. Il limite di quantificazione (LOQ) è tra 1 e 2 ppb, a seconda della matrice. I recuperi medi per matrice sono compresi tra il 90 ed il 130%, indicando buone correlazioni tra valori attesi e quelli ottenuti nel saggio. Il coefficiente di variazione in condizioni di ripetibilità e riproducibilità è stato per le matrici analizzate inferiore a 10% e 16%, rispettivamente.

Dai risultati ottenuti si conclude che *Celer* AFLA B₁ grazie alle sue prestazioni in termini di specificità, accuratezza e precisione, unite alla sua facilità d'uso, è un valido metodo di *screening* per l'analisi sia di alimenti destinati al consumo umano diretto o da usare come ingredienti, sia di mangimi.

**P36 SISTEMA AUTOMATICO
PER LA DETERMINAZIONE DI MICOTOSSINE
CON COLONNA "QIMHERA" HPLC ONLINE
E SISTEMA DI PURIFICAZIONE IN SSPE
RIGENERABILE "MONOLITE TM" SSPE
SEMISOLIDPHASEEXTRACTION**

Faga M.

Varian Inc., Palo Alto, Ca, USA

Ad oggi le micotossine vengono determinate prevalentemente per via strumentale utilizzando un HPLC con un *detector* in fluorimetria o anche con altri metodi meno accurati quali *Lateral Flow* ed ELISA. L'utilizzo della strumentazione HPLC non può in genere prescindere dall'uso di sistemi di purificazione SPE prima della fase dell'iniezione. In genere questi sistemi sono delle colonne SPE usa e getta. Con questo lavoro vengono presentate due importanti novità scientifiche in questo campo ossia: a) Colonnine SSPE di purificazione rigenerabili "Monolite TM" (fino a 40 usi cadauna) con vantaggio di ridurre i costi e di armonizzare i dati permettendo di non modificare il sistema per la determinazione dei rafforzati oltre che garantire una costante qualità del dato; oppure b) un sistema automatico per l'analisi delle micotossine formato da un'innovativa colonna di immunoaffinità rigenerabile "Qimhera" montata direttamente all'interno dell'HPLC che è in grado di operare, effettuando in maniera completamente automatica, le operazioni di purificazione e rivelazione delle micotossine. Le caratteristiche innovative di "Qimhera" le consentono di operare per non meno di 400 purificazioni consecutive senza intervento alcuno dell'operatore se non per le operazioni di caricamento degli estratti grezzi non purificati nell'autocampionatore dell'HPLC.

Le principali caratteristiche di "Qimhera" sono la possibilità di resistere fino a 600 Bar di pressione e di operare su innumerevoli matrici indistintamente garantendo qualità e costi di esercizio competitivi.

P37 ANALISI DELL'AFLATOSSINA B₁ IN ALIMENTI ZOOTECNICI CONTENENTI SEQUESTRANTI

Gallo A., Masoero F., Rastelli S., Piva G., Bertuzzi T., Pietri A.
Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza

Per l'analisi delle Aflatossine, numerosi studi sono stati condotti per valutare l'efficienza di estrazione di alcuni solventi, come metanolo, acetone e acetonitrile; in particolare sono stati considerati i rapporti solvente-acqua (volume solvente/volume acqua), miscela-campione (volume miscela/pesata campione) e le interferenze dovute alla natura del campione (effetto matrice). I metodi più comunemente usati dai laboratori specializzati prevedono un'estrazione con metanolo:acqua (80+20 v/v) o con acetone:acqua (85+15 v/v). Entrambi effettuano la successiva determinazione mediante HPLC, dopo purificazione attraverso colonna di immunoaffinità. L'aggiunta di alcuni sequestranti agli alimenti zootecnici contaminati si è dimostrata una tecnica efficace nel ridurre l'assorbimento dell'Aflatossina B₁ nel digerente, con conseguente minor escrezione di Aflatossina M₁ nel latte, nel caso di vacche in lattazione. I sequestranti usati appartengono a tre diverse classi: argille, pareti di lievito, carboni attivi. Alcuni autori hanno osservato che la presenza di queste sostanze può ridurre il recupero percentuale nell'analisi delle Aflatossine. L'obiettivo del lavoro è stato quello di esaminare se l'aggiunta di alcuni dei più comuni sequestranti può influenzare l'efficienza delle miscele di estrazione più usate. Aliquote di due mangimi naturalmente contaminati da AFB₁ (15,3 e 7,6 µg kg⁻¹), sono state miscelate con 9 diversi sequestranti (4 silicati, 1 a base di pareti di lievito, 1 carbone attivo e 3 prodotti commerciali) a due diversi livelli (1 e 2%). L'AFB₁ è stata quindi estratta con le miscele metanolo:acqua (80+20 v/v) e acetone:acqua (85+15 v/v). Dopo purificazione dell'estratto attraverso colonna ad immunoaffinità, l'AFB₁ è stata quantificata mediante HPLC con rivelazione fluorimetrica dopo derivatizzazione fotochimica. Non sono state rivelate differenze statisticamente significative tra le due estrazioni per i mangimi senza sequestranti. In presenza di sequestranti, valori molto più alti, e vicini al valore vero di contaminazione del mangime, sono stati ottenuti con l'estrazione mediante la miscela acetone:acqua (85+15 v/v). Per il livello di aggiunta più alto (2%), le percentuali medie di recupero sono state pari al 75 e al 12%, rispettivamente per la miscela acetone:acqua (85+15 v/v) e metanolo:acqua (80+20 v/v); per il livello più basso (1%) sono state rispettivamente pari all'84 e al 23%. I campioni addizionati con carbone hanno evidenziato percentuali di recupero inferiori rispetto agli altri sequestranti. È stato successivamente considerato il rapporto acetone-acqua, modificandolo progressivamente da 85+15 a 60+40 v/v. Prove su campioni di mais naturalmente contaminati, con e senza aggiunta di sequestranti, hanno indicato come la miscela acetone:acqua (70+30 v/v) risulti avere la più alta efficienza di estrazione.

