

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**1° Congresso nazionale
Le micotossine
nella filiera agro-alimentare**

**Istituto Superiore di Sanità
Roma, 29-30 novembre 2004**

Atti a cura di
Marina Miraglia e Carlo Brera
Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e i Rischi Alimentari

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN
05/42**

Istituto Superiore di Sanità

1° Congresso nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 29-30 novembre 2004.

Atti a cura di Marina Miraglia e Carlo Brera

2005, vii, 357 p. Rapporti ISTISAN 05/42

Il Congresso si propone di focalizzare i principali aspetti dell'analisi del rischio in Italia relativamente alla contaminazione da micotossine in Italia, sulla base di un principio di osmosi fra la valutazione e la gestione del rischio lungo tutta la filiera alimentare. L'iniziativa si rivolge pertanto a tutti gli operatori del sistema alimentare e mangimistico, invitandoli a portare il loro contributo di esperienze tecnico scientifiche, operative e gestionali al fine di creare un quadro quanto più completo del problema delle micotossine nel nostro Paese. Ciò al fine di minimizzare l'impatto sanitario di questi contaminanti e le eventuali ricadute negative sul "sistema" alimenti e mangimi. Infine, gli argomenti trattati in questo Congresso saranno orientati sia alla diffusione di informazioni scientifiche in grado di tutelare il consumatore italiano, sia all'acquisizione degli strumenti operativi in grado di garantire una maggiore competitività sul mercato europeo e internazionale.

Parole chiave: Micotossine, Analisi del rischio, Alimenti

Istituto Superiore di Sanità

1st National conference. Mycotoxins in agri-food chain. Istituto Superiore di Sanità. Rome, 29-30 November 2004.

Proceedings edited by Marina Miraglia and Carlo Brera

2005, vii, 357 p. Rapporti ISTISAN 05/42 (in Italian)

The Conference is aimed at focusing on the main aspects of risk analysis in Italy relating to mycotoxin contamination, on the basis of the osmosis between the risk assessment and management throughout the food chain. Therefore, this initiative is addressed to all the stakeholders of the food and feed chain, and their contributions in the scientific, operating and managerial experiences that will create a scenario that is a complete representation of the mycotoxins problems in our country. This approach would contribute to decrease the sanitary impact of these xenobiotics on human and animal health and the negative consequences for the food and feed system. Finally, the topics addressed at this Conference can help the dissemination of scientific information related to safeguarding the Italian consumer to the exposure of such toxic substances and to achieve better competitiveness in the European and international markets.

Key words: Mycotoxins, Risk analysis, Foodstuffs

Si ringrazia Valentina Minardi e Viviana Renzi per il lavoro svolto nell'organizzazione del Congresso.

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

Il rapporto è accessibile online dal 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, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2005

INDICE

PREMESSA	vii
RELAZIONI DI APERTURA	
Micotossine, un tema globale <i>Gianfranco Piva, Paola Battilani, Amedeo Pietri</i>	3
Approccio olistico nell'analisi del rischio per le micotossine <i>Marina Miraglia, Barbara De Santis, Valentina Minardi, Carlo Brera</i>	15
Valutazione tossicologica e sicurezza degli alimenti <i>Giorgio Cantelli Forti</i>	29
Prima Sessione	
VALUTAZIONE DEL RISCHIO	
Presenza di tricoteceni e di ocratossina a in <i>baby-foods</i> e prodotti dietetici ricchi di crusca <i>Amedeo Pietri, Terenzio Bertuzzi, Marco Zanetti, Silvia Rastelli</i>	39
Micotossine nel latte materno: indagine epidemiologica <i>Giovanna Turconi, Marianna Guarcello, Sergio Comizzoli, Laura Maccarini, Amedeo Pietri, Gianfranco Piva, Carla Roggi</i>	43
Valutazione analitica dell'esposizione del consumatore alla fumonisin B₁ <i>Carlo Brera, Simona Angelini, Francesca Debegnach, Barbara De Santis, Aida Turrini, Marina Miraglia</i>	44
Valutazione della esposizione alla ocratossina A in campioni di siero di donatori sani <i>Carlo Brera, Francesca Debegnach, Valentina Minardi, Barnaba Pazzaglini, Marina Miraglia</i>	53
Seconda sessione	
GESTIONE DEL RISCHIO	
Micotossine: un problema per l'alimentazione dell'uomo e degli animali <i>Romano Marabelli</i>	61
Ruolo delle fasi fenologiche sulla sintesi di micotossine in mais <i>Paola Battilani, Vittorio Rossi, Andrea Scandolara, Paola Giorni, Terenzio Bertuzzi, Silvia Formenti, Amedeo</i>	71

Valutazione di genotipi di mais per la resistenza a <i>Fusarium verticillioides</i>	
<i>Carlotta Balconi, Chiara Lanzanova, Elena Conti, Luca Gualdi, Vincenza Pisacane, Paolo Valoti</i>	
<i>Nicola Berardo, Mario Motto, Elisabetta Lupotto</i>	74
Aflatossine in spezie, erbe aromatiche, infusionali e officinali	
<i>Cecilia Bergamini, Nadia Gruppioni, Veronica Menna, Barbara Romagnoli</i>	78
Ocratossina A in vini e aceti	
<i>Paolo Branca, Sara Jenifer Coluccia, Francesca Alesso, Marisa Bodda, Sara Ciacciarelli, Marisa Garnero, Francesco Ricci</i>	86
Valutazione di alcuni parametri correlati allo sviluppo della micotossina	
<i>Clarita Cavallucci, Clotilde Villeri, Luciano Terni, Mare Battistelli, Francesca Della Monica, Elena Fioriti, Mauro Migni, Roberto Luneia</i>	90
Analisi dei parametri critici di filiera	
<i>Clotilde Villeri, Luciano Terni, Clarita Cavallucci, Mare Battistelli, Francesca Della Monica, Elena Fioriti, Mauro Migni, Roberto Luneia</i>	97
Effetto del trattamento antipirale sulla presenza di tossine in granella di mais	
<i>Franco Cinti, Silvia Grandi, Mirco Casagrandi</i>	100
Indagine poliennale sulle caratteristiche qualitative e igienico-sanitarie delle granelle commerciali di mais	
<i>Carla Corticelli, Alberto Verderio</i>	103
Approccio epidemiologico allo studio delle contaminazioni da aflatossine B₁ e M₁ nel sistema di allevamento del bovino da latte	
<i>Pier Paolo Danieli, Gilberto Giangolini, Domenico Giontella, Umberto Bernabucci, Bruno Ronchi</i>	108
USMAF Genova: ricerca di micotossine nelle merci in importazione	
<i>Marina De Mattia, Anita Farre, Anna Camoriano, Antonello Campagna, Antonella Mofferdin, Massimo Lobrano</i>	120
Micotossine negli alimenti ad uso zootecnico: situazione in piemonte	
<i>Lucia Decastelli, Jeanne Lai, Chiara Modena, Paola Mogliotti, Fulvio Brusa, Maria Cesarina Abete, Marina Rastelli, Carlo Nachtmann</i>	126
Controllo e prevenzione della produzione di ocratossina a nei cereali: risultati del progetto CEE QLK1-CT-199-00433 (1999-2004)	
<i>Alessandra Ricelli, Massimo Reverberi, Slaven Zjalic, Anna Adele Fabbri, Corrado Fanelli</i>	129
Effetto del trattamento contro <i>Ostrinia nubilalis</i> sulla presenza di funghi potenzialmente tossigeni nelle cariossidi di mais	
<i>Gloria Innocenti, Viviana Babini, Roberta Piccaglia</i>	139

Ocratossina A: decontaminazione biologica dei mosti nel corso della fermentazione alcolica <i>Massimo Morassut, Francesca Cecchini, Emilia Garcia Moruno, Michele Savino, Alberto Cedroni</i>	142
Aflatossine nel latte in commercio: la situazione piemontese <i>Carlo Nachtmann, Silvia Gallina, Monica Gramaglia, Marina Rastelli, Gian Luca Ferro, Lucia Decastelli</i>	147
Ruolo dell'agricoltura per la sicurezza e la qualità degli alimenti <i>Marco Aurelio Pasti</i>	150
Decontaminazione da <i>fusarium</i>-tossine della granella di mais con il processo di molitura a secco <i>Amedeo Reyneri, Francesca Vanara, Laura Bertetto, Ugo Peila</i>	152
Gestione del rischio nelle aziende lombarde <i>Nicoletta Rizzi, Paola Amodeo</i>	155
Aflatossina M₁ nel latte: un problema risolvibile <i>Luca Sillari, Enzo Casarini, Alberto Zaniboni, Kalinka Grozeva</i>	165
Ricerca e determinazione di micotossine in campioni alimentari derivanti da agricoltura biologica e convenzionale <i>Carlo Brera, Barbara De Santis, Francesca Debegnach e Marina Miraglia</i>	172
Terza sessione	
TECNOLOGIE ALIMENTARI	
Presenza di zearalenone e caratterizzazione di ceppi di <i>Fusarium</i> in mangimi per suini <i>Maria Cesarina Abete, Lucia Decastelli, Elisa Piccin, Stefania Gavinelli, Silvia Gallina, Giovanni Falsetta, Angelo Millone</i>	183
Contaminanti micotici e ocratossina a su uve e su vino in Italia <i>Michele Borgo, Michele Savino, Emilia Garcia Moruno</i>	188
Degradazione di patulina ad opera di un agente di lotta biologica <i>Valeria Morena, Vincenzo De Cicco, Raffaello Castoria</i>	194
Influenza della modalità di coltivazione, dell'essiccamento e dello stoccaggio sulla presenza di aflatossine in granella di mais <i>Franco Cinti, Fiorindo Gaspari, Mirco Casagrandi</i>	203
Influenza dell'umidità alla raccolta e della sosta in attesa dell'essiccamento sulla contaminazione con aflatossine della granella di mais <i>Fiorindo Gaspari, Marco Bortolotti, Franco Cinti</i>	206
Relazione tra contenuti di aflatossine della granella di mais e dei mangimi che la contengono <i>Franco Cinti, Marco Bortolotti, Mirco Casagrandi</i>	209

Riduzione di ocratossina a nei vini mediante batteri lattici <i>Maria Daria Fumi, Roberta Galli, Angela Silva</i>	211
Indagine sulla presenza di aflatossine in mangimi prodotti da diverse aziende <i>Roberta Piccaglia, Silvia Grandi, Alessandra Canever, Erika Transerici</i>	215
Influenza del sequestrante “Atox™-bentonite” sulla riduzione di aflatossina M₁ nel latte <i>Fiorindo Gaspari, Roberta Piccaglia, Andrea Borsari, Anna Tampieri (d)</i>	217
La proteina b32 di mais: ruolo nella protezione contro patogeni fungini <i>Mario Motto, Carlotta Balconi, Tiziana Triulzi, Chiara Lanzanova, Luca Gualdi, Fabio Forlani, Nicola Berardo, Elisabetta Lupotto</i>	220
Aflatossine nella filiera del latte: programmi e metodologie di prevenzione <i>Costante Pinelli, Lucio Scianchi, Francesco Venè</i>	224
Aflatossine nella filiera del latte: metodologie di monitoraggio analitico <i>Andrea Messori, Elisabetta Bassi, Ivana Gandolfi, Patrizio Cagnasso</i>	232
Controllo della contaminazione da micotossine nella filiera del mais <i>Amedeo Reyneri, Massimo Blandino, Andrea Maiorano, Francesca Vanara</i>	235
Ocratossina A: decontaminazione fisica dei vini mediante uso di carbone enologico <i>Michele Savino, Massimo Morassut, Francesca Cecchini, Emilia Garcia Moruno, Domenico Tiberi, Barbara Boccaccino</i>	242
Destino dell’ocratossina A nella vinificazione in rosso <i>Angela Silva, Barbara Grazioli, Roberta Galli, Maria Daria Fumi</i>	249
Lotta alla piralide e raccolta anticipata per ridurre le micotossine in mais <i>Mariolino Snidaro, Giorgio Barbiani, Marco Signor, Francesco Del Zan</i>	253
Approccio integrato nella filiera agro-alimentare per la prevenzione del rischio micotossine <i>Maurizio Zucchi, Chiara Faenza, Davide Garbini, Claudio Mazzini</i>	
Quarta sessione	
METODI DI ANALISI E CAMPIONAMENTO	
Problematiche legate alla fase analitica nella determinazione delle micotossine nei prodotti alimentari <i>Carlo Brera e Marina Miraglia</i>	
Campionamento di grappoli in vigneto per la stima del contenuto di ocratossina A nel mosto <i>Carlo Barbano, Paola Battilani, Vittorio Rossi, Terenzio Bertuzzi, Amedeo Pietri</i>	273

Controllo con il metodo elisa del tenore di ocratossina A nel caffè verde in arrivo alla torrefazione dopo sdoganamento <i>Faustina Marcella Bertollo, Luca Gradassi, Emiliano Dragoni, Serena Pancioni</i>	278
Determinazione dell'aflatossina M₁ nel latte: organizzazione e risultati di proficiency test <i>Barbara Magnani, Laura Monaco, Ugo Paggi</i>	281
Immunosensori per la determinazione dell'aflatossina M₁ nel latte <i>Laura Micheli, Silvia Piermarini, Antonio Radoi, Danila Moscone, Giuseppe Palleschi</i>	285
Confronto di metodologie analitiche utilizzate nel dosaggio dell'aflatossina M₁ nel latte <i>Carlo Nachtmann, Monica Gramaglia, Giuseppina Marellò, Marina Rastelli, Gian Luca Ferro</i>	293
Ocratossina A nel vino: valutazione delle prestazioni di un kit ELISA <i>Carlo Brera, Leonardo Bentivoglio, Valentina Minardi, Francesca Debegnach, Maurizio Paleologo Oriundi</i>	298
Saggi immunoenzimatici: quale ruolo nel controllo delle micotossine? <i>Maurizio Paleologo</i>	301
Determinazione simultanea delle tossine T-2 e HT-2 nel frumento mediante HPLC con rivelatore a fluorescenza e derivatizzazione pre-colonna con 1-antrolnitrile <i>Veronica Maria Teresa Lattanzio, Miriam Haidukowski, Michelangelo Pascale, Angelo Visconti</i>	314
Determinazione dell'aflatossina M₁ nei formaggi: nuovo metodo enzimatico di estrazione <i>Amedeo Pietri, Terenzio Bertuzzi, Paola Fortunati, Gianfranco Piva</i>	318
Determinazione dell'ocratossina a in prodotti carnei: nuovo metodo enzimatico di estrazione <i>Amedeo Pietri, Terenzio Bertuzzi, Alessia Gualla, Gianfranco Piva</i>	322
Olio vergine d'oliva: una matrice a rischio <i>Rosalia Ferracane, Alessio Tafuri, Antonio Logrieco, Dolores Balzano, Alberto Ritieni</i>	326
Determinazione del contenuto di aflatossina M₁ nel latte: correlazione fra metodo immunoenzimatico (ELISA) e cromatografico (HPLC-FLD) <i>Paolo Rosi, Andrea Borsari, Sandro Lodi, Alessia Galanti, Alessia Fava</i>	341
Sviluppo di nuovi approcci per la determinazione di micotossine <i>Cinzia Tozzi Laura Anfossi, Claudio Baggiani, Cristina Giovannoli, Gianfranco Giraudi</i>	347
Metodologia d'indagine su campioni di farina di mais per la ricerca di fumonisine <i>Alberto Carniel, Sandro Ceccone, Bruno Bresin, Clara Zuch</i>	353

PREMESSA

Il I Congresso nazionale sulla problematica delle micotossine nella filiera agro-alimentare e zootecnica, organizzato dall'Istituto Superiore di Sanità nel 2004, ha avuto come principale finalità quella di riunire tutti gli operatori della catena alimentare interessati a questo tipo di contaminazione. Gli elementi promotori di questa iniziativa sono stati essenzialmente due, l'uno relativo ad un recente pacchetto normativo comunitario molto nutrito ed esaustivo sulla materia, l'altro derivante dalla gravissima condizione che si è verificata nel 2003 che ha portato alla ribalta anche dei *mass media* le diverse implicazioni di carattere tossicologico, agronomico e commerciale legate alla contaminazione da aflatossine nella filiera maidicola, mangimistica e lattiero-casearia.

Questi ed altri argomenti di natura tecnica come la diagnostica e le modalità di campionamento hanno caratterizzato gli interventi che si sono alternati nel corso delle due giornate, conferendo ed assicurando alla manifestazione una completezza di aggiornamenti, di scambi di opinioni e di azioni prospettiche. Nel corso del Congresso sono state inoltre forniti gli elementi di base dei diversi aspetti che caratterizzano questa tipologia di contaminazione ivi incluso gli aspetti innovativi dell'analisi del rischio individuando i punti critici nell'arco della complessa realtà delle produzioni alimentari e mangimistica.

Pertanto, la pubblicazione di questi Atti, riveste particolare importanza al fine di diffondere in modo esaustivo le informazioni acquisite nel corso del Congresso, in modo tale da costituire un utile strumento conoscitivo per tutti gli operatori della catena alimentare e per gli operatori del Servizio Sanitario Nazionale impegnati, attraverso le attività del controllo ufficiale, a garantire la tutela del consumatore.

Inoltre, nelle finalità del I Congresso Nazionale c'è anche quella di rappresentare un appuntamento di riferimento, per aggiornare in modo sistematico tutte le innovazioni e le realtà legate al settore di produzione e trasformazione dei prodotti alimentari. Per questo motivo si anticipa che l'Istituto Superiore di Sanità organizzerà il II Congresso Nazionale sulle micotossine che si terrà nel 2006.

Relazioni di apertura

MICOTOSSINE, UN TEMA GLOBALE

Gianfranco Piva, Paola Battilani, Amedeo Pietri

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

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

Introduzione

La conquista della terra da parte della specie umana è stato un processo che è avvenuto lentamente e che nel corso dei millenni ha visto l'uomo progressivamente arricchire la propria esperienza biologica attraverso la conquista di nuovi e sempre più vasti areali e ambienti tra loro molto diversi. L'uomo ha imparato ad utilizzare via via nuovi alimenti e a manipolarli con l'impiego di nuove tecnologie, la più importante delle quali è stata certamente l'uso del fuoco. L'uomo di Pechino 300.000 anni fa utilizzava questo importante strumento per difendersi, riscaldarsi e forse per cuocere i cibi. La padronanza di questa tecnica ha garantito una indiscussa superiorità nei riguardi delle altre specie animali. Un momento di grande rilievo in questa fase evolutiva è stato certamente quello dell'avvento delle prime forme di agricoltura nel Neolitico, 10-15.000 anni fa, che consentì di assicurare maggiori disponibilità alimentari. Il passaggio da una fase nella quale le risorse alimentari derivavano dalla raccolta di frutti, radici, molluschi, insetti o dalla caccia, magari già realizzata in modo selettivo per assicurare il mantenimento delle disponibilità venatorie, al pascolo di greggi di erbivori, alla coltivazione dei terreni, ha rappresentato un modo per assicurare migliori disponibilità alimentari e ha comportato una rilevante rivoluzione alimentare, con l'introduzione dei cereali. La coltivazione avveniva nei terreni disboscati prevalentemente con il fuoco. La popolazione poté così rapidamente aumentare e diventare stanziale, soprattutto nelle zone ove si svilupparono sistemi agricoli che si basavano su una fertilità rinnovabile dei terreni. L'esempio più rilevante è rappresentato dall'Egitto ove le periodiche inondazioni del Nilo assicuravano una adeguata fertilizzazione. Anche questo sistema produttivo, che pur rappresentava una importante evoluzione, rispetto alla fase di raccolta e alla pastorizia, non era esente da problemi, costituiti soprattutto dalla variabilità climatica, che condizionava la qualità e l'abbondanza dei raccolti. In questo ambito potrebbero essere inquadrati le piaghe descritte nell'Antico Testamento (Esodo 7, 14-13,16) e che afflissero gli egiziani, si stima fra il 1250-1300 a.C. (acqua mutata in sangue, invasione di rane, zanzare, mosche velenose, pestilenza fra il bestiame, pustole/piaghe, grandine, locuste, tenebre, morte dei primogeniti degli egiziani). Probabilmente alcune potrebbero essere in relazione con i cereali contaminati da micotossine, che potrebbero aver provocato malattie o per azione diretta a seguito di ingestione di alimenti contaminati, o per inalazione. Il fatto che gli ebrei fossero immuni dalle piaghe che colpivano gli egiziani, potrebbe essere spiegato con le abitudini di questo popolo, dedito soprattutto alla pastorizia, che aveva ovviamente un regime alimentare diverso da quello tipico degli agricoltori egiziani, i quali conservavano i cereali in primitivi granai-sili.

Il problema delle micotossine non è quindi un problema nuovo e forse ha condizionato la storia e la salute dei popoli più di quanto normalmente si pensi.

Nell'autunno del 1943, nella regione di Limoges in Francia, migliaia di persone vennero colpite da una strana malattia caratterizzata da convulsioni, dolori lancinanti alle estremità e lesioni cutanee vaste, accompagnate da febbre alta e senso di bruciore insopportabile; in pochi

giorni si poteva manifestare la gangrena e la morte. In casi meno gravi, il decorso si svolgeva in modo sub-acuto ma con sofferenze ed esiti più o meno analoghi, attribuibili all'azione vasocostrittiva dell'ergotamina, il più importante principio attivo presente negli sclerozoidi della segale cornuta. Proprio a causa del senso di bruciore insopportabile, la malattia venne chiamata in Francia "mal des ardents" e "Fuoco di S. Antonio"¹ o "Ignis Sacer" in Italia.

L'ergotismo epidemico assurse a tale importanza nel medioevo e nei secoli successivi, da essere compreso fra le pestilenze, sospettato di essere una malattia infettiva trasmissibile e diffusiva. Peraltro l'infezione e la diffusibilità esistevano, ma non avvenivano direttamente attraverso l'uomo, bensì attraverso la contaminazione dei cereali; l'uomo ne subiva la conseguenza tossica per via alimentare, consumando pane di segale e prodotti derivati contaminati dal fungo.

Per soccorrere l'ingente numero dei colpiti sorse l'Ordine degli Antoniani del Delfinato. S. Antonio fu considerato il Patrono protettore; da ciò la denominazione "fuoco di S. Antonio". L'Ordine degli Antoniani si diffuse ben presto in molte nazioni, dove furono fondati ospedali dedicati al Santo protettore; fra le mansioni di questo Ordine vi era quella di praticare le amputazioni degli arti cancrenosì. Le porte degli ospedali e dei chiostrì dell'Ordine erano tinte di rosso, simbolo del fuoco, o recavano dipinte le fiamme. Gli arti amputati delle persone scampate alla morte venivano talora essiccati e conservati quasi come ex voto di chi riusciva a sopravvivere.

Fra la fine del Medio Evo e l'inizio del Rinascimento, più precisamente nel 1400, la popolazione vivente in Italia era molto ridotta (Tabella 1). Vaste zone e interi villaggi erano praticamente disabitati, sul territorio vivevano circa sette milioni di persone (contro gli oltre 55 milioni di oggi). La popolazione era concentrata nei borghi e nelle poche città.

Tabella 1. Popolazione residente e incidenza di epidemie in Italia ed Europa Nord

Epoca	Popolazione stimata (milioni)		Epoca	Numero di epidemie	
	Italia	Europa Nord Occidentale		Italia	Europa Nord Occidentale
1400	7	26,75	1351-1430	235	625
1500	10	23,4	1431-1499	220	710

(*) Isole britanniche, Francia, Paesi Bassi, Germania, Austria, Boemia, Svizzera

L'Europa Nord Occidentale non presentava certo una situazione migliore; nello stesso periodo la popolazione era stimata in 26,7 milioni di abitanti (Tabella 1). Alla fine del Medio Evo la popolazione complessiva dell'Europa Nord Occidentale e dell'Italia si attestava su un valore di poco superiore ai 33 milioni di abitanti.

Le "epidemie" erano un fatto ricorrente; fra il 1400 e il 1500 le cronache ne riportano ben 1790, accompagnate spesso da gravi carestie, anche se non sempre è chiaro il rapporto causa-effetto fra carestia e il manifestarsi di una "epidemia".

Le epidemie falciavano le popolazioni delle città e dei borghi e le popolazioni rurali, togliendo forze di lavoro alla coltivazione dei campi, con effetti drammatici sulle fragilissime economie e sulla disponibilità di alimenti.

¹ La denominazione "fuoco di S. Antonio" è anche attribuita all'*herpes zoster* come testualmente è richiamato in una nota di Major (1959) (1). La denominazione colloquiale comune alle due malattie deriva senza dubbio da una similitudine della sintomatologia principale, l'intenso bruciore della zona del corpo interessata. Peraltro le differenze tra le due affezioni morbose restano sostanziali e consistono soprattutto nel fatto che l'*herpes zoster* è malattia sporadica, non epidemica per riattivazione del virus latente varicella-zoster nelle radici dorsali dei gangli nervosi e si presenta con maggiore frequenza tra 60 e 70 anni.

L'andamento di varie epidemie, ad un'analisi epidemiologica attenta, manifestava un comportamento definibile "bizzarro".

Matossian, nell'intento di comprenderne le ragioni, ha analizzato il succedersi delle epidemie a partire dall'Alto Medio Evo, in relazione con l'alternarsi delle situazioni climatiche e ha tratto la convinzione di una possibile relazione più con la qualità dei cibi che con la quantità; tanto è vero che (Tabella 1), in situazioni di abbondanza di cereali si riscontrava, a volte, una incidenza più frequente della peste, specie della peste bubbonica. Il fatto viene spiegato con la proliferazione di topi nei granai, quando i cereali venivano conservati più a lungo del solito e spesso venivano alterati da attacchi di insetti e di muffe.

Nel Medio Evo le popolazioni erano fortemente dipendenti dai cereali. La segale era il cereale più utilizzato per la panificazione, soprattutto a nord delle Alpi, seguita dall'orzo, dal frumento, dall'avena, dal riso e da molti altri cereali minori oggi quasi scomparsi.

Nei due anni precedenti la comparsa della grande pandemia che colpì l'Europa fra il 1348 e il 1350, il clima era stato estremamente piovoso, freddo, umido, i raccolti scarsi e di cattiva qualità. Inoltre, a causa delle poche giornate di sole, non sempre avevano potuto essere essiccati adeguatamente. La pandemia colpì non solo l'uomo ma anche, e in modo evidente, i topi e si ebbe anche una elevata mortalità fra cavalli, bovini, pecore, capre, e altri animali domestici.

Il grafico riportato di seguito (Figura 1) evidenzia in modo drammatico lo stato della popolazione, fra il 1250 e il 1550, in Normandia. A partire dal 1350 si ebbe un progressivo decremento demografico che vide la popolazione ridotta a circa il 45% attorno al 1380, per scendere a poco più del 30% attorno al 1460. Occorreranno quasi 100 anni per ritornare alla situazione precedente.

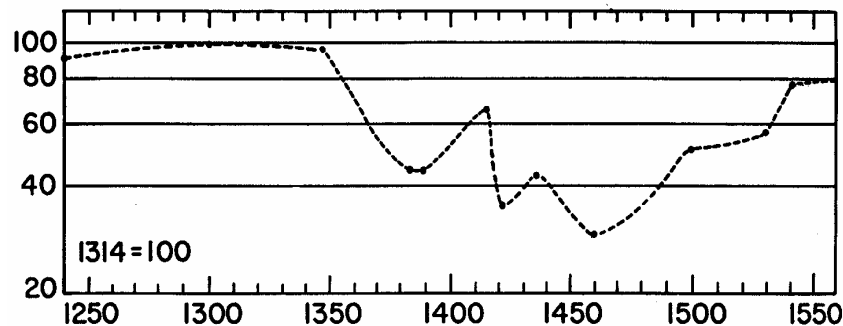


Figura 1. Andamento dell'indice della popolazione nella Normandia orientale fra il 1250 e il 1550 (riprodotta per gentile concessione di Yale University Press) (1)

Condizioni climatiche caratterizzate da elevata piovosità, alta umidità e temperature relativamente basse erano risultate estremamente favorevoli allo sviluppo di muffe responsabili della produzione di varie micotossine sui cereali in campo e in magazzino. I paesi a clima più secco e freddo nello stesso periodo (Islanda, il nord della Norvegia e della Svezia, la Finlandia, larghe aree della Russia o dei Balcani) furono colpiti dalla pandemia in ritardo, solo quando si verificarono condizioni di elevata piovosità. Nei territori a clima secco quindi la pandemia non si diffuse e non causò elevata mortalità, nonostante i commerci e gli spostamenti degli abitanti rendessero il contagio possibile.

Matossian osserva che oltre al contagio "altri fattori aggravanti od altre malattie erano probabilmente necessari per causare un'elevata mortalità" e conclude che "Se queste premesse

sono corrette, appare giustificato orientare l'attenzione dall'agente patogeno causale della peste al sistema immunitario di difesa degli uomini e dei topi".

Significativo è il fatto che la situazione migliorò drasticamente all'aumentare della percentuale di frumento nella dieta a scapito di altri cereali e soprattutto della segale. La quota del frumento utilizzato nell'alimentazione è passata in certe zone dal 30% circa nel periodo 1300-1350 a quasi l'80% nel periodo 1450-1500 (Tabella 2) (1).

Tabella 2. Variazioni delle percentuale di frumento nella dieta nella zona di Lione

Anni	Percentuale di frumento
1300-1350	30,8
1350-1400	51,5
1400-1450	66,0
1450-1500	78,8

I medici inglesi avevano evidenziato, a metà del diciassettesimo secolo, una relazione fra la dieta a base di segale e una serie di disturbi nervosi anche gravi, con manifestazioni caratterizzate da convulsioni e allucinazioni, che facevano considerare le persone colpite indemoniate. A volte gli ammalati erano sottoposti a pratiche esorcistiche. In alcune situazioni queste manifestazioni nervose portarono anche a processi con l'accusa di stregoneria.

I processi per stregoneria, fra la fine del 1550 e la prima metà del 1600, furono particolarmente concentrati nelle zone dove prevalente era il consumo di segale. La segale, in condizioni climatiche sfavorevoli, può essere facilmente contaminata dalla *Claviceps purpurea* i cui sclerozi contengono vari alcaloidi, alcuni dei quali ad effetto allucinogeno. Sono le aree a nord delle Alpi, caratterizzate in quel periodo da clima freddo e particolarmente umido, ove questi episodi raggiunsero una particolare intensità (Figura 2). L'Irlanda, con una alimentazione a base di latticini e orzo, fu praticamente indenne, oltre che da situazioni epidemiche, anche dai processi per stregoneria.

In Inghilterra, nello stesso periodo storico, si era verificata una situazione di bassa fertilità ad andamento variabile condizionata dal modificarsi del rapporto fra il prezzo della segale e quello del frumento. La fertilità diminuiva quando il prezzo del frumento era elevato e aumentava il consumo di segale. La segale era il cereale base per la preparazione del pane, che anche le madri allattanti consumavano. Gli alcaloidi della segale cornuta, eliminati con il latte, determinavano una elevata mortalità dei neonati.

Alcuni medici francesi avevano già preso coscienza di questa situazione tanto che, all'inizio del 1600, consigliavano alle madri allattanti di consumare pane bianco per evitare che i loro bambini avessero "spasmi".

Un famoso quadro del pittore fiammingo Peter Brugel il Vecchio (ca 1525-1569), "I mendicanti", documenta i drammatici effetti dell'ergotismo su alcune vittime, in Olanda.

Anche la particolare situazione di panico che percorse la Francia nel 1789 e che si associò a manifestazioni di particolare ferocia in occasione della Rivoluzione Francese, sembra possa essere associabile al consumo di segale di cattiva qualità per le avverse condizioni climatiche di quel periodo.

La scomparsa dell'ergotismo – come è stato già accennato – fu dovuta alla scoperta della relazione intercorrente fra cereali parassitizzati dal fungo e comparsa della malattia.

Anche nei secoli successivi, la situazione di malnutrizione legata ad alimenti di cattiva qualità (attaccati da insetti o contaminati da muffe) era estremamente diffusa e le manifestazioni di tipo carenziale, (pellagra in zone ad alimentazione prevalente di mais per carenza di vitamina

PP, dermatiti, diarrea, disturbi mentali, morte) si sovrapponevano e si confondevano con gli effetti degli alimenti contaminati da micotossine (ulcerazioni in gola e manifestazioni emorragiche, depressione del sistema immunitario, soppressione linfociti B, neutrofili e linfociti T) Ne derivava una maggiore suscettibilità a malattie infettive di origine microbica o virale.

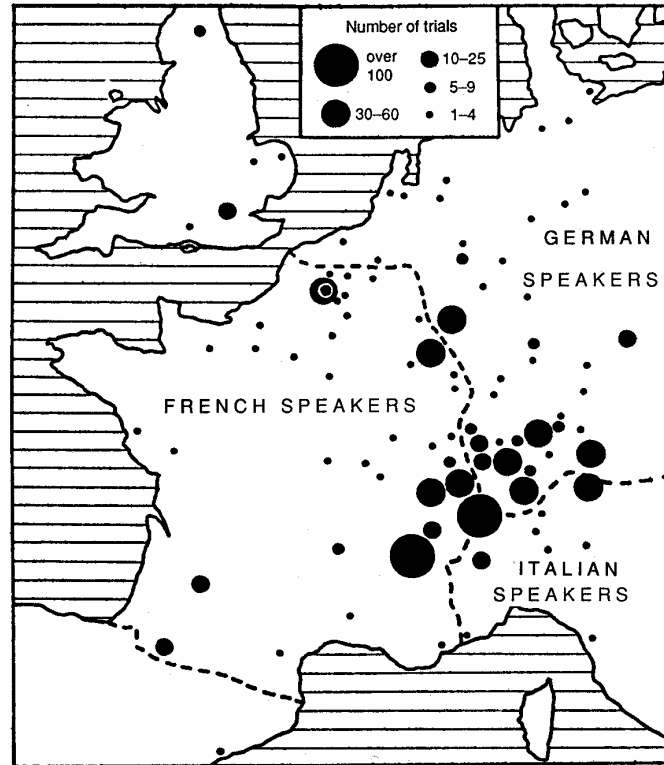


Figura 2. Distribuzione dei processi per stregoneria nell'Europa Occidentale fra il 1580 e il 1650 (riprodotta per gentile concessione di Yale University Press) (1)

La situazione era particolarmente grave in Russia alla fine dell'800. Nel 1897 la mortalità infantile era di 260 su 1000 nati contro i 156/1000 in Italia e Inghilterra. La situazione migliorò leggermente solo negli anni precedenti la 1^a guerra mondiale, per la diffusione del consumo della patata in sostituzione dei cereali. Nello stesso tempo si ebbe anche una diminuzione della mortalità da ergotismo, che era associato all'aleuchia tossico alimentare (ATA). Il Governo russo era ben al corrente delle cause alimentari che erano all'origine di questi fatti; ma la prevenzione veniva realizzata solo per i militari, ai quali venivano destinati i cereali di migliore qualità. Nel 1943 il Ministero della Salute dell'Unione Sovietica ha descritto l'ATA indotta da fusariotossina T-2. Tutti i cereali risultarono substrati più o meno contaminati o contaminabili, ma non la patata. Pertanto le micotossine, anche se identificate e studiate solo recentemente, hanno causato problemi all'uomo e agli animali sin dall'antichità.

Micotossine: un problema attuale

Tutti i continenti sono interessati dai problemi causati dalle micotossine. Infatti, vi sono differenze in termini di scala di importanza, ma aflatoxine, fumonisine, ocratossine, tricoteceni e zearalenoni preoccupano tutti i paesi, in particolare quelli emergenti.

Le micotossine sono dei killer silenziosi che colpiscono ovunque. Ci limitiamo a segnalare quello che riteniamo sia l'ultimo episodio grave. Nel maggio 2004 in Kenia nei distretti di: Kitui, Thika, Embu, Machakos Mbeere, vennero segnalati 323 casi con manifestazioni cliniche caratteristiche: occhi gialli, addome ingrandito, arti gonfi, nausea, vomito e piressia, in vari casi (122) morte. La causa venne identificata nel consumo di mais contaminato da oltre 20 ppm di aflatoxina B₁.

Anche l'Italia ha dovuto affrontare il problema, come risulta dallo schema riportato, che riassume gli episodi che abbiamo avuto occasione di rilevare direttamente

Casi da noi rilevati negli animali allevati in Italia dagli anni '60'

- fine anni '60: tacchini / arachide AFB
- anni '70: suini / mais - zearalenone; DON
- anni '70: vitelloni / necrosi coda - T2
- episodi: LEM / cavalli - fumonisine
- varie: tricoteceni, DON, ocratossina A, ecc.
- AFB₁- AFM₁: episodi rari fino al 2003
- AFB₁- AFM₁: 2003 mais/Latte grave contaminazione
- AFB₁- AFM₁: 2004 mais/Latte episodico??

Le micotossine sono un problema che viene da lontano, ma del quale, solo di recente, si è preso coscienza.

L'approccio scientifico inizia negli anni '60 a seguito della sindrome che colpì un elevato numero di tacchini in Inghilterra ("Turkey X disease" - Blount, W.P., Turkeys, 9, 52 (1961)). A prescindere dalle notazioni storiche - che associano la probabile presenza di micotossine a situazioni patologiche gravi che hanno colpito intere popolazioni; hanno influito sul numero di abitanti di intere zone, sulla diffusione di epidemie di vario tipo, probabilmente sul comportamento individuale e collettivo - possiamo chiederci perché le micotossine siano un problema.

Ormai è accertato che le micotossine agiscono sull'organismo animale per ingestione, inalazione o per semplice contatto, esplicando una serie di effetti:

- citotossico, teratogeno, cancerogeno, danni al DNA
- epato-nefro-enterotossico
- dermatossico, emorragico
- estrogenosimile
- neurotossico, ecc.
- immunosoppressore

Solo in alcuni casi sono chiari i rapporti di causa effetto fra la presenza di una micotossina e una manifestazione patologica.

Probabilmente è l'effetto immunosoppressore il più subdolo, in quanto predispone ad una serie di malattie di altra origine, con conseguenze epidemiologiche difficilmente valutabili.

L'organismo animale non sembra disporre di molti meccanismi di difesa nei riguardi di queste molecole; in vari casi sono attivi processi di trasformazione, che hanno come obiettivo quello di favorire l'eliminazione delle molecole stesse, magari aumentandone la solubilità in acqua. La suscettibilità nei riguardi delle varie micotossine è molto differenziata in funzione della specie e del momento fisiologico. Per i ruminanti la presenza del rumine rappresenta una barriera rilevante per alcune micotossine. L'adattamento alle micotossine è in genere poco noto, anche se è stato possibile selezionare ceppi di polli resistenti all'aflatossina B₁.

Le micotossine sono metaboliti secondari prodotti da funghi; quelle di maggiore interesse sono prodotte da specie appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, che determinano effetti indesiderati quando gli animali o l'uomo vi sono esposti. Rappresentano la faccia cattiva delle muffe, se consideriamo come faccia buona la capacità di alcuni miceti di produrre molecole a funzione antibiotica.

Si possono trovare in tutti gli alimenti:

- *cereali*: segale, mais, orzo, frumento, riso, miglio, ecc.; derivati fermentati;
- *frutta*: pistacchi, fichi secchi, arachidi, mandorle, uva, mele, ecc. (es. succhi, vino, ecc.);
- *altri vegetali*: caffè, cacao, erbe infusionali, spezie, foraggi, ecc.
- *prodotti di origine animale*: carni suine e derivati, latte e latticini (anche latte umano).

In pratica tutti i substrati organici possono, con varia specificità, essere substrato per lo sviluppo di muffe produttrici di queste molecole. Nei prodotti di origine animale sono in genere residui della contaminazione dei vegetali, ma non si escludono contaminazioni dirette durante la fasi di stagionatura e conservazione degli stessi.

Nonostante la pericolosità delle micotossine, che le pone come rischio reale fra i primi posti nella scala della valutazione (ad esempio prima dei pesticidi), questa non è avvertita dal consumatore.

L'attenzione del mondo scientifico nei riguardi di questo problema è notevole, dal 1972 fino ai primi sei mesi del 2004 sono stati pubblicati su riviste scientifiche un totale di oltre 20.000 lavori. Anche l'attenzione degli organi sanitari dei vari paesi è notevole (van Egmond & Junger, 2004).

Nel 2002, 100 paesi risultavano dotati di una legislazione specifica sull'argomento. In particolare, le micotossine per le quali vi sono specifiche norme risultano essere: aflatossine (B₁ – M₁), ocratossina A, fumonisina B₁, B₂, zearalenone, tricoteceni, deossinivalenolo, diacetossiscirpenolo, T-2, HT-2, ac. agarico, alcaloidi ergotici, patulina, fomopsina, sterigmatocistina. Attualmente, il 90% della popolazione mondiale è coinvolta dal punto di vista normativo. Dal 1995 il numero dei paesi che si è dato delle norme è aumentato del 30%.

I criteri adottati dai vari paesi nel fissare dei parametri sono piuttosto differenziati; un caso eclatante è rappresentato dai limiti di AFM₁ imposti per il latte. Su 60 paesi dotati di norme specifiche nel 2002 (2), 21 pongono il limite di 0,5 µg/kg, fra questi gli USA, e 36 pongono il limite di 0,05 µg/kg, compresa l'UE. Si tratta di un rapporto di 1/10. In merito al significato di questa differenza dal punto di vista del rischio del consumatore, il JEFCA nel 2001 (3) si esprime testualmente:

“The calculation showed that, with worst case assumption, projected risk for liver cancer attributable to use of the proposed maximum levels of aflatoxin M₁ of 0,05 e 0,5 µg/kg are very small, and there is no significant health benefit from reducing a 0,5 µg/kg limit to 0,05 µg/kg.”

Le micotossine entrano nella filiera alimentare umana per varie vie dirette, che a partire dal campo possono riguardare tutte la fasi produttive (colture in campo, raccolta, conservazione e immagazzinamento, trasporto, miscelazione, distribuzione, Immagazzinamento, lavorazioni finali, fino alla conservazione a livello domestico); oppure per vie indirette, attraverso alcuni

alimenti di origine animale. Fortunatamente questa via è di minor rilievo, dato che il passaggio attraverso l'allevamento animale rappresenta una barriera importante.

Le sindromi tossiche causate dalle micotossine sono indicate come micotossicosi o più correttamente si dovrebbe parlare di sospette micotossicosi, dato che non sempre è possibile evidenziare un rapporto di causa-effetto inequivocabile. Le più importanti sono di seguito riportate:

Tabella 3. Sospette micotossicosi umane

Malattia	Alimento	Agente eziologico	Tossina
Aleukia tossica alimentare	Cereali	<i>Fusarium</i> spp.	Tricoteceni
Nefropatia dei Balcani e nefropatia cronica interstiziale	Cereali	<i>Penicillium</i>	Ocratossina A
Berberi cardiaco	Riso	<i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> spp.	Citreoviridina
Ergotismo	Segale, cereali	<i>Claviceps purpurea</i>	Alcaloidi dell'ergotismo
Tumori esofagei	Mais	<i>Fusarium verticillioides</i>	Fumonisin B ₁
Epatocarcinoma (aflatossicosi acuta)	Cereali, arachidi	<i>Aspergillus flavus</i> e <i>parasiticus</i>	Aflatossina B ₁
Malattia di Kashin-Beck	Cereali	<i>Fusarium</i> spp.	Tricoteceni
Kwashiorkor	Cereali	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	Aflatossina B ₁
Onyalai	Miglio	<i>Phoma sorghina</i>	Indefinito
Sindrome di Reye	Cereali	<i>Aspergillus</i>	Aflatossina B ₁
Cancro ai testicoli	Vari	<i>Penicillium</i>	Ocratossina A
Difetti al tubo neurale	Mais	<i>Fusarium verticillioides</i>	Fumonisin B ₁

Accanto alle micotossine per le quali sono stati ipotizzati od accertati sospetti di micotossicosi e verso le quali si è concentrata l'attenzione dei ricercatori e degli organismi deputati alla tutela della salute pubblica, ve ne sono altre che possiamo considerare emergenti o per le quali può essere accettata l'espressione di "micotossine in cerca di malattia" quali: micotossine da *Alternaria* (alternariolo, ac. tenuazonico, ecc.); da *Fusarium* (moniliformina, ac. fusarico, ecc.); da *Aspergillus* (sterigmatocistina, gliotossine, ecc.).

Alcuni medici francesi avevano già preso coscienza di questa situazione tanto che, all'inizio del 1600, consigliavano alle madri allattanti di consumare pane bianco per evitare che i loro bambini avessero "spasmi".

Per ora abbiamo scarsi elementi per quantificare gli effetti associativi sull'organismo animale.

Gli effetti di maggiore rilievo sugli animali allevati, riproducibili sperimentalmente, si caratterizzano per: riduzione delle performance produttive e riproduttive; rifiuto dell'alimento; aumento della morbilità; aumento della mortalità; immunodepressione (ridotta efficacia delle vaccinazioni). Tanto è vero che molti sintomi osservati in situazioni di micotossicosi sono manifestazioni secondarie derivanti da malattie opportunistiche conseguenti all'immunosoppressione da esposizione a micotossine (4).

Gli effetti delle varie micotossine sono piuttosto differenziati.

Aflatossine

Gli alimenti a rischio sono: arachide, mais, cotone, frutta secca, latte, ecc.

La biotrasformazione comporta processi di riduzione, idrossilazione, epossidazione, O-dealchilazione (con intervento di NADPH riduttasi- citocromo P 450). L'eossidazione sta alla base dell'induzione di mutagenicità e cancerogenicità. Si osserva anche alterata risposta infiammatoria, inibita (polli) immunità cellulo-mediata, depressa sintesi RNA e proteine, citochine, ecc (susc. genetica - polli).

La depressione dell'immunità è dimostrata anche in suini, tacchini, cavie, conigli. Gli effetti sono aggravati dallo stress.

Il problema latte è rappresentato dal *carry over* dell'AFM₁, nei mammiferi (uomo compreso), e dagli effetti di concentrazione in certi processi produttivi alimentari (es. produzione di formaggi).

Zearalenone

Gli alimenti a rischio sono: mais granella, insilati, cereali, sesamo, fieni, soia granella.

La biotrasformazione è data dalla conversione nella forma α , che è più attiva e a β -zearalenolo nei ruminanti. I metaboliti si ritrovano nelle urine come α e β -zearalenolo e anche α e β zearalanolo. Non sono segnalati effetti diretti sul sistema immunitario. La manifestazione più eclatante è l'iperestrogenismo, soprattutto nei suini.

Tricoteceni

Gli alimenti a rischio sono identificabili in tutti i substrati utilizzabili dal *Fusarium*.

DON

Per questa tossina gli alimenti a rischio sono mais e frumento.

La biotrasformazione è di deossidazione, processo idrolitico messo in atto dalla microflora del ruminante e dell'intestino

L'effetto è una depressione nell'assunzione di alimenti, l'influenza sull'immunità umorale (sintesi anticorpi), la riduzione di IgM, IgG, l'aumento di IgA, l'alterazione dell'attività dei linfociti T e delle citochine. Si verifica la depressione delle performances dei suini e la produzione del latte. Si nota un effetto sinergico con acido fusarico.

Tossina T-2 e DAS

Gli alimenti a rischio di contaminazione sono mais, orzo, frumento, miglio.

Le manifestazioni sono di tipo emorragico.

La biotrasformazione osservata è da tossina T2 a HT-2, coniugata con acido glucuronico ed escreta con bile; da DAS a MAS (monoacetossi scirpenolo) trasformazione operata da microflora intestinale di ratti, bovini e suini.

Ocratossina A

Gli alimenti a rischio sono orzo, cereali in genere, cacao, caffè, uva, carni suine.

Elevata risulta l'esposizione della popolazione, anche nelle fasce più deboli (il latte umano risulta contaminato per l'81% da un'indagine effettuata in Lombardia nel 2001).

L'effetto dominante è sulla funzionalità renale "nefropatia Balcanica"; a questa va aggiunta neurotossicità.

Interferisce sull'attività immunitaria deprimendo nel plasma le globuline $\alpha 1$, $\alpha 2$, β e γ e nei tessuti linfoidei e nel siero le IgG, IgA, IgM. Ne deriva un effetto dose-risposta nei suini per quanto riguarda la suscettibilità alla salmonellosi.

Il meccanismo possibile è l'inibizione della sintesi proteica per competizione della molecola dell'ocratossina con la fenilalanina.

Fumonisine

Gli alimenti a rischio sono mais e suoi derivati.

Gli effetti sul bestiame sono: sindromi ELEM negli equini, edema polmonare nei suini; sull'uomo, sospetta cancerogenità epatica, esofagea.

La bioattività è analoga alla sfingosina, antagonista della sintesi degli sfingolipidi.

L'interferenza sull'attività immunitaria è di predisposizione alle infezioni da *E. coli* (suinetti), con riduzione dell'immunità locale; influisce sullo sviluppo delle cellule dell'epitelio e favorisce l'aumento della traslocazione batterica attraverso la parete intestinale.

Risultano quindi chiaramente documentati dalla letteratura gli effetti delle micotossine sul sistema immunitario, ma i risvolti che ne possono derivare non sono di facile valutazione, specie se complicati da effetti associativi. È questo un aspetto che merita di essere particolarmente approfondito, sia per l'uomo ma soprattutto per gli animali, anche per le conseguenze che si possono avere sullo stato di benessere e sull'impiego di farmaci.

Effetti economici della contaminazione degli alimenti da micotossine

Le stime che sono disponibili sono molto generali. La FAO stima che circa il 25 % del raccolto mondiale sia contaminato a vario livello da micotossine e da ciò derivano perdite per svariati miliardi di dollari. Negli USA queste perdite sono quantificate per un valore annuo variabile da 418 a 1.666 milioni di dollari.

Le perdite si manifestano lungo tutto la filiera produttiva, dal campo fino alle fasi ultime delle lavorazioni dei cereali, comprese le perdite derivanti dal peggioramento dello stato sanitario degli animali, dal conseguente maggior impiego di farmaci e dalla riduzione delle performances.

Nella valutazione di queste perdite, tutte nel breve periodo, non è compreso il peggioramento dello stato sanitario delle popolazioni più o meno esposte, per le quali si hanno effetti in lungo periodo che finiscono per gravare sui costi sanitari, in modo non apparente.

Da questa preoccupazione deriva la scelta da parte di molti paesi di introdurre limiti sempre più rigorosi, anche se in breve periodo gli effetti non sono misurabili. D'altronde, quando si ha a che fare, come nel caso dell'AFB₁, con molecole certamente cancerogene e genotossiche, è ovvio che si tenda a richiedere il livello più basso possibile.

Considerazioni etiche in merito al costo della precauzione

Quale è il prezzo della precauzione? (5).

Un'analisi economica degli effetti della variazione dei limiti di accettabilità dei livelli di aflatoxine in prodotti importati dall'Africa, evidenzia effetti rilevanti sul piano commerciale. La riduzione del 10% del limite AF per l'arachide nell'Unione Europea, ne determina una riduzione dell'importazione dell'11%. L'adozione dei nuovi limiti EU per AF (4 µg/kg totali) rispetto ai limiti del Codex (15 µg/kg totali) riduce il flusso commerciale del 63%.

Si ha una perdita di esportazione dell'Africa di 720 miliardi di US\$ (dati rif. 1998). Si tratta di una cifra veramente rilevante per le economie dei paesi di quel continente. Si tratta di capire quanto l'adozione di questi livelli sempre più restrittivi sia un fattore di sicurezza reale.

Il segretario Generale dell'ONU Kofi Annan (2001) commenta in un suo intervento: "la Banca Mondiale ha calcolato che questi (limiti UE) possono salvare la vita di un cittadino dell'U.E. ogni due anni. Ma escludendo dalla commercializzazione cereali, frutta secca, nocciole/noci per 670.000 milioni di dollari si getta in una situazione di povertà molte migliaia di africani, che soffriranno di morte precoce per malnutrizione e malattie endemiche".

Sembra evidente che queste scelte, se tutelano le popolazioni di alcuni paesi, possono avere effetti gravi sulle economie e sulle popolazioni di altri paesi. Viene avanzato anche il dubbio che queste scelte rappresentino una forma di nuove barriere doganali.

In ogni caso si innescano aspetti etici nelle valutazioni relative, che implicano un allargamento del principio di precauzione ad una valutazione globale, che deve riguardare i vari aspetti del problema.

Cosa fare?

Solo una visione globale della filiera, che coinvolga competenze di tipo agronomico, climatologico, fitopatologico, entomologico, chimico, molecolare, zootecnico, nutrizionale (animali allevati e uomo), medico e ingegneristico, può consentire un approccio gestionale sistemico per prevenire e controllare il problema. Le nuove opportunità offerte da piante geneticamente modificate resistenti ad attacchi parassitari (insetti e funghi) vanno attentamente esplorate. Alcune prospettive sembrano essere interessanti.

Un esempio di approccio integrato è dato certamente dal Progetto del MiPAF "AFLARID": si tratta di un "programma di ricerca per la riduzione della contaminazione da aflatoxine nel latte e derivati; si propone di mettere a punto un Sistema di Supporto alle Decisioni (SSD) per gestire la filiera maidicola/Lattiero-casearia".

Conclusioni

Le micotossine sono quindi una sfida globale per il futuro. Una visione pessimistica ci farebbe dire che sono un problema, talvolta all'apparenza irrisolvibile, per tutti i paesi, più grave per alcuni. Ma una visione ottimistica potrebbe invece considerarle un elemento base per costruire collaborazioni tra operatori e ricercatori in diverse discipline e fra paesi fra loro distanti e con differenti interessi economici.

Ringraziamenti

Si ringrazia il prof. Fabio Galvano, Università di Catania, per il materiale bibliografico fornito.

Bibliografia

1. Matossian MK. *Poisons of the Past: Molds, Epidemics, and History*. New Haven: Yale University Press; 1989.
2. Van Egmond HP, Jonker KM, Poelman M, Scherpenisse P, Stern AG, Wezenbeek P, Bergwerff AA, Van den Top HJ. Proficiency studies on the determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish. *Food Additives and Contaminants* 2004;21(4):331-40.
3. JEFCA. Joint Committee on Food Additives. Fifty-six meeting. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva, 6-15 February 2001. Disponibile all'indirizzo: http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/en/summary_56.pdf ; ultima consultazione 3/12/2005.
4. Whitlow LW, Hagler WMJr. Mycotoxins in feeds. *Feedstuffs* 76 2004;38:66-76.
5. Otsuki T, Wilson J, Sewadeh M. Saving Two in a Billion: Quantifying the Trade Effect of European Food Safety Standards on African Exports. *Food Policy* 2001;26(5):495-514.

APPROCCIO OLISTICO NELL'ANALISI DEL RISCHIO PER LE MICOTOSSINE

Marina Miraglia, Barbara De Santis, Valentina Minardi, Carlo Brera
Reparto OGM e Xenobiotici di Origine Fungina, Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Analisi del rischio come pilastro della sicurezza alimentare

La sicurezza alimentare riveste un ruolo sempre più rilevante nel complesso panorama della salute umana. Tale rilevanza ha spinto le organizzazioni internazionali, comunitarie e nazionali ad affrontarne sistematicamente i diversi aspetti attraverso le procedure dell'analisi del rischio, quali codificate per la prima volta dalla FAO/WHO nel 1995 (Figura 1) (1). L'analisi del rischio, considerata a livello internazionale e a livello europeo (Reg. (CE) 178/2002) (2) il pilastro della sicurezza alimentare, rappresenta un percorso multidisciplinare strettamente correlato agli aspetti sanitari, economici ed etici del problema.