P38 VALIDAZIONE INTRA-LABORATORIO DI UN METODO ELISA PER LA RIVELAZIONE DELL'AFLATOSSINA M₁ IN LATTE

Gallo P. (a), Guadagnuolo G. (a), Pellis V. (b), Tarantino C. (c), Rossini C. (a), Serpe L. (a)
(a) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Napoli*
(b) *CELBIO SpA, Milano*
(c) *EuroClone SpA, Diagnostic Division, Pavia*

È descritto uno schema generale per la valutazione delle prestazioni di un kit ELISA per la rivelazione dell'Aflatossina M₁ nel latte di massa e termicamente trattato. Il metodo è stato validato intra-laboratorio per l'analisi di *screening* qualitativo, secondo i criteri descritti dalla linea guida dei settori chimici degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali, ed applicato al latte bovino, bufalino, ovi-caprino. In conformità a quanto previsto dal Regolamento 882/2004/CE, sono stati valutati l'applicabilità del kit, la specificità, l'intervallo della risposta lineare, il limite di quantificazione (LOQ), la capacità di rivelazione (CC β), la robustezza per cambiamenti lievi. Alcune modifiche della procedura di preparazione del campione sono state introdotte per ridurre il bias. Lo studio di validazione si basa sull'analisi statistica dei dati, mediante un F-test per verificare l'omoschedasticità dei dati, ed un *paired t-test* per valutare la significatività del segnale medio dei campioni fortificati rispetto a quello dei campioni non contaminati. La risposta quantitativa del kit ELISA è stata valutata confrontando i risultati ottenuti con un metodo di conferma HPLC con rivelazione fluorimetrica. Il LOQ del metodo a 0,004 $\mu\text{g}/\text{kg}$ indica una elevata sensibilità del metodo ELISA. Il CC β del metodo, un parametro analitico introdotto dalla Decisione 2002/657/CE che rappresenta la concentrazione alla quale un campione può essere considerato contaminato con una probabilità >95%, è stato verificato al livello del LOQ.

P39 THE BENEFITS OF ULTRA-HIGH RESOLUTION MASS SPECTROMETRY IN SCREENING ANALYSIS OF MYCOTOXINS IN FOOD

Godula M. (a), Čajka T. (b), Hrbek V. (b), Hajšlová J. (b), Schoutsen F. (c)

(a) *Thermo Fisher Scientific, Prague, Czech Republic*

(b) *Institute of Chemical Technology Prague, Department of Food Chemistry and Analysis, Prague, Czech Republic*

(c) *Thermo Fisher Scientific, Breda, The Netherlands*

Screening of pesticides, mycotoxins and veterinary drugs is of great importance in regulated environments such as food and animal feed analysis. Due to the broad variability of physico-chemical properties of the screened residues it is critical to employ very simple sample preparation procedure to maintain the recovery of the broad range of analytes. This however unavoidably leads to the fact that final extracts injected into the chromatographic system contain significant amounts of coextracts. For the chromatographic analysis it is therefore necessary to use the system with high selectivity but still capability to identify potential unknowns.

Traditionally these types of screening experiments have been carried out using SRM scanning with triple quadrupole instruments. This approach has certain limitations: I) no post acquisition re-interrogation of data; II) limited number of compounds per analysis; III) little possibility to scan for unknown compounds at high levels. Because of these limitations, there is currently a trend towards full scan MS experiments in residue analysis. Current screening approaches employ high performance ToF instruments, with mass accuracies of <5 ppm and resolutions max 15,000, coupled to Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC). However, most of the techniques and instruments currently available suffer from either poor mass accuracy and its variability and more significantly from resolution not sufficient to separate analytes of interest from coeluting species. Especially the mass resolution plays an important role in the successful identification of the most of present residues in samples containing high amounts of matrix coextracts.

The presentation will focus on the main problems and issues related to the application of the MS based screening techniques using accurate mass technology and will introduce the new system based on the proven OrbitrapTM technology. Mass spectrometers based on the unique performance of this type of mass analyser are routinely achieving mass resolution up to 100,000 and mass accuracy below 2 ppm. Those parameters significantly improve the efficiency and accuracy of the residue screening methods and allow successful screening of various residues at even very low concentration levels. This fact will be documented on practical examples from the field of the analysis of priority mycotoxins in the samples of food and feed.

P40 VALUTAZIONE INTER-LABORATORI DEL LETTORE RIDA® QUICK SCAN PER L'ANALISI DI DON

Jonville D. (a), Reck B. (b), Bony M. (c)

(a) BASF Agrochemical Division, Ecully, France

(b) R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

(c) R-Biopharm France, Saint-Didier au Mont D'Or, France

Il nuovo lettore RIDA® QUICK SCAN sviluppato da R-Biopharm AG è stato valutato in Francia in uno studio di collaborazione tra R-Biopharm France e BASF-divisione Agrochimica. Il lettore è stato valutato utilizzando il kit RIDA® QUICK DON, sviluppato e prodotto da R-Biopharm AG. Questo kit è commercializzato in Francia da R-Biopharm France con il nome di RIDA® QUICK DON e dalla BASF-divisione Agrochimica con il nome di Qualidon, secondo il marchio BASF. La procedura di Qualidon varia rispetto a quella per il RIDA® QUICK solamente per il quantitativo di campione che è di 2g anziché di 1g, come richiesto invece per il RIDA® QUICK DON.

RIDA® QUICK DON si basa sul principio immunocromatografico: utilizza anticorpi monoclonali e un coniugato su strip. Un risultato si può definire positivo quando 2 bande colorate appaiono sulla strip mentre campioni negativi portano allo sviluppo di una sola banda. L'intensità di colore della banda è letta attraverso il lettore ed è valutata in funzione ad una curva standard che consente di eseguire la quantificazione di DON. Il tempo totale richiesto per l'analisi, dall'estrazione del campione alla lettura, è inferiore ai 15 minuti. Da notare: i valori ottenuti con il lettore possono essere stampati o salvati su PC per la conservazione e la rintracciabilità dei risultati.

È stato organizzato un *ring test* con 8 laboratori (pubblici e privati), principalmente nel settore dei cereali, per l'analisi di 6 campioni di grano macinato e la quantificazione di DON mediante l'uso di 3 tecniche analitiche in parallelo: ELISA classica (1 laboratorio, con il kit RIDASCREEN® FAST DON fornito da R-Biopharm AG), HPLC (4 laboratori) e RIDA® QUICK DON (6 laboratori).

I campioni sono stati selezionati da 500 fino a 2.500 ppb. Nel 95% dei casi, i risultati ottenuti con il RIDA® QUICK SCAN si sono dimostrati in accordo con quelli ottenuti mediante HPLC ed ELISA, tenendo conto di un 30% di incertezza sui risultati ottenuti nell'analisi con HPLC.

Questo studio ha confermato le ottime prestazioni ottenute con il RIDA® QUICK DON (Kit Qualidon) quando viene utilizzato con il nuovo lettore RIDA® QUICK SCAN sviluppato dal Gruppo R-Biopharm.