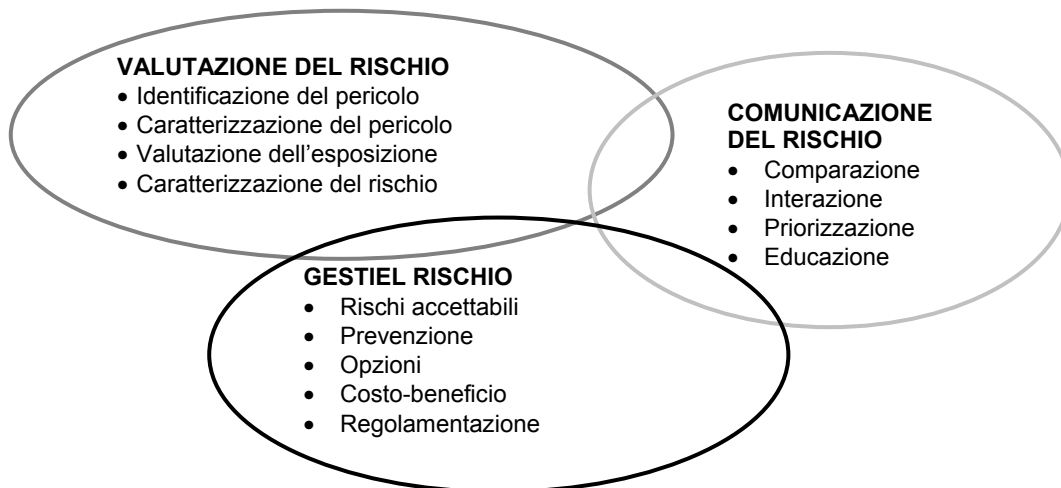


Figura 1 Analisi del rischio per le micotossine

Storicamente l'analisi del rischio, da effettuarsi singolarmente per ogni agente chimico, fisico o biologico che possa provocare un danno all'uomo, agli animali o all'ambiente, è stata staticamente e settorialmente scomposta nelle tre fasi relative alla valutazione, gestione e comunicazione del rischio.

La prima fase, considerata di competenza prettamente scientifica, è costituita essenzialmente da processi conoscitivi relativi all'agente in esame, che implicano: (i) l'identificazione del pericolo, cioè l'acquisizione che l'agente è intrinsecamente in grado di arrecare un danno alla

salute dell'uomo, degli animali e/o all'ambiente e (ii) la caratterizzazione del pericolo individuato, cioè lo studio dell'entità del danno, tramite l'approfondimento della tossicologia dell'agente in esame. Gli altri due stadi della valutazione del rischio, cioè (iii) la valutazione dell'esposizione e (iv) la caratterizzazione del rischio, identificano quale sia il reale impatto sanitario sulla popolazione anche sulla base dei consumi alimentari. Queste ultime due fasi assumono pertanto una valenza "locale" in quanto hanno il compito di valutare l'entità effettiva del danno in un determinato contesto geografico e ambientale.

La gestione del rischio, nella sua accezione di area separata dalla valutazione del rischio, viene invece considerata l'insieme delle valutazioni e scelte "politiche" che dovrebbero essenzialmente valutare i rischi accettabili, promuovere opzioni preventive, effettuare analisi di costo/beneficio ed emanare normative.

La terza fase, rappresentata dalla comunicazione del rischio, dovrebbe assicurare che tutti gli *stakeholder* siano informati, coinvolti e partecipi nel processo di analisi del rischio.

Aspetti innovativi e prospettici dell'analisi del rischio

Recentemente è stata evidenziata la necessità che i vari elementi dell'analisi del rischio non siano considerati domini a se stanti, ma che debbano essere riguardati come elementi del "ciclo del rischio" (Figura 2) (3). In particolare è stato riconosciuto che la comunicazione del rischio deve rappresentare la piattaforma su cui sia la valutazione che la gestione del rischio si devono sviluppare e con cui devono interagire e confrontarsi. Inoltre in questa nuova concezione la gestione e la valutazione del rischio svolgono attività interattive e iterative, risultando in opzioni sempre più mirate ed efficaci. L'interattività comporta lo scambio di *inputs* e di *outputs* tra contributi scientifici e gestionali, mentre l'iteratività comporta la rivisitazione progressiva e periodica della situazione relativa all'agente studiato, sulla base di mutate condizioni e/o di nuove acquisizioni. Verticalizzando sulle micotossine, un esempio di questo percorso concertato è rappresentato dalla valutazione della esposizione da effettuarsi preliminarmente alle consequenziali attività di gestione del rischio (quali la normativa e le attività di sorveglianza), che a loro volta forniscono preziosi dati di valutazione regionale del rischio, informazione quest'ultima a sua volta importante per la definizione delle attività di prevenzione. E ancora, i dati di caratterizzazione del rischio, come parte della valutazione del rischio, possono portare alla stima dei costi riferibili all'impatto sulla salute dell'uomo e degli animali, da utilizzare, unitamente ad altri costi (impatto sulla salute pubblica, ridotta produttività degli animali da allevamento e ridotto valore di mercato delle derrate contaminate), nell'analisi costi/benefici, attività che rientra nella gestione del rischio.

Inoltre una visione olistica dell'analisi del rischio porta alla considerazione che il panorama della sicurezza alimentare è estremamente multifaccettato e molti sono gli agenti per i quali è stato necessario intraprendere (o dovrebbe essere intrapresa) l'analisi del rischio, supportata da dati statisticamente rappresentativi.

Questa visione, unitamente alla consapevolezza che le risorse economiche sono generalmente insufficienti a fronteggiare adeguatamente tutte le problematiche, porta alla necessità della prioritizzazione sia dei rischi che delle opzioni (Figura 3). La comparazione preliminare dei rischi, da effettuarsi anche su base epidemiologica, può risultare in *inputs* per la formulazione di scelte di azioni (sia nel settore pubblico che privato) e nella ragionata allocazione delle risorse.

Estendendo ad un ambito planetario le considerazioni effettuate sulla sicurezza alimentare la visione olistica dell'analisi del rischio diviene ancora più complessa, collegandosi direttamente a problemi etici di assicurazione di risorse adeguate di cibo per tutti (*food security*).

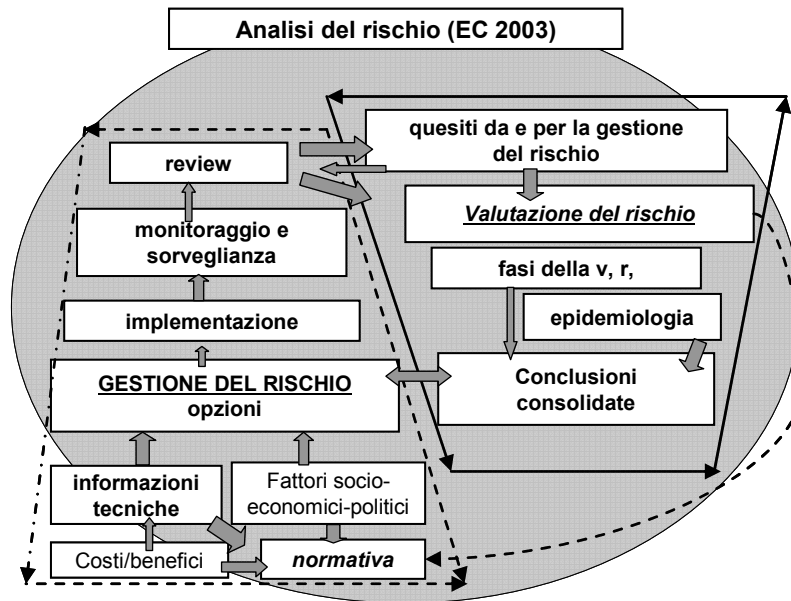


Figura 2. Ciclo del Rischio

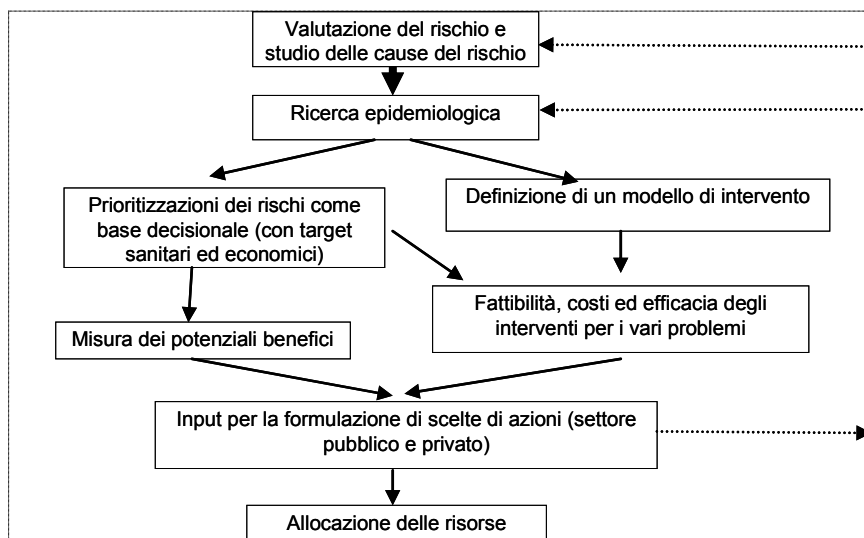


Figura 3. Prioritizzazione dei rischi e delle opzioni

Analisi del rischio per le micotossine

Come evidenziato in altre parti di questa monografia il problema sanitario ed economico riferibile alla contaminazione da micotossine negli alimenti e mangimi riveste una valenza

prioritaria nel panorama della sicurezza alimentare (*food safety*) e della assicurazione di razioni alimentari adeguate per tutti (*food security*). Tale impatto si interfaccia con problemi economici, commerciali, politici ed etici di rilevanza planetaria e multifaccettata che collocano le micotossine fra le priorità per le autorità governative, la comunità scientifica e il settore produttivo. Per contro a tale riguardo rimane ancora piuttosto scarsa l'attenzione del consumatore verso questa problematica per motivi di natura diversa quali la mancanza di effetti acuti delle micotossine e la carenza di una adeguata informazione. Nonostante ciò, a livello europeo e nazionale, l'analisi del rischio per le micotossine ha ricevuto, e ancor più sta ricevendo, una particolare attenzione.

Valutazione del rischio da micotossine

La valutazione del rischio è stata effettuata con ragionevole scientificità per molte micotossine, anche se le ricerche epidemiologiche a riguardo, peraltro di difficile attuazione, sono molto carenti.

Gli aspetti della caratterizzazione del pericolo da micotossine sono trattati in altra parte di questa monografia.

Per quanto riguarda la caratterizzazione del rischio, processo che implica anche la valutazione della incidenza di contaminazione, numerosi programmi coordinati (4, 5, 6, 7) sono stati promossi dalla UE per valutare la presenza di alcune micotossine in determinate derrate alimentari di particolare rilievo. Per la valutazione dell'esposizione esempi di studi effettuati sono rappresentati dalle SCOOP tasks promosse dall'UE per valutare l'esposizione della popolazione europea alle più importanti micotossine (8, 9, 10). Inoltre, sia a livello nazionale che internazionale, sono stati sviluppati o sono in corso di sviluppo molti progetti di ricerca al fine di acquisire elementi da utilizzare nella valutazione del rischio da micotossine. Esempi di queste iniziative sono alcuni progetti nell'ambito del "Mycotoxin Cluster" (<http://www.mycotoxin-prevention.com/>) del V Programma Quadro dell'UE. Progetti di ricerca in corso di svolgimento includono SAFEFOODS (<http://www.safefoods.nl/>), che prevede il confronto della contaminazione da micotossine nelle tre principali modalità di produzione (convenzionale, *low input* e *high input*) e la valutazione del rischio tramite approccio probabilistico (Metodo Montecarlo).

Gestione del rischio da micotossine

In Europa e in Italia la gestione del rischio da micotossine risulta, per alcune parti, molto ben sviluppata: in particolare è stato messo a punto un pacchetto normativo piuttosto robusto e completo. Tutto il settore produttivo sta reagendo a questi provvedimenti in maniera responsabile e consequenziale, nonostante non siano pervenute sollecitazioni particolari a riguardo da parte dei consumatori.

La normativa sulle micotossine in Europa e in Italia

A partire dal 1976, anno in cui sono stati definiti limiti massimi per le aflatossine nei mangimi, sono stati emanati, sia a livello nazionale che comunitario, provvedimenti legislativi relativi a livelli massimi ammissibili per le più importanti micotossine in molte matrici alimentari, oltre a provvedimenti legislativi relativi a metodi per il campionamento, a requisiti per l'analisi, a condizioni per l'importazione e a programmi coordinati da eseguire nell'ambito del controllo ufficiale.

Definizione di limiti massimi ammissibili in alimenti e mangimi

Nel 1998 l'UE ha iniziato il processo sistematico di definizione di limiti massimi ammissibili per le micotossine negli alimenti, e attualmente il pacchetto normativo risulta notevolmente sviluppato anche se non ancora completo. La Tabella 1 elenca i limiti massimi ammissibili per le micotossine nelle diverse matrici alimentari in Europa.

I **cereali** sono attualmente oggetto di una normativa dettagliata per le aflatossine (AFs), per l'ocratossina A e per le fusariotossine (Tabella 1). Di rilievo la differenziazione dei limiti per l'aflatossina nel mais tra prodotto non destinato al consumo umano diretto (da sottoporre a cernita o ad altri trattamenti fisici) e prodotto destinato al consumo umano diretto. Questa differenziazione è stata resa possibile dalla disponibilità di dati relativi all'effetto del processo tecnologico sui livelli di tossina contenuti nella materia prima (11); per le aflatossine in altri cereali, a causa della carenza di dati analoghi, non è stato possibile effettuare una simile differenziazione con grave danno per il settore della trasformazione. Limiti differenziati sono in vigore per tutti i cereali grezzi per l'ocratossina A e per le fusariotossine, per le quali esistono informazioni sull'effetto del processo tecnologico (12, 13). Come riportato in Tabella 1 per alcune fusariotossine in alcune derrate alimentari i limiti dovrebbero entrare in vigore a partire dal 1 luglio 2007, per permettere al settore produttivo di adeguarsi ai limiti stessi. Va inoltre rilevato che per le aflatossine e l'ocratossina A non viene specificato in quale stadio della produzione debba essere applicato il limite sulla materia prima. Ciò può creare notevoli inconvenienti al settore produttivo in quanto è noto che alcune operazioni di pulitura della materia prima possono diminuire il livello di contaminazione. Per le fumonisine invece è stato specificato che il limite sul prodotto non processato si applica ai cereali commercializzati per il first stage processing. Più precisamente per first stage processing si intendono "tutti i trattamenti fisici o termici del grano diversi dall'essiccazione. Se non viene esercitata alcuna azione fisica sul grano e quest'ultimo rimane intatto dopo la pulizia e la cernita, le procedure di pulizia, cernita o essiccazione non sono considerate parte della "prima trasformazione". Nonostante queste precisazioni tuttavia, la complessità e la continua evoluzione dei processi tecnologici di lavorazione dal campo alla molitura rendono di difficile individuazione il punto della filiera cerealicola a cui debba essere applicato il limite fissato per la derrata non processata.

La **frutta secca** e le **spezie** sono anche matrici soggette a limiti massimi tollerabili per le aflatossine (Tabella 1). Anche in questo caso per le arachidi è stato fissato un limite differenziato tra prodotto da sottoporre a cernita o altri trattamenti fisici e prodotto destinato al consumo umano diretto o da impiegare quale ingrediente alimentare.

I **prodotti derivati dalla vite** sono da tempo oggetto di discussione per la definizione di limiti relativamente alla contaminazione da ocratossina A. I primi prodotti ad essere oggetto di limiti massimi ammissibili sono stati i frutti essiccati della vite (Reg. 472/2002, Reg. 123/2005) (14, 15). Più recentemente sono stati fissati limiti per il vino e altre bevande a base di mosto d'uva e per il succo d'uva (Reg. 123/2005) (Tabella 1).

Nel 2004 sono stati fissati limiti massimi negli **alimenti per l'infanzia** per l'aflatossina B₁(AFB₁), l'aflatossina M₁ (AFM₁) e l'ocratossina A (Tabella 1) (Reg. 683/2004) (16).

Per quanto riguarda il **caffè** il Reg. 123/2005 stabilisce invece limiti massimi ammissibili esclusivamente per il caffè torrefatto e solubile, e solo nei prossimi anni la stessa tossina dovrebbe essere regolamentata anche nel caffè verde. Analogamente nel prossimo futuro saranno stabiliti limiti massimi per birra, cacao e spezie.

I **succhi di frutta**, con particolare riferimento ai prodotti a base di mela, sono regolamentati dal Reg. 1425/2003 (17) che fissa i livelli massimi tollerabili per la patulina. Nei prodotti per l'infanzia sono previsti valori di cinque volte inferiori a quelli stabiliti per i prodotti destinati alla popolazione adulta.

I livelli massimi ammissibili per l'aflatossina M₁ nei **prodotti lattiero caseari** sono stati regolamentati a livello europeo con il Reg. 466/2001 (18) (Tabella 1). Tuttavia secondo questa normativa l'unico prodotto che può essere effettivamente sottoposto a controllo è il latte per il quale l'aflatossina M₁ non può superare il valore di 0,05 µg/kg. Per i prodotti lattiero caseari viene solo indicato che devono essere ottenuti da latte con valori di AFM₁ nei limiti sopraindicati. Non è stato possibile fissare limiti specifici per i vari prodotti derivati dal latte a causa della mancanza di informazioni sui fattori di conversione latte-prodotto derivato. In Italia, a causa dell'*outbreak* di contaminazione da AFB₁ nel mais verificatosi nel 2003 e della conseguente presenza di AFM₁ nel latte è stato necessario definire quale fosse il valore della tossina nei formaggi a pasta dura e a lunga stagionatura (tipo grana) prodotti a partire da latte contaminato a 0,05 µg/kg. Sulla base del fattore di conversione trovato sperimentalmente è stato possibile stabilire un limite massimo temporaneo di 0,45 µg/kg per questa categoria di formaggi (19).

Tabella 1. Limiti di legge in vigore a livello comunitario per le aflatossine, per l'ocratossina A, per la patulina e per le fusariotossine negli alimenti

Matrice	Limite di legge	Riferimento alla normativa
Aflatossina B₁		
Cereali e derivati (escluso il granoturco) destinati al consumo diretto/cernita o trattamenti	2 µg/kg	Reg. 2174/2003 (modifica i Reg. 466/2001 e 257/2002)
Mais non destinato al consumo diretto e da sottoporre a cernita/trattamenti fisici	5 µg/kg	
Mais destinato al consumo diretto	4 µg/kg	
Arachidi non destinate al consumo diretto	8 µg/kg	
Altra frutta secca non destinata al consumo diretto	5 µg/kg	
Frutta secca destinata al consumo diretto	2 µg/kg	
Peperoncini rossi, pepe di Caienna, paprica, pepe nero e bianco, noce moscata, zenzero, curcuma	5 µg/kg	
Alimenti per l'infanzia e alimenti a base di cereali destinati a lattanti e prima infanzia	0,10 µg/kg	Reg. 683/2004
Alimenti dietetici a fini medici speciali destinati ai lattanti	0,10 µg/kg	
Aflatossina M₁		
Alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento, compreso il latte per lattanti e il latte per lo svezzamento	0,025 µg/kg	Reg. 683/2004
Alimenti dietetici a fini medici speciali destinati ai lattanti	0,025 µg/kg	
Latte crudo, latte destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte e latte trattato UHT	0,05 µg/kg	Reg. 2174/2003
Aflatossine totali		
Cereali e derivati (escluso il granoturco) destinati al consumo diretto/cernita o trattamenti	4 µg/kg	Reg. 2174/2003 (modifica i Reg. 466/2001 e 257/2002)
Mais non destinato al consumo diretto e da sottoporre a cernita/trattamenti fisici	10 µg/kg	
Mais destinati al consumo diretto	2 µg/kg	
Arachidi non destinate al consumo diretto	15 µg/kg	
Altra frutta secca non destinata al consumo diretto	10 µg/kg	
Frutta secca destinata al consumo diretto	4 µg/kg	
Peperoncini rossi, pepe di Caienna, paprica, pepe nero e bianco, noce moscata, zenzero, curcuma	10 µg/kg	

segue

continua

Matrice	Limite di legge	Riferimento alla normativa
Patulina		
Succhi di frutta (mela) e ingredienti a base di succo di mela in altre bevande	50 µg/kg	Reg. 1425/2003 (modifica il Reg. 466/2001)
Sidro, bevande fermentate derivati da succo di mela	50 µg/kg	
Composta e purea di mele	25 µg/kg	
Succhi di mela e altra frutta per l'infanzia	10 µg/kg	
Ocratossina A		
Cereali grezzi	5 µg/kg	Reg. 123/2005
Prodotti derivati dai cereali (cereali destinati al consumo diretto)	3 µg/kg	
Frutti essiccati della vite (uva passa di Corinto, uva passa, uva sultanina)	10 µg/kg	Reg. 683/2004
Caffè torrefatto ad eccezione del caffè solubile	5 µg/kg	
Caffè solubile	10 µg/kg	
Vino e altre bevande a base di mosto d'uva (esclusi i vini liquorosi e con un grado alcolico >15% vol.)	2 µg/kg	
Succo d'uva	2 µg/kg	
Alimenti per bambini e alimenti a base di cereali per lattanti e bambini	0,50 µg/kg (su materia secca)	
Alimenti dietetici destinati a fini medici speciali, soprattutto all'alimentazione per lattanti	0,50 µg/kg (su materia secca)	
Alimenti per l'infanzia e alimenti a base di cereali destinati a lattanti e prima infanzia	0,50 µg/kg	
Alimenti dietetici a fini medici speciali destinati ai lattanti	0,50 µg/kg	
Cereali grezzi	5 µg/kg	
Frutti essiccati della vite (uva passa di Corinto, uva passa, uva sultanina)	10 µg/kg	
Prodotti derivati dai cereali (cereali destinati al consumo diretto)	3 µg/kg	
Fumonisina		
Farina di mais	1000 µg/kg	n. DGVA-IV/32663 P/ I.2.b.d del 27/10/2004
Fumonisine B₁ + B₂		
Granturco non trasformato	- ^a	Reg. 856/2005
Farina e semola di granturco	- ^a	
Alimenti a base di granturco destinati al consumo diretto	- ^a	
Alimenti trasformati a base di granturco destinati a lattanti e alimenti per l'infanzia	- ^a	
Zearalenone		
Cereali non processati	100 µg/kg	Reg. 856/2005
Granturco non trasformato	- ^b	
Farina di cereali	75 µg/kg	
Farina e semola di granturco e olio di mais raffinato	- ^b	
Prodotti di panetteria, pasticceria o biscotteria	50 µg/kg	
Merende a base di granturco e cereali da colazione a base di granturco	- ^b	
Altre merende a base di cereali e altri cereali da colazione	50 µg/kg	
Alimenti trasformati a base di granturco per lattanti e bambini	- ^b	
Alimenti per l'infanzia trasformati a base di cereali derivati a lattanti e bambini e alimenti per l'infanzia	20 µg/kg	

segue

continua

Matrice	Limite di legge	Riferimento alla normativa
Deossivalenolo		
Cereali non processati	1250 µg/kg	Reg. 856/2005
Grano duro non trasformato	^c	
Ingredienti derivanti dai cereali	750 µg/kg	
Pasta	750 µg/kg	
Pane, biscotti, pizza, prima colazione	500 µg/kg	
Alimenti per l'infanzia	200 µg/kg	

^a Se entro il 1 ottobre 2007 non viene fissato un livello specifico, si applicherà il tenore di:

- 2 000 µg/kg al granturco non trasformato,
- 1 000 µg/kg alla farina e alla semola di granturco,
- 400 µg/kg agli alimenti a base di granturco destinati al consumo diretto,
- 200 µg/kg agli alimenti trasformati a base di granturco per lattanti e bambini e agli alimenti per l'infanzia.

^b Se entro il 1 luglio 2007 non viene fissato un livello specifico, in seguito si applicherà il tenore di:

- 200 µg/kg al granturco non trasformato,
- 200 µg/kg alla farina e alla semola di granturco e all'olio di mais raffinato,
- 50 µg/kg alle merende e ai cereali da colazione a base di granturco,
- 20 µg/kg agli alimenti trasformati a base di granturco per lattanti e bambini.

^c Se non viene fissato un livello specifico entro il 1 luglio 2007 al granturco al presente punto si applicherà il valore di 1750 µg/kg

Per quanto riguarda il **settore mangimistico**, la Direttiva 1999/29/CE (20), recepita in Italia con il DM 23 Dicembre 2002 N 317 (21), stabilisce limiti massimi ammissibili per l'AFB₁ nelle varie categorie di mangimi (Tabella 2). È ancora in fase di studio a livello comunitario la normativa relativa ai limiti massimi ammissibili per lo zearalenone e il deossivalenolo.

Tabella 2. Limiti di legge in vigore a livello comunitario per le aflatossine negli alimenti per animali

Matrice	Limite di legge	Riferimento alla normativa
Aflatossina B₁		
Materie prime per mangimi	0,05 mg/kg	Direttiva 1999/29/CE
<i>Ad eccezione di: arachidi, copra, palmisti, semi di cotone, babassu, granturco e loro derivati</i>	0,02 mg/kg	
Mangimi completi per bovini, ovini e caprini	0,05 mg/kg	
<i>Ad eccezione di:</i>		
- animali da latte;	0,005 mg/kg	
- vitelli, agnelli e capretti	0,01 mg/kg	
Mangimi completi per suini e pollame (salvo animali giovani)	0,02 mg/kg	
Altri mangimi completi	0,01 mg/kg	
Mangimi complementari per bovini, ovini e caprini (ad eccezione dei mangimi complementari per gli animali da latte, vitelli, agnelli e capretti)	0,05 mg/kg	
Mangimi complementari per suini e pollame (salvo animali giovani)	0,03 mg/kg	
Altri mangimi complementari	0,005 mg/kg	
Materie prime per mangimi: arachidi, copra, palmisti, semi di cotone, babassu, granturco e loro derivati	0,2 mg/kg	
Materie prime per mangimi, ad eccezione di:		
arachidi, copra, palmisti, semi di cotone, babassu, granturco e loro derivati	0,05 mg/kg	
	0,02 mg/kg	

A livello italiano la Circolare 10 del 9 giugno 1999 (23) aveva fissato un numero considerevole di limiti per le più importanti micotossine nelle principali matrici alimentari a rischio, con valori più restrittivi per gli alimenti per l'infanzia. Molti dei valori contenuti nella Circolare citata sono stati quelli successivamente adottati dall'UE.

Come evidenziato nella Tabella 3 in Italia sono in vigore limiti massimi per l'ocratossina nel caffè verde, nel il cacao e nei prodotti carnei, limiti non ancora fissati a livello europeo. Anche per il cacao rimangono in vigore in Italia i limiti massimi fissati dalla circolare citata e dalla successiva modifica Circolare 28 novembre 2003, n. 6 (0.5 µg/kg per il cioccolato e derivati e 2 µg/kg per il cacao) (24).

Tabella 3. Limiti per le micotossine negli alimenti attualmente in vigore in Italia (Circolare 9 giugno 1999 n. 10 e Circolare 28 novembre 2003, n. 6.)*

Matrice	Aflatossine totali	Aflatossina B ₁	Zearalenone	Ocratossina
Cereali	-	-	100 µg/kg	-
Caffè crudo	-	-	-	8 µg/kg
Caffè tostato e caffè solubile	-	-	-	4 µg/kg
Cacao e prodotti derivati: prodotti a base di cacao in polvere	-	-	-	2 µg/kg
Cacao e prodotti derivati: prodotti a base di cioccolato	-	-	-	0,5 µg/kg Circolare 28 novembre 2003, n.6 Ministero della Salute
Birra	-	-	-	0.2 µg/kg
Alimenti per l'infanzia	0.1 µg/kg	-	20 µg/kg	-
Piante infusionali	10 µg/kg	5 µg/kg	-	-
Prodotti carnei	-	-	-	1 µg/kg

* I limiti indicati devono essere considerati aggiuntivi a quelli in vigore a livello comunitario

Le normative a supporto del controllo ufficiale

Le normative a supporto delle metodologie per l'esecuzione del controllo ufficiale (campionamento e analisi) vengono discusse in una diversa parte di questa monografia. A tale proposito per il campionamento all'importazione è attualmente in fase di discussione un draft relativo alle procedure di controllo al fine di agevolare l'attuazione della Direttiva 98/53 relativa al campionamento (25).

Fra le normative di maggiore efficacia emanate dall'UE a supporto del Controllo Ufficiale si collocano numerose Decisioni (Tabella 4), che indicano, per alcune tipologie di frutta secca (principalmente pistacchi, arachidi, fichi e nocciole), quale percentuale delle partite provenienti da Turchia, Cina e Iran devono essere controllate prima dell'importazione. Il provvedimento è particolarmente restrittivo per i pistacchi provenienti dall'Iran (100% delle partite), e indica per ciascun Paese quali sono i porti nei quali può avvenire la nazionalizzazione del prodotto.

Infine possono essere considerate parte della normativa a supporto del controllo ufficiale le già citate Raccomandazioni relative ai programmi coordinati da svolgere per raccogliere informazioni utili sulla contaminazione di alimenti e mangimi. Le più recenti Raccomandazioni relative a programmi coordinati riguardano le aflatossine nelle spezie (2004), alcune micotossine (aflatossina B₁, ocratossina A, zearalenone, deossinivalenolo e fumonisine) nei mangimi (2004 e 2002), aflatossine in arachidi e pistacchi (1998), ocratossina A in tutti i tipi di caffè (1999).

Tabella 4. Decisioni della Commissione Europea relative ai prodotti di importazione

Decisione	Alimento	Frequenza campionaria	Paese di provenienza
- Decisione 2005/85/CE (26/1/2005)	- Pistacchi e pistacchi tostati	100%	Iran
- Decisione 2002/80/CE (4/2/2002) modificata dalla Decisione 2002/233/CE del 20 marzo 2002	- Fichi e fichi secchi, nocciole	10%	Turchia
- Decisione 2002/679/CE (22/8/2002)	- Pistacchi - Miscugli di noci o frutta secca e contenenti fichi, nocciole o pistacchi - Nocciole, fichi e pistacchi, comprese le miscele		
- Decisione 2003/552/CE (22/7/2003)	- Farine e polvere di nocciole, fichi e pistacchi		
- Decisione 2004/429/CE (29/4/2004)	- Fichi, nocciole, pistacchi e alcuni prodotti derivati		
- Decisione 2002/79/CE (4/2/2002) modificata dalla Decisione 2002/233/CE (20/3/2002)	- Arachidi	10%	Cina
- Decisione 2002/678/CE (22/8/2002)	- Arachidi tostate		
- Decisione 2003/550/CE (22/7/2003)			
- Decisione 2000/49/CE (6/12/1999) modificata dalla Decisione 2003/580/CE (4/8/2003)	- Arachidi tostate	20%	Egitto
- Decisione 2004/429/CE (29/4/2004)	- Arachidi con guscio - Arachidi sgusciate		
- Decisione 2003/493/CE (4/7/2003)	- Noci del Brasile	100%	Brasile
- Decisione 2004/428/CE (29/4/2004)			

Le attività preventive nell'ambito della gestione del rischio

Per la contaminazione da micotossine la prevenzione rappresenta uno dei momenti più efficaci nella gestione del rischio e individua il momento di maggiore interazione tra gestione e comunicazione del rischio. Autorità governative, ricercatori e *stakeholder* dovrebbero confrontarsi e interagire fra loro per contribuire a mettere in atto strategie preventive.

La prevenzione pre-raccolto è giustamente considerata la migliore strategia per controllare il problema, anche se un sistema integrato di prevenzione deve focalizzarsi anche sulle fasi di raccolto, lavorazione e distribuzione.

Per quanto riguarda la prevenzione in campo si è sviluppata negli ultimi decenni una vasta bibliografia riguardante tecniche più o meno largamente applicabili che includono la selezione di ibridi resistenti, l'impiego di pesticidi idonei, la rotazione dei raccolti ecc. L'attacco degli insetti è riconosciuto come uno dei fattori che maggiormente favoriscono l'attacco fungino in campo. A tale riguardo sono riportati in letteratura lavori che indicano come il mais biotecnologico resistente all'attacco di alcuni insetti abbia livelli di fumonisine inferiori a quelli riscontrati nelle varietà convenzionali.

Le autorità governative hanno iniziato ad emanare linee guida per la prevenzione in campo quali, a livello nazionale, le linee guida nella produzione vitivinicola per la prevenzione della potenziale contaminazione da micotossine (Decreto 7 aprile 2000) (26) e, a livello europeo, la

prossima emanazione di codici di pratica per la prevenzione di alcune micotossine (ocratossina A, zearalenone, fumonisine e tricoteceni).

Anche il *Codex Alimentarius* ha lavorato molto nell'ambito della prevenzione da micotossine pubblicando codici di corrette pratiche agricole per la prevenzione della contaminazione da patulina (27), da ocratossina A e da alcune fusariotossine (28), per le noci del Brasile (29) e per le arachidi (30).

Particolarmente attiva e strutturata continua ad essere l'attività di ricerca sulla prevenzione: il *Mycotoxin Cluster* a livello europeo e il progetto AFLARID a livello nazionale ne costituiscono esempi di rilievo. Il progetto AFLARID, originato dall'*outbreak* di contaminazione da aflatossine nel mais nel 2003, sta sviluppando importanti temi di prevenzione e acquisendo informazioni di rilievo per la filiera maidicola e lattiero casearia. Importante output di questo progetto è la costituzione di un osservatorio per le micotossine il cui obiettivo è la predizione della contaminazione sulla base di informazioni geografiche, atmosferiche e ambientali.

La prevenzione all'atto della raccolta si effettua principalmente controllando l'attività dell'acqua (A_w) e il danno meccanico alle granaglie.

Nelle fasi successive al raccolto le tecniche attualmente autorizzate in Europa si riferiscono essenzialmente alla cernita.

Una visione più moderna e prospettica della prevenzione dei rischi alimentari, peraltro sancita nel Regolamento 178/2002 (2), è quella basata sulla identificazione dei rischi emergenti e riemergenti. Un progetto del VI Programma Quadro, PERIAPT (<http://www.periapt.net/>), conclusosi recentemente, ha studiato le strategie per l'individuazione di tali rischi individuando nell'*host environment* la chiave per poter prevedere insorgenza di rischi imprevisti. Lo studio dell'*host environment* prevede l'analisi di tutte le possibili fonti di rischio che possono provenire da cambiamenti nei più svariati settori dell'attività umana e dalle diverse aree disciplinari. Cambiamenti nell'ambiente, nella demografia, nella tecnologia, nell'assetto socioeconomico ecc. possono creare le condizioni per l'insorgenza di nuovi rischi nel settore alimentare. Nell'ambito di tale settore è stato affrontato come caso studio la problematica delle micotossine e la figura 4 schematizza le diverse fonti di rischio per questa tipologia di contaminanti.

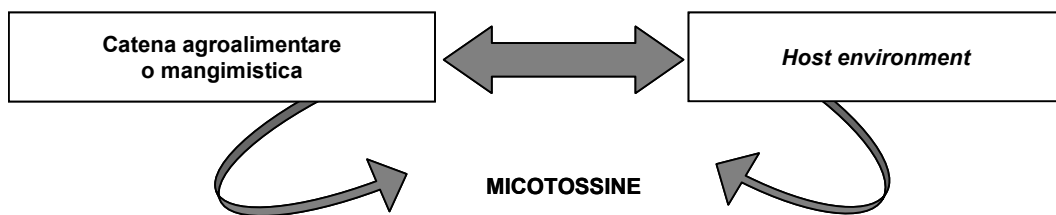


Figura 4. Approccio olistico per l'identificazione di rischi emergenti derivanti dalla presenza di micotossine in alimenti e mangimi

Analisi dei costi

Come precedentemente indicato l'analisi dei costi derivanti dalle singole problematiche è parte integrante della gestione del rischio. Tale analisi non è ancora stata eseguita in nessun paese europeo. Questo tipo di studi invece è stato di recente intrapreso negli USA dove si stima una perdita economica annuale tra gli 0,5 milioni e gli 1,5 miliardi di dollari. Per l'anno 2000 la spesa del USDA per programmi di prevenzione delle micotossine è stata di 17,7 milioni di

dollari; per quanto riguarda i costi di analisi, per le sole aflatossine, la spesa si aggira intorno ai 40 milioni di dollari (31). Le cifre ipotizzate risultano molto significative e dovrebbero spingere ad effettuare simili studi anche per l'Europa.

Comunicazione del rischio da micotossine

In termini generali per comunicazione del rischio si intende il processo interattivo di scambio di informazioni tra chi valuta e gestisce il rischio e tutte le altre parti interessate al problema in esame. Molto spesso tuttavia nella comunicazione del rischio viene enfatizzata l'importanza del dialogo e della informazione del consumatore a scapito della comunicazione con le altre parti interessate quali ad esempio gli operatori del settore. Per quanto riguarda le micotossine, se l'importanza del dialogo con il consumatore è eticamente corretta e indispensabile, il principio della assicurazione della sicurezza d'uso tramite il percorso *from farm to fork* e viceversa può essere proficuo soprattutto tramite il dialogo interattivo tra autorità governative, ricerca e settore produttivo. Tra questi tre settori è indispensabile che ci sia un processo di azione e reazione attuato attraverso lo scambio delle conoscenze acquisite e le opzioni conseguentemente adottate. Per le micotossine, come in altri casi, questo processo di interazione vede il suo punto di partenza con la definizione di limiti massimi ammissibili, che hanno rappresentato la molla per le azioni preventive da parte del settore produttivo.

Rilevanti e recenti dati da utilizzare nell'analisi del rischio da micotossine sono contenute in molti dei lavori che compongono questa monografia.

Bibliografia

1. FAO/WHO. *Application of risk analysis to food standard issue*, Geneve. 1995.
2. Comunità Europea. Regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 28 gennaio 2002, che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare. *Gazzetta ufficiale* n. L 031, 1 febbraio 2002.
3. European Commision. Genetically modified crops in the EU: food safety assessment, regulation, and public concerns, Overarching report ENTRANSFOOD, the European Network on safety assessment of genetically modified food crops, Ariane Konig, Gijs Kleter, Walter Hammes, Ib Knussen and Harry Kuiper. 2004.
4. Comunità Europea. Raccomandazione della Commissione relativa ad un programma coordinato per il controllo ufficiale dei prodotti alimentari per il 1998. 2 febbraio 1998.
5. Comunità Europea. Raccomandazione della Commissione relativa ad un programma coordinato di controllo ufficiale dei prodotti alimentari per il 1999. 22 dicembre 1998.
6. Comunità Europea. Raccomandazione della Commissione relativa a un programma coordinato di controlli ufficiali dei prodotti alimentari per il 2004 in spezie, erbe e condimenti vegetali. 19 dicembre 2003.
7. Comunità Europea. Raccomandazione della Commissione sul programma coordinato d'ispezione nel settore dell'alimentazione animale per l'anno 2004, (aflatossina B₁, ocratossina A, zearalenone, deossinivalenolo e fumonisine) nei mangimi. 17 febbraio 2004.
8. Miraglia M, Brera C. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU Member States, January 2002. Disponibile all'indirizzo: http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/index_en.html; ultima consultazione 20/11/2004.

9. Majerus P, Kapp K. Assessment of dietary intake of patulin by the population of EU member states, March 2002. Disponibile all'indirizzo: http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/index_en.html; ultima consultazione 25/11/2004.
10. Gareis M, Schothorst RC, Vidnes A, Bergsten C, Paulsen B, Brera C, Miraglia M. Collection of Occurrence Data of Fusarium Toxins in Food and Assessment of Dietary Intake by the Population of EU Member States. Report of Experts Participating in SCOOP Task 3.2.10 Disponibile all'indirizzo: <http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/task3210.pdf> . 2003.
11. Brera C, Catano C, De Santis B, Miraglia M, Effect of Industrial Processing on the Distribution of Aflatoxins and Zearalenone in Corn Milling. Dati non pubblicati.
12. Brera C, Debegnach F, Grossi S, Miraglia M. Effect of Industrial Processing on the Distribution of Fumonisin B1 in Dry Milling Corn Fractions. *Journal of Food Protection* 2004;67(6):1261–1266.
13. Scudamore KA, Banks JN, Guy RCE. Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grain during extrusion. *Food Additives & Contaminants* 2004;21(5):488-497.
14. Comunità Europea. Regolamento (CE) n. 472/2002 della Commissione, del 12 marzo 2002, che modifica il regolamento (CE) n. 466/2001 che definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari, *Gazzetta ufficiale* n. L 075 del 16 marzo 2002.
15. European Commission. Commission Regulation (EC) No 123/2005 of 26 January 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards ochratoxin A.
16. Comunità Europea. Regolamento (CE) n. 683/2004 della Commissione, del 13 aprile 2004, che modifica il regolamento (CE) n. 466/2001 per quanto riguarda le aflatoxine e l'ocratossina A negli alimenti per lattanti e prima infanzia. *Gazzetta ufficiale* n. L 106 del 15 Aprile 2004.
17. Comunità Europea. Regolamento (CE) n. 1425/2003 della Commissione, dell'11 agosto 2003, recante modifica del regolamento (CE) n. 466/2001 per quanto riguarda la patulina, *Gazzetta ufficiale* n. L 203 del 12 agosto 2003.
18. Comunità Europea. Regolamento (CE) N. 466/2001 della Commissione dell'8 marzo 2001 che definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari. *Gazzetta ufficiale* n. L 077 del 16 marzo 2001.
19. Italia. Ministero della Salute. D.G.V.A./IX/25664/F.5.B.B.2/P del 24.08.2004. Metodi di campionamento e di analisi per la ricerca di aflatoxine nei formaggi.
20. Comunità Europea. Direttiva 1999/29/CE del Consiglio, del 22 aprile 1999, relativa alle sostanze ed ai prodotti indesiderabili nell'alimentazione degli animali. *Gazzetta ufficiale* n. L 115 del 04 maggio 1999.
21. Italia. Decreto 23 dicembre 2002, n.317 Ministero della Salute. Regolamento interministeriale recante norme di attuazione della direttiva 1999/29/CE, relativa alle sostanze ed ai prodotti indesiderabili nell'alimentazione degli animali. *Gazzetta Ufficiale* n. 155 del 7 luglio 2003.
22. Comunità Europea. Progetto di Regolamento (CE) della Commissione Europea, modifica del Regolamento (CE) n. 466/2001 per quanto riguarda le Fusarium-tossine, Bruxelles SANCO/0006/2004 – rev. 6 – aggiornato.
23. Italia. Circolare 9 giugno 1999, n.10 Direttive in materia di controllo ufficiale sui prodotti alimentari: valori massimi ammissibili di micotossine nelle derrate alimentari di origine nazionale, comunitaria e Paesi terzi. *Gazzetta Ufficiale* n. 135 del 11-06-1999.
24. Italia. Circolare 28 novembre 2003, n.6 Ministero della Salute. Valori massimi ammissibili di ocratossina A nel cacao, GU n. 286 del 10-12-2003.
25. Comunità Europea. Direttiva 98/53/CE della Commissione del 16 luglio 1998 che fissa metodi per il prelievo di campioni e metodi d'analisi per il controllo ufficiale dei tenori massimi di taluni contaminanti nei prodotti alimentari, *Gazzetta ufficiale* n. L 201 del 17 luglio 1998.

26. Italia. Decreto 7 aprile 2000, Linee guida nella produzione vitivinicola per la prevenzione della potenziale contaminazione da micotossine, *Gazzetta Ufficiale* n. 97 del 27 aprile 2000.
27. FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee On Food Additives And Contaminants Thirty-Fifth Session Arusha, United Republic Of Tanzania, 17 - 21 March 2003 Comments Submitted On The Draft Code Of Practice For The Reduction Of Patulin Contamination In Apple Juice And Apple Juice Ingredients In Other Beverages. Disponibile al'indirizzo: ftp://ftp.fao.org/codex/ccfac35/fa03_20e.pdf, ultima consultazione 10/11/2004.
28. FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee on Food Additives and Contaminants Thirty-Fifth Session Arusha, United Republic of Tanzania, 17 - 21 March 2003 Comments Submitted on the Draft Code of Practice for the Prevention (Reduction) of Mycotoxin Contamination in Cereals, Including Annexes on Ochratoxin A, Zearalenone, Fumonisin and Tricothecenes. Disponibile al'indirizzo: ftp://ftp.fao.org/codex/ccfac35/fa03_22e.pdf, ultima consultazione 18/11/2004.
29. FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee on Food Additives and Contaminants Thirty-Fifth Session Arusha, Tanzania, 17 - 21 March 2003 Proposed Draft Code of Practice for the Reduction of Aflatoxin Contamination in Tree Nuts. Disponibile al'indirizzo: ftp://ftp.fao.org/codex/ccfac35/fa03_24e.pdf, ultima consultazione 20/11/2004.
30. FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee on Food Additives and Contaminants Thirty-Fifth Session Arusha, United Republic of Tanzania, 17 - 21 March 2003 Discussion Paper on the Development of a Code of Practice for the Reduction of Aflatoxin Contamination in Peanuts. Disponibile al'indirizzo: <ftp://ftp.fao.org/codex/ccfac35/fa0325ae.pdf>, ultima consultazione 01/11/2004.
31. Cardwell KF, Desjardins A, Henry HS, Munkvold G, Robens J. Mycotoxins: The Cost of Achieving Food Security and Food Quality, Feature Story August 2001. Disponibile al'indirizzo: <http://www.apsnet.org/online/feature/mycotoxin/>, ultima consultazione 10/11/2004.

VALUTAZIONE TOSSICOLOGICA E SICUREZZA DEGLI ALIMENTI

Giorgio Cantelli Forti

Dipartimento di Farmacologia, Università degli Studi di Bologna, Bologna

Il rischio tossicologico

Una adeguata valutazione dei potenziali effetti avversi associati all'alimentazione porta necessariamente ad una corretta definizione di sicurezza e di rischio tossicologico.

La sicurezza (*safety*) viene definita come la certezza pratica che l'uso di una sostanza in specifiche condizioni e modalità d'impiego non provochi un danno. La valutazione del rischio è la caratterizzazione scientifica e sistematica degli effetti avversi sulla salute che derivano dall'esposizione dell'uomo ad agenti o a situazioni dannose. La terminologia inglese più propriamente utilizza anche il termine pericolo (*hazard*), volendo distinguere e precisare la possibilità che un danno derivi da una sostanza in condizioni specifiche. Il rischio tossicologico è il prodotto di un azzardo (evento pericoloso) per la probabilità che si verifichi. La probabilità è funzione dell'esposizione (fonte e via di esposizione) e della suscettibilità individuale (differenze nel metabolismo, nella risposta immunitaria, nell'assetto ormonale). Una situazione di rischio derivante dall'uso di una sostanza e dalla sua esposizione comporta quindi l'interazione con un sistema biologico con induzione di danno dal quale scaturiscono dei conseguenti effetti.

Per l'identificazione e la quantificazione dell'azzardo derivante da sostanze potenzialmente tossiche vengono impiegati metodi sperimentali a diversi livelli di informazione, che tutti insieme concorrono ad una corretta valutazione complessiva del rischio: 1) relazione tra struttura chimica e l'attività biologica, 2) analisi *in vitro* e di breve durata; 3) studi nel modello animale; 4) studi epidemiologici (1). La valutazione del rischio deve essere quindi orientata alla identificazione del pericolo, alla sua quantificazione (dose-risposta), alla valutazione dell'esposizione e della suscettibilità individuale, alla caratterizzazione del rischio, all'analisi costi-benefici e infine a decisioni operative. Per quanto concerne i limiti di sicurezza, i risultati ottenuti dalla sperimentazione della tossicità di una sostanza servono per elaborare "dosi soglia" al fine di rimanere entro al margine di sicurezza all'atto di emanare norme d'uso nell'utilizzo delle sostanze e nei controlli successivi.

Una fase fondamentale della ricerca tossicologica riguarda la **gestione del rischio** che si riferisce all'insieme dei procedimenti scelti dalle agenzie per gestire il pericolo identificato nel corso del processo di valutazione del rischio. Gli esperti prendono in considerazione l'evidenza scientifica e le valutazioni del rischio dal punto di vista legislativo, economico, sociale e politico nel corso del processo di valutazione delle regole alternative e nella scelta delle opzioni. La **comunicazione del rischio** è la fase finale del trasferimento dell'informazione della valutazione del rischio ai responsabili pubblici (Enti sanitari, Politici, Magistratura) e alla popolazione in generale.

Il rischio alimentare

La qualità degli alimenti può essere valutata sotto un profilo nutrizionale, igienico-sanitario e produttivo, sia in rapporto alla salute dell'uomo che in rapporto a problematiche di natura ambientale, tecnologica, economica e sociale. Tuttavia, numerosi e recenti eventi internazionali hanno dimostrato che oggi il concetto di qualità degli alimenti deve necessariamente includere un corretto e accurato studio tossicologico.

La necessità di assicurare un livello di nutrizione accettabile, l'esigenza di distribuire prodotti in tempi e distanze dilatati e infine il livello crescente di inquinamento ambientale (acque, aria, suolo) condizionano la presenza nei prodotti alimentari di numerose sostanze chimiche. Inoltre con lo sviluppo dell'agricoltura, dell'allevamento e dell'industria di trasformazione degli alimenti si è cercato di incrementare la qualità mediante l'impiego di tecniche sempre più sofisticate: selezione genetica, controllo dell'alimentazione e della condizioni di allevamento degli animali, impiego di fitofarmaci in agricoltura, uso di additivi chimici nell'industria della lavorazione degli alimenti.

L'utilizzo di tecniche sempre più moderne per ottenere alimenti con specifiche caratteristiche chimico-bromatologiche, tecnologiche e nutrizionali può comportare una serie di problemi per la salute pubblica a causa della presenza negli alimenti di un numero sempre maggiore di sostanze chimiche. Sono quindi entrate a far parte integrante della composizione degli alimenti diverse classi di composti chimici alimentari: additivi alimentari, coloranti, farmaci veterinari, pesticidi, contaminanti di origine naturale, inquinanti ambientali. Di conseguenza la valutazione dei potenziali effetti tossici dei contaminanti alimentari è di fondamentale importanza per la tutela della salute umana e per la salvaguardia dell'ambiente.

Fitofarmaci

Tra i composti chimici che possono essere presenti negli alimenti, i fitofarmaci (pesticidi o antiparassitari), rappresentano un esempio concreto per illustrare il ruolo e l'importanza delle indagini tossicologiche nella prevenzione del rischio per l'uomo e l'ambiente.

L'agenzia di protezione dell'ambiente degli Stati Uniti (*US Environmental Protection Agency*, EPA) definisce come fitofarmaco ogni sostanza o miscela di sostanze intese a prevenire, distruggere o indebolire insetti, animali, vegetali, o microrganismi indesiderabili o nocivi.

I fitofarmaci vengono principalmente utilizzati per eliminare o ridurre il numero di parassiti che possono danneggiare il raccolto, o alterare gli alimenti nel periodo che intercorre dalla produzione fino al consumo. Il loro impiego si è rivelato un mezzo affidabile e potente che ha portato ad un notevole sviluppo della produzione agricola in quanto ha permesso di accrescere la quantità e la qualità dei prodotti disponibili.

Sicurezza d'uso dei fitofarmaci

Per poter valutare la sicurezza d'uso di un composto è necessario conoscere i limiti di sicurezza. Per poter definire questi parametri sono indispensabili i risultati sperimentali della tossicità di una sostanza per elaborare le dosi soglia che guidano a rimanere entro margini di sicurezza chi è preposto ad emanare normative d'uso, o al controllo o all'uso della sostanza stessa.

Innanzitutto deve essere calcolata la NOEL (*No Observed Effect Level* – dose senza effetto osservabile; mg/kg), che è la dose massima alla quale non si osserva nessun effetto tossico nella

specie animale più sensibile. Essa viene desunta da studi di tossicità cronica nell'animale sperimentale. L'ADI (*Acceptable Daily Intake* – dose giornaliera ammissibile; mg/kg/die) è invece la dose che si ritiene possa essere assunta giornalmente da un adulto senza che compaia alcun effetto tossico. Il calcolo dell'ADI è dato dal valore della NOEL diviso per un fattore di sicurezza (FS), di solito pari a 100, che tiene in considerazione le differenze tra la specie animale e umana, e la variabilità di sensibilità tra i soggetti umani. L'ADI viene, quindi, così calcolata:

$$ADI = \frac{NOEL}{FS}$$

Il fattore di sicurezza pari a 100 non deve essere considerato immutabile, può essere 10 se ci sono dati attendibili sulla specie umana, o 1000 in casi specifici quando è necessario un maggior margine di sicurezza (2, 3).

Il processo della registrazione dei fitofarmaci richiede di stabilire i livelli accettabili anche in seguito ad una assunzione acuta con la dieta. Questo livello viene definito *Acute Reference Dose* (ARfD), e rappresenta la stima della quantità di sostanza presente negli alimenti, espressa in mg/kg, che può essere ingerita nel corso di un breve periodo di tempo, generalmente durante un pasto o una giornata, senza apprezzabili rischi per la salute dell'uomo, sulla base di tutte le informazioni disponibili al momento della valutazione (4).

Problema dei fitofarmaci come residui alimentari

Il livello finale di residuo di antiparassitari negli alimenti risulta determinato da numerosi fattori che vanno presi in considerazione nel loro complesso: caratteristiche chimico-fisiche dei principi attivi, tipo di derrata, dose applicata, tempo intercorso dal trattamento, condizioni ambientali, conservazione del prodotto, processi industriali o casalinghi subiti dagli alimenti. Per una corretta valutazione del rischio tossicologico per l'uomo dovuto a residui di prodotti antiparassitari ingeriti con gli alimenti, è necessario conoscere esattamente la quota di sostanza chimica assunta. Le trasformazioni industriali o la semplice preparazione domestica dei cibi possono avere un effetto sul livello dei residui. Le operazioni fondamentali quali lavaggio, scottatura, spremitura, cottura e sterilizzazione hanno diversi effetti sul livello dei residui presenti nella derrata; inoltre, ogni tipo di derrata presenta caratteri propri che modificano tali effetti. La natura chimica del fitofarmaco è forse l'elemento che più di ogni altro determina l'andamento del processo degradativo. Anche il tempo che intercorre fra applicazione del pesticida, lavorazione e immagazzinamento ha comunque una grande influenza sull'entità dell'effetto del trattamento. Per quanto concerne l'intervallo di sicurezza, esso è stato definito come il periodo di tempo, in giorni, che deve intercorrere fra l'ultima somministrazione del fitofarmaco e la commercializzazione della derrata; durante questo tempo si ritiene che il principio attivo venga metabolizzato a composto non tossico o meno tossico o venga allontanato sotto l'azione degli agenti atmosferici (3).

Per definire il valore del residuo massimo legale, un corretto approccio allo studio di un fitofarmaco deve sviluppare indagini sperimentali che contemplino sia saggi di tossicità che prove su campo e relative valutazioni come schematizzato nella Figura 1 (2, 4).

Il Residuo Massimo Legale (RML) viene stabilito dai risultati delle analisi del "Residuo massimo risultante", condotte secondo le norme di Buona Pratica Analitica, a seguito delle prove agronomiche e ambientali, condotte secondo le norme di Buona Pratica Agricola, confrontati con il limite teorico tossicologico ammissibile, determinato mediante saggi condotti secondo le norme di Buone pratiche di laboratorio. Per garantire la qualità e l'uniformità dei risultati, gli studi tossicologici devono essere condotti secondo le norme di *Good Laboratory*

Practices (GLP), che sono metodologie standard internazionali applicate agli studi per valutare la sicurezza degli agenti chimici (3). La concentrazione massima ammessa di principio attivo nella derrata pronta per il consumo viene espressa in parti per milione (ppm) ovvero in mg/kg. È importante sottolineare che i RML non rappresentano una soglia di sicurezza. La presenza di residui di fitofarmaci in un alimento che supera il RML stabilito, non comporta automaticamente un rischio per la salute. Il loro scopo principale è assicurare il controllo del corretto impiego dei fitofarmaci e garantire il commercio dei prodotti alimentare sicuri.