P41 IDROLISI ENZIMATICA DELLA TOSSINA T-2 PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DELLA SOMMA DI T-2 E HT-2 NEI CEREALI

Lattanzio V.M.T., Solfrizzo M., Visconti A.

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

La presenza nei cereali di carbossilesterasi che catalizzano la de-acetilazione selettiva della tossina T-2 in tossina HT-2 è stata utilizzata per sviluppare un metodo analitico per la determinazione di queste micotossine in mais, frumento, avena. Il metodo è basato sull'uso di tampone fosfato (pH 7,4) come solvente di estrazione. L'idrolisi enzimatica della tossina T-2 avviene con maggiore velocità e resa nell'estratto di mais rispetto al frumento e all'avena. Per aumentare l'attività esterasica naturalmente presente negli estratti di frumento e avena è stata purificata una frazione proteica arricchita dal mais che viene aggiunta in piccole aliquote per l'estrazione di T-2/HT-2 da questi cereali. Tale procedura consente di estrarre quantitativamente come HT-2 la somma delle tossine T-2 (idrolizzata ad HT-2 durante l'estrazione) e HT-2 presenti nel campione iniziale. Gli estratti acquosi sono stati purificati direttamente su colonnine ad immunoaffinità evitando la fase di diluizione con acqua che è indispensabile quando si utilizza la miscela di estrazione convenzionale composta da acetonitrile/acqua (84:16 v/v). La determinazione finale è stata eseguita mediante cromatografia liquida-spettrometria di massa/massa (LC-ESI-MS/MS).

Il metodo è stato validato con prove di recupero su campioni di mais, frumento e avena fortificati a livelli di contaminazione compresi tra 20 e 400 µg/kg. Le percentuali di recupero variano da 72 a 97% in mais, da 67 a 84% in frumento, e da 61 a 87% in avena, con deviazioni standard relative inferiori al 10%. I limiti di rivelabilità per HT-2 (calcolati ad un rapporto segnale/rumore pari a 3) sono 0,5 µg/kg in mais e 0,4 µg/kg in frumento e avena. Risultati concordanti sono stati ottenuti da prove di confronto condotte con mais naturalmente contaminato da T-2 e HT-2 e analizzato con questo metodo e con un metodo convenzionale che utilizza acetonitrile/acqua 84:16 (v/v) come solvente di estrazione. La possibilità di estrarre quantitativamente la tossina T-2 in una forma più idrosolubile (HT-2) utilizzando tampone fosfato come solvente di estrazione permetterà di sviluppare nuove metodiche analitiche basate sull'uso di anticorpi. La presenza di solventi organici nella miscela di estrazione costituisce infatti uno dei fattori maggiormente limitanti nello sviluppo di metodi analitici che utilizzano anticorpi. La determinazione come HT-2 della somma di T-2 e HT-2 è in linea con la legislazione europea che sta considerando per i limiti massimi ammissibili un solo valore come somma di T-2 e HT-2.

P42 FUMONISINE B₁ E B₂ IN PRODOTTI ALIMENTARI A BASE DI MAIS: OTTIMIZZAZIONE E VALIDAZIONE DEL METODO ANALITICO MEDIANTE HPLC-FLD CON DERIVATIZZAZIONE CHIMICA POST-COLONNA E MONITORAGGIO SU CAMPIONI REALI

Lo Magro S. (a), Nardiello D. (a), Campaniello M. (a), Iammarino M. (a), Palermo C. (b), Muscarella M. (a)

(a) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia*

(b) *Dipartimento di Scienze Agro-Ambientali, Chimica e Difesa Vegetale, Università degli Studi, Foggia*

Le Fumonisine sono micotossine prodotte dal metabolismo di funghi appartenenti al genere *Fusarium*, in particolare *F. moniliforme* e *F. proliferatum*. Tali funghi si sviluppano prevalentemente nelle zone a clima temperato, infestando colture di mais sia in campo che durante le fasi di raccolta, stoccaggio e lavorazione. Tra le numerose forme di Fumonisine finora identificate, negli alimenti contaminati vengono, generalmente, rinvenute quelle di tipo B (FB₁, FB₂ e FB₃). Sono sostanze altamente tossiche per gli animali ed in grado, inoltre, di esplicare una consistente azione lesiva nei confronti dell'uomo. Nel 2002 l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) ha classificato la FB₁ nel gruppo 2B, quale potenziale agente cancerogeno per l'uomo. La maggiore diffusione e tossicità della FB₁ e la minore concentrazione della FB₃ consentono di semplificare le indicazioni legislative riferendo i valori soglia, fissati nel Regolamento CE 1126/2007, per il granoturco e i prodotti da esso derivati, alla sola somma di FB₁ e FB₂. Tra i metodi analitici descritti in letteratura per la determinazione delle Fumonisine in matrici alimentari, la tecnica più adoperata si basa sulla cromatografia liquida abbinata alla rivelazione fluorimetrica che, tuttavia, a causa delle scarse proprietà spettroscopiche di tali molecole, prevede la derivatizzazione pre-colonna con opportuni agenti fluorogeni. Per ovviare alle limitazioni delle derivatizzazioni pre-colonna, laboriose e poco riproducibili, è stato da noi messo a punto un metodo analitico basato su un processo di derivatizzazione post-colonna mediante *o*-ftalaldeide e Thiofluor™. Tale metodo consente di ottenere una elevata riproducibilità di analisi e risulta facilmente gestibile e suscettibile di automazione, garantendo ottimi risultati in termini di sensibilità e selettività. Il metodo, validato secondo quanto prescritto nel Regolamento CE 882/2004 e rispondente ai criteri stabiliti nel Regolamento CE 401/2006, è stato adottato per condurre un monitoraggio sulla presenza delle FB₁ e FB₂ in 100 campioni di alimenti a base di mais (21 di polenta, 8 di farina di mais, 7 di mais, 35 di cornflakes, 16 di snacks e 13 di prodotti per celiaci), acquistati negli anni 2007 e 2008 in diversi punti vendita della Puglia e della Basilicata. Livelli di contaminazione superiori ai limiti normati sono stati osservati in 4 campioni di polenta, in 2 di farina di mais ed in 1 di mais, mentre non sono stati rilevati campioni positivi tra cereali da colazione, snacks ed alimenti per celiaci. L'indagine da noi condotta ha evidenziato una minore incidenza di campioni positivi nel 2008 rispetto al 2007.

P43 ANALISI MEDIANTE AFLAOCHRA PREP® IN ASSOCIAZIONE ALL'HPLC IN FLUORESCENZA PER LA DETERMINAZIONE DELLE AFLATOSSINE TOTALI E DELL'OCRATOSSINA

Marley E.C. (a), Leeman D. (a), Donnelly C. (a), Milligan C. (a), Comitti R. (b)
(a) *R-Biopharm Rhône, Europa, Glasgow, United Kingdom*
(b) *R-Biopharm Rhône Italia, Milano*

L'Aflatossina e l'Ocratossina A si possono trovare in una vasta gamma di materie prime se gli alimenti sono conservati in condizioni avverse. Nel corso degli anni la legislazione relativa alle micotossine si è ampliata portando ad un aumento della richiesta di test rapidi e di semplice utilizzo. Questo ha spinto inoltre i laboratori ad analizzare più micotossine alla volta su una gamma di materie prime in costante aumento.

Dal momento che le colonne ad immunoaffinità rappresentano il metodo standard ufficiale per l'analisi di micotossine specifiche, vi è la necessità di avere colonne che consentano l'analisi simultanea di più micotossine. *Biopharm Rhône* (RBR) ha sviluppato una serie di nuove colonne per multi-micotossine da utilizzare con l'HPLC o LC-MS/MS, che includono l'EASI-EXTRACT® T-2 & HT-2 e le colonne DZT per la rilevazione simultanea di Deossinivalenolo, Zearalenone, T-2 e HT-2.

In molti Paesi esiste già una legislazione comune per le Aflatossine e l'Ocratossina A in cereali, spezie, alimenti per l'infanzia e mangimi, pertanto RBR ha prodotto AFLAOCHRA PREP® che consente l'isolamento e la concentrazione di Aflatossine e Ocratossina A. Inoltre RBR ha selezionato le condizioni adatte per l'HPLC, basandosi sull'uso della KOBRA® CELL per la derivatizzazione di Aflatossine B₁ e G₁, e ha permesso la quantificazione di tutte e cinque le micotossine con una singola analisi.

Il metodo basato sulle colonne AFLAOCHRA PREP® per le Aflatossine totali e l'Ocratossina A in cereali, frutta secca e spezie, è stato validato internamente. Sono stati inoltre analizzati i materiali di riferimento certificati FAPAS per poter determinare il grado di accuratezza del metodo. I valori di recupero per gli estratti di cereali, spezie e frutta secca variano da 86 a 108% (RSD 2-4%), mentre i valori di recupero per le matrici di cereali, spezie e frutta secca variano da 77 a 106% (RSD 4-6%). I valori ottenuti dall'analisi dei campioni FAPAS sono rientrati in un *range* accettabile per tutti i campioni dell'analisi. I campioni FAPAS sono stati successivamente trattati seguendo la procedura di contaminazione e i valori di recupero ottenuti variano tra l'83 e il 102% (RSD 2-4%). AFLAOCHRAPREP® si sono dimostrate conformi alle attuali raccomandazioni europee sia per le prestazioni del metodo sia per i valori di recupero e la ripetibilità.

In conclusione, AFLAOCHRAPREP® consentono la determinazione quantitativa di Aflatossina e di Ocratossina A utilizzando un unico metodo di preparazione del campione ed una singola impostazione delle condizioni per l'HPLC. AFLAOCHRAPREP® forniscono un metodo rapido e robusto adatto per una vasta gamma di materie prime e consentono una quantificazione accurata e a bassi livelli dei cinque gruppi di micotossine.

P44 RUOLO DELLA REAZIONE DI MAILLARD NEL MASCHERAMENTO DELLE FUMONISINE B₁, B₂ E B₃ IN PRODOTTI DEL MAIS

Meca G. (a), Manes J. (a), Fernandez M. (a), Font G. (a), Ritieni A. (b)

(a) *Laboratorio de Toxicologia y Bromatologia, Facultat de Farmacia, Universitat de Valencia, Burjassot, Spain*

(b) *Laboratorio Benessere, Alimenti e Salute, Facoltà di Agraria, Università degli Studi Federico II, Napoli*

Le Fumonisine rappresentano un gruppo di micotossine prodotto principalmente da *Fusarium verticillioides* e *F. proliferatum*. Sono da considerare contaminanti dei cereali ed in particolare del mais; l'esposizione alle Fumonisine è correlata allo sviluppo del cancro esofageo e di altre forme di patologie. La presenza di gruppi amminici nelle Fumonisine le rende substrato della Reazione di Maillard in alimenti trattati termicamente e in presenza di zuccheri riducenti. La reazione conduce alla formazione di N-(carbossimetil) Fumonisina B₁. Studi precedenti hanno dimostrato che vi è una riduzione della citotossicità e della perossidazione lipidica in cellule renali trattate con l'addotto NCM-FB₁. In questa comunicazione si chiarirà la degradazione delle FB₁, FB₂ e FB₃ e il loro mascheramento mediante la RM in un sistema modello formato da prodotti a base di mais contaminati a 1 ppm e che hanno subito diversi trattamenti termici.

I trattamenti termici modificano sensibilmente la concentrazione delle Fumonisine nel modello mais. La riduzione è proporzionale alla temperatura e al tempo di trattamento. A 160°C le tre Fumonisine calano del 10% e del 50% dopo 20 minuti; a 180°C le riduzioni sono del 40% e 70%. Le migliori condizioni di degradazione sono a 200°C con una riduzione del 60% a 3 minuti e del 92% dopo 20 minuti. L'addotto NCM-FB₁ di conseguenza aumenta in maniera proporzionale; a 160°C si formano 25 e 53 ppb in 3 e 20 minuti. Alla temperatura di 180°C si formano 49 e 67 ppb rispettivamente, mentre a 200°C si formano 64 e 88 ppb dopo 3 e 20 minuti. Non si osservano dall'analisi LC-MS2 derivati delle FB₂ e FB₃. In conclusione, i primi dati indicano che i trattamenti termici riducono i livelli di Fumonisine e si formano degli addotti che appaiono meno tossici rispetto ai prodotti di partenza.