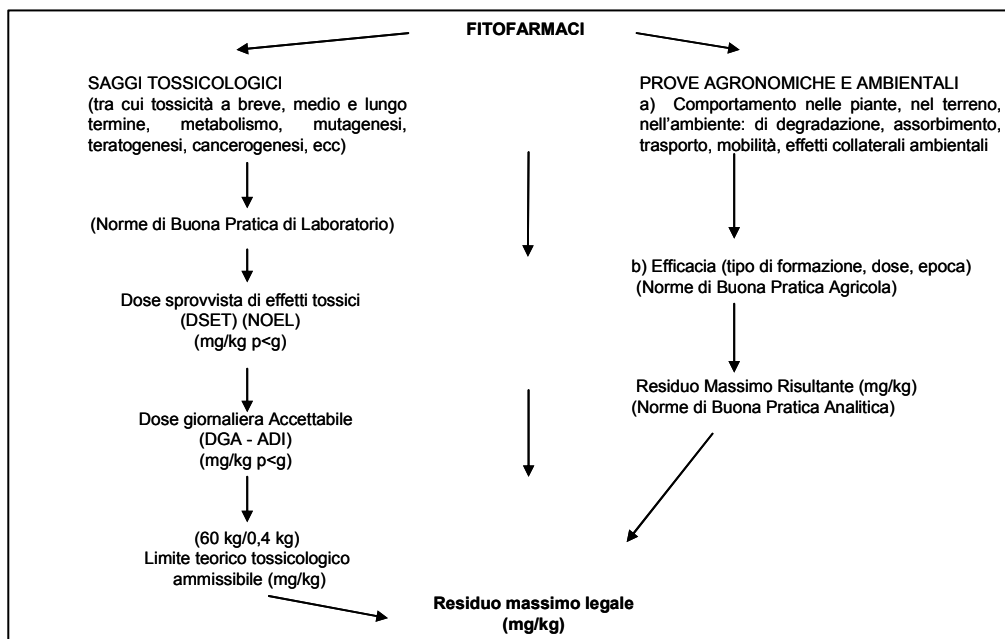


Figura 1. Sviluppo delle prove sperimentali e delle relative valutazioni per i fitofarmaci

Tossine naturali

Nell'ambito di una trattazione sulla valutazione della qualità degli alimenti è necessario ricordare il problema delle tossine naturali.

Le tossine naturali sono un insieme complesso e variegato di composti chimici suddivisi in due categorie. La prima è rappresentata dalle fitotossine, metaboliti delle piante che agiscono come antiparassitari naturali e spesso risultano nocivi per l'uomo. La seconda categoria comprende le tossine prodotte da microrganismi parassiti che possono infestare le piante. Entrambe queste classi costituiscono un serio problema per la salute dell'uomo, sul quale negli ultimi anni si è focalizzata l'attenzione da parte del mondo scientifico. Infatti, recenti teorie propongono di aumentare i livelli di tossine naturali nelle piante mediante selettocoltura, sviluppando varietà di piante altamente resistenti ai parassiti. Gli studi tossicologici comunque hanno evidenziato la pericolosità di tali metodiche agronomo-tecnologiche indicando che la maggior parte di questi antiparassitari naturali risulta mutagena-cancerogena nei test sperimentali, e inoltre gli studi epidemiologici mostrano che il 99,9% degli antiparassitari assunti con la dieta è di origine naturale (5).

Per quanto riguarda le tossine prodotte dai parassiti presenti negli alimenti, attualmente suscitano grande interesse le micotossine. A partire dagli anni '50 si è iniziato a comprendere che la contaminazione di muffe può essere responsabile di gravi problemi per la salute pubblica. Oggi si ritiene che sono circa quaranta le sindromi patologiche dell'uomo e degli animali nelle quali si sospetta siano coinvolte micotossine ingerite con gli alimenti.

La Tabella 1 riporta alcuni esempi di micotossine, i principali effetti tossici conosciuti e le relative derrate alimentari contaminate.

Le micotossine si possono trovare in tutti i prodotti di alimenti, comunque vi è una enorme variabilità in funzione delle caratteristiche specifiche degli alimenti, delle condizioni climatiche nelle zone di produzione, delle tecniche agronomiche, delle modalità di raccolta e conservazione.

La Tossicologia offre strategie di intervento per fronteggiare in tutti i suoi diversi aspetti il rischio correlato alle micotossine. Oggi gli studi per la valutazione dei potenziali effetti tossici di queste sostanze vengono affiancati da approcci chimico-analitici per determinare la presenza delle micotossine negli alimenti, e da indagini di mercato per valutare la reale esposizione dell'uomo alle diverse micotossine. L'insieme di queste informazioni permette di determinare una migliore stima del rischio per l'uomo. Inoltre, vengono intraprese ricerche per identificare e abbattere gli agenti patogeni negli alimenti responsabili delle micotossine alimentari.

Tabella 1. Esempi di micotossine contaminanti gli alimenti per l'uomo e i loro effetti tossici

Micotossine	Effetto tossico	Prodotto contaminato
Patulina Acido penicillico Sterigmatocistina	Epatiti (carcinogenesi)	Frutta e derivati Mais e altri cereali, legumi Cereali, caffè crudo
Roquefortina Pretossina	Disturbi nervosi Mutagenesi	Formaggi erborinati
Acido tenuazonico	Citotossicità	Pomodoro, frutta e relative conserve alimentari, girasole
Rubratossine	Epatiti, emorragie	Cereali, legumi
Aflatossine (B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂)	Epatiti, nefriti	Arachidi e altri legumi, mais e altri cereali, noci e mandorle diverse, semi oleosi, frutta secca
Aflatossine (M ₁ , M ₂)	Derivati del metabolismo animale di aflatossina B ₁ e B ₂	Latte e derivati
Zearalenone	Iperestrisimo Ipo fertilità	Mais e altri cereali
Ocratossina A e B	Nefriti Epatiti	Orzo, mais e altri cereali Pane, pasta e prodotti da forno
Tricoteceni Tossina T-2 Deossinivalenolo Diacetossiscirpenolo	Dermatiti, emorragie Leucopenia, vomito Disturbi nervosi Cardiopatie, inappetenza	Mais, orzo e altri cereali
Fusarina	Mutagenesi, carcinogenesi	Mais
Moniliformina	Citotossicità	
Alcaloidi di Claviceps Citrinina	Ergotismo Epatiti, nefriti	Cereali
Piperazine, Chetomine	Citotossicità	Mais e altri derivati
Viomelleina	Nefriti	Orzo e altri cereali
Acido ciclopiazonico	Astenia, paralisi	Cereali, formaggi, arachidi

Conclusioni

La Tossicologia oggi gioca un ruolo importante nella prevenzione dei rischi associati all'esposizione agli xenobiotici. Su queste basi è possibile affermare che anche la strategia da attuarsi nel campo dell'alimentazione deve coinvolgere necessariamente l'indagine tossicologica a tutti i livelli della filiera agro-alimentare come viene schematizzato dalla Figura 2.

Su queste basi è possibile affermare che anche la strategia da attuarsi nel campo dell'alimentazione deve coinvolgere necessariamente l'indagine tossicologica a tutti i livelli della filiera agro-alimentare come viene schematizzato dalla Figura 2.



Figura 2. della Possibili certificazioni qualità degli alimenti nelle varie fasi della filiera agro-alimentare

Diversi bioindicatori della "qualità tossicologica", selettivamente indirizzati alle varie fasi, possono da una parte ridurre il rischio o garantire il consumatore con una certificazione tossicologica di qualità e, d'altra parte, evidenziare precocemente nella specifica fase l'inquinante, la fonte dell'inquinamento e, di conseguenza, rendere possibile la sua eliminazione. È quindi evidente che all'obiettivo primario di conseguire il miglioramento della salute dell'uomo e dell'ambiente si può affiancare una significativa ricaduta economica.

Bibliografia

1. Klaassen Curtis D. *Casarett & Doull's Toxicology. The basic science of poisons*. New York: McGraw-Hill; 2001.
2. Cantelli Forti G. Rischio tossicologico da sostanze naturali e di sintesi negli alimenti. In: Bruzzi L, Casali F, Giacomelli G, Lanza A (Ed.). *L'uomo e l'ambiente. Rischi e limiti di accettabilità*. Bologna: Editrice Pitagora; 1994. p. 25-39.
3. Cantelli Forti G. L'evoluzione della valutazione tossicologica dei fitofarmaci. *Informatore Fitopatologico* 2001;9:30-4.
4. Renwick AG. Pesticide residue analysis and its relationship to hazard characterisation (ADI/ARfD) and intake estimations (NEDI/NESTI). *Pest Manag Sci* 2002; 58: 1073-82.
5. Ames BN. Mutagenesi e cancerogenesi: fattori endogeni e fattori esogeni. In: Cantelli Forti G, Grilli S (Ed.). *Sostanze naturali e di sintesi in agricoltura: rischi tossicologici a confronto*. Bologna: Editoriale Grasso; 1990. p. 11-51.

Prima sessione
VALUTAZIONE DEL RISCHIO

PRESENZA DI TRICOTECENI E DI OCRATOSSINA A IN *BABY-FOODS* E PRODOTTI DIETETICI RICCHI DI CRUSCA

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

Introduzione

Per il frumento, nell'attuale sistema produttivo europeo, i due principali rischi da micotossine riguardano la presenza di ocratossina A (OTA) prodotta da *Penicillium verrucosum* e talvolta da *Aspergillus ochraceus* e di fusariotossine, quali i tricoteceni (TCT, in particolare il deossinivalenolo, DON) prodotti da *Fusarium culmorum*, *graminearum* e *sporotrichioides*. Nella UE, per l'OTA è stato fissato un limite di 3µg/kg per i prodotti derivati dai cereali; per i TCT sono stati proposti valori massimi per il DON di 500 e 150 µg/kg, rispettivamente per vari prodotti (da forno e cereali da colazione) e alimenti per l'infanzia. Indagini condotte in Italia e in Canada hanno evidenziato la presenza di OTA e TCT in prodotti per l'infanzia (1, 2). Scopo del lavoro è stato quello di condurre un'indagine sulla presenza di queste micotossine negli alimenti a base di cereali per la prima infanzia e nei prodotti dietetici ricchi di crusca. L'indagine è stata condotta su 30 campioni di *baby-foods* (8 creme, 7 semolini, 7 pastine e 8 biscotti), 20 prodotti integrali per colazione (biscotti e fette biscottate) e 30 campioni dietetici a base di crusca (fibra >40%) acquistati in diversi punti vendita durante il 2003.

Materiali e metodi

Analisi ocratossina A

Un'aliquota di 10 g di campione, precedentemente macinato con griglia da 1 mm, è stata estratta con 100 mL di una miscela di CH₃OH:sol. acquosa di NaHCO₃ 0,5M=50:50 mediante agitazione meccanica per 45 minuti. Dopo filtrazione su filtro di carta, un volume di 5 mL dell'estratto filtrato è stato diluito con 50 mL di tampone fosfato PBS (NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L, Na₂HPO₄ 1,15 g/L, KH₂PO₄ 0,2 g/L, pH 7,4) e purificato su colonna ad immunoaffinità (IA). Dopo lavaggio della colonna di IA con 5 mL di tampone PBS, l'OTA è stata eluita in provetta graduata con 2,5 mL di CH₃OH acido per CH₃COOH al 2%. Dopo evaporazione del solvente con flusso di N₂, il residuo è stato ripreso con 1 mL di miscela CH₃CN:H₂O=41:59, utilizzando un bagno ad ultrasuoni; la soluzione è stata miscelata, filtrata (0,45 µm) e sottoposta ad analisi mediante HPLC (3).

È stata utilizzata una colonna RP-18 Superspher (Merck) con fase mobile CH₃CN:H₂O=41:59, flusso 1 mL/min. e rivelazione fluorimetrica (λ_{ecc} =333 nm, λ_{em} =470 nm).

Analisi tricoteceni

Un'aliquota di 25 g di campione, precedentemente macinato con griglia da 1 mm, è stata estratta con 100 mL di una miscela CH₃CN:H₂O=84:16 mediante agitazione meccanica per 90 minuti. Dopo filtrazione su filtro di carta, un volume di 6 mL dell'estratto filtrato è stato purificato con colonna Mycosep 227 (4); 2 mL dell'estratto purificato sono stati trasferiti in provetta e, dopo evaporazione del solvente con flusso di N₂, il residuo è stato derivatizzato con 0,2 mL di una miscela trimetilsililimidazolo+trimetilclorosilano=1+0,2 per 15 minuti a temperatura ambiente e al buio. Dopo aggiunta di 0,8 mL di esano, 1 mL di acqua bidistillata e centrifugazione, i TCT (DON, NIV, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON, HT-2 e T-2) sono stati determinati mediante GC-MS con rivelatore a trappola ionica, con tecnica SIM (selected ion monitoring) (5).

È stata utilizzata una colonna capillare DB-5 (30 m, diametro interno 0,25 mm) con il seguente programma di temperatura: 70°C per 1 min., 70-245°C a 10°C/min., isoterma per 1 min., 245-300°C a 30°C/min., isoterma per 2 min. Sono stati iniettati 2 µl con rapporto di splittaggio 1:30 e modo PTV *solvent split*.

Risultati e discussione

Prove di recupero e limiti di rivelazione

Sono state valutate le percentuali di recupero dei due metodi, aggiungendo ad aliquote di un campione risultato esente da contaminazione da OTA e TCT, un volume misurato di standard delle micotossine considerate, in modo da avere una contaminazione da OTA pari a 1 µg/kg e da TCT pari a 500 µg/kg. Per OTA la percentuale di recupero medio è stata di 92,3±2,7%, mentre per i TCT sono state: 90,1±2,4% per il DON, 91,2±3,6% per 3-Ac-DON, 93,6±2,9% per 15-Ac-DON, 81,4±3,8% per NIV, 88,9±2,7% per HT-2 e 86,7±3,4% per T-2. I risultati dei campioni non sono stati corretti per le percentuali di recupero. I limiti di rivelazione (rapporto segnale/rumore 3:1) sono risultati di 0,020 µg/kg per l'OTA; di 2,0 µg/kg per DON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON e NIV e di 10 µg/kg per HT-2 e T-2.

Risultati dell'indagine sui *baby-foods*

Nei campioni di *baby-foods* l'incidenza di contaminazione per l'OTA è stata del 20%, con un valore massimo di 0,450 µg/kg (Tabella 1). Tra i TCT, è stato rilevato solo il DON (Tabella 2), con un'incidenza del 77% e un valore massimo di 187 µg/kg. I valori medi di OTA e DON sono risultati di 0,046 e 91 µg/kg, rispettivamente.

Tabella 1. Incidenza, media, mediana e valore massimo di OTA in *baby-foods*

Matrice	N. campioni	N. positivi	Media µg/kg	Mediana µg/kg	Val. max µg/kg
Crema	8	2	0,091	<0,020	0,095
Semolini	7	1	-	<0,020	0,138
Pastine	7	2	0,382	<0,020	0,450
Biscotti	8	1	-	<0,020	0,071

Tabella 2. Incidenza, media, mediana e valore massimo di DON in *baby-foods*

Matrice	N. campioni	N. positivi	Media µg/kg	Mediana µg/kg	Val. max µg/kg
Creme	8	7	105±60	123	173
Semolini	7	3	50±67	<2	144
Pastine	7	7	128±55	147	187
Biscotti	8	6	82±57	100	140

Risultati dell'indagine su prodotti a base di crusca e integrali

Nei prodotti dietetici a base di crusca, l'OTA è risultata presente nel 65% dei campioni, con un valore massimo di 2,597 µg/kg e con il 6% dei campioni superiore a 1 µg/kg. Il DON è stato rilevato nel 96% dei campioni, con un valore massimo di 1498 µg/kg e con il 30% dei campioni superiore a 500 µg/kg. Gli altri TCT sono risultati presenti a bassi livelli solo nei campioni dove il DON era superiore a 500 µg/kg. I valori medi sono risultati di 0,209 e 306 µg/kg per l'OTA e il DON, rispettivamente.

Tabella 3. Incidenza, media, mediana e valore massimo di OTA in prodotti a base di crusca e integrali

Matrice	N. campioni	N. positivi	Media µg/kg	Mediana µg/kg	Val. max µg/kg
Prodotti a base di crusca	32	22	0,25±0,57	0,087	2,597
Prodotti integrali	20	12	0,14±0,32	0,041	1,472

Tabella 4. Incidenza, media, mediana e valore massimo di TCT in prodotti a base di crusca e integrali

Matrice	N. campioni	N. positivi	Media µg/kg	Mediana µg/kg	Val. max µg/kg
<i>Prodotti a base di crusca</i>					
Don	32	30	333±335	183	1498
3-Ac-Don	32	0	-	-	-
15-Ac-Don	32	5	15±62	<2	224
Niv	32	14	32±61	<2	180
HT-2	32	1	-	-	104
T-2	32	0	-	-	-
<i>Prodotti integrali</i>					
Don	20	20	263±159	196	564
3-Ac-Don	20	-	-	-	-
15-Ac-Don	20	0	-	<2	52
Niv	20	2	-	-	-
HT-2	20	0	-	-	-
T-2	20	0	-	-	-

La UE ha fissato come valori di TDI (tolerable daily intake) valori di 0,005 e 1 µg per kg di peso corporeo rispettivamente per OTA e DON. Considerando un peso medio di un bambino a inizio svezzamento (6 mesi) pari a 7,5 kg e un consumo di 0,1 kg di prodotti a base di cereali,

dai dati medi di questo lavoro si può stimare che questi alimenti apportano il 12,3% del TDI per l'OTA, ma soprattutto superano (121%) il TDI per il DON. Per i prodotti a base di crusca e quelli integrali, considerando un consumo di 0,05 kg da parte di una persona di 70 kg, gli apporti di OTA e DON risultano essere rispettivamente il 3 e il 22% del TDI.

Bibliografia

1. Beretta B, De Domenico R, Gaiaschi A, Ballabio C, Galli CL, Gigliotti C, Restani P. Ochratoxin A in cereal-based baby foods: occurrence and safety evaluation. *Food Addit Contam* 2002; 19:70-75.
2. Lombaert GA, Pellaers P, Roscoe V, Mankotia M, Neil R, Scott PM. Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market. *Food Addit Contam* 2003; 20:494-504.
3. Scudamore KA, Mac Donald SJ. A collaborative study of an HPLC method for determination of ochratoxin A in wheat using immunoaffinity column clean-up. *Food Addit Contam* 1998; 15:401-10.
4. Radova Z, Holadova K, Hajslova J. Comparison of two clean-up principles for determination of trichothecenes in grain extract. *J Chromatogr A* 1998; 829:259-67.
5. Eskola M, Rizzo A. Sources of variation in the analysis of trichothecenes in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. *Mycotoxin Research* 2001; 17:68-87.

MICOTOSSINE NEL LATTE MATERNO: INDAGINE EPIDEMIOLOGICA

Giovanna Turconi, Marianna Guarcello, Sergio Comizzoli, Laura Maccarini, Amedeo Pietri, Gianfranco Piva, Carla Roggi

(a) *Dipartimento di Scienze Sanitarie Applicate e Psicocomportamentali, Sezione di Scienza dell'Alimentazione, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Pavia*

(b) *Dipartimento di Medicina Preventiva e di Comunità, Istituto di Igiene, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Pavia*

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

I risultati della ricerca, di cui si riporta di seguito l'abstract sono disponibili in: Turconi G, Guarcello M, Livieri C, Comizzoli S, Maccarini L, Castellazzi AM, Pietri A, Piva G, Roggi C. Evaluation of xenobiotics in human milk and ingestion by the newborn-an epidemiological survey in Lombardy (Northern Italy). Eur J Nutr 2004 Aug;43(4):191-7. Epub 2004 Jan 6. Disponibile all'indirizzo: [http://www.springerlink.com/\(5m310brwilp0cp55ttzasq55\)/app/home/contribution.asp?referrer=parent&backto=issue,1,7;journal,13,180;linkingpublicationresults,1:103683,1](http://www.springerlink.com/(5m310brwilp0cp55ttzasq55)/app/home/contribution.asp?referrer=parent&backto=issue,1,7;journal,13,180;linkingpublicationresults,1:103683,1); ultima consultazione 25/1/06.

Il latte materno rappresenta l'alimento principe per l'alimentazione del bambino fino ai sei mesi di vita, in quanto è in grado non solo di fornire i nutrienti e l'energia necessari per una crescita ottimale, ma anche costituisce la scelta alimentare migliore in quanto numerosi sono i vantaggi nei confronti di ogni possibile sostituto. Tuttavia il rischio dei neonati di esposizione a contaminanti, quali le micotossine, attraverso l'allattamento materno resta un problema reale di cui è necessario tenere conto e che deve essere attentamente e continuamente monitorato.

È stata condotta un'indagine epidemiologica sul latte materno al fine di valutare il dato espositivo alle micotossine e il conseguente carico somatico della madre, nonché stimare il potenziale intake da parte del neonato e il conseguente livello di rischio per la sua salute. All'indagine hanno partecipato 231 donne. La popolazione campionata è stata selezionata tra le puerpere che si trovavano nella terza/quarta giornata dopo il parto in sette strutture ospedaliere della Lombardia. La numerosità del campione è stata definita sulla base del numero di parti avvenuti in Lombardia nel 1999 e sul dato di prevalenza delle micotossine nel latte materno in Paesi europei ed extra-europei pari mediamente al 18%. Ad ogni soggetto è stato somministrato un questionario appositamente predisposto nel quale, oltre ai dati anagrafici, venivano richieste informazioni sull'attività lavorativa, le abitudini alimentari e personali. Per ciascun soggetto è stato prelevato un campione di 20 mL di latte per il dosaggio delle micotossine mediante HPLC. Le elaborazioni statistiche di tipo descrittivo sono state effettuate con pacchetto statistico SPSS/PC + V 2.0. Dei 231 campioni di latte analizzati, uno solo conteneva aflatossine (11,4 ng/L di Aflatossina B1 e 194,0 ng/L di Aflatossina M1), mentre 198 campioni (85,7%) mostravano positività per l'Ocratossina A. Nessuna correlazione significativa tra le concentrazioni di Ocratossina A nel latte e potenziali fattori di rischio è stata evidenziata né in relazione alla distribuzione territoriale, né alle caratteristiche anagrafiche e personali. Per quanto riguarda le abitudini alimentari sono emerse differenze statisticamente significative solo per il consumo di pane. Relativamente ai lattanti è emerso che in sesta giornata, con un consumo presumibile di 300 grammi di latte, un'alta percentuale di soggetti (71,0%) è da considerarsi a rischio in quanto esposta a valori di Ocratossina A superiori al limite proposto da Kuiper-Goodmann e Scott (0,2 ng/kg p.c). In conclusione, i risultati dello studio possono rappresentare un punto di partenza per indagini future e confermano la necessità di continuare l'attività di monitoraggio per fornire informazioni sul livello di esposizione della puerpera e del neonato, soprattutto in relazione all'individuazione del ruolo dei possibili fattori di rischio sulla qualità del latte materno.

VALUTAZIONE ANALITICA DELL'ESPOSIZIONE DEL CONSUMATORE ALLA FUMONISINA B₁

Carlo Brera, Simona Angelini, Francesca Debegnach, Barbara De Santis, Aida Turrini, Marina Miraglia
(a) Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(b) Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (INRAN), Roma

Introduzione

Le micotossine sono metaboliti secondari prodotti da funghi filamentosi che possono causare manifestazioni di tossicità acuta e cronica negli animali superiori. La contaminazione delle matrici alimentari da micotossine, e in particolare da fumonisina B₁(FB₁), è in genere di tipo puntiforme, interessa numerose matrici ed è pertanto importante, come anche richiesto dall'Unione Europea, condurre studi volti ad ottenere una valutazione realistica del rischio a cui il consumatore è esposto con la dieta.

Più specificatamente per definire qualitativamente e quantitativamente un fattore di rischio, la valutazione della assunzione di un contaminante mediante la dieta (*dietary intake*) deve essere successivamente confrontata con il valore della *Tolerable Daily Intake* (TDI) o con il *Provisional Tolerable Weekly Intake* (PTWI). Le stime dell'assunzione dei contaminanti sono parametri critici per prendere decisioni in materia di sicurezza alimentare; gli studi di *dietary intake*, infatti, forniscono informazioni che sono finalizzate alla revisione di limiti di legge, laddove esistenti, o alla fissazione di nuovi limiti per la presenza di contaminanti nei prodotti alimentari.

Sono possibili tre approcci di base per condurre studi di *dietary intake*. La *World Health Organization* (WHO) ha individuato lo studio della Dieta Totale (*Total Diet Study - market basket*) come la procedura in grado di fornire la stima più accurata dell'assunzione dei contaminanti mediante l'alimentazione (1). Si tratta di un approccio complesso e molto costoso. Gli altri due approcci sono lo Studio selettivo di singoli alimenti (*Selective Studies of Individual Foodstuff*) e lo Studio delle porzioni in duplicato (*Duplicate Portion Studies*). Tali metodologie richiedono un minor lavoro di programmazione e minori capacità tecniche.

La finalità di questo studio è stata quella di valutare la quota di rischio associata alla contaminazione da fumonisina B₁ nei prodotti alimentari, in modo tale da poter disporre di un parametro reale da tenere in considerazione nella definizione e nella applicazione di limiti massimi tollerabili, e nel controllo di questa micotossina nei prodotti destinati al consumatore.

Lo studio per la valutazione della esposizione alla fumonisina B₁ secondo l'approccio della dieta totale si è articolato in varie fasi nelle quali si sono studiati i seguenti parametri:

- *Fase 1*
Dati di consumo, lista degli alimenti, campionamento (Sezione Materiali e metodi)
- *Fase 2*
Preparazione e analisi dei campioni (Sezione Materiali e metodi)
- *Fase 3*
Dati di incidenza di contaminazione e calcolo dell'esposizione (Sezione Discussione dei risultati)

Materiali e metodi

Scelta dei siti di campionamento

Il campionamento dei prodotti alimentari del market basket è stato effettuato nei negozi di vendita al dettaglio per garantire che i prodotti prelevati fossero rappresentativi di quelli effettivamente offerti al pubblico.

I campioni sono stati prelevati in tre grandi centri di distribuzione alimentare, aperti alla vendita al pubblico. I criteri che hanno condizionato la scelta dei punti vendita sono stati:

- selezione di catene di distribuzione molto rappresentate sia sul territorio di studio che su tutto il territorio nazionale
- elevata possibilità di scelta, in termini di numero di marche disponibili per ciascuna matrice da prelevare
- dislocazione differenziata sul territorio in modo da rendere più rappresentativi i campioni.

Le categorie alimentari campionate sono illustrate nella Tabella 1, in cui è stato anche riportato il numero di marche per ciascuna categoria, prelevato in ciascun punto vendita.

Tabella 1. Categorie alimentari e relativo numero di marche prelevate

Matrice	Numero di marche prelevate		
	Punto Vendita "A"	Punto Vendita "B"	Punto Vendita "C"
Birra chiara	38	100	62
Birra scura e rossa	5	5	10
Birra analcolica	2	3	2
Mais dolce	11	8	4
Fiocchi di mais	14	8	7
Farina per polenta	7	6	5
Fagioli	15	17	8
Piselli conservati	7	10	7
Muesli e cereali misti	11	23	14
Orzo	6	4	4
Riso	26	34	34
Cioccolato e cioccolatini	19	12	42
Cacao per prima colazione	5	3	1
Cacao in polvere	3	6	7
Crema con cacao	5	1	8
Crema dessert budini	5	3	3
Merendine al cacao	14	13	34

Fase 1

Dati di consumo

I dati di consumo utilizzati nel nostro studio si sono riferiti alla seconda indagine a livello nazionale sui consumi alimentari eseguita dall'Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (INRAN- INN-CA 1994-96) (2) che costituisce la fonte ufficiale più recente. I dati di consumo sono stati elaborati da uno studio condotto su base multicentro comprendente 15 diversi centri di collaborazione. Il campione scelto consisteva in un gruppo di 1978 soggetti, esclusi i bambini di età inferiore ad un anno, geograficamente rappresentativo per l'Italia. L'indagine ha fornito i quantitativi base in grammi/die per stabilire la composizione della dieta campione per l'intera popolazione italiana e per gruppi di essa identificati per genere, età e area geografica. L'indagine ha riguardato quattro diverse stagioni e ha utilizzato una procedura

basata sulla compilazione di un diario per la registrazione delle assunzioni pesate individuali dei membri della famiglia nell'arco di 7 giorni. Inoltre, è stato tenuto a livello familiare un libro contenente un inventario delle risorse alimentari in entrata e in uscita, con le ricette e i metodi di cottura degli alimenti. Come strumento di controllo dell'attendibilità dei risultati forniti dall'indagine è stato usato il rapporto metabolismo/energia (BMR, *Basal Metabolic Rate*).

Scelta dell'approccio di Dieta Totale

Tra le possibilità di approccio al metodo Dieta Totale già illustrate in precedenza, si è ritenuto di utilizzare per questo studio, quello dell'analisi delle matrici individuali. Infatti, l'informazione ottenuta per le singole matrici permette di utilizzare il dato di contaminazione per analizzare e confrontare le diete tipiche di diverse aree geografiche, di stagioni differenti e di gruppi di popolazione divisi per fasce di età. Inoltre, l'approccio individuale alle matrici alimentari permette di minimizzare l'effetto di diluizione che si avrebbe aggregando più matrici. Tali matrici sono state preparate e analizzate individualmente in modo da ottenere informazioni sul contributo apportato all'assunzione giornaliera del contaminante da ciascuna di esse.

Formulazione della lista degli acquisti

Il fattore primario che ha influenzato la scelta degli alimenti da inserire nella lista degli acquisti (shopping list) è stato, come indicato anche dalla WHO, la natura del contaminante da analizzare. Infatti per la formulazione della Dieta Totale sono state individuate, tra tutte le matrici alimentari, solo quelle potenzialmente esposte alla contaminazione della micotossina in esame. La fase successiva è stata quella di eseguire una aggregazione di primo livello, riunendo all'interno di una categoria, i prodotti di uno stesso genere, ad esempio nella categoria "riso" sono state racchiuse tutte le diverse tipologie o qualità dell'alimento, considerando per esse un unico consumo giornaliero.

Campionamento

Le varie fasi del campionamento si sono svolte secondo le seguenti modalità:

- individuazione e prelievo di una o più confezioni dei prodotti individuati nelle fasi precedenti di tutte le marche presenti, con modalità casuale tra le unità disponibili sugli scaffali;
- imballaggio e spedizione delle confezioni presso il laboratorio di analisi;
- catalogazione ed etichettatura dei campioni secondo una specifica codifica.

Ciascun paniere della spesa è stato raccolto e spedito in giorni diversi, ma le operazioni si sono concluse nell'arco di un mese.

Fase 2

Preparazione dei campioni

Ogni campionatura o paniere della spesa proveniente da ciascuno dei tre punti vendita interessati, è stata preparata e analizzata separatamente, in modo da avere da ciascuna campionatura un valore di contaminazione per le singole matrici, da poter poi mediare con quelli provenienti dagli altri due panieri. Ogni unità di ciascuna marca, appartenente ad una matrice solida, è stata sminuzzata e poi macinata, per aumentarne la omogeneità, mediante un omogeneizzatore. Successivamente alla fase di omogeneizzazione, da ogni unità, di tutte le marche a disposizione, è stata prelevata un'aliquota di uguale peso (campione elementare) per andare a comporre il campione globale di quella specifica matrice. Il campione globale è stato a sua volta mescolato, omogeneizzato e riposto in contenitori di vetro per essere refrigerato o congelato a seconda del tempo trascorso tra la preparazione e l'analisi. Dal campione globale sono state successivamente prelevate le aliquote da destinare alle analisi. Per le matrici liquide si è ugualmente prelevata da ogni unità appartenente ad una categoria, un'aliquota di uguale

peso che è stata riposta unitamente alle altre in un contenitore adatto. Nel caso dei liquidi l'omogeneizzazione del campione globale si è ottenuta per semplice mescolamento. Nel caso del campione di birra, dal campione globale liquido si è prelevato un campione di laboratorio, previa fase di degassamento con bagno ad ultrasuoni, da cui successivamente sono state prelevate le aliquote per l'effettuazione delle analisi replicate.

In alcuni casi le matrici studiate sono state analizzate tal quali, perché già nella forma destinata al consumo, in altri casi sono state analizzate dopo aver subito processi di cottura o di miscelazione con acqua potabile previamente analizzata per il contenuto in fumonisina B₁. Le matrici che vengono solitamente consumate dopo miscelazione con latte sono state analizzate tal quali poiché è nota l'assenza della fumonisina B₁ nel latte stesso.

Analisi dei campioni

La fase preliminare dello studio ha consentito di verificare che l'efficienza dei metodi utilizzati, ottenuti modificando quelli riportati in letteratura, fosse applicabile ai diversi prodotti alimentari, utilizzando come base di riferimento i valori di precisione e accuratezza suggeriti dal CEN (Comité Européen de Normalisation) (3).

Una volta stabilita l'idoneità dei metodi analitici si è proceduto alle analisi replicate dei campioni dei tre panieri e si sono ottenuti i dati di contaminazione media (in µg/g) di ciascuna matrice di ogni singolo paniere. In questo lavoro non si è impiegato il metodo ufficiale dell'AOAC (4, 5, 6) per la granella di mais, perché questo prevede per il clean-up l'uso di colonnine SAX (Strong Anion eXchange). Si è invece preferito usare un metodo che impiegasse le colonnine di immunoaffinità in quanto queste consentono una maggiore specificità e selettività.

A causa della diversità e complessità delle matrici alimentari sottoposte alle analisi, la prima fase del lavoro è stata caratterizzata dalla messa a punto di diversi metodi in manuale, tutti con fase di derivatizzazione e iniezione in HPLC eseguita in automatico. Si è partiti da metodi validati a livello internazionale e nazionale per la determinazione della fumonisina B₁ nella granella di mais e nella birra e, a seconda delle problematiche presentate dalle diverse matrici, si sono apportate le necessarie modifiche. Per ogni matrice analizzata è stata verificata l'efficienza del relativo metodo di analisi mediante l'utilizzo di campioni artificialmente contaminati (*spike*) e il calcolo dei fattori di recupero.

Metodo per le matrici solide

Il metodo analitico utilizzato per le matrici solide si è basato su quello messo a punto da Visconti *et al.* (2001) (7) apportando le opportune modifiche a seconda delle matrici analizzate.

Vengono di seguito descritte le singole fasi della metodologia finale utilizzata:

Estrazione

Venticinque grammi di campione sono stati pesati direttamente in *blender*, e addizionati di 2,5 g di NaCl con lo scopo di aumentare la forza ionica della soluzione, aumentando di conseguenza anche la solubilità della tossina da estrarre.

La fase di estrazione dalla matrice ha previsto l'aggiunta di 125 mL di soluzione estraente [acetone:metanolo:acqua bidistillata (25:25:50 in volume)]. L'estrazione è stata effettuata in *blender* per 5 minuti ad alta velocità.

Questa procedura di estrazione, si è rivelata particolarmente efficiente sia per quanto riguarda la scelta della soluzione estraente, sia per l'utilizzo del *blender*. Altre miscele di estrazione di diversa composizione, quali ad esempio acetone:acqua (50:50 in volume) o metanolo:acqua (3:1 in volume), o di diverso pH erano caratterizzate da fattori di recupero

inferiori rispetto alla miscela scelta. Il campione è stato poi filtrato una prima volta su filtro di carta, successivamente si è prelevata una quantità nota di estratto pari a 10 mL e la si è diluita con 40 mL di PBS. Infine il campione, dopo opportuna miscelazione, è stato sottoposto ad una seconda filtrazione su filtro a microfibra di vetro. Nei casi in cui o la granulometria particolarmente fine del campione (ad esempio l'orzo) o la natura fortemente grassa (ad esempio il cioccolato) sono risultate tali da occludere le maglie del filtro di carta rendendo troppo difficoltosa la filtrazione, questa è stata convenientemente preceduta da una centrifugazione. Le matrici che sono state sottoposte a centrifugazione sono state le seguenti: muesli e cereali misti, orzo, cioccolato e cioccolatini, e le creme con cacao.

Per tali matrici si è eseguita una centrifugazione di 10 minuti a 5000 rpm a temperatura ambiente e il surnatante è stato successivamente trasferito su filtro di carta.

Effettuata l'estrazione secondo le modalità indicate si è prelevata una quantità nota di estratto da destinare alla successiva fase di *clean-up*.

Tra le varie matrici analizzate i fiocchi di mais hanno presentato le maggiori difficoltà a causa dei bassi fattori di recupero (FR=50%). Si è tentato, pertanto, di migliorare la resa della fase di estrazione eseguendo diversi tentativi tra cui una doppia estrazione eseguita come di seguito riportato: i 125 mL della soluzione estraente sono stati suddivisi in due porzioni con le quali sono state eseguite due consecutive estrazioni dal medesimo campione solido. Dopo la prima estrazione effettuata mediante centrifuga, il surnatante è stato fatto passare su filtro di carta, mentre la parte solida è stata estratta nuovamente con la seconda aliquota di fase estraente. Il secondo surnatante è stato riunito al primo, previo passaggio sul medesimo filtro di carta. Questo procedimento ha portato a valori superiori di fattori di recupero (FR=71%).

Clean-up

Le colonnine di immunoaffinità (Fumoniprep - R-Biopharm Rhône) sono state precondizionate con 5 mL di PBS. Dopo il passaggio dell'estratto (10 mL), le colonnine sono state nuovamente lavate, con PBS. La fumonisina B₁ è stata quindi eluita con 1.5 mL di metanolo seguiti da 1.5 mL di acqua bidistillata data la solubilità delle fumonisine in entrambi i solventi. Gli eluati così ottenuti sono stati raccolti in un'unica fiala e agitati per assicurare la omogeneizzazione del campione.

Metodo per le matrici liquide

Le matrici liquide prese in esame in questo studio sulla fumonisina B₁ sono state la birra e l'acqua potabile.

Il metodo utilizzato è stato messo a punto partendo da metodi presenti in letteratura e usati per la determinazione della fumonisina B₁ nella birra (8, 9), apportando anche in questo caso alcune modifiche. Il metodo modificato riduce i tempi richiesti per l'analisi e fornisce buoni fattori di recupero. Rispetto al metodo utilizzato per le matrici solide che prevede una fase di estrazione, in questo metodo si è partiti direttamente dalla fase di *clean-up*, vista la presenza dell'analita già in soluzione.

Clean-up

Per la matrice alimentare birra, preliminarmente alla fase di purificazione, si è proceduto al degassamento mediante sonicazione ad ultrasuoni per due ore. Successivamente a questa fase, 5 mL di campione sono stati introdotti in colonnina di immunoaffinità (Fumoniprep - R-Biopharm Rhône) e percolati per gravità. La colonnina è stata successivamente lavata con due passaggi differenziati: 1 mL di soluzione di lavaggio (0,5% di bicarbonato di sodio, 2,5% di

cloruro di sodio in acqua bidistillata) e 1 mL di acqua bidistillata, in condizioni di leggera pressione. Le acque di lavaggio sono state successivamente eliminate, e prima di eseguire l'eluizione, si è fatta passare aria nella colonnina per eliminare eventuali tracce d'acqua.

Eluizione (matrici solide e liquide)

La tossina è stata eluita mediante passaggio di 1 mL di metanolo per gravità e l'eluato raccolto in una fiala. Successivamente sono stati aggiunti direttamente in fiala, 3,5 mL di metanolo e 4,5 mL di acqua bidistillata per un volume totale di 9 mL (metanolo:acqua = 50:50). Il campione ottenuto è stato agitato per 30 secondi con vortex per ottenere un buon mescolamento dei solventi. I campioni così ottenuti sono stati trasferiti nelle fiale di iniezione e introdotti nel sistema automatico di preparazione dei campioni (ASPEC) dove hanno subito il procedimento di derivatizzazione e poi l'iniezione in HPLC in modo identico ai campioni provenienti dalle matrici solide.

Preparazione del composto derivatizzato (matrici solide e liquide)

La fumonisina B₁, a causa della mancanza di cromofori nella struttura chimica, non mostra una fluorescenza naturale e necessita quindi di un passaggio di derivatizzazione pre-colonna. Tutte le fasi sono state effettuate in automatico e precisamente:

- costruzione della curva di calibrazione;
- derivatizzazione dei campioni;
- iniezione in HPLC;
- elaborazione dei dati cromatografici ottenuti.

Derivatizzazione del campione (matrici solide e liquide)

L'agente derivatizzante impiegato è una soluzione di orto-ftaldialdeide (OPA) e 2-mercaptoetanolo secondo la seguente procedura: si pesano 120 mg di OPA, si sciolgono in 3 mL di metanolo, si diluiscono con 15 mL di una soluzione 0.1M di borace e infine si aggiungono 150 µL di 2-mercaptoetanolo. La soluzione derivatizzante può essere conservata per 5 giorni se protetta dal contatto diretto con la luce. La fluorescenza generata dalla reazione tra OPA, mercaptoetanolo e fumonisina è fortemente dipendente dal tempo: la massima fluorescenza si ottiene 30 secondi dopo che la reazione ha avuto luogo e diminuisce progressivamente nei successivi 5 minuti, passati i quali si ha una netta diminuzione (15%) del segnale. Nella pratica di analisi, si è effettuata l'iniezione in HPLC ad un tempo standardizzato e ripetibile entro i 3 minuti successivi all'aggiunta dell'agente derivatizzante. Tale procedura è stata eseguita in automatico sia per le soluzioni standard che per i campioni incogniti di tutte le matrici alimentari. La derivatizzazione del campione è stata effettuata in automatico aggiungendo 50 µL di campione a 450 µL di OPA e miscelando la soluzione con aria insufflata (10 mL/min) in 3 fasi.

Analisi per HPLC (matrici solide e liquide)

L'analisi quantitativa strumentale ha previsto una separazione cromatografica in fase inversa mediante utilizzo di un HPLC dotato di uno spettrofluorimetro come rivelatore (HPLC Gilson con detector Jasco 821-FP).

Condizioni cromatografiche:

- Colonna cromatografica: C18, 250x4. mm, ID 5µ, termostata a 40° C

- Fase mobile: metanolo:soluzione 0.1M di fosfato biacido di sodio (77:23 in volume) portata a pH 3.35 mediante aggiunta di acido ortofosforico all'85%
- Flusso: 1 mL/min
- Lunghezze d'onda di esercizio: $\lambda_{ecc} = 335 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 440 \text{ nm}$.

Discussione dei risultati e conclusioni

Nella fase 3 dello studio, è stata effettuata la valutazione dei dati di incidenza di contaminazione e il relativo calcolo della esposizione.

I dati di contaminazione di ogni alimento del paniere (espressi in μg di contaminante per g di campione), sono stati moltiplicati per il consumo medio giornaliero per persona (espresso in g), ottenendo la quantità di contaminante assunta giornalmente mediante l'alimentazione con ogni tipologia alimentare. I dati di consumo, oltre che per l'intera popolazione, sono stati diversificati in base alle fasce di età, all'area geografica e alla stagione. Sono stati forniti oltre ai consumi medi anche i consumi relativi al 95° percentile, ovvero il valore soglia entro cui ricadono i consumi del 95% della popolazione italiana.

Calcolo della esposizione

Per il calcolo della assunzione giornaliera, si è considerato il valore medio calcolato dai valori medi di contaminazione ottenuti per ciascuna delle categorie alimentari (Tabella 2).

Tabella 2. Valori di contaminazione mediati su tre punti vendita

Matrice	Contaminazione media ($\mu\text{g/g}$)	DS*
Riso	<LR	-
Mais dolce	<LR	-
Orzo	0,025	0,000
Farina per polenta	1,659	0,476
Fiocchi di mais	0,262	0,286
Muesli e cereali misti	0,025	0,000
Fagioli	<LR	-
Cioccolato e cioccolatini	0,025	0,000
Cacao in polvere	0,063	-
Crema con cacao	<LR	-
Cacao per prima colazione	<LR	-
Merendine al cacao	0,025	0,000
Crema, dessert, budini	0,025	0,000
Birra chiara	0,031	0,010
Birra scura e rossa	<LR	-
Birra analcolica	<LR	-
Piselli	<LR	-

* DS= Deviazione Standard

L'assunzione giornaliera di FB_1 mediante l'alimentazione è stata successivamente ottenuta moltiplicando la contaminazione di ogni matrice (in $\mu\text{g/g}$) per il dato di consumo giornaliero espresso in g/pro capite. Il valore di assunzione giornaliera è stato poi diviso per il corrispondente peso corporeo medio (Tabella 3) (2) fornito dall'INRAN relativo alla fascia di popolazione presa in esame, ottenendo un valore di esposizione espressa in $\mu\text{g/kg pc/die}$.

L'esposizione così ottenuta (Tabella 4) è stata confrontata con il valore di TDI (*Tolerable Daily Intake*) di 2 µg/kg pc/die raccomandato dal SCF (*Scientific Committee for Food*) a livello europeo.

Tabella 3. Pesì corporei utilizzati per il calcolo dell'esposizione

Variabile	Modalità	Peso medio (kg)
Area	<i>nord ovest</i>	63,2
	<i>nord est</i>	62,9
	<i>centro</i>	62,3
	<i>sud e isole</i>	61,1
Età	<i>bambini</i>	24,5
	<i>adolescenti</i>	52,3
	<i>adulti</i>	66,3
	<i>anziani</i>	66,8
Stagione	<i>primavera</i>	62,1
	<i>estate</i>	63,0
	<i>autunno</i>	61,7
	<i>inverno</i>	63,2
Totale		62.3

Tabella 4. Dati di esposizione (µg/kgpc/die) per fasce di età della popolazione italiana

Alimento	Bambini (1-9 anni)		Adolescenti (10-17 anni)		Adulti (18-64 anni)		Anziani (oltre 64 anni)	
	EM	E 95°	EM	E 95°	EM	E 95°	EM	E 95°
Riso	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Mais	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Orzo	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	0,0001	0,0000	0,0003	0,0000
Farina per polenta	0,0372	0,0000	0,0396	0,1885	0,0395	0,2530	0,0342	0,0000
Fiocchi di mais	0,0039	0,0000	0,0063	0,0208	0,0020	0,0000	0,0000	0,0000
Muesli e cereali misti	0,0005	0,0000	0,0001	0,0000	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000
Fagioli in scatola	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Cioccolato e cioccolatini	0,0018	0,0103	0,0009	0,0057	0,0004	0,0027	0,0002	0,0008
Cacao in polvere	0,0036	0,0020	0,0012	0,0043	0,0002	0,0000	0,0001	0,0000
Crema con cacao	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Cacao per prima colazione	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Merendine a base di cacao	0,0024	0,0147	0,0004	0,0030	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000
Crema, dessert, budini	0,0067	0,0438	0,0010	0,0045	0,0005	0,0002	0,0002	0,0000
Birra chiara	0,0025	0,0000	0,0048	0,0250	0,0131	0,0664	0,0052	0,0270
Birra scura e rossa	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Birra analcolica	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Piselli conservati	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Dieta totale	0,0585	0,0708	0,0544	0,2516	0,0559	0,3222	0,0401	0,0279

EM: esposizione media

E 95°: esposizione 95° percentile

Sulla base dei risultati ottenuti si possono trarre le seguenti conclusioni:

- Il valore della stima dell'esposizione alla fumonisin B₁ condotto con la metodologia Dieta Totale sulla popolazione italiana è risultato essere ben al di sotto del valore di TDI raccomandato dallo *Scientific Committee for Food* (2 µg/kgpc/die) a livello europeo. Questa informazione indica la sicurezza delle derrate alimentari commercializzati nel nostro Paese per quanto riguarda la contaminazione da fumonisin B₁.
- I maggiori contributi all'assunzione giornaliera di fumonisin B₁ sono stati apportati dalle matrici alimentari farina per polenta e birra chiara, confermando che i cereali risultano essere i prodotti alimentari maggiormente interessati dalla contaminazione da fumonisin oltre che dalle micotossine in genere. I contributi minori apportati dai prodotti a base di cacao risultano particolarmente interessanti in quanto non costituiscono un rischio per una fascia di consumatori alquanto critica quale quella dei bambini.
- La fascia di popolazione più esposta all'assunzione di fumonisin B₁ mediante l'alimentazione è risultata essere quella degli adulti (18-64 anni) seguita da quella degli adolescenti (10-17 anni) perché presentano abitudini alimentari che prevedono consumi maggiori delle matrici contaminate.
- L'area geografica italiana con esposizione maggiore alla fumonisin B₁ è risultata essere il Nord-Ovest e la stagione dell'anno in cui lo schema alimentare comporta una maggiore assunzione di contaminante è risultata essere l'inverno.
- Dai parametri relativi alla efficienza, si sono messi a punto metodi attendibili per la determinazione della FB₁ in un numero ampio di matrici, fornendo un utile strumento diagnostico per il monitoraggio dei prodotti alimentari interessati a questo tipo di contaminazione.

Bibliografia

1. GEMS/Food Total Diet Studies, WHO/SDE/FOS/99.9, Report of a Joint USFDA/WHO International Workshop on Total Diet Studies in cooperation with the Pan American Health Organization, Kansas City, Missouri, USA, 26 July- 6 August 1999.
2. Turrini A, Saba A, Perrone D, Cialfa E, D'Amicis A. Food consumption patterns in Italy: the INN-CA Study 1994-1996. *Eur J Clin Nutr* 2001;55(7):571-88.
3. Comité Européen de Normalisation (CEN) - Food analysis - Biotoxins - Criteria of analytical methods for mycotoxins. CR 13505, 1999.
4. AOAC. Official Method n. 995.15 (AOAC, 2000).
5. Shephard GS; Sydenham EW, Thiel PG, Gelderblom WCA. Quantitative Determination of Fumonisin B₁ and B₂ by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Journal of Liquid Chromatography* 1990;13(10):2077-2087.
6. Sydenham EW, Shephard GS, Thiel PG, Stockenstrom S, Snijman PW, Schalkwyk DJ. Van. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂, and B₃ in corn. AOAC-IUPAC collaborative study. *Journal of AOAC International* 1996;79(3):688-696.
7. Visconti A, Solfrizzo M, De Girolamo A. Determination of fumonisin B₁ and B₂ in corn and corn flakes by high performance liquid chromatography and immunoaffinity column-clean-up: collaborative study. *Journal of AOAC International* 2001; 84:1828-1837.
8. Scott PM, Lawrence GA. Analysis of beer for fumonisins. *Journal of Food Protection* 1995;58:1379-1382.
9. Hlywka JJ, Bullerman LB. Occurrence of fumonisin B₁ and B₂ in beer. *Food Addit Contam* 1999;16:319-324.

VALUTAZIONE DELLA ESPOSIZIONE ALLA OCRATOSSINA A IN CAMPIONI DI SIERO DI DONATORI SANI

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

Introduzione

Il numero delle matrici alimentari per le quali l'incidenza di micotossine ha suscitato motivi di preoccupazione è andato crescendo negli ultimi anni, includendo sia materie prime sia prodotti derivati e trasformati. Inoltre la presenza di micotossine nei mangimi, oltre a rappresentare un problema di vastissime proporzioni per gli allevamenti, può costituire un'ulteriore fonte di rischio per l'uomo, attraverso il trasferimento di tossine nei prodotti d'origine animale quali il latte e i prodotti lattiero-caseari, la carne e le uova. Un'ulteriore fonte di assunzione di micotossine da parte di alcune fasce di popolazione è rappresentata dall'inalazione di polveri aereodisperse contaminate da micotossine. Questa circostanza può verificarsi sia in ambienti di lavoro in cui sono trattate derrate alimentari contaminate, sia in ambienti domestici in cattive condizioni igienico-ambientali.

Nonostante lo studio sistematico delle micotossine sia iniziato da più di quaranta anni, solo recentemente il loro potenziale impatto sulla salute dell'uomo e degli animali ha ricevuto una crescente attenzione.

Date le numerose fonti di errore che possono intervenire nella valutazione dello stato di contaminazione da micotossine delle derrate alimentari e in quella dei consumi alimentari, i dati di valutazione del rischio e della assunzione media giornaliera non sempre sono dotati di una sufficiente attendibilità. Per ovviare a questa incertezza secondo un'ottica più recente e moderna rispetto alle metodologie tradizionali per la valutazione del rischio sono state affiancate quelle basate sui biomarcatori.

La presenza di un biomarcatore di esposizione nei fluidi biologici può essere correlata con l'assunzione; nel caso delle micotossine spesso questa si identifica con la tossina tal quale, ma è di grande interesse anche la possibilità di quantificare e usare come biomarcatori i metaboliti derivanti dalle tossine assunte.

La stima dei biomarcatori nei fluidi biologici costituisce pertanto un ulteriore e più moderno approccio per la determinazione delle esposizioni medie (1). Inoltre le micotossine essendo distribuite nella derrata contaminata in modo estremamente disomogeneo, implicano la messa a punta di un adeguato piano di campionamento che preceda l'esecuzione dell'analisi. Nel caso dei sieri invece questo problema è superato, infatti i fluidi biologici sono omogenei e il campione prelevato risulta pertanto rappresentativo.

Tra le diverse micotossine, l'ocratossina A (OTA) è quella che maggiormente si presta ad uno studio di esposizione da effettuarsi attraverso l'analisi dei fluidi biologici. Infatti l'OTA è caratterizzata da un tempo di emivita piuttosto lungo che consente di ricercarla nel siero tal quale senza ricorrere allo studio di un suo metabolita. Precedenti studi, riguardanti ad esempio il latte materno (2), sono stati effettuati con successo, riuscendo a fornire un quadro sufficientemente chiaro dell'esposizione.

In questo studio si è effettuata una valutazione della esposizione alla ocratossina A ricorrendo all'analisi di sieri provenienti da diversi centri trasfusionali del Paese. La valutazione della esposizione è stata fatta mediante l'uso della equazione di Klassen. Infine, attraverso informazioni sulle abitudini alimentari dei donatori e l'Analisi delle Corrispondenze Multiple si sono ricercate possibili correlazioni tra il livello di OTA nel siero e l'assunzione di determinati alimenti.

Materiali e metodi

Collettivo campionario¹

Al fine di poter ottenere informazioni rappresentative dell'intero Paese, sono stati contattati centri trasfusionali dislocati su tutto il territorio nazionale. Il collettivo campionario preso in esame è costituito da donatori sani di sesso maschile provenienti da quattro diversi centri trasfusionali e precisamente Verona (n.=200), Firenze (n.=200) Benevento (n.=200) e Lecce (n.=90) rappresentativi del Nord, del Centro e del Sud del Paese. La città di Lecce è stata inserita nello studio anche se il numero di campioni di siero raccolti è stato inferiore a quello delle altre aree geografiche considerate. Per poter limitare la disomogeneità, in termini di numero di campioni, tra Lecce e il resto dei centri trasfusionali considerati si è deciso di unificare i dati relativi a Benevento e Lecce. Il collettivo campionario preso in esame è quindi, nel suo complesso, composto da 690 soggetti.

Ognuno dei partecipanti ha firmato un Consenso Informato nel quale venivano indicate la ragione del prelievo e le finalità dello studio. Oltre al prelievo del siero i partecipanti hanno compilato una scheda divisa in due sezioni di cui la prima riguardante i dati sensibili (dati anagrafici, peso, professione e titolo di studio, stato civile, ecc.), le informazioni sullo stato di salute e se il soggetto era o era stato un fumatore. L'altra parte della scheda riguardava invece le abitudini alimentari, per ogni tipologia di alimento inserita nel questionario si richiedeva di definire l'alimento (es. pane integrale, pane bianco) e di indicare la frequenza di consumo (quante volte al giorno/settimana/mese a seconda del tipo di alimento) e la quantità consumata (grammi). La scheda era piuttosto dettagliata e non tutti i partecipanti hanno risposto a tutte le domande poste. Per poter utilizzare i dati si è proceduto ad una riorganizzazione delle informazioni, semplificando le risposte in spesso/sempre/raramente/mai.

Campionamento dei sieri

I campioni di sangue, raccolti in provette prive di anticoagulanti, sono stati centrifugati a 3000 rpm per 15 minuti; dopo la separazione il solo siero è stato congelato a -20°C . Le operazioni descritte sono state effettuate presso i centri trasfusionali e i campioni di siero, consegnati al laboratorio congelati, sono stati mantenuti a -20°C fino al momento dell'analisi.

Metodo di analisi

L'analisi dei campioni di siero è stata effettuata seguendo il metodo di Breitholtz *et al.* (3), apportando alcune modifiche. Il metodo impiegato è brevemente descritto di seguito:

- Estrazione

¹ Per collettivo campionario si indica la popolazione del campione che ha preso parte allo studio

Due mL di siero sono addizionati con 10 mL di una soluzione di cloruro di magnesio 0,1 M e acido cloridrico 0.05M. Il campione viene successivamente estratto con 8 mL di acetato di etile e centrifugato a 10000 rpm per 10 minuti. Si preleva una quantità nota di surnatante e si porta a secchezza sotto flusso di azoto.

– *Purificazione (clean-up)*

Il residuo secco dell'estratto in acetato di etile viene ripreso con 2 mL di fase mobile e passato su filtro a siringa (\varnothing 25 mm, porosità 0.45, volume 1 mL); 100 μ L di filtrato così ottenuto vengono iniettati in HPLC.

– *Determinazione in HPLC*

L'analisi quantitativa strumentale prevede separazione cromatografica in fase inversa e rivelazione spettrofotometrica. Le condizioni operative dell'HPLC prevedono una fase mobile costituita da AcCN:H₂O acidulata al 2% con acido acetico 50:50 (v/v), flusso 1 mL/min e colonna C18 150x4.6 mm ID, 3.5 μ . Le condizioni di esercizio dello spettrofluorimetro sono $\lambda_{\text{ecc}} = 333$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 470$ nm. La colonna cromatografica è termostata a 40°C. La molecola dell'OTA presenta una naturale fluorescenza che ne permette la quantificazione senza bisogno di ricorrere ad alcuna reazione di derivatizzazione.

Tutti i campioni sia prima che dopo l'estrazione sono stati mantenuti al riparo dalla luce diretta, utilizzando vetreria ambrata, in quanto le radiazioni ultraviolette sono in grado di degradare la molecola di ocratossina, altamente fotosensibile.

Al fine di evitare la possibilità di falsi positivi riferibili alla presenza di sostanze interferenti, è stato necessario confermare i picchi relativi all'OTA. La conferma è stata effettuata per derivatizzazione chimica tramite formazione dell'estere metilico evidenziato in HPLC.

Il limite di determinazione (LOD) di questo metodo è 0.1 μ g/L.

Risultati e discussioni

Su tutti i campioni di siero analizzati (690), solo 9 (1.3% dei campioni) sono risultati non contaminati. In particolare tre di questi sieri provenivano dal centro trasfusionale di Benevento (3/200, 1.5%), mentre gli altri sei da quello di Lecce (6/90, 6.7%). In Tabella 1 sono riportati i valori medi dei livelli di OTA nel siero ottenuti per le diverse aree geografiche. L'intervallo di contaminazione per i campioni trovati maggiori del limite di rivelazione è invece 0,1-15,5 μ g/kg per il Nord, 0,1-27,2 μ g/kg per il Centro e 0,1-8,13 μ g/kg per il sud e in particolare 0,1-5,3 μ g/kg per la città di Benevento e 0,1-8,13 per la città di Lecce.

Tabella 1. Valori medi di contaminazione di OTA nei campioni di siero analizzati

Area geografica	Livello medio di contaminazione di OTA (μ g/L)	Campioni < LOD (%)
Nord - Verona	1,1	0
Centro - Firenze	1,1	0
Sud	0,6	1,3 (9/290)
Benevento	0,6	1,5 (3/200)
Lecce	0,8	6,7 (6/90)

Valutazione dell'esposizione

Per poter effettuare la valutazione dell'esposizione si è fatto ricorso alla equazione di Klassen. Attraverso l'uso di questa equazione è possibile calcolare, dai livelli di OTA riscontrati nel sangue, i valori di assunzione senza necessariamente coinvolgere informazioni riguardanti la fonte di assunzione, dati, questi ultimi, particolarmente complessi da ottenere in modo rappresentativo con studi basati sui consumi alimentari e sulle incidenze di contaminazione.

Da studi recenti, effettuati sulla base di una singola dose di OTA ingerita da un volontario, considerando che la biodisponibilità dell'OTA nella maggior parte degli animali è del 50% e che la Clearance plasmatica (calcolata usando l'inulina come riferimento) di un uomo medio di 70 kg di peso corporeo è 0.99, l'equazione di Klassen diventa (4):

$$K_0 = 0.99 * C_p / 0.5 = 1.97 * C_p$$

con:

Cl_p = Clearance plasmatica, espressa in mL/kg p.c./die

Questa equazione si basa sulla ipotesi che tutta la tossina venga eliminata solamente attraverso i reni.

Nello studio qui presentato si è dunque applicata la equazione di Klassen a tutti i singoli risultati ottenuti dall'analisi. Il confronto per poter valutare se l'esposizione all'OTA della popolazione italiana risultasse o meno preoccupante è stato effettuato paragonando i risultati di assunzione continua ottenuti dalla Klassen con la TDI. Il valore di TDI scelto è quello riportato dallo SCF ed è pari a 5 ng/kg pc/die. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 2.

Tabella 2. Valori medi di assunzione e numero campioni maggiori della TDI fissata dallo SCF

Area geografica	K_0 (ng/kg p.c./die)	N. campioni > TDI (%)
Nord - Verona	2.1	7.0 (14/200)
Centro - Firenze	2.1	5.5 (11/200)
Sud	1.2	3.5 (10/290)
Benevento	1.1	2.5% (5/200)
Lecce	1.5	5.6 (5/90)

Dai risultati riportati in Tabella 2 si può vedere che, benché le medie di assunzione riscontrate per le singole aree geografiche siano tutte sotto la TDI raccomandata, i livelli medi di assunzione sono piuttosto elevati sia al Nord che al Centro del Paese. Inoltre i campioni che superano la TDI (Tabella 2) sono in numero considerevole, con particolare riguardo al Nord; nella città di Verona infatti i campioni risultati maggiori della TDI sono ben 14 su 200, ovvero il 7.0% dei campioni analizzati. Altro dato rilevante è il fatto che i campioni di siero che indicano un'assunzione maggiore della TDI raccomandata spesso la superano anche ampiamente. In riferimento ai dati del Sud possiamo notare che la situazione di Benevento e di Lecce risulta meno a rischio di quella evidenziata al Nord e al Centro.

Nella valutazione dei dati ottenuti bisogna anche tenere presente che il collettivo campionario, oggetto dello studio, non è rappresentativo di tutta la popolazione in quanto si tratta di un campione interamente maschile e costituito da una parte di popolazione particolare, trattandosi di soggetti sani, donatori abituali di sangue.

Un ultimo dato che merita di essere sottolineato è quello dell'esiguo numero di campioni non contaminati, ovvero minori del LOD, ne sono stati riscontrati solo 9 su 690 sieri analizzati, pari all'1.3% del totale dei campioni.

Analisi statistica

Sulla base dei risultati ottenuti dall'analisi dei sieri e dei dati riportati nelle schede compilate dai partecipanti si è voluto effettuare uno studio statistico con lo scopo di individuare eventuali correlazioni esistenti tra il livello di OTA riscontrato nel siero, la provenienza geografica e alcune abitudini alimentari. A tale scopo si è scelto di effettuare un'Analisi Multivariata, che combina l'effetto delle variabili (ad es. altezza, peso, tipo di alimento) e delle modalità (si/no, spesso/raramente/mai) preponderanti del collettivo campionario. È stata condotta l'Analisi delle Corrispondenze Multiple (ACM) con il software SPAD 5.0 (5).

Nella elaborazione sono state scelte come variabili attive per la costruzione degli assi fattoriali quelle corrispondenti al consumo degli alimenti presi in considerazione nel questionario (mangi?; quanto spesso?). Le variabili illustrative sono state la zona geografica e la contaminazione del siero. Inoltre, in seguito alla riorganizzazione dei dati registrati nelle schede compilate dai partecipanti (ad esempio la soppressione della quantificazione in grammi del tipo di alimento consumato, sostituita da modalità quali spesso/mai ecc.) tutte le variabili prese in esame sono di tipo qualitativo ad eccezione dei valori di contaminazione di OTA nei sieri analizzati. Tali dati sono stati quindi trasformati in variabili qualitative definendo tre classi di contaminazione: scarsamente contaminato (<LOD-1,0 µg/L), mediamente contaminato (1,0-3,0 µg/L) e fortemente contaminato (>3 µg/L).

Dell'Analisi delle Corrispondenze Multiple interessante è il prodotto grafico, che permette di rappresentare, su un numero ridotto di piani, le relazioni intercorrenti tra le modalità delle variabili analizzate. Dal punto di vista grafico, il fine è quello di creare dei raggruppamenti di categorie delle variabili utilizzate che abbiano, rispetto ad alcune variabili selezionate, il massimo di somiglianza tra loro e il massimo di diversità tra i gruppi di categorie delle variabili così individuate.

In Figura 1 si riporta il grafico dell'analisi delle corrispondenze multiple sul quale sono marcate tramite i cerchi colorati le correlazioni che si sono potute mettere in evidenza. Dall'analisi del grafico possiamo vedere che la situazione più critica è quella del Nord al quale è associato un livello di OTA fortemente contaminato, corrispondente ad una contaminazione del siero maggiore di 3 µg/L. Tale risultato rappresenta anche una conferma dei risultati messi in evidenza con la valutazione della esposizione. Infatti anche in quel caso si era riscontrata proprio nel Nord la percentuale più rilevante di campioni che eccedevano la TDI, pari al 7,0%. Sempre nel Nord si è riscontrato il valore medio più alto di assunzione media giornaliera, pari a 2,1 ng/kg p.c./die.

Tale valore di assunzione è in verità comune anche al Centro, però è necessario considerare che il campione più contaminato in assoluto è stato uno di quelli del Centro e tale campione può quindi avere pesato in maniera anomala sulla media. Tuttavia non si è voluto considerare tale dato un *outlier* eliminandolo dall'analisi statistica e dalla valutazione della esposizione, perché il soggetto non mostrava particolari ragioni per presentare un livello tanto alto di OTA nel sangue, vale a dire che tale livello non trovava giustificazione né nelle sue abitudini alimentari, né nella sua attività lavorativa.

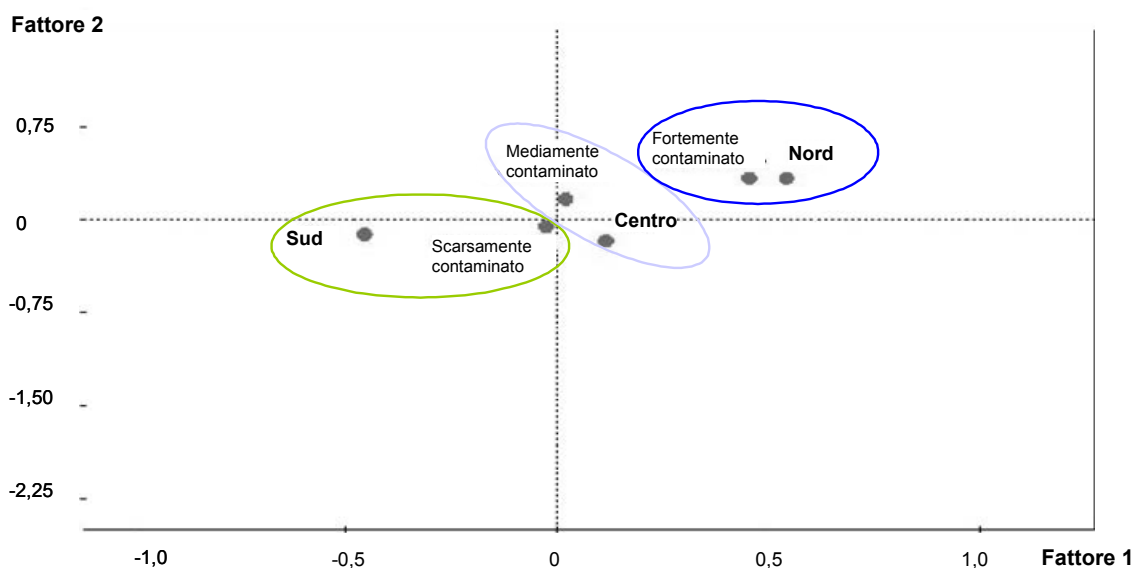


Figura 1. Grafico dell'Analisi delle Corrispondenze Multiple relativo al collettivo campionario preso in esame

I risultati ottenuti nel corso dello studio confermano il fatto che l'ocratossina A è una micotossina che può contaminare diverse tipologie di alimento e che quindi è molto improbabile riuscire a contenere la sua assunzione con la dieta eliminando i cibi passibili di contaminazione. Inoltre la situazione nazionale, in particolare quella del Nord (Verona), induce a pianificare un secondo studio. Sarebbe interessante poter ripetere lo studio nella città di Verona al fine di verificare se i risultati ottenuti saranno confermati, oppure se non si sia trattato di una situazione particolare. Sarebbe inoltre interessante allargare lo studio ad altre regioni e in particolare ad altre province del Nord e del Nord-Est al fine di capire se la situazione di Verona è rappresentativa di tutto il Nord-Est o di tutto il Nord.

Bibliografia

1. Miraglia M, Brera C, Colatosti M. Application of Biomarkers to Assessment of Risk to Human Health from Exposure to Mycotoxins. *Microch. Journ.* 1996; 54:472-477.
2. Micco C, Ambruzzi MA, Miraglia M, Brera C, Onori R, Benelli L. Contamination of human milk by ochratoxin A. *Mycotoxins Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours. IARC Scientific Publications* 1991;115.
3. Breitholtz A, Olsen M, Dahlback A, Hult K. Plasma ochratoxin A levels in three Swedish population surveyed using an ion-pair HPLC technique. *Food Add. Contam.* 1991;8(12):183-192.
4. Stunder-Rohr I, Schlatter J, Dietrich DR, Schlatter C. Intraindividual Variation in Plasma Levels and Kinetic Parameters of Ochratoxin A in Humans. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1995.
5. Fabbris L. *La statistica multivariata*. Milano: McGraw-Hill; 1997.

Seconda sessione
GESTIONE DEL RISCHIO

MICOTOSSINE: UN PROBLEMA PER L'ALIMENTAZIONE DELL'UOMO E DEGLI ANIMALI

Romano Marabelli

Direzione Generale della Sanità Veterinaria e degli Alimenti, Ministero della Salute, Roma

Generalità

Le micotossine sono sostanze tossiche prodotte dal metabolismo di funghi (o muffe) che si sviluppano in particolari condizioni su foraggi insilati, cereali e mangimi aziendali od industriali.

Le muffe del tipo *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* sono le principali produttrici di tossine ritenute dannose per il bestiame. La Tabella 1 che segue individua le principali micotossine e le muffe che le producono.

Tabella 1. Micotossine e relative muffe produttrici

Micotossine	Muffa produttrice
	<i>Aspergillus</i>
Aflatossine	<i>flavus, parasiticus</i>
Ocratossine	<i>ochraceus</i>
	<i>Fusarium</i>
Zearalenone	<i>graminearum</i>
Fumonisine	<i>moniliforme</i>
DON, Tossina T-2	<i>sporotrichoides</i>
	<i>Penicillium</i>
Ocratossine	<i>viridaticum</i>

Principali gruppi di micotossine

I principali gruppi di micotossine, le condizioni ambientali di sviluppo e i substrati di accrescimento

Aflatossine

Le aflatossine sono le micotossine più pericolose per la salute umana e animale. Sono prodotte dalle specie *Aspergillus Flavus* (aflatossine B₁ e B₂) e *A. parasiticus* (aflatossine B₁, B₂, G₁ e G₂), funghi saprofiti che possono svilupparsi sia in campo che in magazzino. La temperatura ottimale di crescita per questi funghi è di circa 25°C (sebbene possano accrescersi a temperature comprese tra 6 e 46°C); il loro sviluppo è, inoltre, favorito da un'umidità relativa dell'aria pari o superiore all'85%. Analogamente, la sintesi e il rilascio di aflatossine possono verificarsi sia nella fase di pre che di post raccolta in condizioni di elevato contenuto di umidità e a temperature relativamente alte.

Le aflatossine possono ritrovarsi in numerosi prodotti alimentari, quali semi oleosi granaglie frutta secca e spezie soprattutto se originari dei paesi tropicali e subtropicali. Il latte e i prodotti lattiero caseari possono contenere aflatossina M₁ cioè il 4-idrossi derivato dell'aflatossina B₁ come conseguenza della conversione metabolica dell'aflatossina B₁ alla quale le vacche da latte sono esposte mediante l'alimentazione con mangimi contaminati.

Ocratossina A

L'ocratossina A è prodotta principalmente da *Aspergillus ochraceus* e da *Penicillium verrucosum*, muffe saprofiti ubiquitarie e agenti di ammuffimento di granaglie, mangimi e alimenti. Per la crescita dei funghi produttori di ocratossine nei cereali sono necessari un contenuto minimo di umidità del 15-16% e temperature di 4-37°C. Le temperature più elevate favoriscono l'attività di *A. ochraceus* che è anche diffuso nelle regioni temperate, mentre le temperature più basse sono favorevoli al *P. verrucosum* che è più diffuso nelle regioni fredde. L'esposizione per l'uomo deriva soprattutto dal consumo di cereali, legumi, caffè e vino anche se in alcune zone del Nord Europa il contributo di alimenti di origine animale, quali carne e sangue di suino, è notevole.

Deossinivalenolo/nivalenolo

Il deossivalenolo e il nivalenolo (appartenenti al gruppo dei tricoteceni) sono tossine largamente distribuite negli alimenti. Si ritrovano soprattutto nei cereali, quali mais orzo e frumento contaminati da alcune specie di *Fusarium* quali *F. graminearum*, *culmorum*, *crookwellense*. Queste specie sono importanti agenti di fusariosi dei cereali che si sviluppano prevalentemente in zone temperate, con condizioni ambientali di elevata umidità relativa e temperature moderate (10-30 °C).

Tossina T-2

La tossina T-2 è un tricotecene con elevata tossicità prodotto principalmente da *Fusarium sporotrichioides*, una specie fungina dotata di debole attitudine parassitaria e che si sviluppa poco nei cereali in campo. A differenza del deossinivalenolo e del nivalenolo questa tossina è molto meno diffusa nelle derrate alimentari e costituisce un problema solo per granaglie umide lasciate in campo in autunno o per le varietà invernali.

Zearalenone

Questa micotossina è prodotta da alcune specie di *Fusarium*, quali *F. graminearum*, *culmorum* e *crookwellense*. Le condizioni ambientali che favoriscono la produzione di zearalenone sono simili a quelle che favoriscono la sintesi di deossinivalenolo, quali elevata umidità relativa dell'aria e temperature comprese tra 10 e 30°C. Per questa ragione lo zearalenone spesso si ritrova negli stessi campioni contaminati da deossinivalenolo, in particolare mais e frumento.

Fumonisine

Le fumonisine costituiscono un gruppo di metaboliti tossici di recente scoperta e caratterizzazione prodotto da funghi del genere *Fusarium*, in particolare da *F. verticilloides* e *proliferatum*. Le fumonisine risultano le micotossine più frequentemente ritrovate nel mais e in alimenti e mangimi a base di mais in ogni parte del mondo. Tra le fumonisine identificate come contaminanti naturali del mais, la fumosina B₁ è la più abbondante seguita dalle fumosine B₂ e B₃.

Aflatossine

Le aflatossine sono micotossine prodotte da *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* in particolari condizioni di umidità e temperatura elevate. Il gruppo delle aflatossine comprende diverse sostanze di varia tossicità a carattere cancerogeno- genotossico, tra cui la più pericolosa è l'aflatossina B₁ classificata dallo IARC come cancerogena.

L'aflatossina B₁ si forma nei mangimi, in particolare nei cereali, nei semi oleosi e semi di cotone, viene introdotta con la dieta nell'organismo animale e qui viene trasformata in aflatossina M₁ che viene eliminata con il latte. L'aflatossina M₁ è quindi un metabolita della B₁ presente nel latte di animali alimentati con alimenti contaminati ed è, seppure meno tossica della B₁, classificata anch'essa come potenzialmente cancerogena.

Le aflatossine sono senza dubbio una tra le più studiate; prodotte da muffe del genere *Aspergillus*, hanno come organo bersaglio il fegato, con effetti carcinogeni e immuno-soppressori. A tutt'oggi sono state studiati 18 differenti tipi d'aflatossine, di cui la B₁ è la più pericolosa per la salute umana, infatti il suo metabolita M₁ si ritrova nel latte e nei suoi derivati. Questo tipo di tossina è molto resistente ai trattamenti termici e la sua concentrazione può variare da 3 a 5 volte rispetto al latte da cui è stato ottenuto il prodotto caseario; per tale motivo il Regolamento n. 1525/98 emanato dalla Commissione Europea fissa come limite massimo accettabile per l'aflatossina M₁ nel latte alimentare 0.05 ppb. (pari a 50 miliardesimi di g/kg di latte).

In Tabella 2 sono descritti i livelli di ingestione tollerabili per il bestiame da carne e da latte. Le aflatossine si sviluppano più facilmente in climi caldo-umidi (T =25-30 °C Umidità = 88-95% aw>0,78).

Tabella 2. Livelli di ingestione tollerabili per bestiame

Concentrazione in razione	Tipo di bestiame	Effetti
> 100 ppb.	Bovini da ingrasso	Livello Tossico
300/400 ppb.	Vacche da latte adulte	Nessun effetto visibile
600/800 ppb.		Ridotta prod. latte
2400/3100 ppb.		Ridotto consumo cibo e prod. latte
600/800 ppb.	Manze	Ridotti consumi e casi di morte
150/200 ppb.	Vitelli/e	Ridotti consumi e lesioni epatiche
450/600 ppb.		Morte

Effetti sulla salute dell'uomo e degli animali

Le micotossine posseggono azione cancerogena, mutagena e teratogena sulla salute umana, come risulta dalla Tabella seguente:

Tabella 3. Principali effetti delle micotossine

Micotossina	Effetto
Aflatossina B1	Cancerogeno, epatotossico, immunosoppressore
Ocratossina A	Nefrotossico, teratogeno, immunosoppressore, cancerogeno
Fumonisin B1	Neurotossico, cancerogeno, citotossico
Tricoteceni	Immunosoppressore, dermatotossico, emorragico
Zearalenone	Estrogenosimile
Ergotina	Neurotossico

Tra gli alimenti d'origine animale, e quindi d'interesse per l'alimentazione umana, il latte e i suoi derivati sono i prodotti più frequentemente contaminati dalla presenza di micotossine, a causa del trasferimento di questi metaboliti dai mangimi contaminati di cui si nutrono le bovine.

I bovini sono in grado di operare una bioconversione ruminale delle micotossine in prodotti meno dannosi, tuttavia sono comunque suscettibili all'azione nociva di queste sostanze, cosa intuibile da alcuni sintomi di tipo generale o specifico.

L'ingestione di sostanza secca può aumentare o diminuire in modo incoerente con la produzione della bovina; in genere se c'è calo d'assunzione si può pensare ad una presenza d'aflatossine, mentre aumenti d'ingestione stanno ad indicare presenza di DON o zearalenone. Si verificano facilmente disordini digestivi, come diarrea (anche emorragica), mancanza d'appetito e rifiuto del cibo, stasi ruminale, chetosi, dislocazione dell'abomaso, anomale quantità di muco nelle feci.

Un'alta incidenza d'aborti, riassorbimento embrionale, ridotto grado di fertilità e concepimento sono indice di presenza di micotossine, così come vulva e capezzoli ingrossati, prolapsi rettali o vaginali, manifestazioni estrali in animali gravidi, calori silenti ecc..

Le forti lattifere sono particolarmente sensibili alla presenza di tossine, cosa evidenziata anche dall'immediato calo produttivo e dall'aspetto arruffato del pelame.

La seguente Tabella riassume gli effetti delle micotossine sulla salute degli animali e gli alimenti in cui vengono più facilmente individuate.

Tabella 4. Effetti delle micotossine e alimenti maggiormente contaminati

Micotossina	Effetto	Alimenti
Aflatossine B1, B2, G1, G2	Epatiti, nefriti, carcinogenesi, immunosoppressione, calo prod. latte	Arachidi, semi oleosi, mais, cereali
M1, M2	Metaboliti di B1 e B2	Latte e derivati
Zearalenone	Attività estrogenica, ipofertilità, aborti	Mais, altri cereali
DON	Calo produzione latte	Mais, orzo, altri cereali
Tossina T-2	Emorragie	
Fumonisin	Epatopatie	
Ocratossine	Epatiti, nefriti, aborti	Mais, orzo, altri cereali

Linee direttrici per il controllo delle aflatossine nei mangimi e nel latte

La scrivente Direzione Generale ha indetto, con telefax n.609/24.64/2253 del 18 novembre 2003, una riunione con le Regioni e Province Autonome, Istituti Zooprofilattici Sperimentali e Istituto Superiore di Sanità, che si è tenuta presso la scrivente.

Il giorno 21 novembre 2003 presso la Direzione Generale Sanità Veterinaria e Alimenti si è tenuta una riunione con i rappresentanti delle Regioni e Province Autonome, degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali e dell'Istituto Superiore di Sanità, nell'ambito della quale sono state esaminate le problematiche relative alla gestione del rischio legato alle aflatossine nei mangimi e nel latte e sono state concordate alcune modalità operative per una corretta applicazione dei controlli e monitoraggio a livello territoriale, in particolar modo per le Regioni che al momento, non hanno comunicato l'adozione di iniziative per il controllo delle aflatossine M_1 nel latte.

1. *Controllo delle aflatossine B_1 nei mangimi.*

Analogamente a quanto previsto nel Piano nazionale Residui per l'anno 2003 con cui sono stati incrementati i controlli dell'aflatossina B_1 nei mangimi destinati alle bovine da latte, il Piano nazionale alimentazione animale ha previsto un incremento dei controlli nei mangimi per gli animali legato alla consistenza produttiva regionale per poter avere un quadro esaustivo sull'effettiva contaminazione da micotossine negli alimenti per animali, ancorché la presenza delle aflatossine (e in generale delle micotossine) è strettamente legata anche ad eventi naturali di tipo straordinari.

Nel suddetto piano sono stati presi in considerazione oltre che le norme di riferimento, anche le modalità di campionamento (per le aflatossine prelievo di campioni ufficiali), le metodiche di analisi e i provvedimenti da adottare in caso di irregolarità dei campioni.

Alla luce degli eventi che hanno comportato , proprio in questo periodo, un aumento delle aflatossina M_1 nel latte, si ritiene che i campioni previsti nel P.N.A.A. anno 2003 debbano essere riconsiderati proprio in virtù delle specifiche situazioni venutasi a creare in alcune Regioni del Paese in relazione alla capacità produttiva delle materie prime oggetto della contaminazione di aflatossine B_1 nei mangimi.

Per quanto riguarda i mangimifici, la normativa vigente prevede l'obbligo di effettuare l'autocontrollo; in questo ambito andranno previste analisi per ricerca di micotossine per tutti i lotti di granella, di farina di mais e degli altri prodotti derivati del mais e inoltre campionamenti anche su altri cereali/materie prime per mangimi per meglio conoscere lo stato di contaminazione da aflatossine.

Il controllo ufficiale verificherà gli esiti delle analisi effettuate in autocontrollo e procederà a campionamenti ufficiali specifici sui prodotti e, prioritariamente, sui mangimi destinati alle bovine da latte, secondo le modalità indicate dal PNAA.

I competenti Servizi veterinari, nel riesaminare le strategie di campionamento dei mangimi devono inoltre tenere conto, non solo della capacità produttiva (parametro quantitativo) intrinseca delle materie prime , ma devono considerare gli aspetti connessi con la provenienza dei mangimi negli allevamenti da altre regioni.

2. *Controllo delle aflatossine nella filiera del latte e prodotti a base di latte.*

Per quanto riguarda il controllo delle aflatossine nella filiera del latte e prodotti a base di latte, occorre prendere in considerazione le diverse realtà:

Aziende di produzione: In merito alla possibile contaminazione da aflatossina B_1 della granella di mais, dei derivati e del mais e suoi derivati attualmente in uso negli allevamenti, legata alle particolari condizioni atmosferiche verificatesi nella scorsa estate, e considerato che l'utilizzo dei suddetti mangimi contaminati può provocare la contaminazione di aflatossina M_1 del latte a livelli superiori ai limiti previsti dalla normativa comunitaria, si ritiene opportuno che i servizi veterinari sensibilizzino gli allevatori che non attuano un vero e proprio piano di autocontrollo aziendale, affinché venga sospesa a scopo cautelativo la somministrazione alle bovine da latte di granella di mais, di mangimi contenenti granella di mais o di altri derivati del mais. Tale cautela

potrà essere evitata qualora siano state effettuate analisi, in autocontrollo, sui mangimi di cui sopra che escludano la contaminazione da aflatossine.

- **Latte crudo.** Nei centri di raccolta, negli stabilimenti che trattano latte e in quelli che producono prodotti a base di latte, deve essere richiesto, da parte dei Servizi veterinari delle ASL, un aggiornamento dei protocolli di autocontrollo secondo quanto previsto dall'art. 13 del D.P.R n. 54/97, in cui sia prevista una sezione specifica per il controllo delle aflatossine con l'indicazione della periodicità, del metodo d'analisi e del sistema di rintracciabilità dei singoli conferenti. I veterinari ufficiali degli stabilimenti di trattamento/trasformazione dovranno verificare la presenza, l'attuazione e l'efficacia delle procedure di autocontrollo, prescrivendo, se considerato insufficiente, un incremento dell'attività analitica e provvedere ad eseguire eventualmente campioni ufficiali. L'autocontrollo deve anche fornire garanzie sul principio che i formaggi siano stati prodotti a partire da latte di partenza con tenore di aflatossine inferiori ai 50 ppt. In caso di campionamento ufficiale, il riscontro del superamento dei limiti di legge, comporta sequestro e distruzione. In base a quanto sopra detto ogni regione disciplinerà le procedure per gli accertamenti in azienda di produzione (stalla) nel caso di accertamento di non conformità nel latte di massa dello stabilimento di trattamento o di produzione di prodotti a base di latte. Su richiesta del titolare, il latte oggetto di vincolo sanitario, può essere avviato al trattamento/trasformazione, ma non alla commercializzazione prima del risultato dei controlli.
- **Prodotti a base di latte.** Come già chiarito con nota n.609/24.64/2245 del 14 novembre 2003, con la quale la scrivente Direzione ha emanato un parere dell'ISS relativo ai valori limiti di aflatossina M₁ nei prodotti a base di latte e in attesa di una definizione specifica del livello massimo tollerabile in tali prodotti, per i prodotti a base di latte si deve tenere conto del mero fattore di concentrazione, considerando che tutte le aflatossine presenti nel latte utilizzato siano trasferite e concentrate nel prodotto stesso (contenuto di aflatossine nel formaggio/fattore di concentrazione per quel tipo di prodotto). Per considerare il fattore di concentrazione si dovrà tenere conto dei dati presenti in autocontrollo (latte utilizzato, prodotto ottenuto) e di quanto riportato all'Allegato 2 del D.M. 31 luglio 2003 del Ministero delle Politiche agricole e forestali.
- **Distribuzione.** Si richiama, infine, l'attenzione di codesti Assessorati ad intensificare, qualora ritenuto necessario, secondo procedure stabilite dagli stessi, i controlli nei punti vendita al minuto sul latte fresco e derivati.

3. *Destino del latte contaminato.*

In relazione al destino del latte crudo, trattato e dei prodotti a base di latte non conformi nonché i formaggi prodotti a partire da latte crudo e il latte fresco o prodotti freschi a base di latte o composti di latte, oggetto di sequestro in seguito a positività ai controlli ufficiali, o ritirati dal mercato in base alle procedure di autocontrollo aziendale e risultati con limiti di contaminazione superiore alla norma, sono da considerarsi sottoprodotti di categoria 1 ai sensi dell'art. 4 comma 1., lettera c) del Regolamento n. 1774/2002 e pertanto devono essere distrutti.

Il latte e colostro prodotti in azienda, se eliminati od utilizzati nell'azienda di origine, non rientrano nel campo di applicazione del Regolamento n. 1774/2002/CE.

La scrivente Direzione ha richiesto, tuttavia, alla Commissione U.E. un parere circa la possibilità di utilizzo, ai sensi dell'art.32 del Regolamento n. 1774/2002, negli impianti di biogas, negli impianti di depurazione o per l'eventuale utilizzo, con opportune procedure di controllo, in alimentazione animale.

4. Metodiche analitiche.

Un altro aspetto che occorre chiarire è quello relativo alle metodiche analitiche da utilizzarsi, a tale proposito si rappresenta che nei Piani di monitoraggio predisposti a livello regionale i tests di screening sono indispensabili per monitorare la situazione in modo da consentire la valutazione e la gestione del rischio in maniera efficace, in questo caso, qualora venissero utilizzati i Test ELISA, questi dovranno essere di tipo quantitativo o semiquantitativo. In presenza di campioni ufficiali e, laddove ci si trovi in presenza di campionamenti che hanno comportato il sequestro della partita, è necessario eseguire una ricerca dell'aflatossina M₁ con metodica HPLC per la conferma dei risultati ottenuti con lo screening.

Il Laboratorio Nazionale di Riferimento per i Residui (presso l'ISS), predisporrà RING-TEST periodici per gli II.ZZ.SS.

5. Informazione.

Fermo restando gli obblighi previsti dalla normativa comunitaria e nazionale relativi al Sistema di Allerta, le Regioni e Province autonome dovranno inviare alla scrivente Direzione una relazione con i dati dei controlli effettuati e dei provvedimenti eventualmente adottati, entro il 28 febbraio 2004.

Normativa di riferimento

- Direttiva 100/2003 relativa alle sostanze indesiderabili negli alimenti.
- Regolamento CE 466/2001 della Commissione dell'8 marzo 2001 che definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari.

In particolare tale Regolamento stabilisce, per il latte, un contenuto massimo ammesso di M₁ di 0,05 microgrammi/kg

- Decreto Ministeriale 23 dicembre 2000 , GURI 9 febbraio 2001 n.33, recepimento della Direttiva 98/53/CE della Commissione che fissa i metodi per il prelievo dei campioni e i metodi d'analisi per il controllo ufficiale dei tenori massimi di taluni contaminanti nei prodotti alimentari.
- Decreto Ministeriale 31 luglio 2003. Modalità di attuazione della Legge 30 maggio, n.119, concernente il prelievo supplementare nel settore del latte e dei prodotti lattiero-caseari.
- Legge 30 maggio 2003 n. 119. Conversione in legge, con modificazioni, del D.L. 28 marzo 2003, n. 49, recante riforma della normativa in tema di applicazione del prelievo supplementare nel settore del latte e dei prodotti lattiero-caseari.
- Circolare 9 giugno 1999, n.10 ,GURI 11 giugno 1999 n.135 , direttiva in materia di controllo ufficiale sui prodotti alimentari: valori massimi ammissibili di micotossine nelle derrate alimentari. Tale circolare , ha indicato negli alimenti per l'infanzia, quindi nel prodotto finito, il valore massimo ammissibile di M₁ di 0,01 microgrammi/kg.
- D.P.R 14 gennaio 1997, n.54, GURI 12 marzo 1997 n. 59, Regolamento recante attuazione delle Direttive 92/46 e 92/47/CEE, in materia di produzione e immissione sul mercato di latte e prodotti a base di latte.
- Regolamento CE 1774/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio del 3 ottobre 2002 recante norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale non destinati al consumo umano.

Il giorno 08/07/04 si è tenuta a Bruxelles , presso la Commissione la riunione -Comitato Esperti"contaminanti Agricoli"-concernente quanto in oggetto indicato.

Tra i documenti esaminati il Documento SANCO/006/2004-rev. 5 che ha lo scopo di definire i limiti massimi di alcuni contaminanti agricoli : DON, ZEA, Fusariotossine negli alimenti per uso umano , è stato oggetto di una lunga discussione.

Questa riunione è stata preceduta da un'altra riunione – Gruppo Esperti di Laboratorio-tenutasi il giorno 7 luglio 2004 , alla quale ha partecipato per l'Italia il dr. C.Brera dell'I.S.S., in seno alla quale sono stati valutati tutti gli aspetti relativi al metodo di campionamento e ai relativi metodi di laboratorio.

Documenti esaminati:

-documento SANCO/006/2004-rev. 5

-documento SANCO/023/2004- rev. 1

-documento SANCO/0094/2003 rev.5

1. Documento SANCO/006/2004-rev. 5 (bozza di Regolamento della Commissione che modifica il regolamento n. 466/2001 per le *Fusarium – toxin*) è stato oggetto di una lunga discussione tra Commissione e gli SS.MM. per poter trovare un accordo di massima per la fissazione dei limiti max , per il Deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEA), fumonisinis e T-2 e HT-2 toxin.

ALLEGATO (limiti max)

▪ DON: il Presidente della Commissione in apertura ha fatto sapere di aver ricevuto delle note ufficiali dalle Associazioni di Categoria: la COPA- COGECA sostiene che i limiti fissati nella Tabella “2.4” possono essere rispettati anche se il limite al punto 1. (cereali non lavorati diversi dal grano duro , orzo e mais) venisse elevato a 1500 µg /kg.

La Francia , l'Italia e la Grecia sostengono che il limite possa essere elevato a 1500 µg /kg , altre delegazioni pur condividendo le considerazioni dell'Italia e della Francia non sono propense ad elevare tali limiti , mentre la maggioranza delle delegazioni non sono d'accordo a mantenere i limiti previsti nella Tabella e chiedono di abbassare i limiti ai punti 1e 2. rispettivamente a: 1000 µg /kg e a 1500 µg /kg, così come veniva indicato nella proposta iniziale della Commissione; la Germania addirittura vorrebbe limiti inferiori per i punti 4 e 5 rispettivamente a: 500 (anziché 750) e 350 (anziché 500).

Molto si è discusso sulla terminologia : Trasformato e non trasformato. La Commissione ha ribadito che non intende modificare quanto previsto nel documento.

In merito alla data di applicazione inoltre è stato chiesto da alcune delegazioni , tra cui l'Italia , di posticipare di un anno l'entrata in vigore e cioè , luglio 2006 (il Presidente prevede che non si faccia in tempo a presentare il documento al Comitato di Settembre ma a quello successivo , con voto finale a Dicembre/Gennaio 2005 e pubblicazione gennaio/febbraio 2005 , se tutto va bene)

▪ ZEA: per lo ZEA non verranno abbassati i limiti come chiesto dal Belgio e pertanto saranno confermati i limiti indicati nella Tabella “2.5”.

▪ FUMONISINE: L'Italia ha sostenuto che il limite di 1000 µg /kg di cui al punto 2 della Tabella “2.6” possa essere elevato a 2000 µg /kg , mentre al punto 1 per il mais non lavorato è possibile prevedere un limite max. di 3500 µg /kg invece di 1750µg/kg.

Tale richiesta è stata supportata dal fatto che una serie di analisi effettuate nel territorio nazionale da “Laboratori Ufficiali” (Università di Torino, I.Z.Sperimentale di Legnaro (PD) I.S. Cerealicolo di Bergamo, Facoltà di Agraria Università Cattolica Sacro Cuore) che hanno messo in luce grosse difficoltà a far rientrare nei limiti fissati dalla CE , almeno nell'immediato futuro, un'alta percentuale della produzione nazionale e anche dei prodotti importati. Inoltre anche L'Istituto Superiore di Sanità , ufficialmente chiamato a fornire un parere in merito a tale problematica, ha considerato che “tali livelli possono essere considerati sufficientemente cautelativi per la tutela della salute umana “.

L'innalzamento dei limiti nelle due categorie di prodotti in discussione non comporterebbe automaticamente l'innalzamento dei limiti nelle altre categorie considerate nel documento in esame. È stato fatto notare come il problema dei limiti nei prodotti per l'alimentazione umana sia direttamente correlato con l'alimentazione per gli animali, visto che i prodotti considerati non idonei per il consumo umano verrebbero destinati all'alimentazione animale. (difficile stabilire limiti "bassi" per i mangimi).

Nessuna delegazione presente ha appoggiato la proposta Italiana e il Presidente ha riferito che presenterà il documento senza alcuna modifica al prossimo Comitato Permanente di metà settembre.

2. Documento SANCO /023/2004- rev 1

In merito a questo documento sono stati presi in considerazione gli allegati :

ALLEGATO I : metodi di campionamento per i controlli ufficiali del livello delle Fusario-tossine in alcuni prodotti alimentari.

-la Commissione ha riferito che prima di discutere in modo più approfondito l'allegato si dovranno verificare le disposizioni contenute nelle altre normative CE, afferenti al controllo degli alimenti, per confrontare se dette norme sono compatibili con il testo dell'allegato.

Comunque durante la discussione sono emerse alcune problematiche relative al fatto che i metodi di campionamento in alcuni P.M sono differenti (vedi SP).

L'IR. chiede che siano meglio specificati i dettagli operativi per i campionamenti sul frumento per la ricerca del DON. Invieranno al più presto un documento pertinente alla Commissione.

ALLEGATO II: preparazione del campione e criteri per i metodi di analisi usati nei controlli ufficiali per i livelli delle Tossine-*Fusarium*.

La delegazione della Germania chiede che il test per le aflatossine, per i prodotti della prima infanzia, venga effettuato prima della omogeneizzazione (con acqua). A tal proposito la Commissione risponde che non ci sono metodi standardizzati e che si augura che ciò avvenga prima del 2006.

3. Documento SANCO/009/2003-5: bozza di documento per le autorità competenti per la conformità con la legislazione UE sulle aflatossine.

Trattasi di un documento molto articolato che si propone di fornire delle linee-guida in merito alla applicazione , in ambito dell'UE, in modo uniforme della normativa comunitaria afferente alle aflatossine.

La Commissione ha chiesto agli SS.MM. di ricevere eventuali suggerimenti o osservazioni al più presto , e comunque prima del l'inizio del mese di settembre. Per quel periodo è previsto un Comitato Esperti, nel frattempo perverranno i commenti da parte dell'OMC. Successivamente a metà settembre il documento sarà sottoposto al CVP.

Stante l'importanza del contenuto del suddetto documento (ALLEGATO I) si ritiene opportuno che gli Uffici III , e IX che legge per conoscenza , facciano pervenire, ogni uno per la parte di propria competenza, eventuali osservazioni in tempo utile al fine di poterle comunicare in tempo alla Commissione.

Effetto della lavorazione industriale sulla distribuzione della fumosina B₁ nelle frazioni di grano derivanti dalla macinatura a secco

ISS – laboratorio alimenti, reparto chimica dei cereali
7 maggio 2003

Lo scopo del presente studio consisteva nell'investigare la distribuzione della fumosina B₁ in varie frazioni della macinatura del grano lavorate da un impianto industriale. Sono stati sottoposti a campionamento i chicchi di grano e sei frazioni della macinatura derivate (germe, crusca, granelle grandi e piccole, farina per l'alimentazione degli animali e farina). Inoltre, al fine di valutare l'effetto della cottura, sono stati preparati campioni di polenta a partire da farina naturalmente contaminata ottenuta del ciclo di lavorazione industriale. L'impianto industriale lavorava di continuo ad un ritmo di 60 tonnellate al giorno. Due sottolotti di 5 tonnellate ciascuno sono state esaminate con campioni di prodotti derivati prelevati a intervalli di tempo regolari. A causa di una tale distribuzione eterogenea di fumosina B₁ con altre micotossine, come l'alfatossina, lo schema di campionamento è stato derivato dalla Direttiva EU 98/53 per le aflatossine. Entrambi i lotti di chicchi hanno mostrato una contaminazione da fumosina di 4.54 e 5.09 mg/kg rispettivamente. Le germe, la crusca e la farina per l'alimentazione animale hanno mostrato livelli di contaminazione, specificatamente di 8.92 mg/kg (lotto 1) e 9.56 mg/kg (lotto 2), 7.08 mg/kg (lotto 1) e 8.08 mg/kg (lotto 2), e 9.36 mg/kg (lotto 1) e 6.86 mg/kg (lotto 2), più elevati rispetto alle granelle grandi e piccole e alla farina (.039 mg/kg – lotto 1 e 0.42 mg/kg – lotto 2, 0.60 mg/kg – lotto 1 e 1.01 mg/kg – lotto 2, e 0.40 mg/kg – lotto 1 e 0.45 mg/kg – lotto 2, rispettivamente). Questi risultati sembrano spiegare sia la produzione industriale dei prodotti derivati e la distribuzione della contaminazione da fumosina in un chicco. La cottura della polenta in una pentola a pressione di uso domestico non ha influenzato la contaminazione da fumosina perché le concentrazioni di micotossina erano simile a quelle della farina di partenza (0.40 e 0-45 mg/kg).

RUOLO DELLE FASI FENOLOGICHE SULLA SINTESI DI MICOTOSSINE IN MAIS

Paola Battilani, Vittorio Rossi, Andrea Scandolaro, Paola Giorni, Terenzio Bertuzzi, Silvia Formenti, Amedeo

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

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

Introduzione

La presenza di fumonisine nella granella di mais è un problema rilevante in tutte le zone maidicole italiane (1-3). I fattori che regolano la sintesi di queste micotossine sono stati studiati *in vitro*, utilizzando farina o cariossidi mature, in particolare per quanto concerne la temperatura e l'acqua libera (4, 5). È però noto che la sintesi di fumonisine inizia in planta, durante la maturazione delle cariossidi. Di norma, queste tossine vengono rilevate a partire da 30 giorni dopo l'impollinazione, quindi dalla maturazione cerosa, mentre nelle fasi precedenti esse risultano assenti o presenti al di sotto dei limiti di determinazione (6). Le infezioni fungine, con particolare riferimento a *Fusarium verticillioides*, possono al contrario instaurarsi a partire dalla emissione delle setole, pur trovando condizioni ottimali per l'infezione con il loro invecchiamento. Una delle possibili spiegazioni per l'assenza di fumonisine nelle prime fasi di sviluppo della spiga, pur in presenza di colonizzazione fungina delle cariossidi, legata al riferimento alla composizione chimica delle cariossidi stesse. Al fine di indagare questo aspetto, sono state eseguite prove *in vitro* utilizzando terreni colturali a base di farina ottenuta dalla macinazione delle spighe raccolte in diverse fasi fenologiche, dall'emissione delle setole fino alla maturazione fisiologica del mais.

L'obiettivo della prova è stato quello di studiare il ruolo della temperatura e della fase fenologica del mais sulla crescita di *F. verticillioides* e *A. flavus* e sulla sintesi di micotossine.

Materiali e metodi

Sono stati preparati terreni di crescita con spighe di mais (Maize Meal Agar), ibrido ---, prelevate a differenti giorni dopo l'impollinazione (Days After Pollination). Per poter determinare con certezza la data dell'impollinazione e, nel contempo, impedire le infezioni fungine naturali, le spighe sono state mantenute coperte con sacchetti di carta dal momento della loro emissione e sono state impollinate manualmente, tutte alla stessa data. Tutti i terreni presentavano valori di acqua libera pari a 0,99. I funghi di solati micotossigeni dei due funghi sono state inoculate al centro di piastre Petri contenenti i vari substrati di crescita; le piastre sono state quindi incubate a 30°C per 14 giorni. Al termine di tale periodo è stata misurata la crescita fungina; in particolare, sono stati misurati 2 diametri delle colonie, perpendicolari fra loro e passanti per il punto di inoculo. Da ogni piastra sono stati prelevati, lungo il raggio della colonia, tre tasselli di 0,46 cm di diametro, i quali sono stati posti in provetta con 1 mL di metanolo; la soluzione è stata poi utilizzata per la quantificazione della presenza di fumonisinina B₁ (FB₁) e aflatossina, B₁ (AFB₁) con la tecnica HPLC (7). Inoltre, utilizzando cariossidi raccolte in corrispondenza della maturazione fisiologica, è stato valutato il

ruolo della temperatura sia sulla crescita ifale che sulla sintesi di micotossine, nell'intervallo 5-40°C.

Risultati

I risultati hanno evidenziato che la fase fenologica dell'ospite non svolge alcun ruolo sullo sviluppo miceliare dei due funghi, ma ha un effetto significativo sulla sintesi delle micotossine. *F. verticillioides* non ha prodotto FB₁ sui terreni ottenuti da spighe prelevate prima del raggiungimento della maturazione lattea, ha avuto un picco di produzione nei terreni preparati con spighe ad inizio maturazione cerosa, e ha mostrato una riduzione con il procedere della maturazione delle spighe.

Per quanto concerne la crescita miceliare, *F. verticillioides* è risultato attivo già a 5°C; con l'aumentare della temperatura sono stati osservati incrementi del tasso di crescita fino al raggiungimento di un valore massimo attorno a 25°C. Per valori superiori a 35°C la temperatura ha inibito la crescita delle colonie. Questa dinamica di crescita è stata descritta in modo accurato da una curva di Analytis. *F. verticillioides* ha iniziato la sintesi di FB₁ a partire da 15°C; il tasso massimo di produzione si è registrato a 25°C con 50 µg/kg per giorno. Per valori di temperatura superiori, il tasso di produzione di FB₁ è diminuito fino ad annullarsi a 35°C.

A. flavus ha mostrato un picco di produzione di AFB₁ sul substrato ottenuto con le cariossidi a fine della maturazione lattea, mentre nelle fasi precedenti e in quelle successive sono stati rilevati valori molto più bassi. Nel substrato ottenuto con le cariossidi a maturazione fisiologica l'AFB₁ è stata prodotta a tutte le temperature, con un optimum a 25°C.

Conclusioni

Il tasso di accumulo di FB₁ e AFB₁ è significativamente influenzato dalla fase fenologica del mais. In accordo con i dati di campo, la FB₁ non viene sintetizzata prima di 15 giorni dall'impollinazione. Al contrario, la sintesi di AFB₁ sembra possibile in tutte le fasi fenologiche, anche se in campo viene generalmente rilevata solo vicino alla maturazione fisiologica. La temperatura ottimale per la sintesi di entrambe le tossine sembra essere di 25°C.

Ulteriori approfondimenti saranno necessari per confermare questi risultati e per definire relazioni quantitative tra i parametri considerati e le tossine.

Bibliografia

1. Logrieco A. Aspetti della contaminazione da funghi tossigeni e micotossine nelle derrate alimentari. *Informatore fitopatologico* 2001;51(6):55-57
2. Orsi RB, Correa B, Possi CR, Schammas EA, Nogueira JR, Dias SMC, Malozzi MAB. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. *Journal of stored Products Research* 2000;36:75-87
3. Doko MB, Rapior S, Visconti A, Schjoth JE. Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1995; 43:429-434

4. Cahagnier B, Melchion D, Richard-Molard D. Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B₁ on maize grain as a function of different water activities. *Letters in Applied Microbiology* 1995;20(4):247-251
5. Marin S, Sanchis V, Magan N. Water activity, temperature, and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* isolates from maize. *Canadian Journal of Microbiology* 1995;41:1063-1070
6. Warfield CY, Gilchrist DG. Influence of kernel age on fumonisin B₁ production in maize by *Fusarium moniliforme*, *Applied and environmental microbiology* 1999;65(7):2853-2856
7. Pietri A, Bertuzzi T, Pallaroni L, Piva G. Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in Northern Italy. *Food Additives and Contaminants* 2004;21:479-487

VALUTAZIONE DI GENOTIPI DI MAIS PER LA RESISTENZA A *FUSARIUM VERTICILLIOIDES*

Carlotta Balconi, Chiara Lanzanova, Elena Conti, Luca Gualdi, Vincenza Pisacane, Paolo ValotiNicola Berardo, Mario Motto, Elisabetta Lupotto
Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Bergamo

La costituzione di piante capaci di sottrarsi, in tutto o in parte, ai danni provocati da patogeni fungini, è un obiettivo tradizionale dei genetisti. Le piante di mais sono attaccate da diversi patogeni che danneggiano quantitativamente e qualitativamente le produzioni.

I marciumi della radice, dello stocco, della spiga e della granella causate da *Fusarium verticillioides*, sono la principale fonte di perdita produttiva della coltura di mais; tali perdite oscillano dal 10-20% in ibridi suscettibili, al 25-30% in aree dove il patogeno è particolarmente virulento, fino al 50% in aree localizzate dove l'infezione è estesa (1).

Il danno della resa produttiva è ascrivibile prevalentemente a spighe incomplete o a spighe con minor peso medio del seme; la causa del calo produttivo può derivare anche da perdite di raccolto dovute alla rottura o all'allettamento delle piante colpite dal marciume della radice e/o dello stocco.

Lo sviluppo dei marciumi è favorito da situazioni ambientali, con temperature elevate all'inizio della stagione e situazioni di stress a fine maturazione. I primi sintomi del marciume della spiga e delle cariossidi, causato da *F. verticillioides*, consistono nella comparsa di una colorazione variabile da rosa-salmone a bruno-rossastra visibile sul pericarpo delle singole cariossidi o su gruppi di cariossidi della spiga unitamente allo sviluppo di una muffa quasi bianca con tenui sfumature rosa (2). Col progredire della malattia, si sviluppa sulle cariossidi infette una muffa polverulenta o cotonosa di color rosa; l'intensità del colore è di norma indicativa di un diverso grado di infezione da *Fusarium*. Per le cariossidi infettate tardivamente si riscontrano striature biancastre sul pericarpo (2).

La patologia fungina causata da *Fusarium* spesso si innesca su tessuti che hanno subito danneggiamenti causati da stress ambientali (siccità, grandine) o da attacco da insetti (ad es. *Ostrinia nubilalis*), riducendo sia le rese produttive sia il valore alimentare. Infatti, *F. verticillioides* è in grado di produrre micotossine (fumonisine) nelle piante infette prima della raccolta, o nella granella conservata (3, 4, 5). La presenza di micotossine nei cereali ha influenze sfavorevoli dal punto di vista della salubrità degli alimenti; la loro presenza nei foraggi e negli alimenti da essi derivati è spesso associata a micotossicosi croniche o acute nel bestiame e anche negli uomini (6, 7).

La disponibilità di metodi affidabili di valutazione di genotipi di mais per accertare la tolleranza all'attacco di *Fusarium* è, quindi, un supporto di primaria importanza per lo sviluppo di programmi di miglioramento atti a potenziare la resistenza delle piante all'attacco di patogeni fungini.

In questo contesto, lo sviluppo di genotipi di mais con maggior resistenza a *F. verticillioides*, mediante interventi di miglioramento genetico tradizionale e l'applicazione di biotecnologie, si riflette positivamente sia sulla produttività della pianta che sulla qualità alimentare.

Lo scopo di questa ricerca è diretto a mettere a punto un metodo di indagine atto a valutare la resistenza di genotipi di mais all'attacco di tale patogeno fungino. A tale scopo, sono state impiegate come materiale sperimentale due linee di riferimento W64A e A69Y, in versione normale (*wild-type*, *wt*) e in versione *opaco-2* (*o2*), in aggiunta a sei linee pure di mais rilasciate dall'Istituto per la Cerealicoltura, Sezione di Bergamo (Lo904, Lo1010, Lo1096, Lo1067,

Lo1095, Lo1124) (8). Lo schema sperimentale ha previsto la semina di ciascun genotipo in parcelle elementari costituite da 10 piante con 12 repliche.

I diversi genotipi sono stati saggiati tramite inoculo artificiale di *F. verticillioides* (Saggio di Inoculo nel Canale delle Sete, SCIA-*Silk Channel Inoculation Assay*) (9). Il ceppo di *F. verticillioides* (MRC826 fornito da PRI-Wageningen), è stato allevato su PDA in piastra, a 26°C, fino al raggiungimento della copertura della superficie della piastra da parte del micelio; tale micelio è stato utilizzato per la produzione di un inoculo fresco di spore.