P45 THE USE OF FULLY STABLE ISOTOPE LABELED MYCOTOXINS AS INTERNAL STANDARDS FOR MYCOTOXIN ANALYSIS WITH LC-MS/MS

Mitterer G. (a), Kainz M. (a), Freudenschuss M. (b), Häubl G. (c), Krska R. (c)

(a) Romer Labs Division Holding GmbH, Technopark 1, Tulln, Austria

(b) Biopure Referenzsubstanzen GmbH, Technopark 1, Tulln, Austria

(c) Christian Doppler Laboratory for Mycotoxin Research, Center for Analytical Chemistry, Department for Agrobiotechnology, IFA-Tulln, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria

The mass spectrometric detection of mycotoxins in analytical chemistry is a very powerful tool. Nowadays, so called LC-MS/MS *multitoxin analysis methods* allows the determination of more than 100 toxins in a single run. Nevertheless, interferences from matrix components can lead to a different ionization of the analyte in a sample in comparison to pure standard calibrants resulting in different signal intensity. This so called "matrix effect" limits the methods using a mass spectrometer as detector for liquid chromatography. Such "matrix effects" can be overcome by adding an Internal Standard (IS) to the sample, which behaves similar to the analyte and therefore can both correct recovery losses during the sample preparation process and ion suppression effects in the MS source. Stable isotope-labeled analogs of natural mycotoxins provide the best IS for these toxins. However, it should be noted that deuterated compounds still run the risk of H/D exchange in protic solvents and retention time shifts relative to the natural toxin. Moreover, partially labeled toxins frequently contain considerable amounts of "lighter" isomers, leading to mass peaks that interfere with natural toxin isotopes. Therefore, fully ¹³C-substituted compounds can be regarded as the best standard for quantification by LC-MS/MS- and also GC-MS/MS-based methods.

In our work, we demonstrate exemplarily the use of fully isotope labeled mycotoxin internal standards to correct for fluctuations that may occur during extraction, clean-up, separation and ionization of the sample. Therefore, labeled mycotoxins are well suited for performing accurate LC-MS/MS analysis of mycotoxins in cereals.

**P46 VALIDAZIONE DEL METODO DI CONFERMA
PER LA DETERMINAZIONE SIMULTANEA
DELLE AFLATOSSINE B₁, B₂, G₁ E G₂ IN PRODOTTI
ALIMENTARI ED ALIMENTI PER USO ZOOTECNICO
MEDIANTE HPLC CON DERIVATIZZAZIONE
FOTOCHIMICA ONLINE E RIVELAZIONE
FLUORIMETRICA**

Muscarella M. (a), Iammarino M. (a), Nardiello D. (a), Lo Magro S. (a), Palermo C. (b),
Centonze D. (b)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia

(b) Dipartimento di Scienze Agro-Ambientali, Chimica e Difesa Vegetale, Università degli
Studi, Foggia

Le Aflatossine (AF) sono metaboliti secondari prodotti dai funghi *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Sono state identificate almeno 17 differenti forme e tra di esse le Aflatossine B₁, B₂, G₁ e G₂ sono considerate le più pericolose, manifestando proprietà di genotossicità, cancerogenità ed immunotossicità. Nella classificazione sulla base del rischio cancerogeno per l'uomo (Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro, IARC) le AF sono state inserite nel gruppo 1. La AFB₁, oltre ad essere la più tossica, è anche la più diffusa. In condizioni ambientali favorevoli, le spore degli *Aspergillus* germinano e, successivamente, colonizzano svariate tipologie di alimenti, quali cereali, granaglie, mais, arachidi ed altri semi oleosi. I limiti di legge per le AF nei prodotti alimentari destinati al consumo umano diretto, fissati dal Regolamento CE 1881/2006, sono pari a 2 µg/kg per AFB₁ e 4 µg/kg per le Aflatossine totali (AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂). Per l'alimentazione animale, il DLgs 149/2004, in conformità con la Direttiva CE n. 100/2003, stabilisce per l'AFB₁ un contenuto massimo nelle materie prime per i mangimi di 0,02 mg/kg e limiti variabili nell'intervallo 0,005-0,02 mg/kg per i mangimi nelle varie formulazioni destinate alle differenti produzioni. Tra i numerosi metodi riportati in letteratura per la determinazione delle AF nei prodotti alimentari (metodi immunoenzimatici, metodi HPLC con derivatizzazione chimica pre- o post-colonna o derivatizzazione elettrochimica *online*), la separazione a fase inversa abbinata alla rivelazione fluorimetrica con derivatizzazione fotochimica post-colonna risulta economica e di semplice utilizzo e garantisce un'elevata riproducibilità di analisi, senza necessità di controllo della reazione di derivatizzazione. Il metodo proposto si è dimostrato semplice, rapido ed altamente sensibile e consente di quantificare separatamente le diverse Aflatossine, requisito indispensabile quando, come nel caso degli alimenti per uso zootecnico, è necessario accertare il livello della sola AFB₁. La procedura di validazione, effettuata in accordo con quanto definito nel Reg 882/2004/CE, ha dimostrato la rispondenza dei requisiti del metodo analitico ai criteri previsti dal Regolamento 401/2006/CE, confermandone l'affidabilità per il controllo delle Aflatossine B e G negli alimenti per uso umano e zootecnico.

P47 PRECOCE RILEVAMENTO DI *PENICILLIUM EXPANSUM*, PRODUTTORE DI PATULINA, SU POMACEE MEDIANTE PCR *REAL-TIME*

Tolaini V. (a), De Rossi P. (b), Del Fiore A. (b), Reverberi M. (a), Fabbri A.A. (a), Fanelli, C. (a)

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

(b) *Dipartimento Biotecnologie, Agroindustria e Protezione della Salute, ENEA, Centro Ricerche Casaccia, Roma*

Penicillium expansum è il principale agente eziologico del marciume verde-azzurro nelle pomacee nel post-raccolta che causa considerevoli perdite economiche, ed è produttore di patulina, una micotossina nota per gli effetti di tossicità immunologica, neurologica e gastrointestinale in modelli animali. L'utilizzo di frutti contaminati da *P. expansum* anche nelle prime fasi di infezione aumenta considerevolmente il rischio di contaminazione da patulina nei succhi di frutta e in altri prodotti trasformati, prodotti consumati principalmente da bambini. Il precoce rilevamento del patogeno sui frutti è quindi importante per garantire la qualità e salubrità della materia prima e dei prodotti da essa derivati. In questo lavoro è stato messo a punto un saggio di PCR *real-time* per il precoce e rapido rilevamento di *P. expansum* su pomacee utilizzando *primers* (PePG₁) disegnati sul gene della poligalatturonasi, enzima responsabile del marciume molle dei tessuti vegetali. I *primers* sono stati testati preliminarmente su DNA fungino estratto da coltura pura, successivamente su DNA fungino estratto da mele infettate artificialmente con un inoculo pari a 5-10 conidi/mela. I *primers* si sono mostrati specifici per il patogeno, discriminandolo da altri funghi isolati da mele, e sensibili, permettendo di amplificare il DNA fungino anche a basse quantità. Inoltre la tecnica ha consentito di rilevare *P. expansum* estratto direttamente da mela già dopo 6 ore dall'inoculo. L'amplificazione del DNA estratto da mele commerciali integre ha rilevato la presenza di *P. expansum* in tutti i campioni saggiati, ad indicare una comune e diffusa presenza del patogeno. I risultati ottenuti consentono quindi di affermare che la PCR *real-time* proposta nel presente lavoro potrebbe rappresentare un valido ed efficace sistema per l'*early detection* di *P. expansum* su pomacee da utilizzare in campo commerciale.