Per ciascun genotipo è stata effettuata la valutazione delle seguenti variabili previste dal metodo SCIA: i) due concentrazioni differenti di spore ii) due tempi di inoculo ; iii) lunghezza del canale delle sete al momento della fioritura. Per ciascuna condizione sperimentale saggiata per ciascun genotipo, sono stati rilevati i dati di 10 repliche. Le piante sono state impollinate mediante fecondazione controllata; l'applicazione di SCIA è stata condotta a due diversi stadi di sviluppo del seme: a 3 e a 6 giorni dopo l'impollinazione (DAP, *Days After Pollination*). Per l'inoculo sono state utilizzate due concentrazioni differenti di spore (10⁵ and 5x10⁵ /mL); i controlli sono rappresentati da piante non inoculate e da piante inoculate con acqua sterile. L'inoculo è stato effettuato mediante iniezione (2mL) nel canale delle sete di ciascuna spiga primaria, come riportato da Reid *et al.* (9). Le spighe sono state raccolte manualmente; la rimozione delle brattee è avvenuta al momento della valutazione delle spighe. La severità dei sintomi di marciume della spiga è stata valutata assegnando un punteggio riferito ad una scala visiva di valutazione basata sulla percentuale di semi con sintomi visibili dell'infezione, marciume e crescita di micelio (9). Tale scala consiste di 7 classi distinte in base alla percentuale di semi per spiga con infezione visibile: Disease Severity Rating-(DSR)-: DSR:1=0%-no infezione; DSR:2=1-3%; DSR:3=4-10%; DSR:4=11-25%; DSR:5=26-50%; DSR:6=51-75%; DSR:7=76-100%).

I punteggi assegnati alle singole spighe, impiegando la scala di valutazione descritta in precedenza, hanno consentito di discriminare i sei genotipi valutati per la resistenza a *Fusarium*. Lo stadio di sviluppo del seme al momento dell'inoculo, è risultato un importante parametro di riferimento: in tutti i genotipi sotto studio, l'inoculo è risultato più efficace se effettuato a 3DAP. A questo stadio le sete, benché appaiano allungate, sono ancora verdi e vitali. Peraltro, i punteggi di intensità di attacco (DSR) sono risultati inferiori, per tutti i genotipi, nel saggio con inoculo a 6DAP: questo stadio corrisponde ad un cambiamento fisiologico associato all'invecchiamento delle sete che apparentemente altera la recettività delle sete all'insediamento delle spore del fungo e il conseguente marciume della spiga.

Per entrambe le concentrazioni di spore utilizzate per l'inoculo effettuato a 3DAP, la versione *o2*, sia per W64A che per A69Y, è risultata più suscettibile all'attacco di *F. verticillioides* (DSR-range: 4.65-5.63 nel caso di mutanti *o2*), rispetto alla corrispondente versione *wt* (DSR-range: 2.33-3.29). Tali dati confermano precedenti osservazioni che mostrano linee *opaque-2* generalmente più suscettibili all'attacco di funghi e insetti (10).

I risultati relativi alle linee Lo sono utili nell'individuare una situazione nella quale è stato possibile, sulla base della concentrazione più bassa di spore inocolata a 3DAP, assegnare alle varie linee Lo un diverso grado di resistenza contro *Fusarium*. Infatti, nel caso delle sei linee pure, una concentrazione di spore pari a 10⁵/mL, utilizzata per l'inoculo a 3DAP, ha consentito di evidenziare la massima differenziazione tra i genotipi, spaziando dal più resistente Lo904 (DSR: 2.58 ± 0.49), al più suscettibile Lo1124 (DSR: 6.42 ± 0.66). In aggiunta a Lo904, anche Lo1010 e Lo1096 sono risultati più resistenti (DSR-range: 2.58-3.89) rispetto a Lo1124, Lo1067 e Lo1095 (DSR-range: 5.7-6.42). Per tutti i genotipi, i controlli, rappresentati da piante non inoculate o inoculate con acqua sterile, non hanno mostrato alcun segno di infezione e un DSR prossimo a 1.

Per ciascun genotipo sono state registrate le osservazioni relative alle diverse modalità di attacco e di invasione da parte del *Fusarium*, anche in relazione alla lunghezza del canale delle sete all'impollinazione. Attualmente non è emersa una chiara correlazione tra tale parametro e il grado di suscettibilità a *Fusarium*. In aggiunta, è stata valutata l'eventuale presenza di striature rosa e/o bianche nei campioni inoculati e nei controlli. La presenza di striature non è apparsa direttamente associata al punteggio DSR, descritto in precedenza e assegnato in base all'estensione della crescita di micelio sulle cariossidi.

Il contenuto delle principali tossine associate a *F. verticillioides* (fumonisine) è stato valutato nei materiali inoculati e in quelli di controllo tramite il Kit Ridascreen-Fast-Fumonisin-(R-Biopharm); per ciascuna condizione sperimentale saggiata all'interno dei genotipi, sono state valutate tre repliche. Attualmente è in corso una valutazione dei dati relativi al contenuto di fumonisine, alla luce del punteggio di intensità di attacco assegnato alla spiga, in base alla percentuale di semi con sintomi visibili dell'infezione. Peraltro, tali dati verranno interpretati in modo più completo ad ultimazione dell'indagine relativa all'eventuale presenza di *F. verticillioides* in materiali in cui non si riscontrano segni visibili di contaminazione. Tale analisi è effettuata piastrando i semi appartenenti ai diversi campioni sperimentali su PDA al fine di evidenziare la presenza di patogeni fungini, come suggerito da Marocco *et al.* (11).

Inoltre, il metodo non-distruttivo di analisi NIRS (Near Infra-Red Spectroscopy) è stato impiegato per verificare il grado di infezione dei materiali. È in corso l'analisi dei profili ottenuti e il confronto tra materiali inoculati vs. non-inoculati e resistenti vs. sensibili. Precedenti ricerche effettuate nei nostri laboratori hanno dimostrato la validità di quest'indagine quale metodologia non-distruttiva in grado di fornire una stima rapida del livello di infezione di una partita di seme (11).

Una delle considerazioni più importanti della nostra ricerca, consiste nell'identificazione di un metodo efficiente e riproducibile di inoculo della pianta, dimostrandone l'efficacia nell'evidenziare differenze nella risposta dei diversi genotipi all'attacco di patogeni fungini.

Nell'ambito dello sviluppo di metodi di valutazione dei materiali per resistenza al fungo, oltre allo screening dei genotipi tramite inoculo artificiale in prove di campo, è in corso anche la valutazione di metodologie che permettano di evidenziare la resistenza in saggi di laboratorio utili ad uno screening rapido e riproducibile dei materiali.

La ricerca si è sviluppata nell'ambito del progetto Eu-finanziato SAFEMAIZE (ICA4-CT2000-30033, Coordinatore: Prof. Dave Berger, University of Pretoria, SA) in FP5.

Bibliografia

1. Shurtleff MC (Ed.). Compendium of maize diseases. Edagricole; 1984
2. A.I.R.E.S. Associazione Italiana Raccoglitori Essiccatori Stoccatore di Cereali e Semi Oleosi Mais. Qualità e Micotossine. Edizioni Junglemidia; 2004
3. Bottalico A. *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *J Plant Pathol* 1998;80(2):85-103
4. Munkvold GP. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annu Rev Phytopathol* 2003;41:99-116
5. Bush BJ, Carson ML, Cubeta MA, Hagler WM, Payne GA. Infection and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* in developing maize kernels. *Phytopathology* 2004;94(1):88-93
6. Rodricks JV, Hesseltine CW, Mehlman MA. (Ed.). Mycotoxins in Human and Animal Health. Pathotox Publishers. Park Forest South, IL (USA); 1977

7. Reid LM, Nicol RW, Ouellet T, Savard M, Miller JD, Young JC, Stewart DW, Schaafsma AW. Interaction of *Fusarium graminearum* and *F.moniliforme* in maize ears: Disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. *Phytopathology* 1999;89:1028-37
8. Bertolini M, Bosio M, Bressan M, Coppolino F, Di Fonzo N, Gentinetta E, Introzzi F, Lupotto E, Maggiore T, Perenzin M, Snidaro M, Valoti P, Verderio A, Bianchi A, Soave C, Lorenzoni C, Motto M, Salamini F. Breeding activity of the maize station of Bergamo: synthetic gene pools and inbreds released in the period 1975-1989. *Maydica* 1991;36:87-106
9. Reid LM, Hamilton RI, Mather DE. Screening maize for resistance to Gibberella ear rot. Technical Bull 1996-5E, Research Branch, Agriculture and Agri-Food Canada; 1996
10. Gupta SC, Asnani VL, Khare BP. Effect of the opaque-2 gene in maize (*Zea mays* L.) on the extent of infestation by *Sitophilus oryzae* L. *J Stored Prod Res* 1970;6:191-4
11. Marocco A, Scandolara A, Battilani P, Berardo N. Use of near infrared reflectance spectroscopy to detect mould infection in corn kernels. Proceedings of Euro Food Chem XII-Strategies For Safe Food. 2003;2:694-7

AFLATOSSINE IN SPEZIE, ERBE AROMATICHE, INFUSIONALI E OFFICINALI

Cecilia Bergamini, Nadia Gruppioni, Veronica Menna, Barbara Romagnoli
ARPA, Agenzia Regionale Prevenzione e Ambiente dell'Emilia Romagna, sezione di Bologna

Introduzione

Le derrate alimentari di origine vegetale come cereali e derivati, semi oleaginosi, frutta secca, caffè, cacao, erbe e spezie, sono facilmente attaccabili da muffe che in particolari condizioni di temperatura e umidità elevate, possono produrre dei metaboliti secondari quali le micotossine (1). In particolare i funghi filamentosi *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* possono produrre le aflatoossine (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂) (2, 3).

Queste molecole possiedono un diverso grado di tossicità (4). La più potente è la AFB₁ classificata come cancerogena per l'uomo dalla *International Agency for Research on Cancer* (5). Studi epidemiologici mostrano infatti la stretta correlazione tra il tumore al fegato e i livelli di aflatoossine nella dieta giornaliera dell'uomo (6, 7, 8).

Considerando questo fatto e il loro effetto sulla salute dell'uomo e degli animali, il problema della contaminazione di aflatoossine nei prodotti alimentari acquista un significato globale (2).

Esistono molti studi sulla micoflora nei prodotti agricoli, ma solo un'esigua parte di essi riguarda le spezie e le erbe officinali e aromatiche che sono invece sempre più presenti nella nostra dieta giornaliera acquistando un ruolo di crescente importanza nell'economia. La provenienza di questi prodotti da paesi tropicali e la tecnologia di produzione impiegata sono le cause principali della probabile contaminazione da aflatoossine (9, 10).

Inoltre, precedenti studi dimostrano che i livelli di aflatoossine non sono ridotti dai metodi di cottura domestici, sia con microonde che con gas convenzionale (11, 12) e che le tossine non decompongono alla temperatura di ebollizione dell'acqua durante la preparazione della tisana o dell'infuso, cosicchè non si può escludere che piccole quantità di tossine vengano ingerite e che si accumulino nel tempo provocando danni anche irreversibili (13).

Ecco perchè risulta importante avere un metodo di analisi semplice e quantitativo per controllare i livelli di aflatoossine negli alimenti.

Nel 1998 la Commissione Europea ha fissato i valori limite per l'AFB₁ e le aflatoossine totali (AFs) (rispettivamente di 2 e 4 µg/kg) nella frutta secca e nei cereali con la Direttiva CE 98/53 (14) e solo nel 2002 nelle spezie con il Regolamento CE 472/2002 (15) (*Caspicum spp.*, *Piper spp.*, *Myristica fragrans.*, *Zingiber officinal*, *Curcuma longa*) (AFB₁ 5 µg/kg; AFs 10 µg/kg). Nel 2003 questi due Regolamenti sono stati riuniti in un testo unico (Reg. CE 2174/03). (16) Per quanto riguarda le erbe officinali invece non ci sono ancora direttive europee; in Italia si fa riferimento a valori guida dell'Istituto Superiore di Sanità (17) e al "Volume droghe vegetali e preparazioni" FU XI ed. (18) (AFB₁ 5 µg/kg; AFs 10 µg/kg).

Lo scopo di questo studio è quello di fornire utili informazioni sui livelli di aflatoossine in differenti campioni analizzati tra il 2000 e il 2004 utilizzando il metodo ufficiale dell'Association of Official Analytical Chemists International (19): 25 campioni di erbe aromatiche (basilico, semi di coriandolo, aglio, rosmarino, lauro, maggiorana, prezzemolo, origano, salvia, semi di finocchio), 25 di spezie (cannella, cumino, semi di papavero, semi di sesamo, pepe nero, peperoncino) e 45 di erbe infusionali e officinali (guaranà, tè, tè verde, succo

di aloe, rosa canina, karkadè, iperico, erbe svizzere, succo di betulla, bissaps secco, gombo secco, erbe cinesi, melissa e biancospino).

Campionamento

I campioni provengono da prelievi effettuati in modo casuale tra il 2000 e il 2004 sia dall'AUSL in mercati, negozi, super-market della Regione Emilia Romagna, sia dall'USMA sulla merce ancora allo stato estero per la verifica della conformità alle leggi italiane ed europee.

Ove è stato possibile si è proceduto al campionamento secondo la direttiva CE 27/2002 (20), come indicato in Tabella 1.

Tabella 1. Metodo di campionamento secondo la direttiva CE 27/2002

Prodotto	Peso del lotto (t)	Peso dei sottolotti (t)	N. campioni elementari	Campione globale (kg)
Spezie	≥ 15	25	100	10
	< 15	-	10 - 100	1 - 10

Materiali

- Colonnine di immunoaffinità Easi-Extract Aflatoxin della ditta Rhone Diagnostic Technologies (Glasgow, Scozia).
- Tampone fosfato pH 7,4 (PBS) preparato con 2,38 g di sodio fosfato bibasico*12H₂O, 0,19 g di potassio fosfato monobasico e 8,00 g di sodio cloruro.
- Miscela estraente: Metanolo + acqua (8 + 2, v/v).
- Fase mobile per HPLC: acqua + acetonitrile + metanolo (6 + 2 + 3). Ad ogni litro di fase mobile si aggiungono 350 µl di acido nitrico 4 M e 120,0 mg di potassio bromuro.
- Soluzione Standard di aflatossine Mix (1 µg/mL AFB₁, AFG₁; 0.3 µg/mL AFB₂, AFG₂ in metanolo) della ditta Supelco (Bellafonte, USA).

I reagenti analitici sodio fosfato bibasico, potassio fosfato monobasico, sodio cloruro, acetonitrile e metanolo per HPLC, acido nitrico e potassio bromuro sono forniti dalla ditta Carlo Erba srl (Milano, Italia).

Tutti i reagenti sono di grado analitico riconosciuto (RPE).

Analisi

50g di campione finemente macinato sono stati miscelati con sodio cloruro e la miscela estraente. L'estratto è stato filtrato, diluito con il tampone fosfato e applicato alla colonnina di immunoaffinità che contiene anticorpi specifici per le AFs. La colonnina è stata lavata con acqua e le aflatossine eluite con metanolo.

La presenza di aflatossine è stata rilevata per cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) con colonna a fase inversa RP C18 (lunghezza 25 cm, diametro 4,6 mm, dimensioni delle particelle 5 µm), flusso di 1 mL/min con derivatizzazione elettrochimica post-colonna (Kobra cell) e rivelazione fluorimetrica (Perkin Elmer LC 240) (eccitazione 360 nm, emissione 435 nm) (19).

Per confermare la presenza di AFB₁ e AFG₁ è stata disconnessa la cella Kobra e collegato direttamente il fluorimetro alla pompa. In questo modo i picchi delle due aflatossine sono scomparsi dal cromatogramma in quanto non fluorescenti.

Le aflatossine si degradano alla luce per cui è stato necessario lavorare con vials ambrate e fogli di alluminio per proteggere il lavoro.

Per calcolare i parametri statistici è stata usata un campione non contaminato di polvere di peperoncino con aggiunta di standard a concentrazione nota.

I risultati delle prove di recupero e i dati statistici sono stati raccolti in Tabella 2.

Tabella 2. Prove di recupero delle aflatossine B₁, B₂, G₁ e G₂ e dati statistici

	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
AFB ₁ aggiunto (µg/kg)	3,92	1,62	4,97	1,45
Media 16 tests (µg/kg)	3,96	1,35	4,06	1,20
Recupero (%)	83,50	76,50	81,70	82,50
Deviazione standard (SD)	0,46	0,09	0,36	0,10
Precisione (DRS) (%)	11,60	6,70	9,00	8,10
Limite di rilevabilità (LDR) (µg/kg)	0,47	0,17	0,44	0,18

Risultati e discussioni

L'estrazione delle aflatossine dalle spezie non è semplice a causa dei materiali contaminanti altamente colorati che possono essere co-estratti con le aflatossine. Le colonnine di immunoaffinità usate in questo lavoro hanno fornito una veloce e semplice soluzione a questo problema grazie alla loro alta specificità permettendo così di ottenere dati esenti da interferenze.

I risultati della ricerca di aflatossine in spezie, erbe aromatiche, piante officinali e infusionali sono raccolte nelle Tabelle 2 e 3 e nelle Figure 1, 2 e 3.

Dei 95 campioni analizzati solo 6 spezie sono risultate contaminate (il 6,3 % dei campioni totali), come mostra la Figura 1.

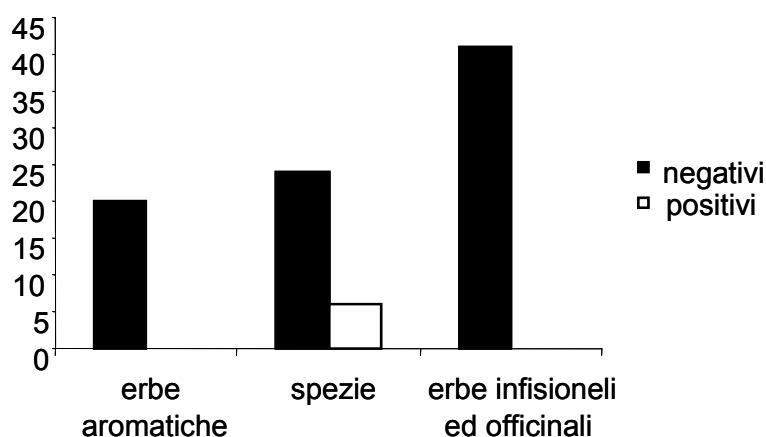


Figura 1. Risultati delle analisi sul totale dei campioni

La Tabella 3 mostra l'incidenza dei campioni positivi sul totale analizzato e i livelli di aflatossine trovati. Il più alto valore di AF tot è stato trovato in un campione di peperoncino intero secco: AFB₁ 26.9 µg/mL, AFB₂ 1.2 µg/mL, AFG₁ 1.4 µg/mL, AFG₂ 1.2 µg/mL.

Solo 2 peperoncini (il 2,1% dei campioni totali) superano i valori di legge.

Tabella 3. Incidenza (n. positivi / n. campioni analizzati) e i valori di aflatossine trovati

Campione	Incidenza (positivi/campioni analizzati)		Intervallo di valori di AF tot trovati (ppb)			
	n.	%	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
Erbe aromatiche	0/25	0	-	-	-	-
Aglione	0/3	0	LDR*	LDR	LDR	LDR
Basilico	0/3	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Coriandolo	0/2	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Cumino	0/1	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Lauro	0/1	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Maggiorana	0/3	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Prezzemolo	0/1	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Rosmarino	0/4	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Salvia	0/1	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Semi di finocchio	0/2	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Semi di papavero	0/1	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Sesamo	0/3	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Spezie	6/25	24	-	-	-	-
Cannella	1/1	100,0	0,98	LDR	LDR	LDR
Curcuma	0/1	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Miscela di spezie e aromi	0/1	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Noce moscata	0/2	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Pepe	0/9	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Peperoncino	5/10	50,0	26,90 ^a	1,20 ^a	1,40 ^a	1,20 ^a
			1,82	LDR	LDR	LDR
			5,58 ^a	0,81	LDR	LDR
			0,95	LDR	LDR	LDR
			0,57	LDR	LDR	LDR
Erbe infusionali e officinali	0/45	0	-	-	-	-
Aloe	0/1	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Betulla	0/1	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Biancospino	0/1	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Dhania polvere	0/1	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Erba centauri	0/1	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Erbe cinesi	0/4	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Gombo secco	0/1	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Guaranà	0/2	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Iperico	0/1	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Iris pallida	0/1	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Melissa	0/1	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Rosa canina	0/2	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Tè	0/2	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Tè verde	0/6	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Tisane e infusi	0/20	0	LDR	LDR	LDR	LDR
Totale	6/95	6,3	-	-	-	-

* LDR = non rilevabile (inferiore al limite di rilevabilità)

^a livelli non conformi

Limite di rilevabilità (ppb): AFB₁= 0,47; AFB₂=0,17; AFG₁=0,44; AFG₂=0,17

Per quanto riguarda le spezie il 24% dei campioni analizzati risulta contaminato da AFB₁ e l'8% di questi presenta valori che vanno da 5.0 a 30.0 µg/kg. Nessuno dei 45 campioni di erbe officinali, infusionali e aromatiche è risultato contaminato (Figura 2).

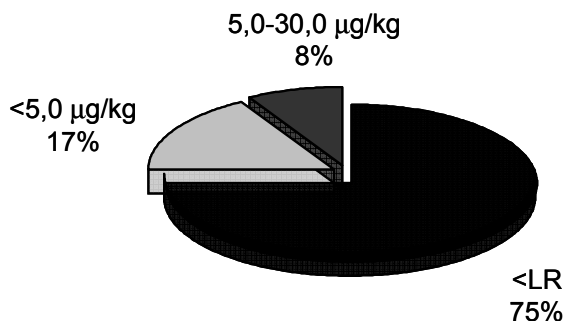


Figura 2. Risultati delle analisi sui campioni di spezie

Alcune erbe officinali, infusionali e aromatiche sono state sottoposte anche a un'indagine di tipo microbiologico. Su 27 campioni di tisane, thé ed erbe cinesi sono state eseguite analisi microbiologiche per la ricerca di ifomiceti: 10 campioni sono risultati con valori inferiori a 10² U.F.C./g, 2 campioni con valori compresi tra 10² e 10⁴ U.F.C./g, 13 campioni con valori compresi tra 10⁴ e 10⁶ U.F.C./g, e 2 campioni con valori superiori a 10⁶ U.F.C./g.

Considerando che il valore di riferimento è di 10⁴ U.F.C./g, si evidenzia che il 56 % dei campioni risulta contaminata da ifomiceti (Figura 3) anche se non presenta contaminazione da aflatoxine.

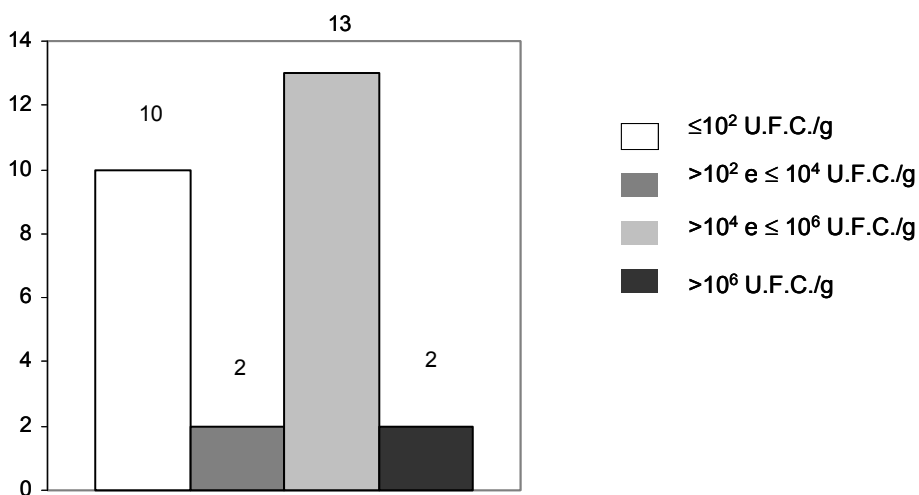


Figura 3. Numerazione ifomiceti

Le erbe aromatiche, infusionali e officinali non sembrano però essere un favorevole substrato per la formazione di aflatossine rispetto ad altre derrate alimentari, probabilmente perché contengono alcune sostanze che possono inibire la produzione di tossine. Queste sostanze potrebbero essere gli olii essenziali, che sembrano infatti avere delle proprietà antitossigene (21, 22) come diversi studi dimostrano (23-29).

Per quanto riguarda le spezie i risultati di questo studio sembrano indicare che su queste matrici la contaminazione di aflatossine sia significativa.

Dai risultati emerge anche che tra le aflatossine la contaminazione più frequente è data dalla AFB₁ e che la matrice più a rischio è rappresentata dal peperoncino e i suoi derivati.

Questa contaminazione potrebbe essere addebitata al fatto che spesso il peperoncino viene umettato con acqua prima di essere commercializzato offrendo così un ideale substrato alla crescita delle muffe (2).

Questi dati concordano con quelli riportati in alcuni precedenti lavori svolti in diversi Paesi come il Portogallo (30), il Giappone (31), la Turchia (32), l'Egitto (33, 34), l'Africa (35) e altri ancora (2, 36, 37, 38).

In realtà è importante sottolineare che la crescita fungina nelle spezie e nelle erbe è comunque inferiore a quella che avviene su altre derrate alimentari.

Per esempio, l'*Aspergillus flavus* cresce bene sulle spezie, ma la produzione di aflatossine è minore che nei cereali (11). Sembra quindi che su questi substrati non tutti i ceppi dell'*A. flavus* siano aflatossigenici (9). Uno studio indiano ha trovato la contaminazione da AFB₁ nelle spezie più usate, ma a livelli inferiori a quelli settati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (39).

Questo studio fornisce utili informazioni sul rischio delle micotossine e spera di accrescere la coscienza tra i consumatori, ricercatori, agricoltori e commercianti circa l'importanza di migliorare i metodi di processo dei prodotti (raccolta, essicamento, stoccaggio e trasporto), di stabilire un programma di monitoraggio e la necessità di ottenere sempre più dati sulla distribuzione e i livelli di contaminazione da aflatossine nei prodotti a largo consumo come spezie, erbe e piante officinali.

Bibliografia

1. Brera C, Miraglia M, Colatosti M. Evaluation of the impact of mycotoxins on human health: sources of errors. *Microchemical Journal* 1998;59(1):45-49.
2. Reddy SV, Kiran Mayi D, Uma Reddy M, Thirumala-Devi K, Reddy DVR. Aflatoxins B₁ in different grades of chillies (*capsicum annum* L.) in India as determined by indirect competitive-ELISA. *Food Additives and Contaminant* 2001;18:553-558.
3. Garner CR, Whattam MM, Taylor PJL, Stow MW. Analysis of United Kingdom purchased spices for aflatoxins using an immunoaffinity column clean-up procedure followed by HPLC analysis and post-column derivatisation with pyridinium bromide perbromide. *Journal of Chromatography* 1993;648:485-490.
4. Busby WF, Wogan GN. in C.E. Searle (Editor) *Chemical Carcinogens* (ACS Monograph 182), 2nd ed. American Chemical Society, Washington, 945.
5. International Agency for Research on Cancer, IARC Monographs, *Cancer Res.* 1980;40:1.
6. Peers FG, Linsell CA. Dietary aflatoxins and liver cancer a population based study in Kenya. *British Journal of Cancer* 1973;27:473.
7. Van Rensburg SJ., Wander Watt JJV., Purchase LFH., Pereira CL., Markham R. Primary liver cancer rate and aflatoxin intake in a high cancer area. *South Africa Medical Journal* 1974;48:2508.

8. Shank RC., Bhamarapravati N., Gordon JE., Wogan GN. Dietary aflatoxins and human liver cancer. IV. Incidence of primary liver cancer in two municipal populations of Thailand. *Food Cosmetics Toxicology* 1972;10:170.
9. Elshafie AE., Al-Rashdi TA., Al-Bahry SN., Bakheit CS. Fungi and aflatoxins associated with spices in the Sultanate of Oman. *Mycopathologia* 2002;155:155-160.
10. Halt M. Mould and mycotoxins in herb tea and medicinal plants. *European Journal of Epidemiology* 1998;14:269-274.
11. MacDonald S, Castle LA. UK retail survey of aflatoxins in herbs and spices and their fate during cooking. *Food Additives and Contaminants* 1996; 13:21-128.
12. Midio AF, Campos RR, Sabino M. Occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in cooked food components of whole meals marketed in fast food outlets of the city of Sao Paulo, SP, Brazil. *Food Additives and Contaminants* 2001; 18:445-448.
13. Durakovic' S, Galic' J, Pajnovic' P. Toxin and cancer metabolites of moulds in food and fodder. *Hrana Iishrana* 1989; 30:71-100.
14. Unione Europea. Direttiva CE 98/53 della Commissione del 16 luglio 1998. *Gazzetta Ufficiale dell'Comunità Europea - Serie L201/93*, 17 luglio 1998.
15. Unione Europea. Regolamento CE n. 472/2002 della Commissione del 12 marzo 2002. *Gazzetta Ufficiale dell'Comunità Europea - Serie L75/18*, 16 marzo 2002.
16. Unione Europea. Regolamento CE n. 2174/2003 della Commissione del 12 dicembre 2003. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea - Serie L326/12*, 13 dicembre 2003.
17. Italia. Circolare 9 giugno 1999, n. 10. Direttiva in materia di controllo ufficiale sui prodotti alimentari: valori ammissibili di micotossine nelle derrate alimentari di origine nazionale, comunitaria e Paesi terzi. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale n.135*, 11 giugno 1999.
18. Italia. Farmacopea Ufficiale della Repubblica italiana edizione XI 2002: Volume Droghe Vegetali e Preparazioni.
19. Stroka J, Anklam E, Jorissen U, Gilbert J and collaboratores. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, gif paste and paprika powder: collaborative study. *Official Method of Analysis of AOAC International* 2000;Vol. 83:No.2,999.07.
20. Unione Europea. Direttiva CE 27/2002 della Commissione del 13 marzo 2002. *Gazzetta Ufficiale dell'Comunità Europea - Serie L75/44*, 16 gennaio 2002.
21. Llewellyn GC, Mooney RL, Cheatle TF, Flannigan B. Mycotoxin contamination of spices an update. *International Biodeterioration and Biodegradation* 1992;29:111-121.
22. Bartine H, Tantaoui – Elaraki A. Growth and toxigenesis of *Aspergillus flavus* isolates on selected spices. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 1997;16:61-65.
23. Ahmed FH, Al-Badri AA, Ibrahim MM, Al- Ashahed AS. El-Khalafawy HM. Comparative studies of antifungal potentialities for some natural plant oils against different fungi isolated from poultry. *Grasasy Aceites* 1994;45:260-264.
24. Llewellyn GC, Burkett ML, Eadie T. Potential mould growth, aflatoxin production and antimycotic activity of selected natural spices and herbs. *Journal Association Official Analitical Chemistry* 1981;64:112-121.
25. Hitokoto H, Morozumi S, Wauke T, Saki S, Kurata H. Hinibitory effect of spieces on growth and toxin production of toxigenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 1980;39:818-822
26. Martini H, Weidenborner M, Adams S, Kunz B. Eugenol and carvenol: the main fungicidal compound in clove and savory. *Italian Journal of Food Science* 1996;1:63-67.

27. Patkar KL, Usha CM, Shetty HS, Paster N, Lacey J. Effect of spice essential oils on growth and aflatoxin B₁ production by *Aspergillus flavus*. *Letters in Applied Microbiology* 1993;17(2):49-51.
28. Fagar RS, Daw ZY, Abo-Raya SH. Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. *Journal of Food Science* 1989;54(1):74-76.
29. Chou CC, Yu RC, Effect of piper-betle and its extracts on the growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Proceedings of the National Science Council Republic of China Part B Life Sciences*. 1984.
30. Martins ML, Tins HI, Bernardo F. Aflatoxins in spices in Portugal. *Food Additives and Contaminants* 2001;18:315-319.
31. Tabata S, Ibe A, Ozawa H, Kamimura H, Yasuda K. Aflatoxin contamination in foods and foodstuffs in Tokyo: 1991-1996. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 1998;39:444-447.
32. Gurbuz U, NizamLioglu M, NizamLioglu F, Dinc I, Dogruer Y. Examination of meat, cheeses and spices for aflatoxins B₁ and M₁. *Veterinarium* 1999 2000;10:34-41.
33. Selim MI, Pependorf W, Ibrahim MS, Sharkawy S, Kashory ES. Aflatoxin B₁ in common Egyptian foods, *Journal of AOAC international* 1996;79:1124-1129.
34. El-Kady IA, El-Maraghy SSM, Mustafa EM. Natural occurrence of mycotoxins in different spices in Egypt. *Folia Microbiologica* 1995;40:297-300.
35. Fufa H, Urga K. Screening of aflatoxins in Shiro and ground red pepper an Addis Ababa. *Ethiopian Medical Journal* 1996;34:243-249.
36. Aziz NH, Youssef YA, El Fouly MZ, Moussa LA. Contamination of some common medicinal plant samples and spices by fungi and their mycotoxins. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 1998;39:279-285.
37. Finoli C, Ferrari M. Aflatossine in spezie ed erbe aromatiche. *Industriae alimentari* 1994;33:732-736.
38. Kumar S, Roy AK. Occurrence of aflatoxin in some liver curative herbal medicines. *Letters in Applied Microbiology* 1993;17:112-114.
39. Roy AK, Chourasia HK. Mycotoxin problems of some common spices in Bihar, India. *International symposium and Workshop on Food Contamination, mycotoxins and phytotoxins, 1990, Cairo, Egypt*.

OCRATOSSINA A IN VINI E ACETI

Paolo Branca, Sara Jenifer Coluccia, Francesca Alesso, Marisa Bodda, Sara Ciacciarelli, Marisa Garnero, Francesco Ricci

Polo Regionale Alimenti, ARPA Piemonte, Torino

Introduzione

L'ocratossina A (OTA – Figura 1) è una micotossina nefrotossica, biosintetizzata da funghi del genere *Aspergillus* e *Penicillium*, presente in diverse matrici alimentari, in particolare su cereali e derivati, quali la birra.

Recentemente la contaminazione è stata riscontrata anche in vino e succo d'uva e sono stati promossi diversi studi di screening che permettano di stabilire i valori critici di controllo e i tenori massimi ammissibili per poter programmare dei sistemi di monitoraggio ed eventualmente suggerire azioni di prevenzione e correzione.

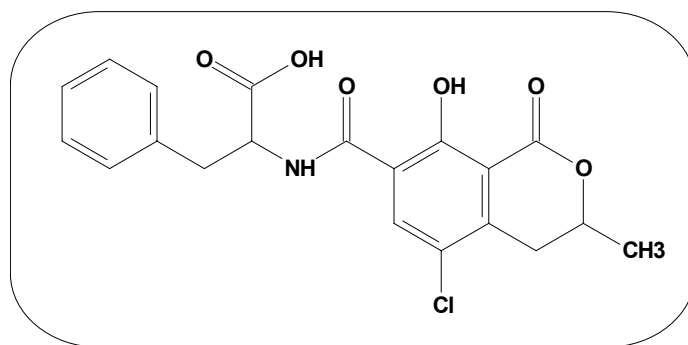


Figura 1. Ocratossina A

Metodo analitico

Nel nostro laboratorio abbiamo messo a punto un metodo per la ricerca dell'ocratossina A per la birra, per i vini e, con qualche modifica, per gli aceti; dal 2002 si esegue di routine questo tipo di determinazione analitica.

Il metodo si sviluppa in quattro fasi:

1. Preparazione del campione
2. Estrazione
3. Purificazione
4. Analisi Strumentale

Preparazione del campione

I campioni, se necessario vengono degasati su agitatore magnetico fino a scomparsa dell'anidride carbonica, ovvero della schiuma.

Estrazione

Si aggiungono 10 mL di soluzione estraente (soluzione acquosa di Sodio Bicarbonato al 5% + Polietilenglicole 8000 all'1%) a 10 mL di campione; si agita per 40 minuti su agitatore magnetico. Si aggiungono 20 mL di PBS (soluzione salina tamponata con fosfati a pH 7,4); per i campioni di aceto è opportuno controllare il pH della soluzione ottenuta, e, se necessario correggerla con Idrossido di Sodio 0,1 normale fino a pH 7,4. Si filtra l'estratto su filtro di carta.

Purificazione

Si trasferisce il campione diluito su colonnina ad immunoaffinità (Ochrates VICAM) con flusso di circa 1-2 mL al minuto. Si lava la colonnina con 5 mL di PBS e 10 mL di acqua deionizzata ultrapura. Si secca la colonnina flussando aria.

Si eluisce per gravità con 1 mL di soluzione eluente (Ac. acetico/metanolo 2/98) e 1 mL di acqua ultrapura.

Analisi strumentale

L'eluato viene omogeneizzato su vortex, filtrato su filtri a siringa 0,2 μ m, e trasferito nei vials per la successiva analisi tramite HPLC abbinato a fluorimetro (Figura 2).

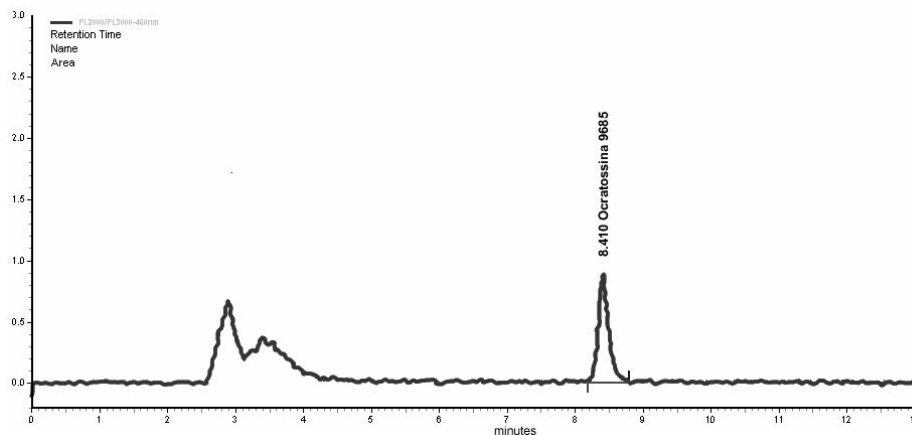


Figura 2. Cromatogramma dell'ocratossina A in matrice vino

Condizioni strumentali:

- Volume di iniezione: 200 μ l
- colonna: RP18 Supelco
- temp. colonna: 42°C
- flusso: 1mL/min
- fase mobile: H₂O/CH₃CN/CH₃COOH (99/99/2)
- spettrofluorimetro: eccitazione 334nm emissione 460nm

Prima di ogni sessione di lavoro si costruisce una retta di taratura costruita su 4 punti (0,2-0,5-1-5 μ g/kg) iniettando le soluzioni a concentrazione nota. (Criterio di accettabilità della retta di taratura: $r^2 \geq 0,99$).

Si identifica il picco relativo all'ocratossina A nel cromatogramma confrontando il tempo di ritenzione corrispondente al riferimento.

Si determina la quantità dell'ocratossina A, nell'eluato iniettato, tramite la retta di taratura (Figura 3).

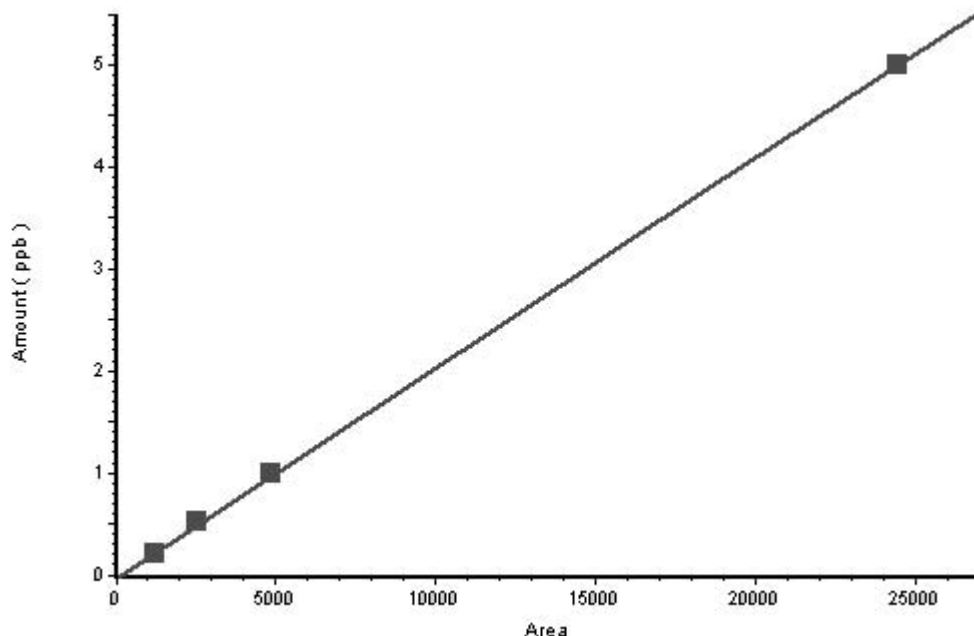


Figura 3. Retta di taratura (0,2 - 0,5 - 1,0 - 5,0 µg/kg): $r^2 = 0,999921$

Validazione del metodo

Il metodo è stato validato e i valori di CV% e recupero sui livelli analizzati sono conformi alle direttive prescritte dal DM 31/5/2003 “Recepimento direttiva CEE 2002/26/CEE 31/3/2002 campionamento e metodi analisi OTA in cereali e frutta secca”.

La procedura è risultata particolarmente sensibile.

In Tabella 1 sono riportati i risultati ottenuti in fase di validazione sui livelli fortificati 0,25 – 0,50 – 1,0µg/kg.

Tabella 1. Validazione del metodo

Parametri	Vino	Aceto
Limite di quantificazione	0,04 µg/kg	0,04 µg/kg
CV%	3,1	5,0
Ripetibilità	0,07	0,20
Nome variRecuperoabile	67,0%	71,8%
Incertezza	Horwitz	Horwitz

Analisi 2003-2004

Nel corso degli ultimi due anni sono stati analizzati 82 campioni di vino (Figura 4) di provenienza nazionale di cui 18 sono risultati positivi alla ocratossina A con concentrazioni comprese tra 0,14 e 1,22 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 13 campioni di aceto (Figura 5) di cui uno solo positivo con concentrazione pari a 0,28 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Tutti i campioni su cui si è riscontrata la presenza della tossina sono vini rossi, e solo il 22% di questi sono a “Denominazione di origine controllata” (DOC) o “Denominazione di origine controllata garantita” (DOCG).

In caso di positività, vista l'assenza di legislazione in merito, si è fatto riferimento al Regolamento CEE/UE n.472 del 12/03/2002 che indica genericamente il limite giornaliero ammissibile di ocratossina A in 5 ng/kg peso corporeo/giorno; è però difficile stabilire l'entità di un consumo medio per un adulto, e in molti casi la tossina assunta tramite il vino potrebbe da sola superare la dose raccomandata; in questo contesto è auspicabile una regolamentazione che preveda dei limiti dell'ocratossina A oltre che sui cereali e sulla birra anche su vino e aceti.

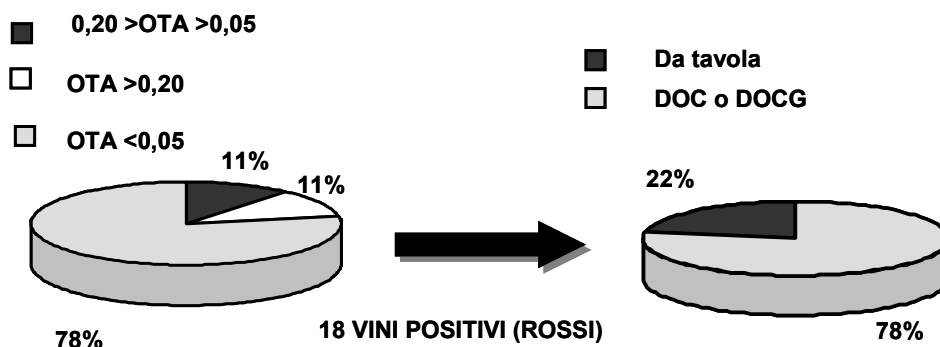


Figura 4. Campioni di vino 2003-2004

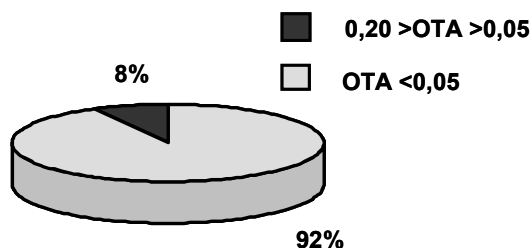


Figura 5. Campioni di aceto 2003-2004

VALUTAZIONE DI ALCUNI PARAMETRI CORRELATI ALLO SVILUPPO DELLA MICOTOSSINA

Clarita Cavallucci, Clotilde Villeri, Luciano Terni, Mare Battistelli, Francesca Della Monica, Elena Fioriti, Mauro Migni, Roberto Luneia

(a) *Centro Studi e Formazione Petrini Institute® SpA, Bastia Umbra, Perugia*

(b) *Analysis, Srl Gruppo Neutron, Pantalla, Perugia*

Introduzione

Alcune muffe o funghi hanno la capacità di produrre sostanze velenose e quindi di indurre intossicazioni. Esistono numerose specie di funghi tossigeni, nel caso specifico di nostro interesse prendiamo in esame l'*Aspergillus flavus* le cui micotossine (aflatossina B₁ e B₂), possono causare seri problemi agli animali che ingeriscono gli alimenti contaminati e quindi anche al consumatore finale dei prodotti di origine animale: l'uomo.

Molti funghi tossigeni sono ubiquitari e possono svilupparsi in diverse condizioni ambientali. L'accrescimento delle muffe e la produzione di micotossine sono in relazione a molteplici fattori di natura fisica, chimica e biologica, e i prodotti vegetali sono soggetti a contaminazioni durante tutto il loro ciclo produttivo: dalla coltura in campo, alla raccolta, alla essiccazione e stoccaggio sino al trasporto in mangimificio, insilaggio e infine anche nella mangiatoia. Le contaminazioni di campo hanno un peso considerevole sulla sanità finale dei prodotti alimentari; soggette come sono ad imprevedibili eventi naturali esse costituiscono un rischio che attualmente si presenta tra quelli più inevitabili. Tutti i prodotti alimentari sono suscettibili di contaminazioni micotossiche, ma vi sono alcuni alimenti che, sia per la loro natura intrinseca sia per le condizioni delle aree di produzione, sono in generale più di altri soggette a contenerne. In senso assoluto gli alimenti che mostrano la più elevata frequenza di contaminazione e che per la loro importanza economica impongono una costante sorveglianza sono nell'ordine, il mais, le proteaginoso e il latte. Vi sono inoltre aree geografiche più soggette di altre ai rischi di contaminazioni micotossiche, pertanto un parametro da considerare è anche l'area di produzione; per le aflatossine, le aree geografiche a rischio più elevato sono quelle con condizioni meteorologiche di caldo-umido. Le micotossine possono restare nelle derrate alimentari per molto tempo dopo la morte del fungo produttore ed essere in seguito ritrovate negli alimenti e nei mangimi ottenuti con materie prime contaminate. Le micotossine possono quindi essere presenti in concentrazioni tossiche nei prodotti alimentari anche quando essi non appaiono visibilmente ammuffiti. Molto frequente ed economicamente importante è la diffusione di micotossine nei mangimi. Per gli allevamenti zootecnici le micotossine sono generalmente causa di riduzione delle produzioni e, sporadicamente, anche di micotossicosi acute con la morte dei soggetti colpiti. Le stesse micotossine o i loro prodotti metabolici possono ritrovarsi come residui nel latte, nelle carni e nelle uova degli animali colpiti. I fattori (1) che influenzano la crescita delle muffe tossigene e la sintesi delle micotossine nelle piante in campo e nei prodotti durante la raccolta e la conservazione sono riportati nella Tabella 1. seguente.

Tabella 1. Fattori che influenzano la crescita delle muffe tossigene e la sintesi delle micotossine nelle piante in campo e nei prodotti durante la raccolta e la conservazione

Fattori	Campo	Raccolta	Magazzino
Fisici			
Umidità	+	+	+
Temperatura	+	+	+
Danni meccanici	+	+	+
Miscelazione	-	+	+
Autoriscaldamento	-	-	+
Tempo	+	+	+
Chimici			
Anidride carbonica	-	-	+
Ossigeno	-	-	+
Natura del substrato	+	-	+
Nutrizione minerale	+	-	+
Trattamenti antiparassitari	+	-	+
Biologici			
Stress della pianta	+	-	+
Insetti vettori	+	-	+
Infezioni fungine	+	-	+
Variabilità ospite	+	-	+
Variabilità patogeno	+	-	+
Inoculo	+	+	+
Microflora	+	-	+

Lo scopo della attività di ricerca effettuata dal Petrini Institute® è stato quello di valutare la presenza della aflatoossina B₁ in differenti campioni di alimento (materie prime e prodotti lavorati), di diversa provenienza geografica e di diverso metodo di lavorazione.

Materiali e metodi

L'attività di ricerca è stata svolta presso lo stabilimento della azienda Petrini 1822 SpA di Bastia Umbra. Sono stati raccolti 168 campioni di mais in granella provenienti da silos di stoccaggio, 73 campioni di farina di mais e 107 campioni di prodotto finito contenente mais in diversa percentuale (inferiore a 25, compresa tra 25 e 35 e superiore al 40%). Le aree geografiche di provenienza dei prodotti appartengono ad 8 province italiane e una della Spagna. I campioni di alimento provenivano dalla campagna di raccolta agosto - ottobre 2003.

Tutti i campioni sono stati sottoposti ad analisi per la determinazione della aflatoossina B₁ mediante procedura Fluorimetrica (2, 3, 4, 5).

L'obiettivo delle analisi è stato quello di monitorare e conoscere la presenza di aflatoossina B₁ nel mais e nei mangimi per vacche da latte contenenti il cereale e di valutare i risultati in funzione dei parametri considerati.

Risultati e conclusioni

Il peso degli attacchi dei funghi tossigeni alle colture in campo, sulla sanità finale degli alimenti appare evidente. Nessun campione di granella di mais analizzato è risultato esente da contaminazione ($5,56 \pm 0,23$).

Si rende quindi necessario, a partire dallo stoccaggio, applicare rigorose misure di controllo e di salvaguardia nel corso delle successive fasi industriali e commerciali dei processi produttivi. Il clima torrido della passata estate è stato fonte di danni per l'agricoltura che ne ha pagato immediatamente le conseguenze e la zootecnia le sta pagando anche in questo momento. I valori trovati nella seguente sperimentazione mostrano comunque una media di contaminazione di entità tale da consentire di rientrare nei parametri di controllo qualità applicati dalla azienda Petrini 1822 SpA.

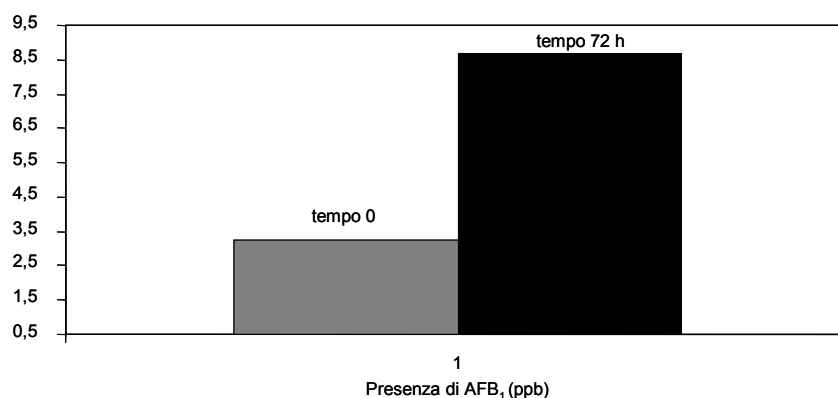


Figura 1. Analisi della farina di mais

Nelle farine di mais (Figura 1) il valore è risultato significativamente differente per tempi di macinazione nei campioni analizzati ($3,2 \pm 1,1$) vs ($8,7 \pm 1,2$), $p < 0,005$. Il valore elevato ritrovato nelle farine di mais dopo macinazione potrebbe essere dovuto all'effetto meccanico che provoca induzione di calore, che associato alla presenza di acqua crea un ambiente ideale alla proliferazione di funghi e produzione di tossine. Il contenuto minimo di umidità per la crescita delle specie aflatossinogene nelle granaglie è quello che è in equilibrio con una umidità relativa dell'aria dell'85%, mentre per la sintesi delle aflatossine sono necessarie umidità più elevate. I risultati sin qui ritrovati saranno oggetto di studi e verifiche al fine di controllare un importante fase del processo produttivo e poter consolidare e confermare la validità di tale ipotesi.

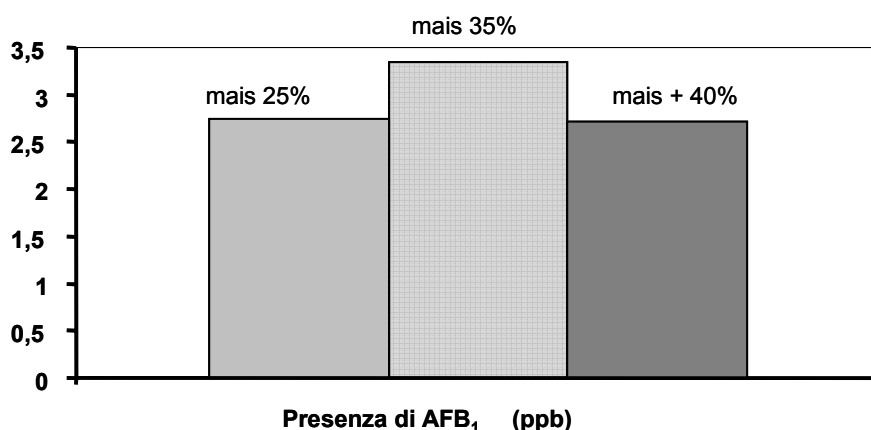


Figura 2. Mangimi composti con diverse % di mais

Mentre i valori ritrovati nei prodotti finiti, (Figura 2) differenti per contenuto in mais, sono risultati avere valori contenuti nei limiti di legge e non statisticamente significativi nei confronti ($2,7 \pm 0,3$, per il mais al 25%; $3,35 \pm 0,9$, per il mais al 35% e $2,7 \pm 1,2$, per il mais al 40%). La crescita delle specie aflatossinogene avviene nell'intervallo termico di 6-46°C, mentre per la sintesi di aflatossine sono richieste temperature tra 8 e 42°C (6). Pertanto il vero problema va studiato e affrontato in preraccolta ma naturalmente vanno rigorosamente applicate misure di controllo in sede di lavorazione tali da evitare ripercussioni a catena sino alla mangiatoia.

Bibliografia

1. Bottalico A, Le micotossine nelle piante e nelle derrate. Italia agricola 1998, 193-212.
2. Power S, Kohn B. Metodo A.O.A.C. VICAM 1993 Mycotoxin Standars Fluometer Calibration Standards - VICAM 313 Pleasant Street - WATER TOWN MA 02472, USA; 1993.
3. Wilson DM, Abramson D. Mycotoxins. In D.B. Sauer. St. Paul, MN (Eds.) Storage of cereal grain and their products. American Association of Cereal Chemists 1992; 341-391.
4. Williams PC. Storage of grain and seeds. In Smith JE, Henderson RS (Eds). Mycotoxins and Animal Foods. 1991. CRC press Inc.: Boca Raton, 721-746.
5. Bottalico A. Riflessi degli attacchi di funghi tossigeni alle colture agrarie, sulla qualità finale dei prodotti alimentari. In "Rischi microbiologici del 2000 nel settore alimentare: Muffe, lieviti e micotossine". Ed. Unipath, Milano, 11-28; 1994.
6. Christensen CM, Sauer DB. Microflora. In: David BS (Ed.). Storage of cereal grains and their products. The American Ass. of Cereal Chemists; 1982. St. paul, Minnesota: Christensen C.M., 219-240.