P48 NEW METHOD FOR RAPID DETECTION OF FUMONISINS IN MAIZE USING IMAGE ANALYSIS

Torelli E., Firrao G., Gobbi E., Locci R.

Dipartimento di Biologia e Protezione delle Piante, Università degli Studi, Udine

Fumonisin contamination is a major concern to the maize industry in North East Italy and there is a pressing need for rapid methods for predicting maize contamination at the time of delivering the crop to drying and storage stations, in order to avoid compromising the quality of the bulk with heavily contaminated individual lots. Fumonisin quantitation by chemical analysis requires extraction with solvents, cleanup, and reverse phase high performance liquid chromatography methods (RP-HPLC), and therefore is accurate but expensive, laborious and not suitable for on site, real time response. Therefore our aim was the development of a novel measurement system based on image analysis to provide fast response with minimum effort and cost. Maize samples were grounded and imaged at 1,024x768 pixels resolution under 10 different LED lights centered at wavelength ranging from 720 to 940 nm. The digital images were converted into matrices of data to compare the relative shift intensity values under the different lights for each pixel and compute comparative indexes. A custom program written in C language was then used to train a three *layers* feed-forward neural network and predict Fumonisin content from the calculated indexes. Statistical analysis based on pixel data matrices showed significant correlation between predictions and actual Fumonisin concentrations. The results obtained showed that this methodology has the potential for rapid quality monitoring control in food and feed industries.

P49 METODI DI CAMPIONAMENTO PER LA RICERCA DELLE MICOTOSSINE: CONFRONTO TRA MODALITÀ DI PRELIEVO STATICO E DINAMICO SU GRANELLA DI MAIS

Vanara F., Blandino M., Reyneri A., Sacco D.
Dipartimento di Agronomia, Selvicoltura e Gestione del Territorio, Università degli Studi, Torino

Il campionamento dei cereali per la ricerca delle micotossine è una problematica affrontata da numerose ricerche e affiancata a tutte le normative relative alla definizione dei tenori massimi ammissibili nelle derrate ad uso alimentare e zootecnico. Nella normativa europea sono dettagliate le quantità da prelevare in funzione della dimensione del lotto campionato ma è lasciata libertà sulla modalità operativa del prelievo dei singoli campioni elementari. Nell'ambito di un progetto regionale sulla filiera cerealicola, sono state confrontate le modalità di prelievo di tipo statico e dinamico. Il progetto vuole fornire indicazioni sul miglior metodo applicabile in fase di monitoraggio all'interno di centri di stoccaggio e impianti di trasformazione.

Il numero dei prelievi per ciascun lotto da 7 t, in base al Regolamento 401/2006, è stato fissato in 40 campioni elementari da 100 g. Queste le modalità di prelievo: a) campionamento dinamico: da un unico punto di prelievo sono stati estratti i campioni ad intervalli regolari di 30 secondi per tutta la durata del riempimento del rimorchio; b) campionamento statico: prelievo tramite sonda in 40 punti distinti del lotto, di cui 20 nella metà inferiore e 20 nella metà superiore del rimorchio. Al fine di comporre un campione globale e mantenere contemporaneamente i singoli campioni elementari per le analisi, il prelievo dei campioni elementari è stato fatto in doppio.

I risultati della prova eseguita su 3 lotti contaminati da Fumonisine, evidenziano una buona corrispondenza del livello di contaminazione dei prelievi fatti con le 2 modalità (variabilità media pari al 12%). La contaminazione dei singoli campioni elementari prelevati con modalità dinamica, osservati secondo l'ordine cronologico di campionamento, evidenzia la variabilità presente tra campioni prelevati a distanza ravvicinata. La stessa osservazione è valida per i prelievi fatti con la sonda, dove non si evidenzia una concentrazione delle cariossidi più contaminate in particolari zone del rimorchio ma la distribuzione è comunque casuale. In tutti i lotti, la variabilità espressa come coefficiente di variazione risulta più bassa nel caso di prelievo dinamico (54%) rispetto al prelievo di tipo statico (76%).

La prova conferma la difficoltà ad eseguire un corretto campionamento per la verifica del contenuto in micotossine di partite di cereali. Il prelievo di un adeguato numero di campioni elementari è un prerequisito per l'accuratezza del risultato finale e la scelta di un prelievo di tipo dinamico è migliorativa, in considerazione della minore variabilità emersa con questa modalità di campionamento.

P50 TRASFERIMENTO DELL'AFLATOSSINA M₁ DAL LATTE AL FORMAGGIO IN TRE CASEIFICAZIONI TIPICHE

Cavallarin L. (a), Tabacco E. (b), Giaccone D. (c), Antoniazzi S. (a), Borreani G. (b)
(a) *Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, ISPA, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Grugliasco, Torino*
(b) *Dipartimento di Agronomia, Selvicoltura e Gestione del Territorio, Università degli Studi, Grugliasco, Torino*
(c) *Associazione Regionale Allevatori del Piemonte, Torino*

Lo studio ha avuto l'obiettivo di definire in quale misura si trasferisca la Aflatossina M₁ (AM₁) dal latte al siero ed al formaggio, in tre caseificazioni tipiche piemontesi: una lavorazione lattica fresca a latte crudo (Robiola), due lavorazioni a coagulazione presamica una a fresca (Primosale) e una stagionata per 90 giorni (Maccagno). A questo scopo sono state realizzate tre prove di caseificazione con latte contaminato, sia naturalmente sia artificialmente, a concentrazione nota (5, 50 e 200 ppt). I livelli di contaminazione scelti rappresentano, per quanto riguarda il valore inferiore, una contaminazione media del latte piemontese in un'annata favorevole, per quanto riguarda la seconda concentrazione, il limite massimo di contaminazione fissato per il latte a livello europeo, ed il terzo livello rappresenta una contaminazione molto al di sopra del livello massimo fissato per legge. Le concentrazioni di AM₁ nel latte, siero e formaggio sono state determinate mediante analisi in HPLC, accoppiato a rivelatore a fluorescenza, e preceduta da purificazione del campione per immunoaffinità. In tutte le caseificazioni realizzate si è verificata una concentrazione di AM₁ nei formaggi rispetto al latte con cui sono stati prodotti. Per i tre livelli di contaminazione da AM₁ considerati nel latte (5, 50 e 200 ppt), nel Primosale si è osservata, rispettivamente, una concentrazione di AM₁ pari a 2,5, 1,6 e 1,45 volte la contaminazione presente nel latte, nella Robiola una concentrazione pari a 3,8, 1,5 e 1,9 volte, nel Maccagno una concentrazione pari a 7,5, 7,4 e 6,8 volte. I dati ottenuti confermano quanto descritto in letteratura per altre tipologie di caseificazione, per quanto riguarda la concentrazione dell'Aflatossina M₁ durante i processi di caseificazione. Inoltre, questi risultati costituiscono i primi dati disponibili circa gli indici di concentrazione in caseificazione tipiche piemontesi e livelli di concentrazione nei relativi formaggi.