STUDIO DI SISTEMI DI DECONTAMINAZIONE DELL'ALIMENTO

Clarita Cavallucci, Clotilde Villeri, Luciano Terni, Mare Battistelli, Francesca Della Monica, Elena Fioriti, Mauro Migni, Roberto Luneia

(a) Centro Studi e Formazione Petrini Institute® SpA, Bastia Umbra (PG)

(b) Analysis, srl Gruppo Neutron, Pantalla (PG)

Introduzione

In relazione al regime di stoccaggio e alla provenienza geografica, nelle granaglie si possono ritrovare diverse micotossine, spesso anche in associazione. Tra le micotossine di maggiore interesse per diffusione e tossicità vi sono quelle formate da specie di *Aspergillus flavus* che producono le aflatossine B₁ e B₂, e da quasi tutti i ceppi di *Aspergillus parasiticus* che invece producono le aflatossine G₁ e G₂.

L'aflatossina B₁ in particolare si può ritrovare nelle derrate alimentari nonché nei mangimi. Il prodotto che va facilmente incontro a contaminazione è il mais e dato che è un cereale ampiamente utilizzato per la produzione di alimenti per animali, va debitamente controllato. Le aflatossine possono essere formate sia in pre-raccolta e cioè nelle piante infette di mais, che in post raccolta cioè nelle granaglie e derrate in magazzino. Le aflatossine sono metaboliti con elevata tossicità acuta e cronica, dotati di attività cancerogena, mutagena e teratogena. Esse sono essenzialmente delle potenti epatotossine, responsabili di aflatossicosi caratterizzate da epatocarcinomi, ricorrenti negli allevamenti zootecnici e, probabilmente anche di epatocarcinoma nell'uomo (1, 2).

Le numerose osservazioni epidemiologiche sulla formazione e diffusione delle micotossine hanno portato a una diversa visione del problema per quanto riguarda l'origine delle contaminazioni. Il vero problema delle micotossine si instaura in pre-raccolta; il peso degli attacchi dei funghi tossigeni alle colture in campo, sulla sanità finale degli alimenti è apparso evidente in molti studi e rigorosi controlli (3, 4). Infatti anche se è possibile contenere al minimo il livello finale delle contaminazioni micotossiche, la loro presenza nei mangimi non è completamente scongiurata. Pertanto per cercare di ottenere alimenti destinati agli animali che abbiano una qualità nutrizionale è necessario porre attenzione a numerosi aspetti, quali le condizioni igieniche della materia prima e del processo tecnologico, la gestione dei programmi di sanificazione e trattamento delle materie prime. Per garantire una qualità microbiologica occorre perciò effettuare dei controlli e attivare delle operazioni di decontaminazione che siano in grado di abbattere la carica micotossica della granella. L'obiettivo del Petrini Institute è stato quello di sperimentare alcuni sistemi di decontaminazione cercando di valutarne l'efficacia.

Materiali e metodi

L'attività di ricerca è stata svolta presso lo stabilimento della Petrini 1822 SpA di Bastia Umbra. Le prove relative alla decontaminazione sono state effettuate su campioni di mais in granella e sono stati adottati tre diversi trattamenti atti alla decontaminazione: uno di tipo meccanico (trabattatura) e 2 con aggiunta di captanti minerali del commercio (S vs M).

Il metodo della vagliatura, separa e pulisce la granella dagli agenti contaminanti; effettuata con pulitore-separatore a tamburo per il trattamento del mais secco, è stata valutata sperimentalmente ai fini dell'abbattimento del tenore di aflatoxina.

La quasi totalità delle muffe veicolate è presente sotto forma di xerospore o spore secche con una dimensione che va da 0,5 a 1 μm . È quindi indispensabile usare metodi che non creino situazioni di umidità. Il primo captante (M), usato al 2%, è un materiale zeolitico ad elevata concentrazione, elevata capacità di scambio cationico misurata (CEC mis.) e a sterilizzazione e essiccazione artificiale a temperatura superiore a 200°C. Il secondo captante (S) usato all'1%, è un assorbente specifico delle micotossine e delle tossine batteriche a base di argille caoliniche opportunamente lavorate per compressione a basso tenore di sodio ed esenti da amianto.

Il metodo della trabattatura, ha previsto l'esame di 11 campioni di mais in granella del silos in toto (300 qli); le prove effettuate con captanti sono state in numero di 6 con M e 6 con S, sugli stessi campioni di alimento destinati alla vagliatura. Le modalità di campionamento degli alimenti oggetto della sperimentazione sono state effettuate con procedura conforme a quanto previsto nella Legge n. 165 del 15/06/1978.

Ogni campione è stato sottoposto a macinazione e ad analisi per la determinazione della aflatoxina B₁ mediante procedura Fluorimetrica (5, 6).

Risultati e conclusioni

Nel caso del mais sottoposto a trabattatura il trattamento ha operato una azione di detossinizzazione statisticamente significativa $p < 0,05$. I valori ottenuti nella maggioranza dei campioni analizzati dopo vagliatura sono risultati inferiori ai 3 ppb previsti dal controllo di qualità (Figura 1) Questi dati evidenziano chiaramente che la fase di pulitura del mais rappresenta un punto del diagramma di flusso indispensabile poiché riduce di oltre il 50% il livello di contaminazione (7). L'abbattimento della tossina ha avuto, in queste prove, un andamento altalenante e comunque non è risultato tanto maggiore quanto più era elevata la carica iniziale.

Nei casi di trattamenti con captanti, l'abbattimento della carica microbica si è ottenuto in entrambe le tesi S ($17,8 \pm 3,1$) vs M ($24,6 \pm 8,2$). Va fatto notare che i campioni di partenza avevano una carica pari a 52 ppb di AFB₁. Nel confronto tra le due tesi il trattamento S ha ridotto in maniera più incisiva il tasso di contaminazione.

Le argille caoliniche (S) pur essendo meno vantaggiose economicamente, hanno ridotto il tasso di contaminazione di circa il 30%. Probabilmente ciò è dovuto all'elevato grado di adesione del prodotto alla granella di mais dettato dalla sua probabile affinità elettrostatica.

Purtroppo non esistono lavori scientifici tali da supportare la nostra ipotesi, ci riserviamo quindi la possibilità di proseguire ulteriori indagini a confermare l'efficacia di tale tesi anche *in vivo*.

In conclusione si può affermare che è di rilevante importanza il costante monitoraggio delle contaminazioni e di come l'attuazione di sistemi decontaminanti, siano essi meccanici che chimici, possano essere di indispensabile ausilio al fine di sanificare le materie prime in modo da mantenere entro valori di sicurezza i prodotti finali (8, 9).

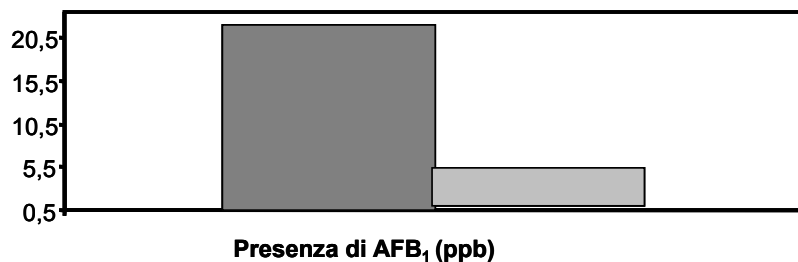


Figura 1. Metodo della Vagliatura (T)

Bibliografia

1. IARC. Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to human. *Int. Ag. Res. Cancer* 1993; 397-444
2. Eaton DL, Groopman JL. The toxicology of aflatoxins. Human health, veterinary, and agriculture significance. *Ac. Press Inc.* 1994; 552.
3. Bottalico A. Riflessi degli attacchi di funghi tossigeni alle colture agrarie, sulla qualità finale dei prodotti alimentari. In "Rischi microbiologici del 2000 nel settore alimentare: Muffe, lieviti e micotossine". Ed. Unipath, Milano, 11-28; 1994.
4. Williams PC. Storage of grain and seeds. In Smith JE, Henderson RS (Eds). *Mycotoxins and Animal Foods*. 1991. CRC press Inc.: Boca Raton, 721-746.
5. Power S, Kohn B. Metodo A.O.A.C. VICAM 1993 Mycotoxin Standards Fluometer Calibration Standards - VICAM 313 Pleasant Street - WATER TOWN MA 02472, USA; 1993.
6. Wilson DM, Abramson D. Mycotoxins. In D.B. Sauer. St. Paul, MN (Eds.) *Storage of cereal grain and their products*. American Association of Cereal Chemists 1992; 341-391.
7. Bottalico A. Toxigen *Fusarium* species and their mycotoxins in pre-harvest cereals in Europe. *Bull. Inst. Compr. Agr. Sci. Kinki Univ.* 1997; 5: 47-62.
8. Christensen CM, Sauer DB. Microflora. In: David BS (Ed.). *Storage of cereal grains and their products*. The American Ass. of Cereal Chemists; 1982. St. Paul, Minnesota: Christensen C.M., 219-240.
9. Miraglia M, Brera C, Staccini A. Le micotossine: problematiche, criteri di intervento e prospettive. *Rapporti ISTISAN 93/29*; 1993.

ANALISI DEI PARAMETRI CRITICI DI FILIERA

Clotilde Villeri, Luciano Terni, Clarita Cavallucci, Mare Battistelli, Francesca Della Monica, Elena Fioriti, Mauro Migni, Roberto Luneia

(a) *Centro Studi e Formazione Petrini Institute® SpA, Bastia Umbra, Perugia*

(b) *Analysis, Srl Gruppo Neutron, Pantalla, Perugia*

Introduzione

In considerazione dell'elevata resistenza delle micotossine ai più comuni mezzi fisici, chimici e/o biologici di preparazione, conservazione e sanificazione dei prodotti alimentari, gli interventi più efficaci contro la loro formazione e diffusione sono essenzialmente di carattere preventivo e quindi basati sulla prevenzione della crescita delle muffe in ciascuna delle fasi della filiera, dal campo alla mangiatoia. Le operazioni che sono normalmente condotte durante i processi di trasformazione delle materie prime in alimenti finiti possono contribuire a diminuire o ridistribuire (diluire) le micotossine. In generale i fattori che influenzano maggiormente il destino delle micotossine durante le lavorazioni includono la natura del cereale, il contenuto di umidità, l'aggiunta di additivi o conservanti, il livello e natura della contaminazione. Il Petrini Institute® ha analizzato tutti i punti critici di filiera con l'obiettivo di gestire e controllare i pericoli di contaminazione nell'intero diagramma di flusso aziendale e ha quindi istituito delle linee guida operative per ridurre il rischio di contaminazione da aflatossine.

Materiali e metodi

Stabilimento di produzione

Le fasi di approvvigionamento del mais consistono in:

- valutazione dei fornitori;
- controlli all'ingresso delle forniture;
- aggiornamento periodico della valutazione dei fornitori.

La scelta del fornitore viene effettuata tramite valutazione tecnica, commerciale, qualità e costi; in generale il processo prevede una qualifica iniziale per i fornitori e poi una valutazione annuale. I criteri guida per una valutazione iniziale prevedono una dettagliata analisi della documentazione in possesso del fornitore e la sua notorietà sul mercato.

I controlli sulla merce sono di tipo:

- organolettici;
- chimici;
- microbiologici.

Viene stilata una scheda di valutazione del fornitore che può essere quindi annualmente riconfermato o sospeso, a seconda delle "Non Conformità" riscontrate e della costanza delle forniture.

Si effettua il campionamento del mais:

- prima dello scarico della merce, secondo i termini previsti dalla Legge, tramite sonda;
- i campioni prelevati vengono immediatamente portati al laboratorio interno dove viene effettuata l'analisi specifica per evidenziare:

- presenza aflatossina B₁;
- % umidità;
- % impurità;
- % semi rotti.

Aflatossina B₁

Entro 30 minuti si ottengono le risposte delle analisi e quindi qualora il carico fosse idoneo (< 20 ppb) è possibile fare scaricare la merce. Qualora la merce arriva in azienda in orari in cui il laboratorio fosse chiuso, il mais viene fatto scaricare in una apposita buca di scarico e stoccato in attesa del risultato delle analisi. Se la materia prima risultasse non idonea, viene immediatamente rimandata al fornitore.

Le partite di mais inferiori a 3ppb sono destinate in silos specifici per vacche e ovini da latte.

Percentuale di umidità

Se l'indice di umidità è >15% il prodotto viene respinto.

Se la percentuale di umidità è da 13,5 a 15% il prodotto viene destinato a linee soggette a trattamenti fisici (fiocatura, jet-exploder, estrusione etc.).

Se tale parametro è < 13,5 % il prodotto può essere stoccato.

Percentuale di impurità

Il limite di accettazione è < a 2%.

Percentuale di semi rotti

Il limite di accettazione è < a 4%.

In fase di produzione i punti critici sono:

- fariniere (quando vengo impiegate);
- stoccaggio prodotti finiti;
- stoccaggio materie prime.
- In fariniera quando il prodotto permane per un tempo superiore alle 24 ore verifica quantitativa a random del livello di B1.
- Materie prime: con tempi di permanenza sup. a 15gg analisi random contenuto B1.

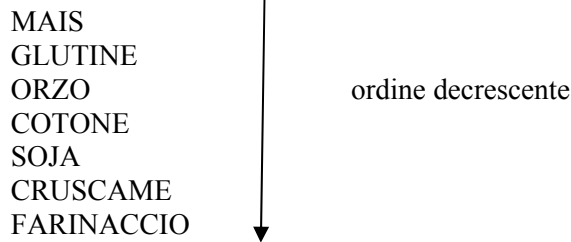
Trasporto prodotti finiti

Avviene la verifica e le pulizie (con eliminazione di eventuali residui) dei mezzi di trasporto al rientro.

Controlli di altre materie prime

Le altre materie prime, usate nella costituzione dei prodotti alimentari ad uso zootecnico, seguono lo stesso iter di controllo del mais con intensità diversa a seconda della frequenza riscontrata più o meno alta di contenuto B₁.

Materie prime ad alta frequenza di B₁



A livello di allevamento

I punti critici a livello di allevamento sono molti e non si presentano ben delineati, di conseguenza è bene procedere ad ispezionare visivamente i vari punti di stoccaggio e quando è necessario confermare con metodo chimico.

Conclusioni

Per garantire prodotti alimentari sicuri si devono dunque adottare azioni preventive. Definire un capitolato d'acquisto delle materie prime e inserire nelle specifiche i limiti per le micotossine in conformità ai limiti di legge; selezionare in maniera oculata i fornitori e conoscere le fonti di approvvigionamento, le condizioni di stoccaggio e i piani di controllo. In funzione del livello di conoscenza del fornitore e dell'origine delle materie prime si devono attuare controlli analitici delle materie prime in entrata, controllare l'impianto e infine anche i prodotti finiti facendo ricorso a metodi analitici ufficiali. Solo da una attenta analisi dei parametri della filiera e con l'attuazione di metodi preventivi si possono ottenere alimenti idonei alla nutrizione animale.

EFFETTO DEL TRATTAMENTO ANTIPIRALIDE SULLA PRESENZA DI TOSSINE IN GRANELLA DI MAIS

Franco Cinti, Silvia Grandi, Mirco Casagrandi

(a) Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali (DiSTA), Università di Bologna

(b) AgriOK SpA, Bologna

Introduzione

Le rosure e le gallerie scavate nelle spighe di mais dalla seconda generazione di piralide (*Ostrinia nubilalis* Hb.) rappresentano delle potenziali vie di accesso per attacchi fungini e perciò condizioni predisponenti per la presenza di aflatossine nella granella (1, 2, 3). Il controllo della piralide può quindi contribuire a contenere lo sviluppo delle micotossine (4, 5, 6, 7).

Lo scopo della ricerca è stato quello di valutare l'efficacia di un trattamento antipiralide abbinato ad un protocollo agronomico a basso rischio per il controllo di micotossine in granella di mais.

Materiali e metodi

Nell'annata 2003, in otto aziende agricole (5 in provincia di Bologna e 1 rispettivamente in quelle di Modena, Ferrara e Mantova), è stata verificata l'efficacia del trattamento con λ -cicalotrina (prodotto commerciale "Karate"), contro la seconda generazione della piralide, su colture di mais da granella condotte secondo il protocollo AgriOK. In definitiva, si tratta dell'applicazione complessiva di "buone norme agronomiche" che prevedono fra l'altro l'esclusione dove possibile del ristoppio, l'utilizzazione di ibridi di ciclo medio, raccolte non troppo ritardate, ecc.

Il trattamento insetticida è stato effettuato intorno alla metà di luglio (in base al monitoraggio dell'insetto con trappole a feromoni e fenilacetaldeide) e impiegando 20 g·ha⁻¹ di principio attivo per ettaro (diluiti in 300-350 litri di acqua e 1 litro di bagnante).

In tutte le aziende si è adottato uno schema a blocchi randomizzati con quattro ripetizioni e parcelle di 800-2000 m². In due aziende del bolognese è stato misurato il livello di infestazione della piralide conteggiando su un campione di 100 spighe quelle attaccate dall'insetto e valutando l'intensità del danno attraverso l'analisi visiva in 3 porzioni (apice, centro, base) di ciascuna spiga.

Alla raccolta in ogni parcella è stato prelevato un campione globale di 30 kg durante lo scarico dell'intera produzione di granella, composto da 100 campioni elementari di 300 grammi. Ogni campione globale, dopo miscelazione, è stato suddiviso in 3 campioni per il laboratorio sul quale è stata determinata la contaminazione con aflatossine (B₁ - B₂ - G₁ - G₂), ocratossina A, fumonisine (B₁ - B₂), deossinivalenolo e zearalenone.

Tutte le determinazioni analitiche sono state effettuate in cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) dopo purificazione degli estratti mediante l'uso di colonnine ad immunoaffinità basate sull'impiego di anticorpi mono o policlonali specifici per ogni micotossina o gruppo di micotossine. Per le aflatossine B₁, B₂, G₁, G₂ è stata effettuata la derivatizzazione post colonna e la determinazione mediante HPLC con rivelatore

spettrofluorimetrico (FLD); per le fumonisine B₁, B₂ è stata effettuata la derivatizzazione pre colonna e la determinazione mediante HPLC/FLD; per l'ocratossina A e lo zearalenone si è proceduto direttamente alla determinazione mediante HPLC/FLD; la determinazione del deossivalenolo è stata effettuata mediante HPLC con un rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi (DAD).

Risultati e discussione

Il trattamento con Karate ha ridotto di oltre il 60% il numero di spighe danneggiate dalla piralide (Figura 1).

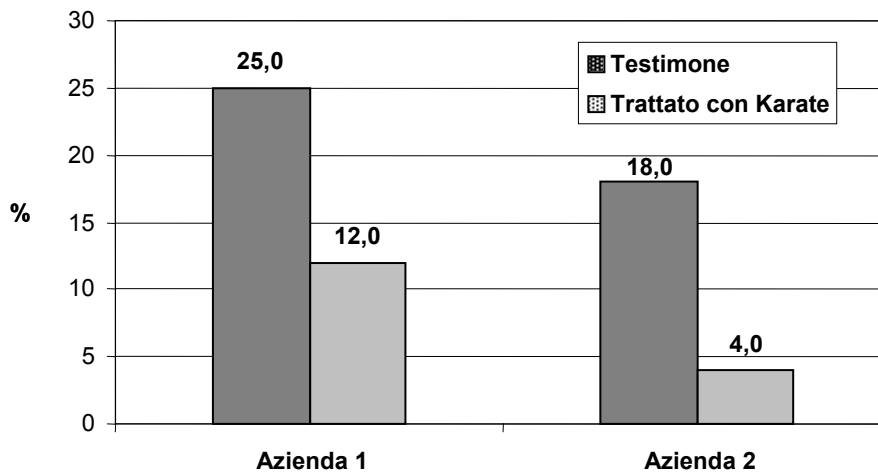


Figura 1. Spighe colpite dalla Piralide (%)

La presenza di aflatossina, in particolare della B₁, è risultata rilevante soltanto in un'azienda (57 ppb), mentre la media generale è risultata di appena 11 ppb (Tabella 1).

Tenuto conto che il 2003 è stata un'annata di elevata contaminazione, questo andamento tenderebbe ad evidenziare l'importanza dell'applicazione di buone tecniche agronomiche per favorire la salubrità della granella.

Il trattamento con Karate non ha evidenziato differenze statisticamente significative nel livello di contaminazione della granella con aflatossine.

La presenza di livelli elevati di ocratossina A è stata rilevata in 3 aziende su 8. Il trattamento con Karate ha determinato una nettissima riduzione (statisticamente significativa per $P \leq 0,05$) della contaminazione con OT-A della granella (da 11,5 a 0,9 ppb, pari ad un calo di oltre il 90%). fumonisine, deossivalenolo e zearalenone sono risultati quasi assenti.

Tabella 1. Aflatossina B₁ e ocratossina A nella granella di mais alla raccolta (ppb)*

Azienda	Aflatossina B ₁		Ocratossina A	
	convenzionale	trattato	convenzionale	trattato
Azienda 1	1,15	0,54	3,29	0,05
Azienda 2	56,81	55,37	30,95	1,86
Azienda 3	4,88	0,36	0,99	0,08
Azienda 4	12,37	4,38	32,52	4,35
Azienda 5	0,70	1,78	0,08	0,20
Azienda 6	11,69	8,09	2,38	0,13
Azienda 7	0,05	0,06	0,19	0,25
Azienda 8	0,05	0,05	21,28	0,58
Media **	10,96	8,83	11,46	0,94

* µg kg⁻¹ al 12% di umidità

** valori medi di 4 ripetizioni x 2 repliche

Conclusioni

Il trattamento con Karate si è rivelato efficace per contenere l'infestazione della piralide con evidenti benefici anche nel contenimento della presenza di ocratossina A, mentre per quanto riguarda la contaminazione con aflatossine, visto il basso valore registrato nel testimone non trattato in 7 casi su 8, non si è in grado di fornire elementi sufficientemente probatori.

Ringraziamenti

Ricerca condotta nell'ambito della convenzione "Alma Mater Studiorum Università di Bologna e Granarolo S.p.A."; responsabile scientifico: Prof. Mauro Vecchietini.

Bibliografia

1. Pietri A. Micotossine la situazione odierna in Italia. Rivista di avicoltura 1998; (1/2):32-38.
2. Piva G, Pietri A, Masoero F, Moschini M. Micotossine e allevamento bovino. In: Congresso Nazionale, Piacenza (Italy), May 1998. Atti-della-Societa-Italiana-di-Buiatria. 1998;30:9-42.
3. Piva G, Pietri A. Le micotossine: origine, diffusione e rischi per il consumatore. In: Giornata buiatria: micotossine e micotossicosi in buiatria, Caltanissetta (Italy), 9 dicembre 2000. Atti della Società Italiana di Buiatria 2001; 33: 403-411.
4. Fennell DI, Lillehoj EB, Kwolek WF, Guthrie WD, Sheeley R, Sparks AN, Widstrom NW, Adams GL. Insect larval activity on developing corn ears and subsequent aflatoxin contamination of seed. Journal of Economic Entomology 1978; 71 (4): 624-628.
5. Rodriguez JG, Patterson CG, Potts MF, Poneleit CG, Beine RL. Role of selected corn insects and plant stress in aflatoxin production in Kentucky corn. Transactions of the Kentucky Academy of Science 1984; 45 (3-4), 138-143.
6. McMillian WW, Widstrom NW, Wilson DM. Impact of husk type and species of infesting insects on aflatoxin contamination in preharvest corn at Tifton, Georgia. Journal of Entomological Science 1987; 22 (4): 307-310.
7. Gorman DP, Kang MS. Preharvest aflatoxin contamination in maize: resistance and genetics. Plant Breeding 1991; 107 (1): 1-10.

INDAGINE POLIENNALE SULLE CARATTERISTICHE QUALITATIVE E IGIENICO-SANITARIE DELLE GRANELLE COMMERCIALI DI MAIS

Carla Corticelli, Alberto Verderio

(a) Associazione Interprofessionale Cerealicola (ASS.IN.CER), Bologna

(b) Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Sezione di Bergamo

ASS.IN.CER., dal 1996 intende rappresentare il punto di riferimento per gli operatori della filiera cerealicola, attraverso l'attivazione e il mantenimento della rete di sinergie tra il mondo della ricerca e gli operatori. Attraverso una vasta rete di contatti e collaborazioni con Università e Istituzioni regionali, nazionali ed europee analizza le caratteristiche della filiera e promuove la comunicazione e la diffusione di informazioni e di strumenti innovativi indispensabili per la valorizzazione della qualità e della competitività nazionale. Tra le proprie attività ASS.IN.CER. realizza indagini per aumentare la trasparenza del comparto cerealicolo per fornire agli operatori strumenti adeguati di pianificazione delle attività; azioni divulgative per trasferire le informazioni dal mondo della ricerca agli operatori (convegni e meeting su conservazione e stoccaggio cereali, HACCP, UNI, contaminanti, OGM, micotossine, tracciabilità); realizza progetti di ricerca e sperimentazione e informazione in collaborazione con Istituti Sperimentali e di ricerca.

Il monitoraggio delle caratteristiche qualitative e igienico sanitarie delle partite di mais da granella, realizzato da ASS.IN.CER. in collaborazione con il Consiglio Ricerche in Agricoltura (CRA) e la Direzione Generale Agricoltura della Regione Lombardia si è rilevato di notevole utilità poiché per la maiscoltura italiana è di fondamentale importanza avere un quadro di riferimento della qualità e della salubrità delle partite di mais prodotte nel nostro Paese, al fine di valutare l'opportunità di attivare strategie preventive al fine di programmare in modo più efficace la propria produzione in funzione del mercato.

Il campionamento

L'indagine è stata condotta in circa 60 centri di essiccazione-stoccaggio che complessivamente detenevano circa l'8% dell'intera produzione nazionale.

Il campionamento degli impianti è stato effettuato per:

- posizione geografica: sono stati scelti impianti omogeneamente distribuiti nelle regioni maidicole quali Piemonte, Lombardia, Veneto, Emilia Romagna e Friuli Venezia Giulia;
- capacità di stoccaggio: la preferenza è ricaduta su impianti di dimensioni medie e medio grandi, in quanto più rappresentativi delle produzioni del proprio bacino di raccolta;
- caratteristiche tecniche degli impianti (essiccazione, stoccaggio, movimentazione) desunte da precedenti indagini condotte dall'Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, dall'Assincer e dall'Istituto di Economia Agraria dell'Università di Parma;
- disponibilità alla collaborazione da parte dei gestori: manifestata come interesse all'indagine e partecipazione alle operazioni di campionamento.

Il campionamento del prodotto entro gli impianti

Ai centri di stoccaggio è stato richiesto di suddividere il prodotto conservato in lotti, generalmente coincidenti con le unità di contenimento (silos e platee).

La derivazione dei campioni di granella dei vari lotti è stata attuata con “metodi di campionamento dinamico” da prodotto in movimento generalmente durante le operazioni di carico degli autotreni in uscita oppure in occasione di movimentazioni interne: in un primo momento è stato composto un pre-campione di circa 5-10 kg, successivamente, con metodi di *sample sorter* (mantenendo la rappresentatività del prodotto), è stato derivato un campione finale di 1,5-2 kg.

Per gestire meglio il notevole numero di campioni e per la tutela della riservatezza, si è provveduto ad attribuire un codice di codifica a ciascun impianto, unito successivamente al numero identificativo di ogni singolo campioni di granella e avere così una completa tracciabilità degli stessi.

Su 300 campioni sono state realizzate diverse analisi qualitative tra cui: umidità, peso ettolitrico, prodotto > 6 mm, granella integra > 4,8 mm, indice di microfessurazione (SCI), aflatoxina B₁, fumonisina B₁, deossinivalenolo e ocratossina.

Commento ai risultati

I dati sulla contaminazione da micotossine nelle partite di mais della produzione 2003 vanno considerati in relazione all’eccezionalità dell’annata, caratterizzata da temperature significativamente al di sopra della media e da precipitazioni significativamente al di sotto della media: ciò ha comportato un aumento dell’incidenza delle cosiddette tossine “da caldo”, cioè aflatoxina e fumonisina (Tabella 1).

Per quanto riguarda l’aflatoxina B₁ è importante sottolineare come gli inconvenienti rilevati nella produzione del latte siano imputabili ad un 10% di produzione con valori di concentrazione superiori a 20 ppb e parzialmente ad un 17% di produzione con valori superiori a 10 ppb; le medie nazionali sono al limite delle indicazioni di legge.

Per quanto riguarda la fumonisina B₁, i dati del 2003 confermano come tale tossina possa considerarsi endemica dell’area di produzione maidicola italiana; da notare come una significativa quota dei campioni analizzati abbia una concentrazione di fumonisina B₁ maggiore di 6000 ppb; migliore la situazione per DON (deossinivalenolo) e ocratossina.

Tabella 1. Concentrazione delle micotossine, produzione 2003

Micotossine	Italia	Lombardia	Emilia Romagna	Veneto	Piemonte	Friuli VG
Aflatoxina B1 (ppb)	5,98	6,69	11,91	6,40	4,40	1,41
Fumonisin B1 (ppb)						
Campioni >6000 ppb (%)	44%	58%	33%	47%	20%	32%
Media dei rimanenti	3140	3570	4390	2580	2450	3060
DON (ppb)	186	202	153	189	n.d.	n.d.
Ocratossina (ppb)	1,3	0,3	3,9	0,7	3,9	0,2

Nota: I dati riportati in Tabella esprimono una media.

Fonte: Regione Lombardia – C.R.A. Consiglio Ricerche in Agricoltura ex Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura - Sezione di Bergamo.

Umidità di conservazione

L'umidità di conservazione è un prerequisito fondamentale di stabilità del prodotto, di conservabilità per la stagione di consumo e di sanità rispetto alle infezioni fungine e alla contaminazione da micotossine.

Da notare (Tabella 2) come l'umidità media sia costantemente diminuita fino ad assestarsi su valori prossimi al 13% (13,6% nel 1999; 13,3% nel 2000; 13,0% nel 2002; 13,1% nel 2003) e come la media nazionale sia sempre risultata inferiore all'umidità di riferimento del Contratto Italiano per Granoturco Nazionale n. 103 in vigore (15% fino al 2001 e 14% dal 2001 in poi); evidentemente le condizioni di temperatura-umidità della Valle del Po e le caratteristiche tecnologiche delle strutture di stoccaggio esistenti hanno imposto una scelta obbligata anche se onerosa (necessità di energia addizionale) e con qualche effetto negativo su microfessurazioni e rotture. Non si evidenziano differenze significative nelle regioni di produzione.

Peso ettolitrico

Tale parametro esprime il rapporto tra endosperma vitreo e farinoso: pesi ettolitrici elevati sono preferiti per le trasformazioni food e altri tipi di impiego. In Tabella 2 si può notare come nei 4 anni di indagine gli effetti della stagione di coltivazione siano stati limitati (75,9 nel 1999; 76,5 nel 2000; 75,2 nel 2002; 76,4 nel 2003); da registrare la diminuzione di 0,9 punti percentuali nel 2002 rispetto alla media del quadriennio, che compare costantemente in tutte le regioni di produzione e non pensiamo quindi sia casuale o dovuta a dissimmetrie di campionamento. In Tabella 2 si possono inoltre notare differenze di ridotta entità ma costanti nelle diverse annate tra le diverse regioni (in Lombardia e Piemonte si registrano i valori più alti): tali differenze appaiono imputabili principalmente alla genetica degli ibridi prevalenti nelle aree considerate, più tardivi e a tessitura più compatta in Lombardia e Piemonte, più precoci a tessitura più farinosa in Emilia Romagna e nella parte bassa del Friuli, dov'è ubicata una buona quota degli impianti conferenti della regione.

Il valore medio delle produzioni italiane (76) è nettamente superiore a quello registrato dalle produzioni USA, con valori di 72-73.

Prodotto +6 mm

È la quota di prodotto trattenuto da un crivello con fori di 6 mm e rappresenta una misura complessiva, molto diretta e di semplice determinazione, del grado di integrità fisico-meccanica e di omogeneità per la dimensione dei costituenti della partita in esame. Il carattere è particolarmente apprezzato dai molini in quanto correlato con l'integrità del prodotto e la conseguente resa in gritz e anche dall'amideria in quanto correlato con l'uniformità di dimensione dei componenti, carattere favorevole nel processo di macerazione.

Da notare (Tabella 2) come i valori medi nazionali siano poco variabili negli anni di indagine 1999, 2000 e 2002 (rispettivamente 76,3%, 75,6% e 76,8%) mentre nel 2003, annata eccezionale per drought stress (caldo torrido e siccità) viene puntualmente registrata una diminuzione significativa del parametro (62,3%), fortemente correlata al calo delle rese verificatosi.

Da notare alcune differenze "consistenti" negli anni, ad esempio tra le partite prodotte in Emilia Romagna (valore del parametro 69%) e quelle prodotte in Lombardia (valore del parametro 78,9%) dovute presumibilmente alla diversa lunghezza del ciclo degli ibridi coltivati e ad un diverso grado di stress "normale" per le due aree.

Granella integra + 4,8 mm

È la quota percentuale di prodotto costituita da cariossidi intere non danneggiate da muffe o da altri agenti biologici, fisici o chimici; costituisce un'ulteriore misura di integrità del prodotto, apprezzata soprattutto dall'industria molitoria.

I valori ottenuti per le produzioni italiane sembrano buoni, (Tabella 2) con valori medi di 83,8% nel 1999, di 87,9% nel 2000, di 86,4% nel 2002 e di 87,4% nel 2003.

Non si notano differenze significative tra le diverse aree di coltivazione, qualche differenza è invece rilevabile tra anni di coltivazione, in particolare un calo nel 1999, in cui la stagione di raccolta era risultata molto breve e le mietitrebbie erano intervenute su mais molto secchi.

Indice di microfessurazione (SCI)

È un indice delle microfessurazioni rilevate nell'endosperma, dovute fondamentalmente alle tensioni della struttura amidacea durante i processi di essiccazione (repentini riscaldamenti e raffreddamenti, evaporazione dell'acqua). La presenza di microfessurazioni diminuisce la resa in gritz di pregio, predispone il prodotto ad ulteriori rotture lungo le filiere commerciali ed è un indice di cattiva separabilità dell'amido dalle proteine per la denaturazione che queste ultime subiscono con temperature di essiccazione elevate.

Le oscillazioni del valore corrispondente al carattere tra gli anni (Tabella 2a, b, c, d) indicano un notevole effetto della stagione di crescita, in termini di durata del periodo di raccolta e di umidità alla raccolta: nel 1999 (stagione di raccolta breve, granella secca in campo) si è avuto un valore elevato (178,7), nel 2000 (stagione di raccolta lunga e regolare ad umidità media) un valore intermedio (146,7), nel 2002 (stagione di raccolta molto lunga con frequenti interruzioni per le piogge e granella umida) il valore più alto (233,3), nel 2003 (stagione di raccolta media, granella raccolta molto secca) il valore più basso (120,4). Gli effetti dell'area di coltivazione non sono di sostanziale entità e altrettanto "confusi" per evidenti interazioni con l'anno di coltivazione.

Tabella 2a. Risultati medi delle analisi qualitative relative all'anno 2003

Caratteri anno 2003	Italia	Lombardia	Emilia Romagna	Veneto	Piemonte	Friuli V. Giulia
Campioni (n.)	305	74	24	108	64	35
Umidità (%)	13,1	13,3	12,8	13,2	12,3	13,5
Peso ettolitrico (kg/hl)	76,4	77,7	75,2	75,9	77,1	75,2
Prodotto +6 mm (%)	62,3	67,9	58,9	58,8	63,0	62,7
Granella integra + 4.8 mm (%)	87,4	87,2	88,5	87,2	87,4	87,5
Indice di microfessurazione SCI	120,4	126,1	91,3	99,2	154,6	134,2

Tabella 2b. Risultati medi delle analisi qualitative relative all'anno 2002

Caratteri anno 2003	Italia	Lombardia	Emilia Romagna	Veneto	Piemonte	Friuli V. Giulia
Campioni (n.)	883	182	111	240	194	156
Umidità (%)	13,0	13,2	12,9	12,9	13,1	12,8
Peso ettolitrico (kg/hl)	75,2	76,2	74,7	75,5	74,7	74,5
Prodotto +6 mm (%)	76,8	79,1	73,2	79,2	71,0	80,2
Granella integra + 4.8 mm (%)	86,4	88,1	85,2	86,4	87,0	86,4
Indice di microfessurazione SCI	233,3	235,6	223,6	242,6	221,1	238,2

Tabella 2c. Risultati medi delle analisi qualitative relative all'anno 2000

Caratteri anno 2003	Italia	Lombardia	Emilia Romagna	Veneto	Piemonte	Friuli V. Giulia
Campioni (n.)	370	131	22	166	31	20
Umidità (%)	13,3	13,2	13,3	13,4	13,5	13,6
Peso ettolitrico (kg/hl)	76,5	77,2	75,3	76,2	76,3	75,8
Prodotto +6 mm (%)	75,6	76,1	69,6	75,7	76,1	76,7
Granella integra + 4,8 mm (%)	87,9	87,1	87,6	88,4	86,6	89,3
Indice di microfessurazione SCI	146,7	178,3	133,8	126,5	124,8	154,9

Tabella 2d. Risultati medi delle analisi qualitative relative all'anno 1999

Caratteri anno 2003	Italia	Lombardia	Emilia Romagna	Veneto	Piemonte	Friuli V. Giulia
Campioni (n.)	868	433	60	261	96	18
Umidità (%)	13,6	13,7	13,6	13,7	13,3	13,5
Peso ettolitrico (kg/hl)	75,9	76,5	74,5	75,1	76,8	74,7
Prodotto +6 mm (%)	76,3	79,1	63,5	75,2	74,7	76,7
Granella integra + 4,8 mm (%)	83,8	83,7	86,7	82,7	85,1	85,0
Indice di microfessurazione SCI	178,7	158,9	187,0	191,9	218,0	228,5

Fonte: Regione Lombardia – C.R.A. ex Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura - Sezione di Bergamo.

APPROCCIO EPIDEMIOLOGICO ALLO STUDIO DELLE CONTAMINAZIONI DA AFLATOSSINE B₁ E M₁ NEL SISTEMA DI ALLEVAMENTO DEL BOVINO DA LATTE

Pier Paolo Danieli, Gilberto Giangolini, Domenico Giontella, Umberto Bernabucci e Bruno Ronchi

(a) *Dipartimento di Produzioni Animali - Università degli Studi della Tuscia, Viterbo*

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma*

Introduzione

L'intensificarsi dei controlli di legge evidenzia una presenza diffusa delle contaminazioni da aflatoossina B₁ (AFB₁) negli alimenti per bovini da latte e di aflatoossina M₁ (AFM₁) nel latte, fattore questo che pregiudica la salubrità delle produzioni del comparto lattiero-caseario. In particolare il recente periodo 2003/2004 si è rivelato critico sotto il profilo della diffusa e talora intensa presenza di tali contaminanti lungo la filiera agro-zootecnica per la produzione di latte (1, 2) strettamente correlata alla qualità degli stocks maidicoli prodotti nel 2003 (3). Sebbene per le produzioni cerealicole, siano reperibili in letteratura diversi lavori inerenti studi basati su approcci di tipo epidemiologico, pochi sforzi sembrano essere stati investiti nel settore agro-zootecnico per la produzione di latte, tutt'altro che secondario per rilevanza socio-economica e le implicazioni sulla salute umana. In tale contesto, gli obiettivi dello studio sono:

- indagare la distribuzione della contaminazione da AFM₁ nel latte e da AFB₁ negli alimenti (unifeed) in una campione di allevamenti di bovini da latte della Regione Lazio;
- stimare il trasferimento delle tossine dagli alimenti ai prodotti animali (latte);
- individuare eventuali fattori, legati alla tipologia e alla gestione aziendale, causa della variabilità nei livelli di contaminazione riscontrati.

Materiali e metodi

La metodologia applicata, si compone di tre fasi di cui la prima, essenzialmente di campo, ha previsto la raccolta di campioni di latte e mangimi e delle informazioni relative al contesto e alla gestione aziendale; la seconda, di laboratorio, ha comportato lo sviluppo e la validazione dei metodi analitici e l'esecuzione delle analisi mentre la terza fase è consistita nella elaborazione dei dati analitici e del quadro informativo aziendale al fine di metterne in luce l'entità e l'estensione della problematica e i fattori che (almeno in via potenziale) possono essere posti in relazione causale.

Piano sperimentale e ambito dell'indagine

Campioni di unifeed e di latte sono stati raccolti durante tre campagne di prelievi negli anni 2002 e 2003 in alcuni allevamenti del Lazio scelti casualmente di cui: 10 in provincia di Latina, 10 in provincia di Viterbo e 16 in provincia di Roma. Contestualmente, sono state raccolte le informazioni relativamente a:

- quadro generale dell'azienda (località, coordinate geografiche, estensione)
- numero di capi in lattazione e livello produttivo
- entità della razione giornaliera
- composizione quali/quantitativa della razione
- utilizzo di integratori, sequestranti, medicinali.

Allo scopo sono state predisposte delle schede/intervista per la cui messa a punto sono stati tenuti in conto la completezza del quadro informativo acquisibile e la semplicità di compilazione. Il piano dei campionamenti (Tabella 1) ha previsto 3 periodi, primavera-estate 2002, inverno 2002 e primavera-estate 2003 con la raccolta, per singola azienda e per periodo, di repliche campionarie di latte crudo di massa e di alimenti.

Tabella 1. Piano dei campionamenti di latte e alimenti per bovini da latte svolti nelle aziende incluse nell'indagine epidemiologica

Provincia	Periodo del campionamento	Latte di massa	Alimenti (<i>unifeed</i>)
Latina	giu 2002 dic 2002 apr 2002	30 campioni in totale (2 repliche/campione)	30 campioni in totale (2 repliche/campione)
Roma	ago 2002 nov 2002 mag-giu 2002	48 campioni in totale (2 repliche/campione)	48 campioni in totale (2 repliche/campione)
Viterbo	giu 2002 dic 2002 giu 2003	30 campioni in totale (2 repliche/campione)	30 campioni in totale (2 repliche/campione)

Per quanto riguarda la numerosità e la distribuzione territoriale delle aziende coinvolte nell'indagine, si è tenuto conto del contesto produttivo di settore del Lazio (4) (Tabella 2). In particolare i 3616 animali in lattazione raggiunti mediante il piano dei campionamenti, rappresentano il 4,6% del totale degli animali da latte allevati nelle cinque province laziali.

Tabella 2. Consistenza dell'indagine in termini di numerosità degli allevamenti, dei capi in lattazione e degli indicatori "n. capi/azienda" e "n. capi/SAU riferiti alla situazione del Lazio

	Studio				Lazio
	Latina	Roma	Viterbo	Totale	
Numero aziende	10	16	10	36	3522
Capi in lattazione	559	2552	505	3616	77817
Capi lattaz. (media aziendale)	56	160	51	100	23
Capi lattaz./SAU* (media)	4,5	2,4	1,9	2,9	1,5

*Superficie Agricola Utile

Campionamento

Il campionamento è stato condotto con particolare riferimento a quanto riportato nelle normative vigenti (5). Nel dettaglio, la raccolta dei campioni di latte è stata effettuata, prima del conferimento, direttamente dal tank aziendale refrigerato. Prima del prelievo, la massa latteica è stata mantenuta in agitazione per 20 minuti e ne sono stati quindi prelevati, in punti differenti

della massa, 5 campioni elementari da 0,3 L mediante mestolo a manico lungo in acciaio inox. I campioni elementari sono stati riuniti entro un contenitore graduato e due aliquote da 250 mL sono state trasferite entro contenitori in HDPE a tenuta ermetica. I barattoli sono stati quindi opportunamente siglati con i riferimenti aziendali, la provincia e la data del prelievo. Per gli alimenti, la raccolta dei campioni da sottoporre ad analisi è stata effettuata direttamente in mangiatoia dopo lo scarico dell'unifeed dal carro miscelatore. Per ogni carico del carro miscelatore (considerato una partita di alimenti da campionare), sono stati prelevati, mediante pala a fondo piatto in materiale plastico, 8 campioni elementari del peso di 0,5 kg in punti diversi e quindi riuniti su di un telone cerato di dimensioni adeguate per consentirne una perfetta miscelazione. Dalla massa di unifeed omogeneizzata, è stato prelevato un campione finale di ca. due chilogrammi in buste di polietilene siglate con i riferimenti dei relativi campioni di latte di massa. Tanto i campioni di latte quanto di mangime, immediatamente dopo il prelievo e fino alla consegna in laboratorio, sono stati mantenuti a +4°C entro cassette adiabatiche refrigerate. Per il periodo intercorso tra il prelievo e l'analisi, s'è provveduto allo stoccaggio in condizioni di congelamento (-20°C).

Pre-trattamento dei campioni

Prima di essere sottoposti ai processi analitici, i campioni di latte, sono stati scongelati in bagno termostato a 37°C (temperatura del campione allo scongelamento: 0 °C < T < +4 °C), aliquotati in tubi da centrifuga da 50 mL e sottoposti a scrematura per centrifugazione (condizioni di lavoro: 15 min a 1500*g alla temperatura di +4 °C). La frazione lipidica è stata quindi eliminata e la fase acquosa processata. I campioni di unifeed sono stati scongelati ed essiccati in stufa ventilata alla temperatura di 60°C fino a peso costante (normalmente raggiunto entro le 72 ore). Durante l'essiccazione, è stata determinata l'umidità reale dei campioni per via gravimetrica. Subito dopo l'essiccazione si è proceduto alla macinazione mediante mulino a martelli equipaggiato con griglia da 1 mm. Del campione globale finemente macinato e omogeneizzato manualmente, sono state tratte due aliquote da ca. 150 g conservate entro contenitori a chiusura ermetica per le successive analisi.

Metodiche analitiche

Per le analisi di concentrazione delle aflatossine, s'è fatto ricorso esclusivamente alla metodica IAC-HPLC, ritenuta alla luce delle informazioni disponibili (6)(7) e della esperienza maturata, più accurata e affidabile. Per la pre-purificazione del latte e degli estratti di alimento, sono state impiegate colonnine d'immunoaffinità AFLATEST WB[®] specifiche per le aflatossine (VICAM, Watertown, MA, USA) e validate sia nel caso del latte che delle matrici solide. Il sistema HPLC utilizzato (SpectraSystem, Thermo Separation Products, Riviera Beach, FL, USA) era composto da un Vacuum Membrane Degaser SCM1000, da una pompa quaternaria Gradient Pump P4000 e da un fluorimetro Fluorescence Detector FL3000. Per l'iniezione dei campioni, il sistema era equipaggiato con una valvola d'iniezione a sei vie Rheodyne 7125NS (Rheodyne, L.P. – Rohnert Park, CA, USA) dotto di un loop di caricamento da 100µl. Per la gestione del sistema cromatografico è stato impiegato il pacchetto software ChromQuest[™] 3.0 (TermoQuest, Inc. San Jose CA, USA) che gira su OS Windows NT Workstation 4.0 (Microsoft Corporation, USA). I reagenti e i solventi utilizzati, tutti di grado HPLC o per analisi in tracce, se non diversamente indicato, sono stati acquistati da Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany.

Aflatossina M₁

Quaranta millilitri di latte sgrassato, sono stati filtrati su fibra di vetro Whatman 934AH (Whatman International LTD, Maidstone England) e, del filtrato, 30 mL sono stati purificati per immunoaffinità ad un flusso di 1-2 gocce per secondo. Il percolamento del campione è normalmente avvenuto per gravità salvo rari casi in cui è stato necessario generare a valle delle colonnina una leggera depressione (600 mmHg) per sostenere il deflusso. Al termine, la colonnina è stata lavata per due volte con 10 mL di acqua ultrapura (conforme Standard ASTM Type I: Cond. Spec. <0,055 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}$). L'aflatossina M₁ è stata eluita con 1,6 mL di metanolo (MetOH), dispensato in due aliquote successive da 0,8 mL separate da un intervallo di 1 min'. Il purificato è stato raccolto in vials da 2 mL ed essiccato in leggera corrente d'azoto per analisi (Rivoira-Italy) alla temperatura di 37°C. Il purificato è stato quindi ripreso in 400 μL di fase mobile e 100 μL iniettati in HPLC (in doppia replica). Per la separazione è stata usata una colonna Discovery[®] C-18, 150 x 4,6 mm, 5 μm (Supelco, Supelco Park Bellafonte, PA, USA) che ha consentito di ottenere valori elevati di efficienza e risoluzione con tempi di ritenzione modesti: RT per la molecola di circa 5,0 min'. Il metodo cromatografico per l'AFM₁ è stato ottimizzando alle seguenti condizioni: eluizione isocratica con fase mobile binaria MetOH/H₂O (45:55), flusso 1 mL/min'; detector fluorimetrico λ_{ecc} 360 nm e λ_{em} 440 nm, fotomoltiplicatore a 800V. Il controllo del recupero del metodo per l'aflatossina M₁ in matrice, è stato effettuato utilizzando una materiale standard certificato (CRM No. 283, AFM₁ LOW LEVEL; Commission of the European Communities – Community Bureau of Reference) il cui tenore è pari a 0,09 ng/g sulla matrice tal quale. La ricostituzione del CRM è stata condotta secondo le indicazioni del rapporto di certificazione (8) e in breve: il latte in polvere è stato diluito con acqua (10 grammi portati a 100 mL finali) aggiungendo dapprima poca acqua ultrapura alla temperatura di ca. 70 °C, agitando con stirrer magnetico per 10 min e quindi portando a volume. In tal caso la concentrazione di AFM₁ nel latte ricostituito è pari a 0,009 ppb. Le prove eseguite hanno fornito indicazione di un buon recupero dell'intero processo analitico stimabile in $0,96 \pm 0,04$ (Media \pm DS, n. 6). Per la determinazione del limite di quantificazione sono state effettuate repliche di calibrazione in matrice (n. 4) su aliquote di due differenti campioni di latte intero reperito in commercio dei quali ne era stata precedentemente accertata l'assenza di AFM₁. I campioni sono stati sottoposti a fortificazione per i livelli 0 ppt, 5 ppt, 20 ppt, 50 ppt, 75 ppt e 100 ppt; tutte le aliquote fortificate sono quindi state analizzate in doppio secondo il protocollo ottimizzato e le aree dei picchi relativi all'AFM₁, plottate contro i rispettivi valori teorici di contaminazione. Il modello di regressione lineare ottenuto $y = 182,53x - 124,35$, risulta sostanzialmente lineare con una varianza spiegata maggiore del 99,7%; i limiti di rivelabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) stimati per il metodo secondo le norme DIN (9), sono risultati rispettivamente 1,6 ngAFM₁/kg e 5,0 ngAFM₁/kg. La ripetibilità delle metodica per l'AFM₁ è stata valutata mediante analisi di campioni di latte intero due dei quali naturalmente contaminati (provenienti dalla sperimentazione) e uno fortificato al livello di 80 ppt (latte intero fresco reperito in commercio). I risultati delle prove (Tabella 3), indicano un buon grado di ripetibilità del metodo compatibile con quanto riportato da AOAC (10).

La quantificazione è stata eseguita mediante la tecnica dello standard esterno, confrontando l'area del picco del campione con una calibrazione lineare a sei livelli: 16,0, 8,0, 4,0, 2,0, 1,0 e 0,5 ngAFM₁/mL all'iniezione (213, 107, 53, 27, 14 e 7 ppt equivalenti campione). Intercetta e pendenza del modello di regressione sono state impiegate per stimare la concentrazione dell'AFM₁ nei campioni e nel CRM.

Tabella 3. Risultati delle prove di ripetibilità per l'aflatossina M₁

	Latte 1* (n. 6)	Latte 2* (n. 4)	Latte 3** (n. 3)
Media	10,5	40,5	81,5
DS	0,5	2,1	3,1
CV%	5,2%	5,1%	3,8%

* Latti naturalmente contaminati.

** Latte commerciale esente da contaminazione fortificato al livello 80 ppt.

Aflatossina B₁

Per l'identificazione e la quantificazione delle aflatossine nei campioni di unifeed, è stato messo a punto un protocollo composto da una fase di estrazione, una fase di clean-up, una fase di derivatizzazione precolonna e una separazione-quantificazione mediante RP-HPLC con rivelazione fluorimetrica. In dettaglio, 50 g di campione finemente macinato, sono stati sottoposti ad estrazione per sbattimento con 150 mL di soluzione estraente MetOH/H₂O (80:20) al 10% (p/v) di NaCl per 30 min in beuta Herlenmayer da 300 mL dotata di tappo e avvolta da pellicola d'alluminio per schermare il contenuto dalle sorgenti di radiazione luminosa. L'estratto filtrato su carta Whatman N.1 (Whatman International LTD, Maidstone England) è stato diluito con acqua ultrapura (diluizione 1 + 4) e filtrato su fibra di vetro Whatman 934AH (Whatman International LTD, Maidstone England). Venti millilitri sono stati eluiti attraverso le colonnine di immunoaffinità ad un flusso controllato di 1-2 gocce al secondo. Dopo una fase di lavaggio con 10 mL d'acqua le aflatossine sono state recuperate per denaturazione degli anticorpi eluendo con 1,6 mL di MetOH grado HPLC dispensato in due aliquote successive da 0,8 mL separate da un intervallo di 1 min'. Il purificato è stato sottoposto ad essiccazione sotto leggero flusso d'azoto per analisi (Rivoira-Italy) a temperatura ambiente in condizioni di luce controllata. Prima dell'analisi HPLC, il purificato essiccato è stato derivatizzato con 200 µl di TFA, lasciato reagire per 15 min al buio e a temperatura ambiente. Nuovamente essiccato in corrente d'azoto e ripreso con 0,4 mL di fase mobile, 100 µl di derivatizzato sono stati quindi iniettati in HPLC. Per la separazione, in isocratica, delle aflatossine è stata utilizzata una colonna Luna C18(2) 250 x 4.6 mm, 5µm (Phenomenex® Torance, CA USA) e fase mobile binaria MetOH/H₂O (45:55) ad un flusso di 1,1 mL/min. La detezione fluorimetrica delle aflatossine è stata effettuata lavorando alle seguenti lunghezze d'onda: $\lambda_{ecc} = 360$ nm, $\lambda_{em} = 440$ nm. Il recupero per l'aflatossina B₁ in matrice, è stato valutato analizzando un materiale standard certificato (CRM No. 376, AFB₁ in Compound Feed; Commission of the European Communities – Community Bureau of Reference) il cui tenore certificato è $9,3 \pm 0,5$ µg/kg sulla matrice tal quale. Le prove (in totale 8) condotte nell'arco di alcuni mesi hanno rivelato un recupero pari a $0,75 \pm 0,06$ (Media±DS). Sebbene non particolarmente elevato, tale valore può essere considerato soddisfacente alla luce delle prescrizioni normativa in materia di controlli ufficiali per la tossina (5). Il limite di rilevabilità del metodo è stato stimato mediante fortificazione di due campioni di insilato di mais esenti da contaminazioni. I risultati sono sintetizzati nella Tabella 4.

Nel range delle concentrazioni testate, la relazione area/concentrazione si è mantenuta lineare con una percentuale della varianza spiegata dai modelli sempre superiore al 99,7% . Per la quantificazione dell'AFB₁ è stata stimata la precisione del metodo, in termini di ripetibilità, analizzando due differenti campioni di unifeed naturalmente contaminati, e un campione di granella mais esente da contaminazioni e fortificato a 10 ppb (Tabella 5).

Tabella 4. Calibrazioni in matrice per le aflatossine presenti nei mangimi e stima dei limiti di rilevabilità e quantificazione

	Modello lineare area/concentrazione	r ²	LOD (ppb)	LOQ (ppb)
AFB1	y = 1195,4x + 535,1	0,9985	0,12	0,38
AFB2	y = 3072,1x + 340,6	0,9972	0,06	0,19
AFG1	y = 110,2x + 57,9	0,9981	0,11	0,35
AFG2	Y= 4943,5x + 149,5	0,9989	0,03	0,10

Tabella 5. Risultati delle prove di ripetibilità per l'AFB₁

	Unifeed 1* (2 ppb)	Unifeed 2* (4 ppb)	Mais** (10ppb)
Media	2,1 (n. 4)	3,9 (n. 4)	8,7 (n. 3)
DS	0,2	0,2	0,6
CV%	8,4%	6,1%	6,4%

* Campioni di unifeed naturalmente contaminati da AFB₁.