P51 EFFETTO DI DIETE CONTENENTI OCRATOSSINA A INTEGRATE CON LICOPENE SULLE *PERFORMANCE* ZOOTECNICHE DI POLLI *BROILER*

Pozzo L. (a), Schiavone A. (a), Rotolo L. (a), Antoniazzi S. (b), Cavallarin L. (b)

(a) *Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi, Grugliasco, Torino*

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

È stato descritto come l'Ocratossina A (OTA) abbia effetti pro-ossidanti. Tra i carotenoidi, il licopene ha recentemente ricevuto particolare attenzione in seguito ad alcuni studi che dimostrano la sua efficiente capacità antiossidante. Obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare l'effetto dell'integrazione di licopene in diete per *broiler* contaminate da OTA sull'incremento ponderale e sull'indice di conversione alimentare (ICA). È stata realizzata una prova di alimentazione con i seguenti tipi di diete: (C) controllo; (O) OTA (dieta basale + 200 μg OTA kg^{-1} s.s.); (O+L) OTA + licopene (dieta basale + 200 μg OTA kg^{-1} s.s. + 500 mg licopene kg^{-1} s.s.); (L) licopene (dieta basale + 500 mg licopene kg^{-1} s.s.), su un totale di 72 animali, in 3 repliche per ciascun tipo di dieta. Al termine del ciclo di allevamento (35 gg) sono stati effettuati prelievi ematici sugli animali ed è stata determinata la concentrazione di OTA nel siero. Ogni settimana è stato registrato il peso degli animali e del mangime, ed è stato calcolato l'ICA. La concentrazione di OTA nel siero e nei mangimi è stata determinata mediante analisi in HPLC accoppiato a rivelatore a fluorescenza, preceduto da purificazione del campione per immunoaffinità. Le concentrazioni sieriche medie di OTA dei gruppi O e O+L sono risultate statisticamente più elevate ($p < 0,001$) di quelle ottenute nei gruppi C e L (rispettivamente 0,99 ng ml^{-1} e 0,97 ng ml^{-1} vs 0,21 ng ml^{-1} e 0,28 ng ml^{-1}). Non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra i gruppi per quanto riguarda il peso vivo e l'ICA. Nonostante la presenza di OTA nel siero dei gruppi O e O+L sia circa 5 volte superiore rispetto ai gruppi C e L, il peso vivo e l'ICA non hanno mostrato variazioni statisticamente significative. È probabile che la contaminazione della dieta basale con OTA alla concentrazione di 200 μg OTA kg^{-1} s.s. non sia sufficiente per poter osservare delle variazioni significative dei parametri considerati tra i gruppi.

INDICE DEGLI AUTORI

- Agosti, B.; 51
Aiello, G.; 64
Amoriello, T.; 27; 56
Annunziata, L.; 55
Antoniazzi, S.; 98; 99
Attili, G.; 40
Aureli, G.; 27; 56
Auriemma G.; 57
Babuscio, T.; 18
Baccarini, G.; 15
Bacer, V.; 83
Baculo R.; 57
Balestrazzi, R.; 65
Barcarolo, R.; 30; 71
Basiricò, L.; 13
Bastiani, E.; 72; 74
Battilani, P.; 25
Belocchi, A.; 27
Benford, D.; 8
Berdini, C.; 4; 17; 38; 75; 76
Bergamini, C.; 33; 73
Bergamini, E.; 49
Bernabucci, U.; 13; 77
Bertuzzi, T.; 11; 51; 52; 53; 85
Biancardi, A.; 55
Biancotto, G.; 55
Biondi, P.A.; 67
Biselli, S.; 70
Blandino, M.; 28; 29; 54; 58; 59; 97
Bonifazi, G.; 42
Bonini Baraldi, A.; 30
Bony, M.; 88
Borreani, G.; 98
Brandolini, A.; 68
Brera, C.; 3; 4; 5; 6; 17; 38; 39; 72; 74;
75; 76
Briggs, J.; 37
Buonaiuto, M.; 24
Čajka, T.; 87
Calderone, A.; 64
Califano, G.; 21
Calò, L.; 24
Campaniello, M.; 90
Cannizzaro, F.; 64
Cantoni, C.; 67
Caputo, D.; 42
Carratù, M.R.; 9
Casarini, E.; 69
Castoldi, A.F.; 8
Cattaneo, M.; 68
Causin, R.; 23; 30; 61
Cavallarín, L.; 98; 99
Cecere, E.; 21
Centonze, D.; 94
Checchetto, F.; 30
Chessa, G.; 55
Chiesa, L.M.; 67
Ciceri, F.; 6
Cicero, C.; 22
Colacci, A.; 33
Colombari, G.; 29
Comitti, R.; 91
Corbellini, M.; 28; 68
Costa, E.; 31
Crosta, L.; 64
Curione, A.; 64
Daffinà, A.; 40
Dall'Asta, C.; 41; 49; 50; 60
Danieli, P.P.; 13; 77
De Cesare, G.; 42
De Girolamo, A.; 78
De Pace, R.; 80
De Palma, D.; 81
De Rossi, P.; 79; 82; 95
De Santis, B.; 3; 4; 5; 6; 17; 38; 39; 75;
76
Debegnach, F.; 4; 5; 17; 38; 75; 76
D'Egidio M.G.; 26
D'Egidio, M.G.; 27; 56
Del Fiore, A.; 79; 82; 95

Dell'Aquila, M.E.; 14
 Della Gatta, S.; 43
 Desiderio, E.; 27; 56; 68
 Di Giuseppe, R.; 11
 Diana, F.; 83
 Donadini, G.; 51
 Donnelly C.; 91
 Dossena, A.; 41; 49; 50; 60
 Fabbri, A.A.; 42; 79; 82; 95
 Fabiansson, S.; 8
 Faccini, N.; 70
 Faccioli, P.; 70
 Faga, M.; 84
 Falavigna, C.; 50; 60
 Fanelli, C.; 42; 79; 82; 95
 Fasano, F.; 74
 Fernandez, M.; 92
 Ferrari, M.; 24; 33; 73
 Ferri G.; 20
 Ferrigo, D.; 61
 Ferro, M.; 62
 Filannino, A.; 14
 Firrao, G.; 96
 Flamini, L.; 63
 Font, G.; 92
 Fornara, M.; 56
 Freudenschuss, M.; 44; 93
 Galaverna, G.; 41; 50; 60
 Gallo, A.; 85
 Gallo, P.; 55; 86
 Gambetta, S.; 30
 Gambini, G.; 53
 Gandini, G.; 40
 Garbetta, A.; 14
 Gatti, M.; 34
 Gatti, R.; 45
 Gebbia, N.; 64
 Germeier, C.U.; 70
 Giaccone, D.; 98
 Gobbi, E.; 96
 Godula, M.; 87
 Gombac, F.; 72; 74
 Grazioli G.; 57
 Gregori, E.; 3; 4; 17; 38; 75; 76
 Grozeva, K.; 69
 Guadagnuolo, G.; 86
 Gualla, A.; 52
 Guerrini, A.; 24
 Haidukowski, M.; 28; 65
 Hajšlová, J.; 87
 Häubl, G.; 44; 93
 Hazel, C.; 37
 Heppner, C.; 8
 Herrmann, M.H.; 70
 Hrbek, V.; 87
 Iacoviello, L.; 11
 Iafrate, E.; 5; 72
 Iammarino, M.; 90; 94
 Jonville, D.; 88
 Kainz, M.; 93
 Krska, R.; 44; 93
 Lacalandra, G.M.; 14
 Lamberti, I.; 45
 Lattanzio, V.M.T.; 37; 43; 89
 Leeman D.; 91
 Lippolis, V.; 37; 78
 Lo Giudice, A.; 64
 Lo Magro, S.; 90; 94
 Locci, R.; 96
 Maiorano, A.; 66
 Mancini, M.C.; 54; 66
 Manes, J.; 92
 Marchelli, R.; 41; 49; 50; 60
 Marley E.C.; 91
 Marrali, G.; 24
 Masoero, F.; 85
 Meca, G.; 92
 Melloni, S.; 56
 Milligan C.; 91
 Minervini, F.; 14
 Miraglia, M.; 3; 4; 5; 6; 17; 38; 39; 75;
 76
 Mitterer, G.; 93
 Molinelli, A.; 44
 Montalbano, M.; 64
 Monte, M.; 64

Morandi, E.; 33
 Morcia, C.; 70
 Morelli, F.; 12
 Moretti, A.; 63
 Morlacchini, M.; 52
 Moscone, D.; 35; 36
 Mosiello, L.; 45
 Mulazzi, A.; 11; 53
 Muscarella, M.; 55; 90; 94
 Napoletano, M.; 12
 Nardiello, D.; 90; 94
 Nascetti, A.; 42
 Nebbia, C.; 10
 Nicassio, M.; 14
 Nocetti, M.; 53
 Oliveri, F.; 64
 Padoan, M.; 30
 Paleologo, M.; 83
 Palermo, C.; 90; 94
 Palleschi, G.; 35; 36
 Pancaldi, D.; 65
 Pannunzi, E.; 4; 17; 38; 75; 76
 Pascale, M.; 27; 28; 37; 65; 68
 Passerò, E.; 67
 Patel, S.; 37
 Patricelli, R.; 24
 Pecorari, A.; 53
 Pecorelli, I.; 55
 Pellis, V.; 72; 74; 86
 Pennino, D.; 12
 Peppi, O.; 40
 Perfetti, R.; 24
 Perilli, P.; 16
 Perrotta, M.; 72; 74
 Persic, L.; 83
 Picardat, S.; 18
 Pietri, A.; 11; 25; 29; 51; 52; 53; 59; 85
 Pinciroli, T.; 67
 Pisante, M.; 16
 Piva, G.; 25; 52; 53; 85
 Pizzichini, L.; 63
 Pizzolato, G.; 31; 59
 Plizzari, L.; 68
 Polisenska, I.; 70
 Powers, S.; 43
 Pozzo, L.; 99
 Prantera, E.; 6
 Puppini, B.; 83
 Quaranta, F.; 56
 Raggi, M.E.; 6
 Rasera, R.; 23; 30
 Rastelli, S.; 11; 85
 Reck, B.; 88
 Reverberi, M.; 42; 79; 82; 95
 Reyneri, A.; 28; 29; 54; 58; 59; 66; 97
 Ricci, F.; 35; 36
 Ricelli, A.; 42; 79; 82
 Risi, C.; 65
 Ritieni, A.; 12; 63; 92
 Romagnoli, B.; 33; 73
 Romanazzo, D.; 35; 36
 Ronchi, B.; 13; 77
 Rossi, F.; 11
 Rossini, C.; 86
 Rosso, A.; 55
 Rotolo, L.; 99
 Sacco, D.; 97
 Sarubbi F.; 57
 Scaroni, I.; 24
 Schiavone, A.; 99
 Schoutsen, F.; 87
 Scopel, C.; 61
 Scudellari, D.; 28; 68
 Segard, M.; 18
 Serpe, L.; 86
 Serranti, S.; 42
 Sforza, S.; 41
 Silingardi, P.; 33
 Sillari, L.; 69
 Solfrizzo, M.; 37; 43; 89
 Somma, M.C.; 12
 Spatola, R.; 55
 Spini, M.; 70
 Stagnari, F.; 16
 Strocchi, V.; 24
 Suman, M.; 49

Tabacco, E.; 98
Talevi, S.; 63
Talleri, M.; 40
Tarantino, C.; 72; 74; 86
Tealdo, E.; 30; 71
Terzano, L.; 62
Terzi, V.; 70
Ticchiati, V.; 18
Tolaini, V.; 79; 82; 95
Torelli, E.; 96
Tsialla, Z.; 6
Ubaldi, A.; 55
Vanara, F.; 28; 29; 54; 59; 97
Ventura, V.; 81
Verna, D.; 24
Vesco, S.; 35; 36
Villani, A.; 15
Visconti, A.; 14; 32; 37; 43; 65; 78; 89
Vita, V.; 80
Volpe, G.; 35; 36
Zaniboni, A.; 69
Zappa, G.; 45
Zoani, C.; 45

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

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

Roma, luglio-settembre 2009 (n.3) 7° Suppl.