** Campione di farina di mais fortificato.

Il rapporto massimo tra la deviazione standard dei risultati analitici e il loro valore medio da AFB₁ (CV%), corrispondente a 8,4% nel caso del livello di contaminazione inferiore, risulta compatibile con i risultati ottenuti da esercizi interlaboratorio riportati da AOAC (11) e ISO (12) per l'AFB₁ in mais e mangimi. L'analisi HPLC dei campioni è stata eseguita mediante la tecnica dello standard esterno, confrontando l'area del picco del campione con una calibrazione lineare a sette livelli 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0, 16,0 ugAFB₁/kg. La calibrazione è stata condotta per ogni batch di campioni e CRM da analizzare mediante interpolazione lineare con calibratori preparati a partire da una Stock Solution di aflatossine in acetonitrile (Aflatoxin Mixture in Acetonitrile, LGC Promochem, Wesel-Germany). La regressione area del picco/concentrazione dello standard ha sempre mantenuto buone caratteristiche di linearità con coefficienti di determinazione (r²) sempre superiori a 0,998. Intercetta e pendenza sono state impiegate per stimare la concentrazione delle aflatossine nei campioni e CRM.

Analisi statistica

La trattazione statistica dei risultati è stata effettuata ricorrendo alle metodologie disponibili nel package STATISTICA (Stat-Soft Inc.). La verifica della normalità delle distribuzioni dei dati è stata condotta applicando il test di Wilks & Shapiro (13). Per i dati la cui distribuzione si discostava sensibilmente dalla normale, e per i quali non è stato possibile ottenere una normalizzazione ricorrendo a semplici trasformazioni matematiche (logaritmica, elevazione a potenza), s'è ricorso a tecniche inferenziali non parametriche quali il Test H di Kruskal-Wallis e la correlazione per i ranghi "R" di Sperman. Nel caso di applicabilità degli analoghi test parametrici (Analisi della varianza di Fisher, Momento prodotto di Pearson), questi test mostrano una potenza/efficienza pari o superiore al 90%, presentando tuttavia il vantaggio di non imporre particolari vincoli alla distribuzione dei dati da analizzare (14). Per descrivere graficamente i diversi set (classi) per cui sono state riscontrate differenze statisticamente significative nei valori di contaminazione, è stato fatto ricorso a *box* e *wisker plot* (15) che consentono di visualizzare contemporaneamente valori medi e grado di dispersione dei dati.

Risultati e discussione

Il quadro generale della contaminazione da AFM₁ nel latte, ha evidenziato una positività con valori inferiori al limite normativo dei 50 ppt nel 75% dei casi mentre nel 13,9% dei campioni testati sono stati riscontrati livelli di contaminazione superiori o uguali a tale limite (Tabella 6).

Tabella 6. Frequenza delle contaminazioni da aflatoxina M₁ in campioni di latte crudo di massa per provincia, totali e per periodo di campionamento

Provincia	Latina (n. 30)		Roma (n. 48)		Viterbo (n. 30)		Tutti dati (n. 108)	
Negativi*	5	16,7%	2	4,2%	5	16,7%	12	1,1%
Positivi**	24	80,0%	37	77,1%	20	66,7%	81	75,0%
≥ Lim. Legge	1	3,3%	9	18,7%	5	16,7%	15	13,9%
Periodo	06/02-07/02 (n. 36)		11/02-12/02 (n. 36)		05/03-06/03 (n. 36)			
Negativi*	2	5,6%	5	13,8%	5	13,8%		
Positivi**	25	69,4%	29	80,6%	27	75,0%		
≥ Lim. Legge	9	25,0%	2	5,6%	4	11,2%		

* livelli di contaminazione inferiori al limite di rilevabilità (LOD) del metodo analitico.

** livelli di contaminazione compresi tra il LOD e il limite di legge (50 ppt).

In particolare per le aziende delle tre aree laziali considerate dallo studio, emerge quanto segue: per il latte di massa proveniente dagli allevamenti della provincia di Latina, la contaminazione riguarda 25 campioni su 30 di cui un solo caso (3,3%) oltre il limite normativo dei 50 ppt (57 ngAFM₁/kg). Cinque casi, invece, risultano all'analisi privi di contaminazione (inferiore al LOD del metodo); per la provincia di Roma, si sono osservate contaminazioni più diffuse, con soli 2 casi negativi su 48 (4,2%), 37 positivi (77,1%) ma inferiori al limite normativo e 9 casi (18,7%) in cui la contaminazione superava tale limite (massima contaminazione riscontrata: 250 ngAFM₁/kg). Per i casi relativi alla provincia di Viterbo, la positività ha riguardato il 66,7% dei campioni analizzati e il limite di legge è stato superato nel 13,9% dei casi con un livello massimo riscontrato di 181 ngAFM₁/kg. Le distribuzioni osservate sono lontane dalla normalità come evidenziato dal test di Shapiro-Wilks ($W > 0,6$, $p < 0,0001$) e dai parametri di asimmetria (predominanza dei minusvarianti) e kurtosi (Tabella 7).

Tabella 7. Statistiche di base della contaminazione da aflatoxina M₁ nei campioni di latte di massa provenienti da allevamenti della Regione Lazio

	n	Media*	DS*	Asimmetria	Kurtosi	Mediana*	Min-Max*	Range*
<i>Dati aggregati per Provincia</i>								
Latina	30	0,011	0,012	2,60	8,24	0,009	0,000-0,057	0,057
Roma	48	0,037	0,045	3,06	11,22	0,026	0,000-0,250	0,250
Viterbo	30	0,024	0,040	2,85	6,61	0,010	0,000-0,181	0,181
<i>Dati aggregati per periodo di campionamento</i>								
06/02- 07/02	36	0,030	0,030	1,54	1,69	0,015	0,000-0,122	0,122
11/02-12/02	36	0,027	0,049	3,38	14,84	0,014	0,000-0,250	0,250
05/03-06/03	36	0,021	0,035	3,32	12,97	0,009	0,000-0,181	0,181
<i>Tutti dati</i>								
	108	0,026	0,038	3,40	14,01	0,012	0,000-0,250	0,250

* Dati espressi in µgAFM₁/kg (ppb).

Per l'interpretazione causale dei dati di contaminazione riscontrati, è stato applicato il test non parametrico per l'ANOVA sui ranghi di Kruskal & Wallis che tuttavia permette solo l'analisi di singoli fattori; nello specifico si sono cercate nell'area di provenienza, periodo di campionamento e nei parametri aziendali quali il livello produttivo, il numero di capi in lattazione e le componenti del piano alimentare le cause in grado di spiegare la variabilità sperimentalmente osservata. I diversi fattori sono stati classificati in base al proprio range di valori, assegnando un numero di classi variabile tra 4 e 2 che hanno permesso di interpretare le differenze riscontrate nei livelli di contaminazione del latte. Per quanto riguarda il raggruppamento dei casi secondo il periodo di campionamento (Figura 1) e la provincia di provenienza (Figura 2), la contaminazione tendenzialmente decresce passando dal primo campionamento del 2002 (giugno-luglio) al corrispondente periodo dell'anno successivo ($H_{(108,2)} = 6,60$, $p = 0,0368$); d'altro canto sono risultati maggiormente contaminati i campioni provenienti dalle province di Roma e Viterbo rispetto alla provincia di Latina.

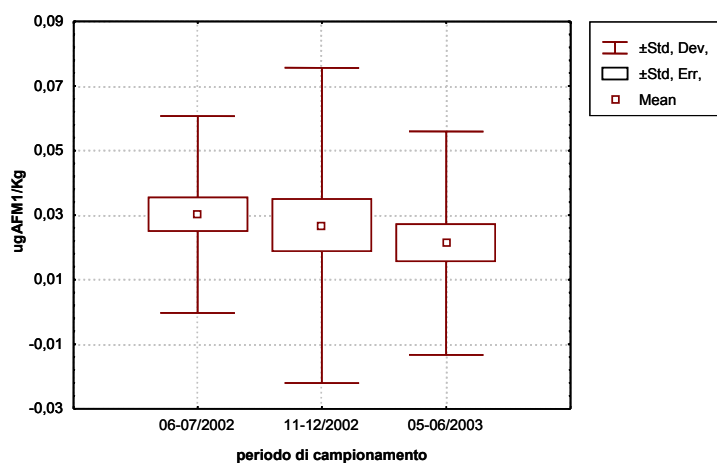


Figura 1. Box e wiskerplot dei dati di contaminazione da AFM_1 classificati per periodo

Le differenze di contaminazione da AFM_1 per i latti in base all'area di provenienza sono risultate altamente significative: $H(108,2) = 18,47$, $p = 0,0006$.

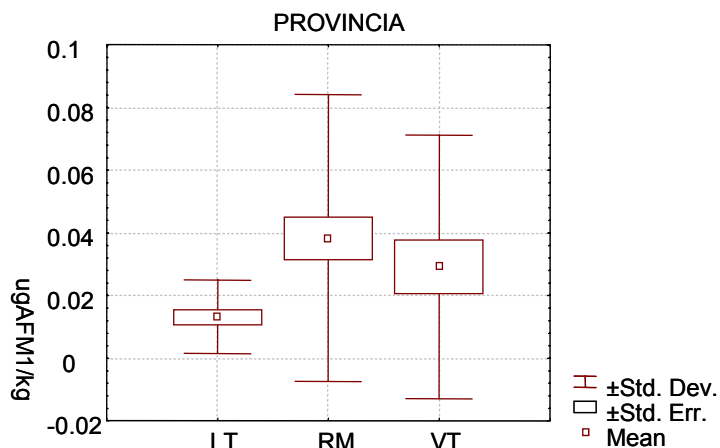


Figura 2. Box e wiskerplot dei dati di contaminazione da AFM_1 classificati per area di provenienza dei campioni

Appare esserci una relazione diretta tra dimensioni dell'allevamento (capi in lattazione dichiarati dall'allevatore) e la contaminazione da AFM₁ con una concentrazione media di poco superiore a 0,02 ugAFM₁/kg per le aziende con meno di 120 capi (75 casi) contro medie comprese tra i 40ppt e i 50 ppt per aziende con più di 120 capi (33 casi) (Figura 3). Per questo fattore, le differenze di concentrazione di AFM₁ nei lattici risultano altamente significative con un valore della statistica di Kruskal-Wallis H(108,2) pari a 13,83 (p= 0,001).

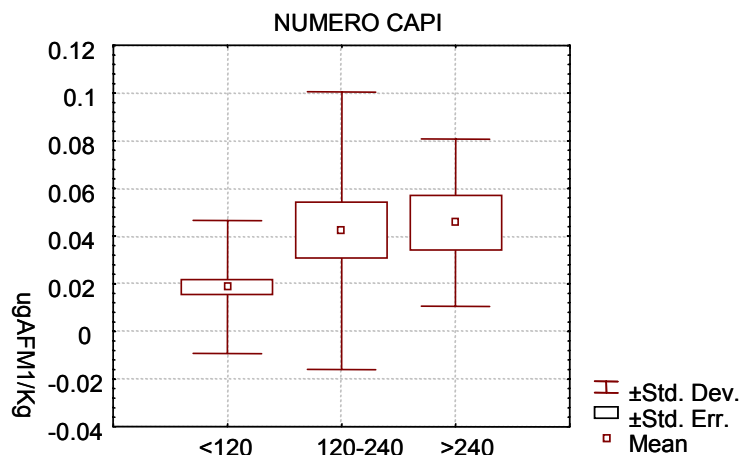


Figura 3. Box e wiskerplot dei dati di contaminazione da AFM₁ classificati in base alle dimensioni dell'allevamento

Il numero di capi allevati è legato alle dimensioni dell'azienda e probabilmente ciò ha delle ripercussioni sul grado di controllo interno sulla qualità delle spartite di alimenti in ingresso e/o sulle relative pratiche di gestione. Inoltre il quantitativo della razione giornaliera per capo, risulta incidere tendenzialmente in modo positivo sulla contaminazione da AFM₁ del latte nei casi in cui sono superati i 25 kg come sostanza secca ingerita (15% sul totale). In tali situazioni, la contaminazione media di AFM₁ è di poco superiore ai 70 ppt contro le medie degli altri raggruppamenti comprese tra 20 e 30 ppt (Figura 4).

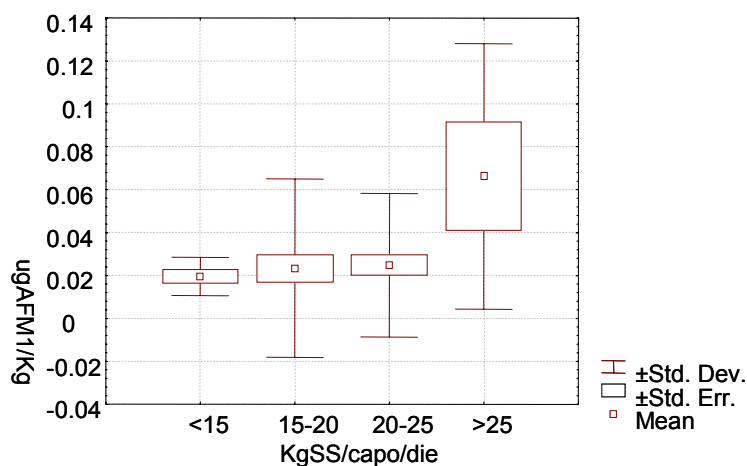


Figura 4. Box e wiskerplot dei dati di contaminazione da AFM₁ classificati in base all'entità della razione in termini di sostanza secca ingerita

Anche gli aspetti legati al piano alimentare sembrano giocare un qualche ruolo nel rischio di contaminazione della produzione aziendale. Tra i fattori considerati, sono risultati significativi, e con effetto positivo sulla contaminazione da AFM₁ nel latte, la quantità di insilato di mais e di cotone presenti nella razione mentre, la concentrazione di AFM₁ è risultata più bassa nelle diete con maggiori quantità di soia e derivati e di fieni (Tabella 8).

Tabella 8. Fattori considerati per l'effetto sulla contaminazione da AFM₁ nel latte

Fattore	n.	classi	df	H	p
Insilato di mais (kg/capo/die)	108	<10; 10-20; >20	2	10,76	0,0046
Semi di cotone (kg/capo/die)	108	<1,2; 1,2-2,4; >2,4	2	8,50	0,0143
Soia (kg/capo/die)	108	<1; 1-1,7; 1,7-2,4; >2,4	3	8,93	0,0302
Fieni (kg/capo/die)	108	<3,5; >3,5	1	8,65	0,0033

Per il quantitativo di mais (granelle, farine, pastoni) impiegato nel piano alimentare aziendale, non sono state rinvenute differenze statisticamente significative in quanto a contaminazione da AFM₁ nei latt. A tale proposito occorre sottolineare che l'indagine ha preceduto la fase critica dovuta alla produzione di mais 2003. Il trasferimento di massa AFM₁ escreta/AFB₁ ingerita (carry-over), che su tutti i casi si è attestato su (Media ± DS) 0,0162±0,0098 microgrammi di AFM₁ escreta per milligrammo di AFB₁ ingerita. La correlazione tra quantitativi stimati di AFB₁ ingerita dagli animali e AFM₁ escreta con il latte (Figura 5) risulta relativamente alta e statisticamente significativa ($R(108,2) = 0,857$, $p < 0,01$): pochi casi risultano deviare consistentemente dal carry-over medio.

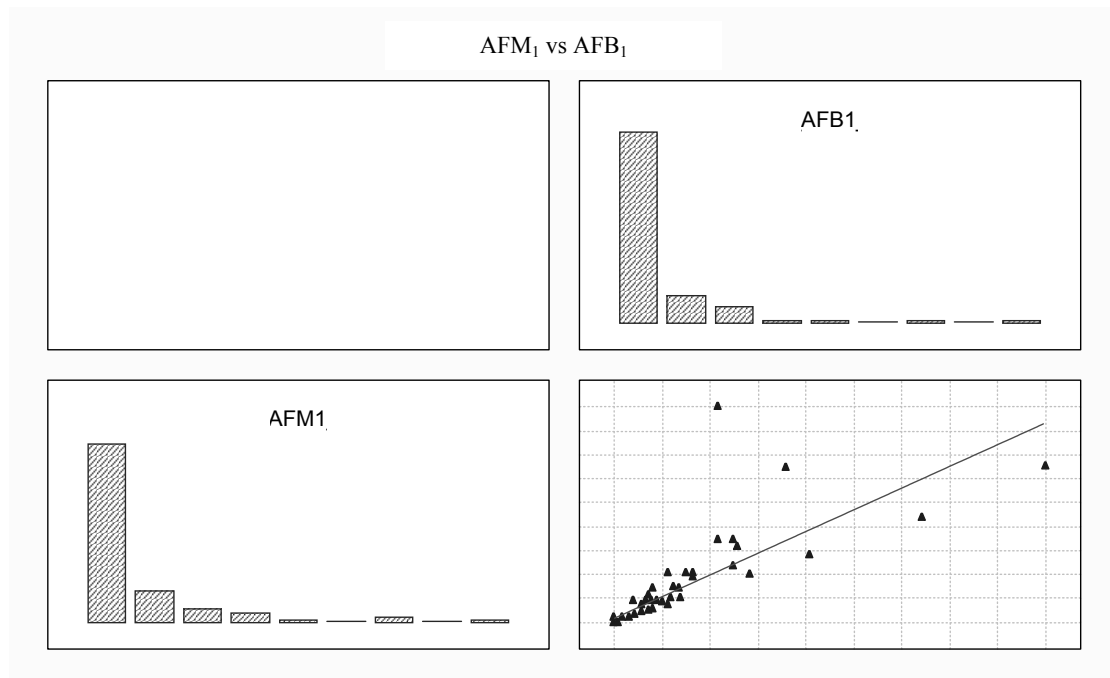


Figura 5. Grafico della correlazione per ranghi tra quantitativi di AFB₁ assunti dagli animali e AFM₁ escreti con il latte

Il carry-over è risultato differente tra le province con valori tendenzialmente superiori per gli allevamenti dell'area romana ($H_{(98,2)}=17,96$; $p=0,0001$). Altre differenze sono state riscontrate nella variabilità del carry-over in relazione al quantitativo di mais ($H_{(98,1)} = 5,5$; $p=0,0189$) e di fieni nella razione ($H_{(98,1)} = 6,35$, $p = 0,0117$) che manifestano azione opposta sul contenuto in AFM₁ del latte: nel primo caso si è osservato un rapporto AFM₁/AFB₁ sensibilmente maggiore. Sebbene al riguardo, in letteratura, non sia stato possibile reperire informazioni, questa evidenza sperimentale lascia ipotizzare che il rapporto energia/fibra della razione possa giocare un qualche ruolo sulla disponibilità dell'AFB₁ ingerita per il metabolismo animale e quindi sul tasso di conversione apparente in AFM₁.

Conclusioni

Il quadro complessivo, porta a concludere che il problema delle contaminazioni da aflatossine nel sistema di allevamento del bovino da latte per la realtà considerata, è presente in maniera estesa anche in assenza di situazioni particolarmente critiche (ad esempio il periodo 2003/2004 a causa degli elevati livelli di contaminazione da AFB₁ nel mais). All'interno del campione di aziende incluse nello studio, la variabilità riscontrata nella contaminazione da AFM₁ appare ampia e legata all'interazione di diverse componenti quali le dimensioni aziendali, i livelli produttivi, il piano alimentare aziendale, pur non potendo escludere altri fattori non contemplati nella presente ricerca. I risultati ottenuti suggeriscono quanto la gestione del problema, debba necessariamente tenere conto della complessità del sistema d'allevamento e dei diversi fattori che di volta in volta possono incidere sulla qualità e la salubrità del latte prodotto attraverso. A tal fine, corrette strategie di assistenza tecnica (agrometeorologia, corrette pratiche agricole e zootecniche, piani di autocontrollo) dovrebbero essere messe in atto. L'importanza dell'approccio epidemiologico allo studio del problema, ne esce evidenziata: sebbene in anni di crisi (ad esempio il 2004) per i sistemi agrozootecnici è probabile che uno o pochi fattori possano incidere pesantemente sulla qualità della produzione generando vere e proprie situazioni di emergenza, in periodi di "relativa tranquillità", le contaminazioni appaiono comunque abbastanza diffuse e solo l'analisi su casistiche abbastanza ampie consentono di studiare, capire e gestire efficientemente il problema.

Bibliografia

1. Bertocchi L., Biancardi A, Boni P, Bonacina C. Emergenza aflatossine nella provincia di Brescia: esperienza di campo. L'Osservatorio, 2004; 7 (1): 4-13. Disponibile all'indirizzo: http://www/oevr.org/ArticoliOsservatorio/2004-1/f_sommario1_04.htm; ultima consultazione 10/11/2004.
2. Poli G, Sala F, Bonizzi L. Il rischio aflatossine. *Corriere della Sera*. 9 novembre 2004.
3. Amatiste S, Rosati R, Ubaldi A, Proietti A, Pietrini P, Giangolini G, Brizioli NR. Estione dell'emergenza aflatossine nella regione Lazio: metodi di analisi impiegati per latte e alimenti zootecnici. I Convegno Agrofood Bioanalysis – Porto Conte Ricerche, Alghero 24-26 giugno 2004. Disponibile all'indirizzo <http://www.anchem.unibo.it/agrofood/poster.htm>; ultima consultazione 20/11/2004.
4. Istituto Nazionale di Statistica. 5° *Censimento Generale dell'Agricoltura. Anno 2000*. Roma: ISTAT; 2004.
5. Italia. Ministero della Sanità, Decreto 23 dicembre 2000. Recepimento della Direttiva 98/53/CE della Commissione che fissa i metodi per il prelievo di campioni e metodi d'analisi per il controllo

- ufficiale dei tenori massimi di taluni contaminanti nei prodotti alimentari. Gazzetta Ufficiale – Serie Generale n. 33, 9 febbraio 2001.
6. Biancardi A. Determination of aflatoxin M₁ residues in milk: a comparative assessment of ELISA and IAC-HPLC methods. *Industrie Alimentari* 1997; 36: 870-876.
 7. Wilkes JG, Sutherland JB. Sample preparation and high-resolution separation of mycotoxins possessing carboxyl groups. *J. Chromatogr. B* 1998; 717: 135-156.
 8. Van Egmond HP, Wagstaffe PJ. The certification of aflatoxin M₁ in 4 milk powder samples. CRMs Nos. 282, 283, 248 and 285. Bruxelles – Luxemburg: Directorate-General Science, Research and Development; 1992 (Report n. EUR 10412 EN. ECSC – EEC – EAEC).
 9. DIN 32645. Chemical analysis; decision limit; detection limit and determination limit; estimation in case of repeatability; terms, methods, evaluation. Berlin. Deutsches Institut für Normung e.V.; 1994.
 10. Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography for Determination of Aflatoxin M₁ in Liquid Milk: Collaborative Study. *JAOAC* 2001, 84 (2):437-443.
 11. Aflatoxins in Corn, Raw Peanuts and Peanuts Butter. Immunoaffinity column Aflatest Method. *JAOC* 1991,74:81.
 12. ISO 14718. Animal feeding stuffs – Determination of aflatoxin B₁ content of mixed feeding stuffs – Method using high performance liquid chromatography. Geneva: International Organization for Standardization; 1998.
 13. Shapiro SS, Francia RS. An approximate analysis of variance test for normality. *J. Am. Stat. Assoc.* 1975; 67: 215-216.
 14. Siegel S, Castellan NJ Jr. *Statistica non parametrica*. Milano: McGraw-Hill Libri Italia; 1992.
 15. Tukey JW. *Exploratory data analysis*. Massachusetts: Addison-Wesley Publishing Company; 1977.

USMAF GENOVA: RICERCA DI MICOTOSSINE NELLE MERCI IN IMPORTAZIONE

Marina De Mattia, Anita Farre, Anna Camoriano, Antonello Campagna, Antonella Mofferdin, Massimo Lobrano.

Ministero della Salute, Uffici di Sanità Marittima, Aerea e di Frontiera (USMAF) Genova

USMAF di Genova

È stato istituito con il Decreto Ministeriale del 17/5/2001 con il quale è stato riordinato il Ministero della Sanità (1).

Con questa normativa infatti, è iniziata anche una nuova organizzazione territoriale degli Uffici Periferici la cui completa attuazione ha preso avvio dal 1° gennaio 2003.

Il Decreto Ministeriale del 17/5/2001 ha previsto l'istituzione di 16 Uffici di Sanità Marittima, Aerea e di Frontiera (USMAF), successivamente ridotti a 12 dal Decreto Ministeriale del 12/9/2003 (2).

Sulla base di questa legislazione, il Ministero della Salute svolge attività di vigilanza igienico-sanitaria nei porti, aeroporti e zone di confine terrestre attraverso i seguenti 12 USMAF e le loro Unità Territoriali:

- Milano-Malpensa (Unità Territoriali di Milano-Malpensa e Torino);
- Venezia (Unità Territoriali di Venezia e Trieste);
- **Genova** (Unità Territoriali di Genova, Savona, La Spezia e Imperia);
- Bologna (Unità Territoriali di Bologna e Ravenna);
- Livorno (Unità Territoriali di Livorno e Pisa);
- Roma-Fiumicino (Unità Territoriali di Roma, Fiumicino e Civitavecchia);
- Pescara (Unità Territoriali di Pescara e Ancona);
- Napoli (Unità Territoriali di Napoli, Salerno, Cagliari, Porto Torres);
- Bari (Unità Territoriali di Bari e Manfredonia);
- Brindisi (Unità Territoriali di Brindisi e Taranto);
- Palermo (Unità Territoriali di Palermo, Porto Empedocle e Trapani);
- Catania (Unità Territoriali di Catania, Messina, Siracusa, Augusta, Reggio Calabria e Gioia Tauro).

L'USMAF di Genova quindi, istituzionalmente, rappresenta un organo periferico di controllo del Ministero della Salute che comprende le Unità Territoriali di Genova, Savona, Imperia e La Spezia.

L'ufficio di Sanità Marittima, Aerea e di Frontiera di Genova ha perciò competenza territoriale su tutti i porti e aeroporti della regione Liguria.

- UT di Genova comprende il porto di Genova, l'aeroporto Crisoforo Colombo di Genova, il porto petroli di Multedo e il porto container VTE (Voltri Terminal Europa). A Genova inoltre, è collocata la sede dell'Ufficio regionale (USMAF);
- UT di Savona comprende il porto di Savona, il porto Container, il terminal frutta e il multiterminal di Vado Ligure;
- UT di Imperia comprende i porti di Imperia e San Remo, la frontiera di Ventimiglia, la dogana e l'aeroporto di Albenga.
- UT di La Spezia comprende i porti di La Spezia e di Lerici.

L'organizzazione del Ministero della Salute relativa agli Uffici periferici di controllo è visualizzata nella Figura 1.

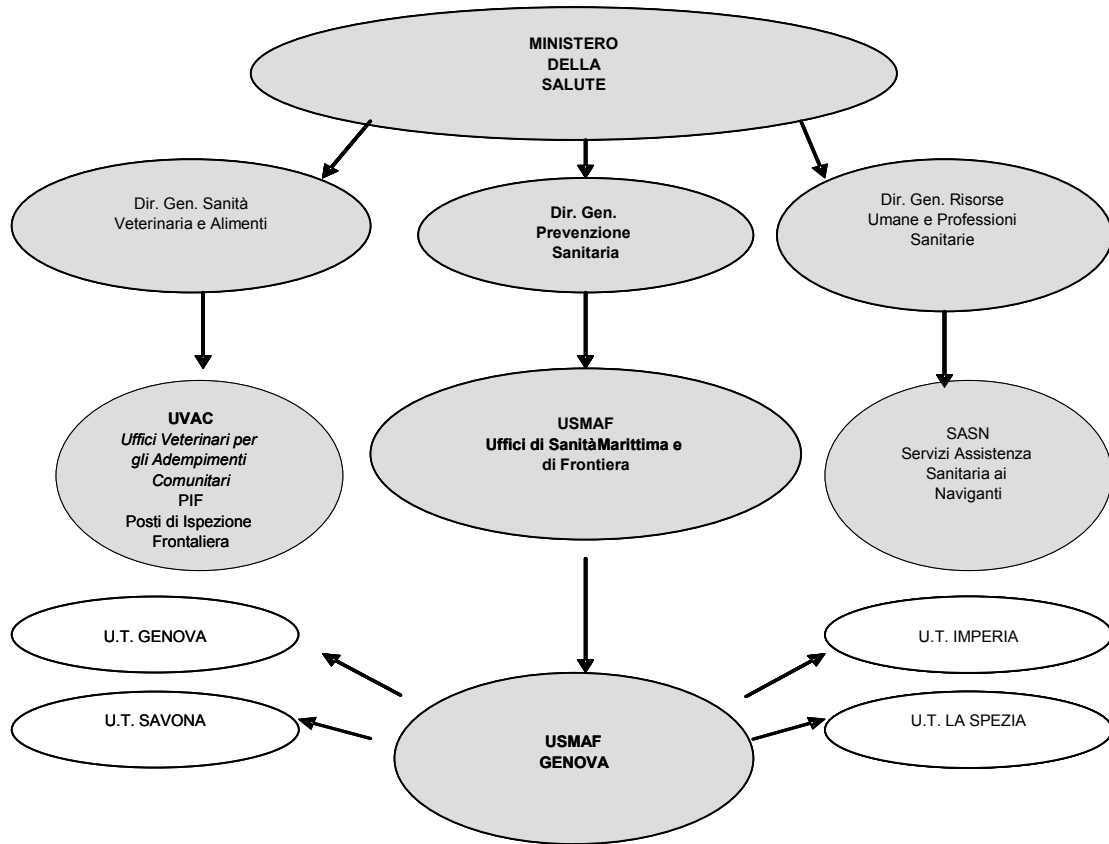


Figura 1. Ministero della Salute: Uffici Periferici e Territoriali

Controlli delle merci

Nell'USMAF di Genova vengono svolte numerose attività tecnico-sanitarie in attuazione di normative nazionali e Comunitarie.

L'attività principale è quella di vigilanza igienico-sanitaria su navi e merci a cui si affianca l'attività ambulatoriale e di profilassi internazionale.

I controlli sulle merci vengono effettuati su partite provenienti da Paesi extracomunitari. Questi controlli possono essere di tipo documentale, documentale e ispettivo oppure documentale, ispettivo e analitico. Sulla base di questi vengono rilasciati:

- Il Nulla Osta sanitario all'importazione, quando non risultano irregolarità e/o i controlli analitici hanno dato esito negativo;
- Il Vincolo sanitario a destino, quando la merce rimane "sotto vincolo" sanitario pur arrivando a destinazione, in attesa dei risultati dei controlli analitici.

In casi di esito negativo, verrà rilasciato il nulla osta definitivo, in caso contrario la merce verrà respinta.

Ogni irregolarità riscontrata comporta il respingimento o la distruzione della merce e da avvio ad una procedura Comunitaria di Allerta (Rapid Alert System) attraverso la quale il rischio sanitario individuato viene comunicato a tutti gli Stati Membri (3).

L'USMAF di Genova effettua campionamenti di merci alimentari di origine vegetale e di merci non alimentari provenienti da Paesi extraeuropei per le quali è stato richiesto il nulla osta all'importazione.

Il tipo di merce da campionare e i parametri da ricercare vengono stabiliti in base alla documentazione allegata alla richiesta di nulla osta e alla presenza di eventuali segnalazioni del Ministero e soprattutto delle notifiche del Sistema Rapido di Allerta della Commissione Europea.

I campioni vengono portati ai laboratori dell'Agenzia Regionale Per l'Ambiente della Liguria (ARPAL) per la ricerca di diversi parametri chimici, fisici e microbiologici.

Nelle partite di merci non alimentari vengono ricercati ad esempio metalli come il Piombo e il Cadmio (negli oggetti destinati al contatto con gli alimenti); ftalati nelle plastiche e indice di ossigeno nei piumini (indumenti e coperte).

La tipologia di merce che viene campionata con maggiore frequenza è però rappresentata dagli alimenti che vengono controllati per la ricerca di:

- pesticidi, coloranti, conservanti e metalli pesanti;
- contaminanti microbiologici (salmonelle e altri batteri);
- organismi geneticamente modificati;
- micotossine.

Ricerca micotossine

Dall'esame dei dati statistici relativi ai campionamenti effettuati dall'USMAF di Genova durante il primo anno di attività, per la ricerca di micotossine, è risultato che sono state controllate merci per la presenza di **aflatossine** e **ocratossine** (Figura 1-2).

- Le **aflatossine** sono state ricercate con una percentuale del 61% dei campionamenti effettuati per riscontrare la presenza di micotossine. La tipologia di merce campionata per il controllo delle aflatossine nel 2003, è stata rappresentata prevalentemente da frutta secca (arachidi, nocciole, pistacchi ecc.) con una percentuale del 84%; armelline (8%); spezie (5%) e cereali (2%).
- Le **ocratossine** invece sono state ricercate nel 39% dei campionamenti. Questo tipo di micotossina è stata ricercata prevalentemente nelle partite di caffè con una percentuale che raggiunge addirittura il 91%. Altre merci controllate per la ricerca di ocratossine sono state rappresentate da uva sultanina (8%) e dal cacao (1%).

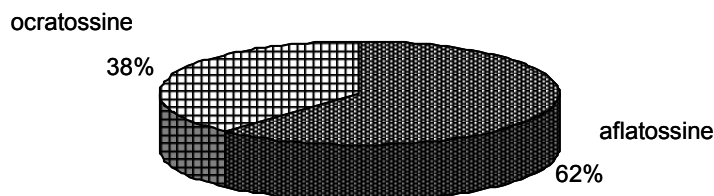


Figura1. Micotossine ricercate nelle merci in importazione

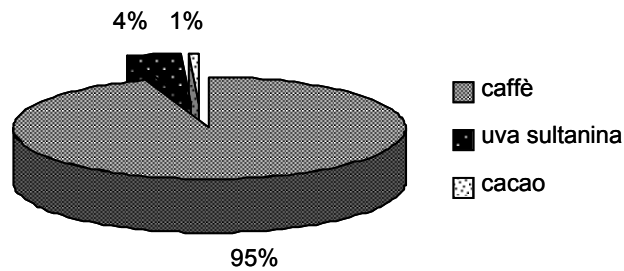


Figura 2. Merci in importazione in cui sono state ricercate ocratossine

Provenienze

Per quanto riguarda la provenienza delle merci, nel 2003 sono state campionate per la ricerca di aflatossine:

- partite di frutta secca provenienti dal Medioriente (69 %), Sudamerica (14%), Africa e Asia (10 %) e dal Nordamerica.(7%);
- spezie dall'Asia (50%), dal Medioriente (30%), e dall'Africa (20%);
- armelline dall'Asia (7%) e dal Medioriente (93%);
- cereali dall'Asia e dal Nordamerica
- Per la ricerca di ocratossine :
- caffè dal Sudamerica (39%), dall'America centrale (14%), Africa (16%) e dall'Asia (31%);
- uva sultanina dal medioriente (89%) e dall'Africa (11%);
- cacao dall'Africa (100%).

Respingimenti

Nei casi in cui l'esito dei controlli analitici ha dato valori di micotossine superiori ai limiti consentiti dalla legge, le merci sono state respinte.

L'esame dei dati statistici relativi ai campionamenti effettuati dall'USMAF di Genova per la ricerca di micotossine nell'anno 2003, ha evidenziato come la quasi totalità dei respingimenti è avvenuta in seguito alla ricerca di aflatossine raggiungendo il 95% del totale.

Nelle partite respinte nel 2003 sono stati inoltre riscontrati i seguenti valori di aflatossine:

- **Aflatossina B₁** – sono stati rilevate concentrazioni comprese tra un minimo di 1,75 microgrammi/chilo e un massimo di 282 microgrammi/chilo (media 45,7; mediana 14,3);
- aflatossine totali – i valori sono risultati compresi tra 2,7 e 295 microgrammi/chilo (media 50,2; mediana 19,7).

I valori medi delle aflatossine totali sono risultati notevolmente superiori ai limiti consentiti dalla normativa vigente, anche considerando quelle merci che saranno sottoposte a cernita o trattamento fisico prima del consumo umano per le quali esistono limiti più elevati (15 microgrammi/chilo).

Dallo studio dei dati statistici è infine emerso che i respingimenti hanno costituito circa il 6% del totale delle partite di merci campionate per la ricerca di micotossine.

Controlli per la CE

Nell'ambito della CE è attivo il Sistema Rapido di Allerta (RAS) che consente di notificare, in tempo reale la presenza di eventuali rischi per la salute pubblica connessi al consumo di alimenti o mangimi.

Questo Sistema trova il suo fondamento giuridico nella Direttiva 92/59/CE del Consiglio Europeo relativa alla sicurezza degli alimenti (4).

Attualmente è in vigore il regolamento CE n. 178/2002, che stabilisce i principi generali della legislazione alimentare e ne fissa le procedure (5).

Quando uno Stato Membro viene a conoscenza, in seguito ai controlli effettuati, dell'esistenza di un rischio sanitario, lo notifica immediatamente alla Commissione Europea che, a sua volta sentito il parere dell'Autorità, lo trasmette a tutti gli Stati della Comunità Europea tramite i Punti di contatto.

Il RAS funziona quindi come una rete che coinvolge gli Stati Membri e la Commissione Europea.

È un meccanismo di comunicazione rapida che si realizza con procedure operative che prevedono l'utilizzo di schede di notifica standard (uguali per tutti i Paesi della Comunità Europea) e della posta elettronica.

Sulla base delle allerte notificate, la Commissione Europea può inoltre, adottare Decisioni relative a specifiche merci che possono rappresentare un rischio per la salute umana subordinandone l'importazione in territorio Comunitario a particolari condizioni.

Ruolo dell'USMAF di Genova

L'Ufficio di Sanità Marittima, Aerea e di Frontiera, è uno degli Uffici periferici del Ministero della Salute che, unitamente ai PIF (Posti di Ispezione Frontaliera) e agli UVAC (Uffici Veterinari adempimenti CEE), effettua controlli igienico-sanitari sulle merci in importazione nella Comunità Europea e pertanto risulta direttamente coinvolto nel Sistema Rapido di Allerta.

Nei casi in cui dai risultati dei controlli si riscontra un possibile rischio per la salute, la merce viene respinta e ne viene data immediatamente comunicazione al Punto di contatto per l'Italia

(Ufficio VI – Direzione generale Sanità Veterinaria e degli Alimenti - del Ministero della Salute) che, a sua volta, ne dà comunicazione alla Commissione Europea innescando il meccanismo del Sistema Rapido di Allerta.

Nel 2003 inoltre, è stata avviata una serie di controlli mirati, tuttora in corso, per la ricerca di aflatossine in specifiche merci e da precise provenienze in seguito a Decisioni della Commissione Europea (6, 7, 8, 9, 10).

In modo particolare l'USMAF di Genova è stato impegnato in una serie di controlli su:

- ARACHIDI e derivati provenienti dalla Cina (Decisione 2003/550/CE);
- ARACHIDI dall'Egitto (Decisione 2003/580/CE);
- PISTACCHI dall'Iran (Decisione 2003 /551/CE);
- FICHI SECCHI, NOCCIOLE e PISTACCHI dalla Turchia (Decisione 2003/552/CE);
- NOCI del BRASILE (Decisione 2003/493/CE).

Le percentuali di partite in importazione da campionare, secondo le suddette Decisioni, vanno da un minimo del 10% per le arachidi dalla Cina al 100% per i pistacchi dall'Iran. (Figura 2).

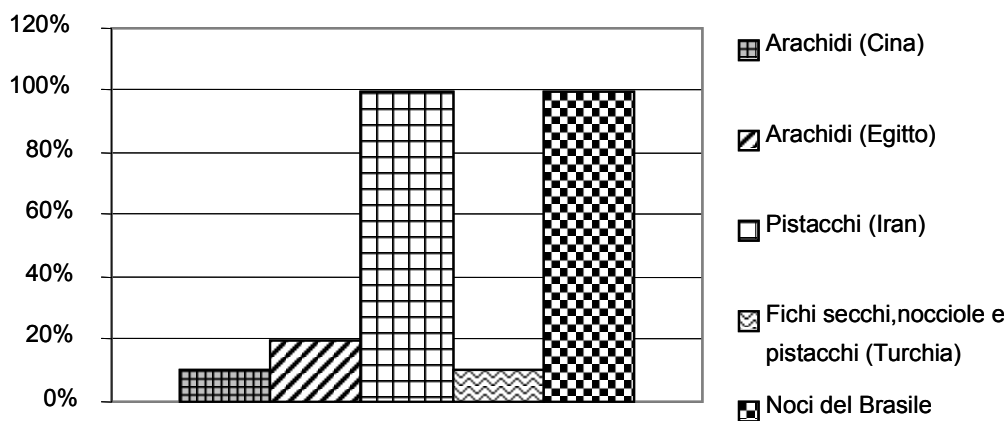


Figura 2. Percentuali dei controlli da effettuare secondo le Decisioni CE 2003-2004

In queste normative CE è riportato inoltre l'elenco dei punti di entrata nel territorio delle merci in esame che, per quanto riguarda la Liguria, sono costituiti da GENOVA e LA SPEZIA.

In questi Uffici i controlli sono ancora in corso e proseguiranno fino a quando le Decisioni Comunitarie che li hanno avviati saranno sottoposte a revisione e, sulla base dei dati ricevuti dalla Commissione Europea da tutti gli Stati Membri, si potrà stabilire che non sussiste più un rischio per la salute umana.

Bibliografia

1. Italia. Decreto Ministero della Sanità del 17 maggio 2001. Individuazione degli Uffici dirigenziali non generali del Ministero della Sanità. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale* n. 185, 10 agosto 2001.
2. Italia. Decreto Ministero della Salute del 12 settembre 2003. Individuazione degli Uffici dirigenziali di livello non generale. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale* n. 256, 4 novembre 2002.
3. Farre A, De Mattia M, Camoriano A, Campagna A, Donnini R, Lucantoni A, Mofferdin A, Lobrano M. Il Sistema Rapido di Allerta Comunitario nel controllo delle merci in importazione. in *Journal of preventive medicine and hygiene*. Pisa: Editrice Pacini. Atti del Congresso "Obiettivo salute: l'evoluzione culturale in Europa" organizzato dalla SitI. Genova 20-23 ottobre 2004.
4. Comunità Europea. Direttiva 92/59/CE del 29 giugno 1992 relativa alla sicurezza generale dei prodotti. L 228 del 11 agosto 1992.
5. Comunità Europea. Regolamento CE 178/2002 del 28 gennaio 2002. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* del 1 febbraio 2002.
6. Comunità Europea. Decisione 2003/550/CE. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* del 26 luglio 2003.
7. Comunità Europea. Decisione 2003/580/CE. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* del 5 agosto 2003.
8. Comunità Europea. Decisione 2003/551/CE. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* del 26 luglio 2003.
9. Comunità Europea. Decisione 2003/552/CE. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* del 26 luglio 2003.
10. Comunità Europea. Decisione 2003/493/CE. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* del 5 luglio 2003.

MICOTOSSINE NEGLI ALIMENTI AD USO ZOOTECNICO: SITUAZIONE IN PIEMONTE

Lucia Decastelli, Jeanne Lai, Chiara Modena, Paola Mogliotti, Fulvio Brusa, Maria Cesarina Abete, Marina Rastelli, Carlo Nachtmann

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

(b) C.Re.A.A. Centro di Referenza Nazionale per la Sorveglianza e il Controllo degli Alimenti per Animali, Torino

Introduzione

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

La direttiva 2003/100/CE, che modifica l'allegato I della Dir. 2002/32/CE, e il suo recepimento a livello nazionale (D.Lgs. del 10/05/2004 n.149) fissano i limiti per la sola aflatoxina B₁, in termini di mg/kg (ppm) di mangime al tasso di umidità del 12% sia per le materie prime che per i mangimi nelle formulazioni destinate alle differenti produzioni.

Per le altre micotossine non esistono, ad oggi, riferimenti legislativi che ne fissino i limiti negli alimenti ad uso zootecnico.

In seguito all'emergenza relativa alla presenza di aflatoxina M₁ nel latte dell'estate 2003, sono stati istituiti piani di sorveglianza, a partire da novembre 2003, finalizzati a verificare, nei mangimi e nelle materie prime, il livello di contaminazione in micotossine.

Tale attività è prevista, inoltre, nel Piano Nazionale per l'Alimentazione Animale segnatamente indirizzata alla ricerca delle aflatoxine B₁, B₂, G₁, G₂ e di altre micotossine quali l'ocratossina, lo zearalenone e il deossinivalenolo (DON). I campionamenti sono effettuati in modo ufficiale per l'aflatoxina B₁ e a scopo di monitoraggio per le altre.

Materiali e Metodi

La ricerca delle aflatoxine nei mangimi è stata condotta con metodo ELISA ImmunoscreenAFLA (Tecna), saggio immunoenzimatico di screening che permette di analizzare contemporaneamente le aflatoxine B₁, B₂, G₁, G₂ in un elevato di campioni a costo contenuto. Successivamente, i campioni che superavano la soglia stabilita per legge (per AFB₁: 20 ppb nel mais e nei mangimi semplici e 5 ppb nei mangimi complementari/completi per bovine da latte), sono stati sottoposti ad analisi di conferma mediante tecnica HPLC. La prova di conferma in HPLC consiste in una determinazione quantitativa di aflatoxina B₁ mediante cromatografia liquida con detector a fluorescenza (λ_{ecc} 360nm; λ_{em} 430nm), previa purificazione dell'estratto in solvente organico tramite cromatografia di immunoaffinità (LOQ: 5 ppb).

Per quanto riguarda le analisi per la ricerca di zearalenone, deossivalenolo (DON) e ocratossina è stato effettuato un test ELISA come screening (R-Biopharm) e per i campioni per cui sono state rinvenute concentrazioni molto elevate si è passati ad un esame di conferma in cromatografia-spettrometria di massa (LC-MS) presso il laboratorio chimico dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Emilia Romagna sede di Brescia.

Risultati

Dal 01/01/04 all'11/11/2004 in Piemonte sono stati analizzati 603 campioni per aflatossine, di cui 8 sono risultati non conformi per aflatossina B₁ (1,3%) (Tabella 1).

Tabella 1. Campioni esaminati per la presenza di aflatossine

	N. campioni	N. campioni positivi	% Positività	Matrice dei campioni pos.
Dal 01/01/04 al 11/11/04	603	8	1,3%	5 complem.; 1 completo; 1 composto; 1 semplice

Nello stesso periodo sono stati esaminati, inoltre, campioni di mangime per la presenza di altre micotossine: 31 per zearalenone, 26 per ocratossina e 37 per DON. Dei 31 campioni analizzati per la presenza di zearalenone, 4 hanno evidenziato una concentrazione di tossina compresa tra 70 e 300 ppb; i campioni analizzati per la presenza di ocratossina sono risultati tutti negativi. Per quanto riguarda il DON, 8 campioni sono risultati positivi a concentrazioni comprese tra 80 e 350 ppb (Tabella 2).

Tabella 2. Presenza di altre micotossine

Micotossine	N. campioni	N. camp. con presenza micotossine	Matrice
Zearalenone	31	4 (da 70 a 300ppb)	4 complem.
Ocratossina	26	0	-
Don	37	8 (da 80 a 350ppb)	4 complem.; 2 completi; 2 semplici

Conclusioni

Le positività confermano anche, nella Regione Piemonte, la presenza di questo contaminante negli alimenti ad uso zootecnico e la necessità di continuare, anche per il 2005, la sorveglianza in modo attivo, continuo e costante.

Da questi dati emerge una bassa percentuale di non conformità per quanto riguarda l'aflatossina B₁ negli alimenti ad uso zootecnico. Le positività riscontrate per le altre micotossine, invece, pongono in rilievo il problema della loro presenza e della necessità di un regolamento legislativo che ne determini i limiti, al fine di tutelare la sicurezza del consumatore come previsto dai Regolamenti Comunitari.

Bibliografia

1. Yiannikuoris A, Jouany JO. Mycotoxins in feed and their fate in animals: a review. *Animal Research* 2002;51:81-99.
2. Sweeney MJ, Dobson DW. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology* 1998;43:141-158.

CONTROLLO E PREVENZIONE DELLA PRODUZIONE DI OCRATOSSINA A NEI CEREALI: RISULTATI DEL PROGETTO CEE QLK1-CT-199-00433 (1999-2004)

Alessandra Ricelli, Massimo Reverberi, Slaven Zjalic, Anna Adele Fabbri, Corrado Fanelli

(a) Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, CNR, Bari

(b) Dipartimento di Biologia Vegetale, Università "La Sapienza", Roma

Introduzione

Il deterioramento degli alimenti causato dai funghi è indubbiamente un grave problema in tutto il mondo poiché è causa di svariati danni economici e sanitari. Infatti, oltre a rendere spesso inutilizzabile una gran parte dei prodotti agricoli, può produrre danni significativi nell'industria zootecnica oltre che causare gravi alterazioni al sistema immunitario umano e animale. Inoltre alcune micotossine sono tristemente note per causare vari tipi di tumore e molti tossicologi, oramai da anni, hanno evidenziato il grave rischio per la salute umana causato da queste micotossine (1).

Le micotossicosi rappresentano un reale problema sia come causa di intossicazioni acute a seguito di ingestioni di alte dosi di micotossine sia come causa di intossicazioni croniche in seguito a esposizioni a bassi livelli di tossine per lunghi periodi (2). Le micotossine possono essere considerate tra le sostanze a più alto rischio presenti negli alimenti per l'uomo e gli animali in paragone ad altre tossine microbiche, additivi per gli alimenti e residui dei pesticidi (3).

Tra i funghi produttori di micotossine, nel presente lavoro, abbiamo considerato *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum* entrambi produttori di ocratossina A (OTA), *Fusarium graminearum* produttore di zearalenone (Zea) e *Fusarium verticillioides* produttore di fumonisine. Lo Zea è un micoestrogeno che si lega in modo competitivo ai recettori cellulari al posto degli estrogeni. Zea causa varie alterazioni in differenti animali quali maiali, mucche e pecore: rifiuto dei mangimi, infertilità, ridotta produzione di latte e iperestrogenismo (4, 5). La correlazione tra adenocarcinoma o iperplasia endometriale e assunzione di Zea è stata ipotizzata nell'uomo ma ancora sono necessarie altre ricerche (6).

F. graminearum è un fungo ampiamente diffuso in Italia e può svilupparsi su molti cereali e svariate dicotiledoni su cui può causare marciumi di foglie, fiori e frutti. In particolare può attaccare le graminacee in tutti gli stadi di sviluppo provocando marciumi pedali e del culmo, alterazioni delle spighe e delle cariossidi sia in campo che durante lo stoccaggio se i tenori di acqua libera (aw) raggiungono i valori di 0.9 (7).

OTA è un inibitore competitivo della sintesi proteica *in vitro* e *in vivo* e ha effetti teratogeni, immunotossici e neurotossici su differenti specie animali (6, 8). L'OTA nell'uomo è stata indicata come determinante di nefropatia endemica, una patologia riportata per la prima volta nell'area Balcanica (9).

A. ochraceus è una delle principali specie responsabili della produzione di OTA in Italia, insieme con *A. carbonarius* e *A. niger*, mentre nell'Europa del nord la sua produzione è principalmente dovuta a contaminazioni causate da *Penicillium verrucosum*. L'*A. ochraceus* si sviluppa su differenti tipi di derrate alimentari sia in campo che durante lo stoccaggio se aw raggiunge il valore di 0.79 (7).

A causa dei problemi economici e degli effetti dannosi sulla salute umana e animale creati dalle micotossine (in particolare lo sviluppo di vari tipi di tumore oltre ai disturbi del sistema immunitario), sono stati sviluppati programmi di controllo della loro presenza in vari alimenti. Le principali metodologie di controllo includono sia la prevenzione della formazione delle micotossine che la loro rimozione attraverso detossificazione o decontaminazione con procedure chimiche, fisiche e biologiche. Fino ad ora non sono stati ancora definiti e approvati metodi per la detossificazione dalle aflatossine sia in Europa che negli USA (10).

Allo scopo di stabilire un approccio sistematico per ottenere cibi sicuri ed esenti da rischi igienico sanitari è stato elaborato il sistema HACCP (hazard analysis critical control point). Mediante l'applicazione di tale sistema può essere definito un approccio pratico e sistematico per produrre e mantenere cibi sicuri durante tutto il processo produttivo e di conseguenza valutare, identificare e quindi controllare i rischi per la sicurezza igienico-sanitaria dei cibi (11).

La prevenzione della contaminazione fungina è stata fatta principalmente mediante strategie chimiche, ma l'impiego intensivo di composti chimici ha causato spesso problemi: la formazione di popolazioni di patogeni resistenti, l'instaurarsi di squilibri omeostatici ambientali con la perdita di competitori naturali, la presenza di residui chimici negli alimenti trattati e nell'ambiente. Per tale ragione, molti studi sono stati fatti per introdurre prodotti meno invasivi e con un minore impatto sia sull'ambiente che sulla salute umana pur mantenendo una buona efficacia inibitoria sulla produzione delle micotossine.

Nel presente studio sono riportati alcuni risultati riguardanti l'impiego di composti food grade già noti e impiegati nell'industria alimentare per verificarne l'efficacia nel prevenire la crescita fungina e la produzione di micotossine. Poiché in alcuni casi è stata descritta una correlazione tra produzione di micotossine ed eventi perossidativi, abbiamo saggiato composti con capacità antiossidative come il resveratrolo (resv) e il butilidrossianisolo (BHA). Il resv è un composto polifenolico appartenente alla famiglia degli stilbeni naturalmente presente in differenti piante (*Polygonum cuspidatum*, *Arachys ipogea* e *Vitis vinifera*) e impiegato essenzialmente come integratore alimentare. Tale composto, insieme ad altri stilbeni, è una fitoalessina della vite ed è sintetizzato in seguito a stress ambientali biotici e abiotici di vario tipo quali esposizione ai raggi UV e attacco di vari patogeni fungini come *Plasmopara viticola* e *Botrytis cinerea*. Inoltre il resv presenta proprietà antiossidanti negli animali e nell'uomo poiché è un agente chelante degli ioni rame, un free radical scavenger dei radicali perossidici, un inibitore della lipossigenasi e della ciclossigenasi (12, 13, 14, 15). Il resv è stato anche studiato per la sua attività antitumorale in seguito all'induzione di differenziazione cellulare e apoptosi in cellule tumorali (16). Inoltre lo stesso composto ha mostrato azione antimicrobica nei confronti di alcuni dermatofiti e patogeni batterici, agenti di infezioni cutanee nell'uomo (17).

Il BHA è un composto antiossidante con proprietà antimicrobiche introdotto fin dagli anni '40 e impiegato nell'industria alimentare sia in Europa che negli USA che ne permettono l'impiego entro certe concentrazioni.

Nel presente lavoro viene riportato l'effetto di differenti concentrazioni di BHA, resv aggiunti su semi di mais e grano e inoculati con alcuni isolati di *A. ochraceus*, *P. verrucosum*, *F. graminearum* e *F. verticillioides* produttori di micotossine. Sono anche riportati alcuni dati preliminari sull'espressione di un frammento di DNA di *A. ochraceus* che presenta alta omologia con un trasportatore ABC di *A. nidulans*.

Materiali e metodi

I ceppi fungini utilizzati sono stati: *Aspergillus ochraceus* MPVP A 163 fornito dall'Università Cattolica di Piacenza, *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides* forniti

dall'Università di Lleida, Spagna, *Penicillium verrucosum* fornito dal Livsmedelsverket di Uppsala, Svezia. Gli isolati sono stati mantenuti su Patata Destrosio Agar-PDA (DIFCO) per 15 giorni a 25°C prima del loro utilizzo.

I semi utilizzati sono stati: frumento (*Triticum durum* cv. Ciccio) e mais (*Zea mais* cv. Cecilia) forniti dall'Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Roma. La sterilizzazione delle cariossidi è stata effettuata utilizzando i raggi γ dopo aver selezionato una dose di irraggiamento che fosse in grado di assicurare il mantenimento della capacità germinativa delle cariossidi oltre al massimo grado compatibile di sterilità. Tutti gli irraggiamenti sono stati eseguiti presso l'ENEA di Roma (centro di ricerche Calliope) utilizzando una fonte di irraggiamento dotata di una sorgente di Co-60. La dose applicata sulle cariossidi di grano è stata di 8kgy con una velocità di irraggiamento di 2602 Gy ora⁻¹, mentre quella fornita alle cariossidi di mais è stata di 8kgy con una velocità di irraggiamento di 1123 Gy ora⁻¹. In ciascun esperimento sono stati posti 50 grammi di semi in beute da 200 mL, questi sono stati poi idratati con acqua distillata sterile fino al raggiungimento di valori di acqua libera di 0,80 o 0,90. I campioni sono quindi stati trattati con una sospensione acquosa di alcool metilico (alcool metilico <1% del peso del campione) contenente BHA (0,02% p/p), resv (12, 23 o 230 ppm) o resvin (12 o 200 ppm).

Gli inoculi fungini sono stati effettuati utilizzando una sospensione conidica di 5×10^5 UFC g⁻¹ di seme nel caso di *A. ochraceus*, *F. verticillioides* e *P. verrucosum* o di 1×10^3 UFC g⁻¹ nel caso di *F. graminearum*. Dopo l'inoculo i campioni sono stati incubati per 30 giorni a 28°C (*A. ochraceus* e *P. verrucosum*) o 25°C (*F. graminearum* e *F. verticillioides*). La crescita fungina è stata verificata attraverso la misura del contenuto di ergosterolo. L'analisi dell'ergosterolo è stata eseguita in HPLC utilizzando un rilevatore UV (λ 282), una colonna Supelco LC-18 5 μ m (25 cmx4,6mm) e una miscela di eluizione costituita da alcool metilico: acqua 98:2 v/v come fase mobile. L'analisi dell'OTA è stata effettuata in HPLC seguendo il metodo descritto da Solfrizzo et al (18), modificato in accordo con Eskola et al. (19). L'analisi dello zearalenone e delle fumonisine sono state effettuate in HPLC seguendo il metodo descritto da Visconti et al. (20, 21).

Il DNA estratto dal micelio di *A. ochraceus* e *F. moniliforme* è stato amplificato mediante PCR usando degli inneschi degenerati PDasp1 (forward 5' ATGGGkgYGAGCGGkgCWCKKA 3' - reverse 5' ATGGGKCYCTGGGkgCWCKKAA 3') disegnati basandosi sulle sequenze consenso conservate dei trasportatori ABC presenti in diverse specie fungine. L'amplificazione effettuata in condizioni di elevata specificità ha generato un singolo frammento di 420 bp sia per l'*A. ochraceus* che per il *F. moniliforme*. Questi sono stati successivamente clonati in pGEMT easy (Promega) e sequenziati. Nuovi inneschi specifici, Aoabc forward 5' CAGGCCAATGTGAGGTA 3' e Aoabc reverse 5' CCTCTTGCGATATAGCGGAG 3', sono stati generati sulla sequenza nucleotidica dell'ABC transporter di *A. ochraceus* (aoabc) e usati per l'RT-PCR.

L'RNA totale è stato estratto con Tri- Reagent (Sigma) da 100 mg di micelio liofilizzato di *A. ochraceus* raccolto 3, 6 e 10 giorni dopo l'inoculo (3 miceli per ogni tempo) e cresciuti in presenza o assenza di resveratrolo a diverse concentrazioni (10, 23, 50, 80, 100 e 230 ppm). L'espressione costitutiva del rRNA 18S è stato valutato usando i primer Ao-18S (forward 5' ATGGCCGTTCTTAGTTGGTG 3'; reverse 5' GTACAAAGGGGCAGGGACGTA 3'). La RT-PCR è stata effettuata usando 500 ng di RNA totale, 200 U di trascrittasi inversa Superscript II e seguendo le indicazioni della casa produttrice (Invitrogen). Il rapporto dei livelli di espressione di aoabc/18S è stato determinato utilizzando il software Molecular Analyst (Bio-Rad) ed è stato usato come indice dell'espressione relativa dell'mRNA di *aoabc* nei diversi campioni.

Il DNA (10 μ g) di *A. ochraceus* e *F. moniliforme* è stato digerito con gli enzimi di restrizione *EcoRI* e *DraI*. Il DNA digerito è stato separato mediante una elettroforesi di 6h in gel d'agarosio

allo 0.8% a 30 V, trasferito per capillarità su membrane di nylon N+ (Roche) e ibridizzato a 58°C con una sonda per il gene codificante per il trasportatore ABC di 2 funghi, seguendo le indicazioni della ditta produttrice (Roche). Tale sonda è un frammento di 420 bp derivato dall'amplificazione, effettuata con il PCR DIG labelling system (Roche), del DNA di *A. ochraceus*.

Risultati

Gli esperimenti effettuati sulle cariossidi di grano inoculate con *A. ochraceus* o *P. verrucosum* hanno evidenziato che la crescita fungina è maggiore quando a_w è 0.95 piuttosto che quando questa è tenuta a 0.85, mentre la produzione di OTA risulta più alta con a_w 0.85 che ad a_w 0.95 (Figura 1).

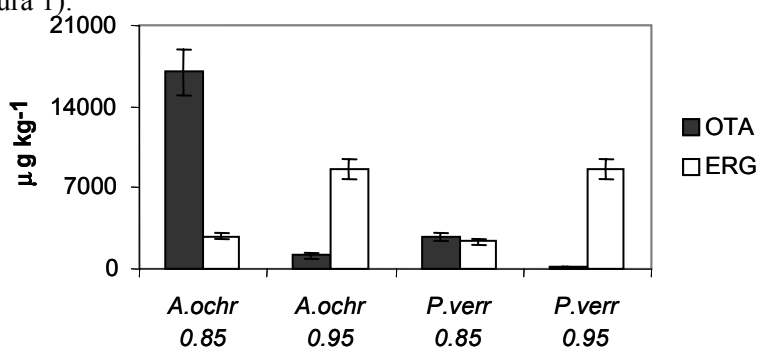


Figura 1. Produzione di ocratossina (OTA) e crescita di *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum*, misurata come quantità di ergosterolo (ERG), su semi di grano non sterili a due differenti valori di acqua libera (a_w 0.85 e a_w 0.95), dopo 30 giorni di incubazione a 28°C.

Negli esperimenti in cui sono stati utilizzati semi sterilizzati per irraggiamento, i risultati hanno mostrato che, in assenza di altri competitori, la produzione di OTA è significativamente inferiore rispetto ai semi non sterilizzati (Figura 2).

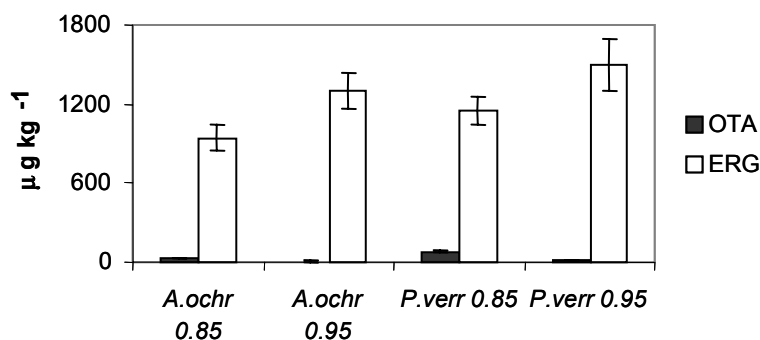


Figura 2. Produzione di ocratossina (OTA) e crescita di *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum*, misurata come quantità di ergosterolo (ERG), su semi di grano, sterilizzati per irraggiamento con raggi g, a due differenti valori di acqua libera (a_w 0.85 e a_w 0.95), dopo 30 giorni di incubazione a 28°C

Ai valori di attività dell'acqua inferiori, inoltre, l'effetto inibente dei trattamenti utilizzati appare generalmente maggiore, in particolare il trattamento con BHA e quello con resv hanno

permesso un controllo della produzione di OTA superiore all'80% e un controllo della crescita fungina totale superiore al 75%. Il trattamento con resvin, anche se ha limitato in maniera significativa lo sviluppo della micoflora ad a_w 0.85, ha inibito la produzione di OTA in maniera comparabile agli altri trattamenti (BHA, resv) solo quando è stato inoculato *P. verrucosum* (Figura 3 a, b).

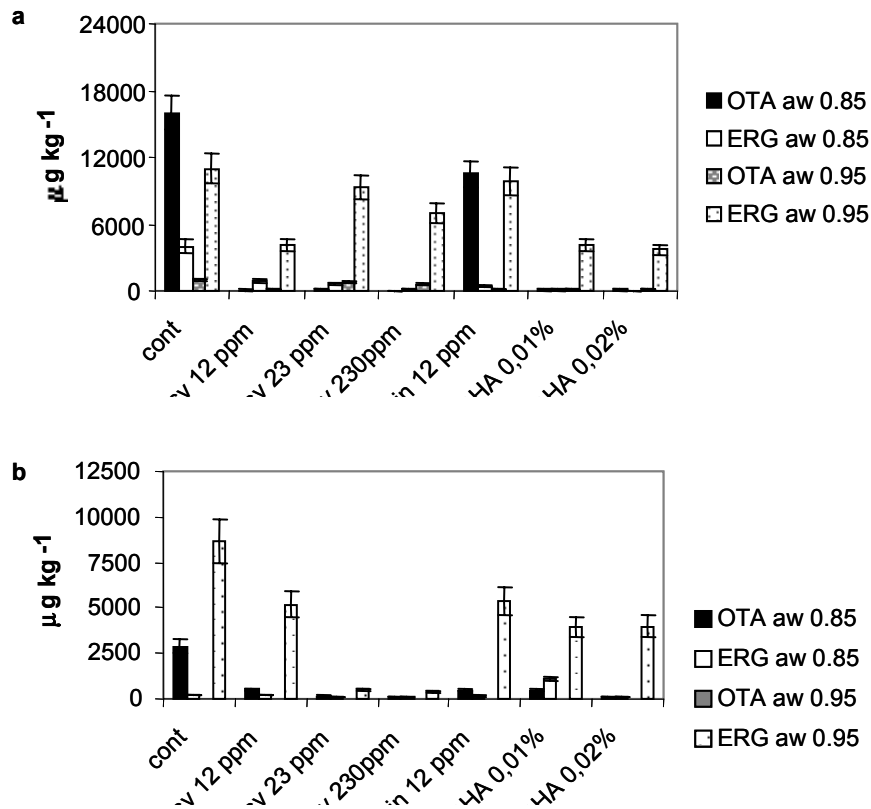


Figura 3. Effetto di diverse concentrazioni di resveratrolo (resv), resvin e BHA sulla crescita, espressa come quantità di ergosterolo (ERG) e sulla produzione di ocratossina A (OTA) da parte di *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum* inoculati su semi di grano non sterili trattati a due diversi valori di acqua libera (a_w 0.85 e a_w 0.95), dopo 30 giorni di incubazione a 28°C

I risultati ottenuti applicando gli stessi trattamenti su cariossidi di grano e di mais con a_w 0.95 inoculate con *F. graminearum* hanno mostrato che l'applicazione di resv a 230 ppm o di BHA 0.02% dava luogo ad una inibizione della crescita fungina totale superiore al 70% e ad un controllo della produzione di Zea di circa il 95%. Il resvin non ha avuto un effetto significativo sul controllo della crescita fungina e della produzione di Zea (Figure 4, 5).

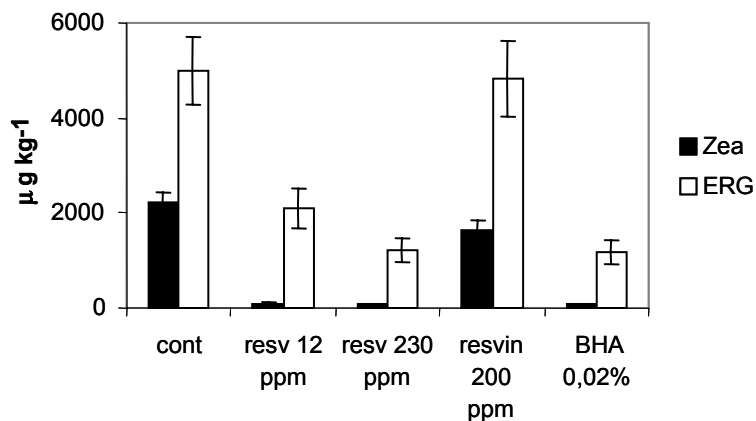


Figura 4. Effetto di resveratrolo (resv), resvin e BHA sulla crescita (contenuto di ergosterolo –ERG) e produzione di zearalenone (Zea) da parte di *Fusarium graminearum* inoculato su semi di grano non sterili ad a_w 0.95 dopo 30 giorni di incubazione a 25°C

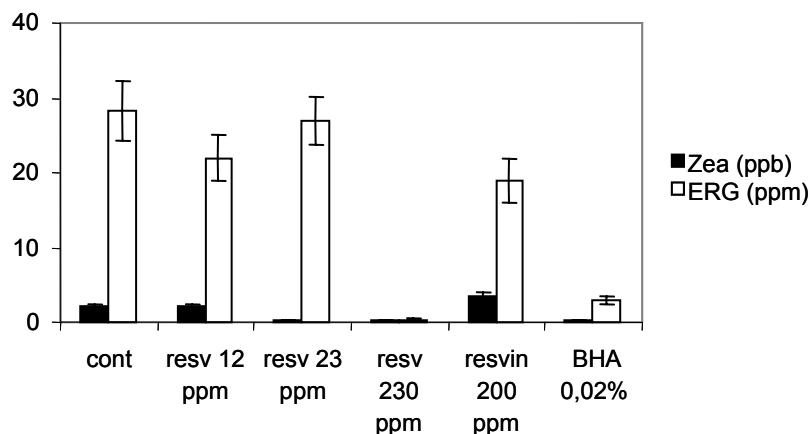


Figura 5. Effetto di resveratrolo (resv), resvin e BHA sulla crescita (contenuto di ergosterolo – ERG) e produzione di zearalenone (Zea) da parte di *Fusarium graminearum* inoculato su semi di mais non sterili ad a_w 0.95 dopo 30 giorni di incubazione a 25°C. Per la più facile comprensione del grafico i dati di ERG sono riportati in $\mu\text{g g}^{-1}$ di seme, mentre quelli di Zea in $\mu\text{g kg}^{-1}$ seme.

Gli esperimenti effettuati sulle cariossidi di mais inoculate con *F. verticillioides* hanno evidenziato che il trattamento con resv a 23 e 230 ppm e quello con BHA 0.02% permetteva un controllo della crescita fungina superiore all'80% e una inibizione della produzione di fumonisine di circa il 95% (Figura 6). Il trattamento con resvin non ha avuto effetto sullo sviluppo della microflora ma ha operato un efficace controllo della produzione di fumonisine, comparabile con quello ottenuto utilizzando resv a 230 ppm o BHA 0.02%.

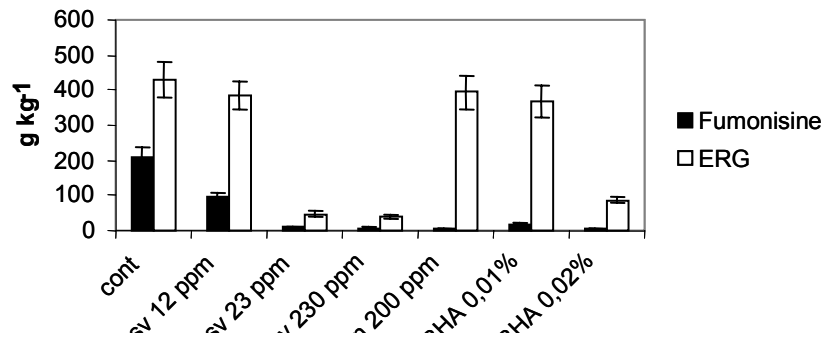


Figura 6. Effetto di resveratrolo (resv), resvin e BHA, aggiunti a diverse concentrazioni a semi di grano non sterili (aw 0.95), sulla crescita (contenuto di ergosterolo – ERG) e sulla produzione di fumonisine (F₁+F₂) da parte di *Fusarium verticillioides* dopo 30 giorni di incubazione a 25°C

I frammenti che sono stati amplificati dal DNA di *A. ochraceus* e *F. verticillioides* mediante inneschi degenerati disegnati in base alle sequenze conservate in diversi trasportatori ABC fungini presentano una omologia del 87% e del 77% rispettivamente con AtrB di *A. nidulans* e con Mtr1 di *Mycosphaerella graminicola*. I trasportatori ABC presenti in *A. ochraceus* e *F. verticillioides* di cui fanno parte i frammenti amplificati sembrano essere presenti in singola copia nel genoma dei 2 funghi. Infatti, l'analisi Southern mostra un singolo segnale nel DNA ristretto con *DraI*, enzima che non ha un sito di taglio all'interno della sequenza in esame e 2 segnali in quello trattato con *EcoRI*, enzima che invece ha un sito di restrizione all'interno di tale sequenza (Figura 7).

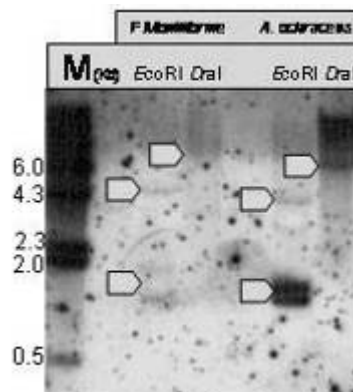


Figura 7. Analisi Southern Blotting di DNA genomico di *F. verticillioides* e *A. ochraceus* ristretto con gli enzimi *EcoRI* e *DraI* e ibridato con la sonda *aoabc-like*.

M: marcatore di peso molecolare λ_{hindIII}

Successivamente è stata analizzata, mediante RT-PCR, l'espressione di *aoabc-like* in *A. ochraceus* trattato con diverse concentrazioni di BHA e di resv. Come risulta dalla Figura 8 il trasportatore ABC viene attivato a basse concentrazioni di BHA (0.01%) e ad alte concentrazioni di resv (80, 100 e 230 ppm) già a partire dal 3° giorno, lasciando supporre un coinvolgimento di tale trasportatore nella detossificazione cellulare.

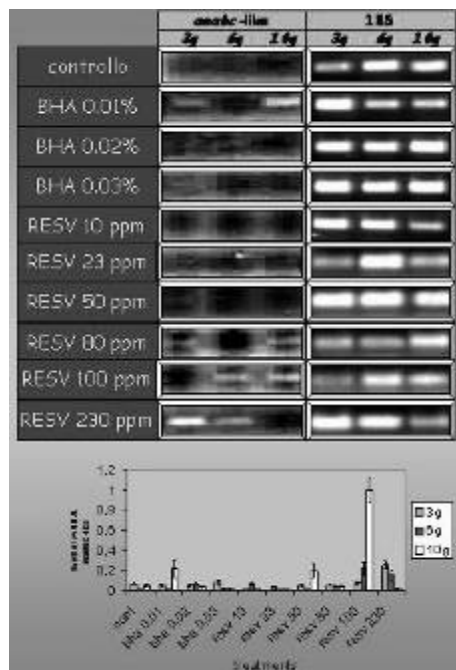


Figura 8. Analisi RT-PCR dell'espressione di *aoabc-like* in *A. ochraceus* cresciuto in diverse condizioni (controllo; Resv: resveratrolo 10, 23, 50, 80, 100 e 230 ppm; BHA: butylated hydroxy anisole 0.01, 0.02 e 0.03%) a diversi tempi dall'inoculo (3, 6 e 10 giorni). Nel grafico sottostante la figura sono presentati i livelli di espressione del mRNA di *aoabc-like* rapportati all'espressione del rRNA 18S

Discussione

Dai risultati ottenuti è evidente l'efficacia del resveratrolo e del BHA nel controllo dello sviluppo fungino e della produzione delle micotossine considerate. L'effetto di questi composti potrebbe essere collegato sia alle loro proprietà antiossidanti che alla loro capacità antimicrobica. In questo lavoro, non essendo stata studiata l'eventuale diretta relazione tra stress ossidativo della cellula fungina e produzione di micotossina, non possiamo supporre quale delle due attività di BHA e resv sia maggiormente coinvolta. Comunque, nel caso degli esperimenti condotti inoculando *F. graminearum* o *F. verticillioides*, data la diretta correlazione tra lo sviluppo miceliare e la produzione di micotossina, l'attività antimicrobica dei composti testati potrebbe svolgere un ruolo importante. Per quanto riguarda gli esperimenti effettuati inoculando *A. ochraceus* e *P. verrucosum* i dati sono di più difficile interpretazione.

In particolare nelle prove sperimentali effettuate con *F. graminearum* è evidente che questa specie riesce a svilupparsi e a produrre Zea in maniera più cospicua sulle cariossidi di grano rispetto a quelle di mais (Figura 4, 5). Ciò può essere dovuto alla presenza di specie competitive presenti sulla superficie delle cariossidi di mais piuttosto che su quelle di grano. È, infatti, noto il ruolo svolto dalle interazioni dinamiche tra le specie fungine che compongono la micoflora caratteristica di ogni ambiente nel controllo della crescita di *Fusarium* e della produzione di Zea (22).

La presenza in *A. ochraceus* e *F. verticillioides* di trasportatori ABC altamente omologhi ai trasportatori coinvolti in *A. nidulans* e in *M. graminicola* con la resistenza a fungicidi o, più in

generale, a composti tossici (23, 24) lascia supporre un coinvolgimento di questo sistema di detossificazione cellulare anche in funghi che, come *A. ochraceus*, sono patogeni del post-raccolta. Tale risultato, se considerato anche alla luce degli esperimenti condotti sulla modulazione dell'espressione di aoabc-like, indicherebbe che composti finora utilizzati per inibire lo sviluppo nelle derrate alimentari dei funghi tossigeni, vengono percepiti dalla cellula fungina e attivamente espulsi. In particolare, in *A. ochraceus* il resveratrolo svolge un ruolo inibente sulla produzione di OTA, ma, ad alte concentrazioni, può essere attivamente espulso dalla cellula dai trasportatori ABC. Quindi l'uso di alte concentrazioni di un composto inibente potrebbe indurre l'attivazione di sistemi detossificanti nel fungo. A questo proposito, uno studio più approfondito potrebbe portare, per ogni composto attualmente usato per inibire le tossine, a definire la minima concentrazione utile e quindi, oltre a consentire un abbattimento dei costi, permetterebbe una riduzione di prodotti potenzialmente tossici ad alte concentrazioni negli alimenti e nell'ambiente.

Bibliografia

1. Petska JJ, Bondy GS. Mycotoxin-induced immune modulation. In: Immunotoxicity and immunopharmacology. Dean JH, Luster MI, Kimber I Eds. New York: Raven Press 1994. p. 206-218.
2. Smith JE, Lewis CW, Anderson JG, Solomons GL. Mycotoxins in human nutrition and health. Directorate-Gen. XII Science, Res. and Development, EUR 16048 EN. 1994.
3. Smith JE. Mycotoxins. In: Food chemical safety. Vol. 1: Contaminants. D.H. Watson Ed. Cambridge (UK): CRC Press; 2001..
4. D'Mello JPF, Placinta CM, Macdonald AMC. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. Anim Feed Sci Technol 1999; 80: 183-205.
5. Placinta CM, D'Mello JPF, Macdonald AMC. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. Anim Feed Sci Tech 1999; 78: 21-37.
6. Creppy EE. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Toxicol Lett 2002; 127: 19-28.
7. JECFA. Ochratoxin A. In Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO food additives series: 47. FAO Food and Nutrition Paper: 74, Geneva; 2001. p.281-417.
8. Xiao H, Madhyastha S, Marquardt RR, Li S, Vodela JK, Frohlich AA, Kemppainen BW. Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: structure-activity relationships. Toxicol Appl Pharm 1996; 137: 182-192.
9. Petkova-Botcharova T, Chernozemsky IN, Castegnaro M. Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan Endemic Nephropaty and urinary system tumors in Bulgaria. Food Addit Contam 1988; 5: 299-301.
10. Bhatnagar D, Lillejohn EB, Bennett JW. Biological detoxification of mycotoxins. In: Mycotoxins and animal foods. Smith JE, Henderson RS Eds. Boca Raton: CRC Press; 1991. p. 747-764.
11. WHO. Application of risk analysis to food standard issues. Report of the joint FAO/WHO Expert Consultation, Geneva, Switzerland 13-17 March 1995. 1995.
12. Pinto MC, Garcia-Barrado JA, Macias P. Resveratrol is a potent inhibitor of the dioxygenase activity of lipoxygenase. J Agr Food Chem 1999; 47: 4842-4846.
13. Fremont L. Biological effects of resveratrol. Minireview. Life Science. 2000; 66: 663-673.

14. Stojanovic S, Sprinz H, Brede O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. Arch Biochem Biophys 2001; 391: 79-89.
15. Miura T, Muraoka S, Ikeda N, Watanabe M, Fujimoto Y. Antioxidative and prooxidative action of stilbene derivatives. Pharmacol Toxicol 2000; 86: 203-208.
16. Pervaiz S. Resveratrol: from the bottle to the bedside? Leukemia Lymphoma 2001; 40: 491-498.
17. Man-Ying Chan M. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. Biochem Pharmacol 2002; 63: 99-104.
18. Solfrizzo M, Avanti G, Visconti A. Use of various clean-up procedures for the analysis of ochratoxin A in cereals. J Chromat A 1998 ; 815: 67-73.
19. Eskola M, Kokkonen M, Rizzo A. Application of manual and automated systems for purification of ochratoxin A and zearalenone in cereals with immunoaffinity columns. J Food Agr Food Chem 2002; 50: 41-47.
20. Visconti A, Pascale M. Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. J Chromat A 1998; 815: 133-140.
21. Visconti A, Solfrizzo M, De Girolamo A. Determination of fumonisins B1 and B2 in corn and in corn flakes by liquid chromatography with immunoaffinity clean-up: collaborative study. J AOAC Int 2001; 84 (6): 1828-1837.
22. Lee H B, Magan N. Environment factors influence *in vitro* interspecific interactions between *A. ochraceus* and other maize spoilage fungi, growth and ochratoxin production. Mycopathologia 1999; 146: 43-47.
23. Zwiers LH and De Waard MA. Characterization of the ABC transporter genes MgAtr1 and MgAtr2 from the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. Fungal Genet Biol 2000; 30 (2): 115-125.
24. Del Sorbo G, Andrade AC, Van Nistelrooy JG, Van Kan, Balzi E, De Waard MA. Multidrug resistance in *Aspergillus nidulans* involves novel ATP-binding cassette transporters. Mol Gen Genet 1997; 4: 417-426.

EFFETTO DEL TRATTAMENTO CONTRO *OSTRINIA NUBILALIS* SULLA PRESENZA DI FUNGHI POTENZIALMENTE TOSSIGENI NELLE CARIOSSIDI DI MAIS

Gloria Innocenti, Viviana Babini, Roberta Piccaglia

(a) Dipartimento di Protezione Valorizzazione Agroambientale, Alma Mater Studiorum Università degli Studi di Bologna

(b) Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Alma Mater Studiorum Università degli Studi di Bologna

Introduzione

Ostrinia nubilalis H. è uno dei patogeni più pericolosi per la produzione del mais in tutte le zone di coltivazione del cereale. Le larve scavano gallerie nei fusti riducendo il passaggio delle sostanze nutritive e dell'acqua e compromettendo la resistenza stessa dei fusti. Le ferite determinate dall'attività trofica a livello delle cariossidi, favoriscono la diffusione delle spore di patogeni fungini appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* che hanno la capacità di produrre micotossine: metaboliti secondari che possono indurre, se ingeriti da animali o dall'uomo, diverse patologie acute o croniche (1, 2). Attualmente la presenza delle micotossine nella filiera agro-alimentare è uno dei problemi più importanti che il settore cerealicolo di trova ad affrontare nella valorizzazione delle proprie produzioni anche dal punto di vista igienico-sanitario. La produzione dei metaboliti tossici è strettamente influenzata dalle condizioni ambientali, in particolare dalla temperatura, dall'umidità relativa dell'aria e dal periodo di bagnatura fogliare. Le specie fungine che rivestono una particolare importanza micotossicologica nei nostri climi per la loro diffusione ed elevata tossicità, sono *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *F. proliferatum*, *F. sporotrichioides* e *F. verticillioides*, produttori di deossinivalenolo, fumonisine, zearalenone, tossina T-2, *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus* e *Penicillium spp.*, produttori di aflatossine e ocratossine (3, 4).

Alle condizioni presenti in Europa la lotta chimica o biologica risulta efficace nel ridurre la presenza *O. nubilalis* (5) e quindi il trattamento contro questo insetto potrebbe avere un potenziale effetto di contenimento anche sulla diffusione dei funghi tossigeni. Prove condotte anche in Italia hanno permesso di evidenziare che l'incidenza della Fusariosi della spiga e il conseguente accumulo di fumosine erano limitati dalla riduzione della popolazione di piralide (4).

Scopo della presente ricerca è stato quello di studiare l'effetto di un trattamento insetticida contro le larve di seconda generazione *O. nubilalis* sulla popolazione di funghi potenzialmente produttori di tossine in due zone maidicole della pianura Padana.

Materiale e metodi

Le prove sono state svolte nel 2003 in due aziende sperimentali dell'Università di Bologna ubicate a Cadriano e Ozzano Emilia (BO), in parcelle ampie 675 m² distribuite secondo lo schema a blocchi randomizzati con quattro ripetizioni per trattamento. Piante di mais ibrido

PR34N43 sono state trattate contro la seconda generazione della piralide con λ -cialotrina (Karate Xpress; Syngenta Crop Protection) alla dose di 20 g h^{-1} . Il controllo era rappresentato da piante non trattate con l'insetticida. Alcuni giorni prima della trebbiatura sono state prelevate a random 25 spighe per parcella per un totale di 100 spighe per trattamento. Le spighe, liberate dalle brattee, sono state sottoposte ad un esame visivo per rilevare l'eventuale presenza di sintomi di malattie fungine. Per determinare la popolazione fungina presente nelle cariossidi si è proceduto a sgranare le spighe e macinare le cariossidi (1mm), quindi dallo sfarinato ottenuto dalle spighe di ogni parcella, è stato prelevato un sub-campione pari al 25% in peso che è stato ulteriormente macinato con apposito mulino fino ad ottenere particelle ampie di 0,2 mm di diametro. Il materiale così ottenuto è stato conservato al buio, in cella fredda ($5-6^\circ\text{C}$) per una settimana, quindi è stato opportunamente diluito con la tecnica delle diluizioni seriali e successivamente piastrato sui seguenti substrati agarizzati contenuti in scatole Petri ampie 9 cm di diametro: *Aspergillus Flavus*, *Parasiticus Agar* (AFPA; Oxoid, UK) ($45,5 \text{ g l}^{-1}$), Czapek Agar (Difco; USA) (49 g l^{-1}) + Rosa Bengala ($0,03 \text{ g l}^{-1}$) + PCNB ($0,2 \text{ g l}^{-1}$) + Streptomicina solfato ($0,3 \text{ g l}^{-1}$) + Neomicina ($0,15 \text{ g l}^{-1}$) (CzAm), Agar Patata Destrosio Oxoid (39 g l^{-1}) + PCNB ($0,2 \text{ g l}^{-1}$) + streptomicina solfato ($0,3 \text{ g l}^{-1}$) + Neomicina ($0,15 \text{ g l}^{-1}$) (APDm). È stato infine determinato il numero di Unità Formanti Colonie per grammo di sfarinato (UFC/g).

I valori medi di UFC di ogni patogeno, per ogni substrato relativamente a ciascuna azienda, sono stati confrontati con il test t di Student; mentre i dati delle due aziende sono stati confrontati con il test F di Fisher.

Risultati e discussione

In tutti e tre i substrati agarizzati è stato rilevato un andamento simile dei valori di UFC; pertanto nelle Tabelle 1 e 2 vengono riportati i dati ottenuti su AFPA.

Valori sulla stessa colonna seguiti da lettere diverse differiscono per $P \leq 0,01$ secondo il test t di Student.

Tabella 1. Numero medio di Unità Formanti Colonia per grammo di sfarinato ottenuto dalle cariossidi provenienti da Ozzano Emilia (BO) su AFPA (valore minimo e massimo)

Tesi	<i>Aspergillus flavus</i> e <i>A. parasiticus</i>	<i>Penicillium spp.</i>	<i>Fusarium spp.</i>
Controllo	$3,4 \times 10^6$ a ($2,4 \times 10^6 - 3,9 \times 10^6$)	$2,3 \times 10^6$ a ($0 - 5 \times 10^6$)	$3,5 \times 10^5$ a ($0 - 6,7 \times 10^5$)
Trattato	$9,3 \times 10^5$ b ($1,2 \times 10^5 - 2,7 \times 10^6$)	1×10^4 a ($0 - 4 \times 10^4$)	$2,3 \times 10^5$ a ($4 \times 10^4 - 7,5 \times 10^5$)

Tabella 2. Numero medio di Unità Formanti Colonia per grammo di sfarinato ottenuto dalle cariossidi provenienti da Cadriano (BO) su AFPA (valore minimo e massimo)

Tesi	<i>Aspergillus flavus</i> e <i>A. parasiticus</i>	<i>Penicillium spp.</i>	<i>Fusarium spp.</i>
Controllo	$2,8 \times 10^4$ a ($0 - 9,5 \times 10^4$)	$1,2 \times 10^2$ a ($0 - 5 \times 10^2$)	$6,8 \times 10^4$ a ($1,9 \times 10^4 - 1,2 \times 10^5$)
Trattato	$3,5 \times 10^5$ a ($7,5 \times 10^3 - 1,3 \times 10^6$)	$2,5 \times 10^3$ a ($0 - 1 \times 10^4$)	$6,6 \times 10^4$ a ($1 \times 10^3 - 1,8 \times 10^5$)

Valori sulla stessa colonna seguiti da lettere diverse differiscono per $P \leq 0,01$ secondo il test t di Student.

I funghi appartenenti al genere *Aspergillus* e in particolare *A. flavus* e *A. parasiticus* sono risultati prevalenti rispetto a *Penicillium spp.* e *Fusarium*, in particolare *F. verticillioides*. La

popolazione di *Aspergillus* è risultata più alta nello sfarinato ottenuto dalle cariossidi provenienti da Ozzano Emilia, rispetto a quella rilevata nello sfarinato ottenuto dalla granella proveniente da Cadriano. L'annata 2003 è stata caratterizzata da un andamento climatico eccezionale, caratterizzato da elevate temperature e scarsa piovosità durante tutto il periodo estivo che ha favorito i funghi xerofili quali *Aspergillus*. Nelle condizioni pedoclimatiche di Ozzano Emilia le piante di mais sono state sottoposte ad una condizione di maggiore stress rispetto a Cadriano e ciò potrebbe spiegare la più elevata presenza di *Aspergillus* nelle cariossidi provenienti da questo campo sperimentale.

Il trattamento contro la piralide ha significativamente ($P \leq 0,01$) ridotto il numero di UFC di *Aspergillus* a Ozzano Emilia, mentre a Cadriano non sono state rilevate differenze significative tra i campioni trattati e non trattati con l'insetticida. In entrambe le località non si è evidenziato alcun effetto significativo del trattamento sulla popolazione di *Penicillium* e *Fusarium*. Dal confronto statistico dei dati rilevati nelle due aziende è emerso che la popolazione di *A. flavus* e *A. parasiticus* era significativamente influenzata ($P \leq 0,01$ secondo il test F di Fisher) sia dal trattamento insetticida contro *O. nubilalis*, sia dalle caratteristiche pedoclimatiche dell'ambiente di coltivazione.

In conclusione si può affermare che l'efficacia del trattamento contro *O. nubilalis* nel ridurre la presenza funghi potenzialmente produttori di tossine sembra influenzata sia dal tipo di patogeno, sia dalle condizioni ambientali. Si tratta tuttavia di dati preliminari essendo il risultato di un solo anno di osservazione; ulteriori indagini sono in corso.

Bibliografia

1. Dowd PF. Involvement of arthropods in the establishment of mycotoxigenic fungi under field conditions. In: Sinha KK, Bhatnagar D (Ed.). *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. NY: Marcel Dekker, 1998. p. 307-350.
2. Munkvold GP, Hellmich RL. Genetically modified, insect resistant corn: implications for disease management. 1999. Disponibile all'indirizzo: <http://www.apsnet.org/online/feature/BtCorn/Top.html>, ultima consultazione 30/1/06.
3. Bottalico A. Funghi tossigeni e micotossine: aspetti generali. *Informatore Fitopatologico* 2002; 12:10-16.
4. Moretti A, Corazza L, Balmas V, Santori A, Ritieni A. Funghi tossigeni e micotossine. *Informatore Fitopatologico* 2002; 12:17-22.
5. Gianessi L, Sankula S, Reigner N. Biotecnologia vegetale: potenziale effetto sul miglioramento della lotta ai parassiti nell'agricoltura europea. 2003. Disponibile all'indirizzo: <http://www.ncfap.org>, ultima consultazione 14/1/05.

OCRATOSSINA A: DECONTAMINAZIONE BIOLOGICA DEI MOSTI NEL CORSO DELLA FERMENTAZIONE ALCOLICA

- Massimo Morassut, Francesca Cecchini, Emilia Garcia Moruno, Michele Savino, Alberto Cedroni
- (a) *Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA), Istituto Sperimentale per l'Enologia sezione di Asti*
 - (b) *Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA), Istituto Sperimentale per l'Enologia sezione di Barletta, Bari*
 - (c) *Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA), Istituto Sperimentale per l'Enologia sezione di Velletri, Roma*

Introduzione

La contaminazione occasionale dei vini con ocratossina A (OTA) di origine fungale, risulta ampiamente documentata da una vasta bibliografia che in parte ha definito i fattori che condizionano il fenomeno (1, 2, 3, 4). I funghi produttori di OTA si sviluppano su foglie e frutti di *Vitis Vinifera L.* e solo in condizioni particolari di temperatura e umidità producono OTA che rilasciano nel corso delle operazioni di vinificazione. L'OTA è classificata come una sostanza con probabile azione cancerogena per l'uomo (5) e un potente agente nefrotossico (6). Allo scopo di ridurre il rischio associato all'OTA contenuta nel vino, diverse attività di ricerca, sono state indirizzate verso la definizione di misure preventive e correttive attraverso l'applicazione del Sistema HACCP (7, 8). La recente definizione di un limite massimo nei vini (9), rende opportuna la individuazione di adeguati interventi oltre che preventivi anche correttivi qualora detti limiti fossero già superati nella matrice iniziale. Tra le possibili azioni a carattere correttivo, può rientrare certamente la stessa fermentazione alcolica nel corso della quale l'azione del lievito a carico della OTA sembra fornire un utile contributo ai fini della riduzione del rischio, soprattutto nel caso di bassi valori iniziali. In questa nota sono presentati alcuni risultati di diverse esperienze già oggetto di specifici approfondimenti.

Materiali e metodi

In precedenti esperienze preliminari nel corso della fermentazione è stata evidenziata una significativa capacità di ridurre il contenuto della OTA, appositamente aggiunta al substrato di fermentazione. Questa attività di ricerca è stata impostata su distinti stipiti di lieviti e su diversi mosti naturali caratterizzati da un diverso contenuto di composti fenolici, soprattutto in relazione al profilo fenolico che distingue i mosti provenienti da uve a bacca colorata (MR) e bacca bianca (MB) per la presenza di composti antocianici. Su questi mosti previa aggiunta di 2 µg/L di OTA, è stata avviata la fermentazione alcolica al termine della quale è stato determinato il contenuto di OTA nei vini e nell'estratto metanolico delle fecce (EMF) residue della fermentazione (10). Gli stipiti di lievito impiegati provengono dalla collezione dell'Istituto Sperimentale per l'Enologia.

Saccharomyces cerevisiae r.f. uvarum (Suvar), *Saccharomyces cerevisiae r.f. cerevisiae* (Scere), *Saccharomyces cerevisiae r.f. bayanus* (Sbaya), *Kloeckera apiculata* (Kloec),

Torulasporea delbruecki (Torul), *Schizzosaccharomyces pombe* (Schiz), *Candida pulcherrima* (Candi), *Saccharomyces ludwigi* (Sludwi).

Risultati e discussione

I dati in Figura 1, evidenziano che, in tutte le tesi, si è verificata una riduzione media di OTA, pari al 55,37% con valori compresi nell'intervallo tra 40,10% e 72,12%. I dati distinti per tipo di mosto dimostrano che la capacità di abbattere il contenuto di OTA appare superiore nei fermentati derivanti da mosto di uve a bacca colorata. Inoltre, solo il 22,61% di OTA iniziale è stato ritrovato nell'estratto metanolico dei lieviti (EMF), mentre in media il 32,76% di OTA aggiunta non è stata recuperata non essendo presente nei vini e nell'EMF.

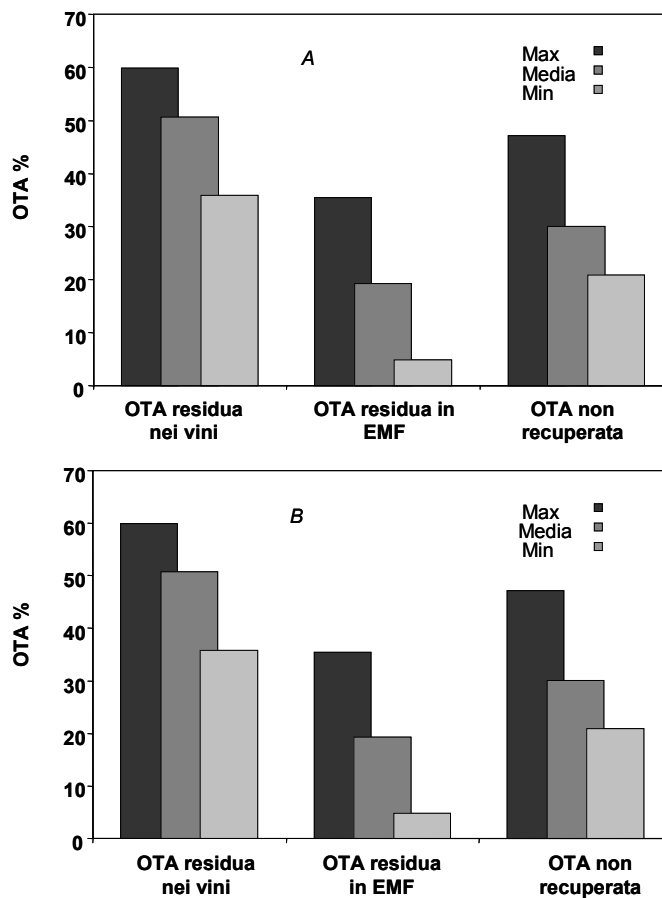


Figura 1. Valori percentuali di OTA nei vini a fine fermentazione, OTA in EMF e OTA non recuperata ottenuta per differenza dal totale aggiunto. A= tesi derivanti da MB, B= tesi derivanti da MR

La distribuzione dei dati relativi al contenuto di OTA, determinato nel fermentato per i diversi lieviti, indipendentemente dal tipo di mosto, evidenzia, ad eccezione della *Kloeckera*, un'ampia dispersione dei valori particolarmente evidente in *Saccharomyces cerevisiae* *rf.*

cerevisiae, *rf. uvarum*, *rf. bayanus* e in *Schizosaccharomyces Pombe* e quindi un diverso comportamento rispetto agli altri lieviti testati (Figura 2).

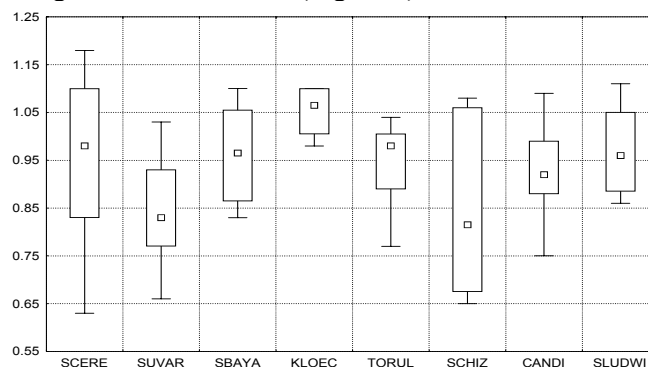


Figura 2. Box Plot, per ogni lievito, del contenuto di OTA (µg/L) nei vini da MB e MR a fine fermentazione

In tutti i lieviti testati ad eccezione del *Saccharomyces ludwigi*, l'OTA trovata negli EMF, derivanti dai fermentati di MR, risulta significativamente diversa da quella determinata negli EMF derivanti dai fermentati di MB (dati non riportati). Se si tiene in considerazione la quantità di OTA recuperata per grammo di feccia, in tutte le tesi a confronto, risulta che nelle fecce derivanti dai vini di MR si concentrano i maggiori quantitativi di OTA (Figura 3), anche se appare evidente una maggiore dispersione dei dati a conferma di un diverso comportamento tra i lieviti a confronto, in relazione al substrato.

Negli EMF derivanti dai fermentati di MR con i lieviti *S. cerevisiae*, *rf. cerevisiae*, *rf. uvarum*, *rf. bayanus* si riscontra la maggiore quantità di OTA confermando, la capacità di questi stipiti a ridurre maggiormente il contenuto di OTA inizialmente presente nel mosto (Figura 4). Il test di Tukey evidenzia, inoltre, che i valori di OTA riscontrate nei rispettivi EMF non differiscono significativamente. Anche in questo caso il substrato di fermentazione sembra influire sulla capacità di assorbimento di OTA sulle fecce.

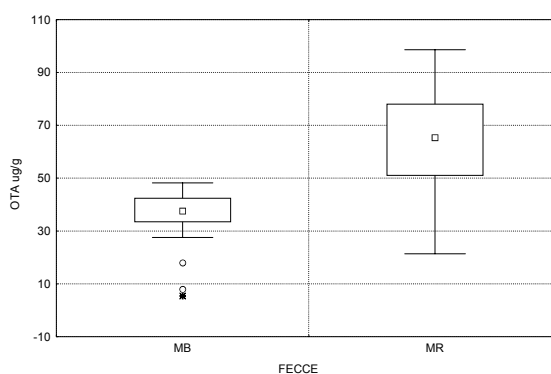


Figura 3. Box Plot, della concentrazione di OTA (ng/g di feccia) in EMF per tipo di mosto

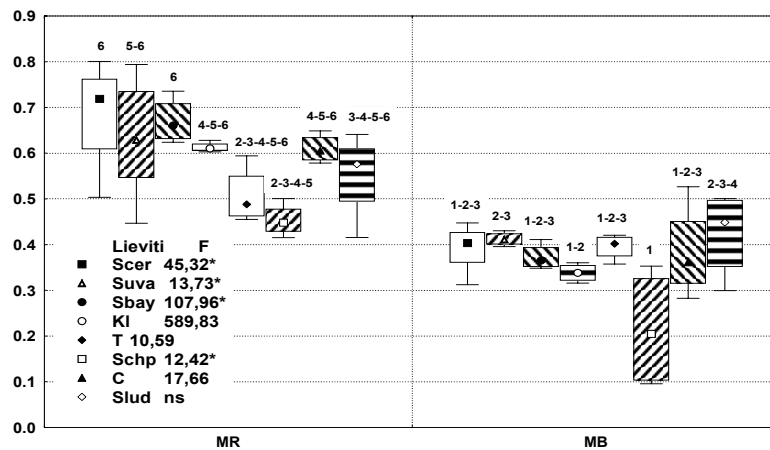


Figura 4. Box Plot, per ogni tesi, del contenuto di OTA (mg/L vino) in EMF derivanti da MR e MB. Nella legenda sono riportati i valori significativi di F per $p \leq 0.05$ ns=non significativo. Numeri differenti individuano valori significativamente differenti per $p=0.05$ (test di Tukey)

Conclusioni

L'esperienza condotta ha confermato che al termine del processo di fermentazione alcolica ad opera di differenti stipiti di lievito, il contenuto di OTA iniziale presente nel mosto (MR, MB) si riduce in modo significativo. La riduzione finale media riscontrata è di circa il 50%. Il fenomeno appare più evidente nei vini rossi, in particolare in quelli derivanti dalle fermentazioni condotte con *Saccharomyces rf. cerevisiae*, *rf. uvarum*, *rf. bayanus*, e *Schizosaccharomyces pombe*. Ciò è probabilmente a causa di un'interazione tra questi lieviti e il contenuto polifenolico del substrato di fermentazione. La determinazione preventiva della OTA nei mosti consente di valutare se la riduzione media di OTA ad opera della fermentazione è sufficiente affinché i vini rientrino nei limiti di legge eventualmente definiti in futuro soprattutto nel caso di bassi valori iniziali.

Bibliografia

1. Zimmerli B, Dick R. Ochratoxyn A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assesement. *Food Additives and Contaminantes* 1996;13:655-68.
2. Codex Alimentarius Commission Codex Committee on Food Additives and Contaminantes. *Revised Position Paper on Ochratoxin A CX/FAC 98/16*;1997.
3. Davis ND, Diener UL. Mycotoxins. In: Beuchat L R (Ed.). *Food and Beverage Mycology, 2nd edition*. New York: Van Nostrand Reinhold; 1987. p. 517-20.
4. Dumeau F, Trionè D. Influence de différents traitements sur la concentration en ochratoxine A des vins rouges. *Revue des Œnologues* 2002;95:37-8.
5. International Agency for Research on Cancer. *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Year 1993* Lyon France: IARC Working Group, World Health Organisation, vol.56, 489-521.
6. Plestina R. Nephrotoxicity of ochratoxin A. *Food Additives and Contaminantes* 1996;13:49-50.

7. Italia. Decreto Ministeriale Ministero delle Politiche Agricole e Forestali 7 aprile 2000. Linee guida nella produzione vitivinicola per la prevenzione della potenziale contaminazione da micotossine. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n. 97, 27 aprile 2000.
8. Morassut M, Cecchini F. Riduzione del contenuto di ocratossina A nei vini. Applicazione del sistema HACCP. *Industria delle Bevande* 2003;186:357-62.
9. Office International de la Vigne et du Vin. *Assemblée Générale de l'82ème, 2002*. Bratislava: OIV; 2002.
10. Visconti A, Pascale M, Centonze G. Determination of Ochratoxin A in wine and beer by immunoaffinity clean-up and HPLC analysis with fluorometric detection. *Journal of chromatography* 1999;A864:89-101.

AFLATOSSINE NEL LATTE IN COMMERCIO: LA SITUAZIONE PIEMONTESE

Carlo Nachtmann, Silvia Gallina, Monica Gramaglia, Marina Rastelli, Gian Luca Ferro, Lucia Decastelli
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

Introduzione

Le aflatossine, metaboliti prodotti da miceti del genere *Aspergillus* (2), sono in grado di causare significative patologie nell'uomo e negli animali; infatti, oltre a manifestare tossicità acuta, possono sviluppare anche effetti cancerogeni.

Lo IARC (*Internazionale Agency for Research on Cancer*) classifica le aflatossine nel gruppo 1, come agenti sicuramente cancerogeni per l'uomo. L'aflatossina M₁, invece, è inserita nel Gruppo 2B, come agente con possibile azione cancerogena per l'uomo (3).

L'aflatossina M₁ è un catabolita idrossiderivato della aflatossina B₁ assimilata con la dieta: dalla aflatossina B₁, infatti, attraverso un processo di idrossilazione, si forma, in sede epatica e renale, l'aflatossina M₁ che viene successivamente eliminata nel latte. L'escrezione mammaria inizia a comparire circa 12 ore dall'inizio della somministrazione di alimento contaminato e scompare dopo circa 24 ore dalla sua eliminazione dalla dieta. Il suo effetto tossico è dovuto al legame tossina-acidi nucleici e tossina-nucleoproteine, comportando la comparsa di immunodepressione, cancerogenesi e teratogenesi secondo i livelli e le modalità di esposizione (4).

Materiali e metodi

L'anno 2003 è stato caratterizzato da particolari condizioni climatiche (elevate temperature estive) che hanno prodotto condizioni ideali per la comparsa nelle derrate cerealicole, mais in particolare, di notevoli concentrazioni di aflatossina B₁. Tale situazione ha prodotto, di riflesso, la comparsa dell'aflatossina M₁ nel latte e nei suoi derivati, generando allarme sanitario.

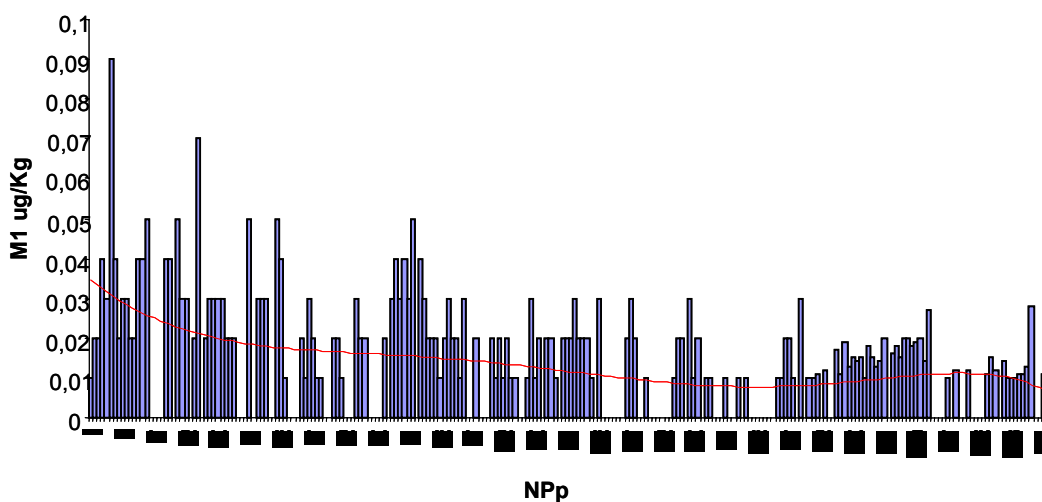
La Regione Piemonte ha provveduto, pertanto, ad istituire un piano di monitoraggio allo scopo di verificare la contaminazione del latte commercializzato sul territorio. Da novembre 2003 a ottobre 2004 sono stati prelevati dai Servizi Veterinari nell'ambito dei Controlli Ufficiali del Sistema Sanitario Nazionale e analizzati, presso i laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, 242 campioni di latte fresco pastorizzato e a lunga conservazione (UHT) (Tabella 1) in fase di commercio per verificare il livello di contaminazione in aflatossina M₁. I campioni sono stati processati mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) accoppiata a rilevazione fluorimetrica, previa purificazione degli estratti mediante immunoaffinità.

Tabella 1. Analisi eseguite

Mese	N. campioni	Media
Novembre 2003	31	0,027
Gennaio 2004	7	0,021
Febbraio 2004	17	0,016
Marzo 2004	19	0,010
Aprile 2004	21	0,024
Maggio 2004	21	0,010
Giugno 2004	31	0,010
Luglio 2004	25	0,006
Agosto 2004	19	0,010
Settembre 2004	27	0,013
Ottobre 2004	24	0,008
Totale campioni conteggiati	242	

Risultati

Esclusivamente 2 campioni (0.8%) sono risultati non conformi alla vigente normativa con concentrazioni superiori al limite di 50 ppt (1); entrambi i campioni si riferiscono al mese di novembre 2003 (Figura 1) e riportano rispettivamente valori di 90 ppt e 70 ppt. Si sottolinea, inoltre, che in 5 campioni (4.3%), 2 del mese di novembre 2003, 2 di febbraio 2004 e 1 di aprile 2004, sono stati evidenziati valori di 50 ppt.

Figura 1. Andamento puntuale M₁

Discussione

Tale andamento sottolinea lo stretto legame che esiste tra l'utilizzo di alimenti contaminati e l'escrezione mammaria di aflatossina M₁. Verificando le concentrazioni riscontrate di aflatossina M₁ (Figura 2) è possibile evidenziare un progressivo decremento della tossina per tutto il periodo di osservazione, ad eccezione di un picco di ricomparsa (aprile 2004) a livelli

paragonabili al mese di novembre 2003. Tale andamento indicherebbe un utilizzo di mangimi contaminati, anche se a livelli più bassi, e consiglia una costante e continua attività di sorveglianza da parte degli organi del controllo ufficiale.

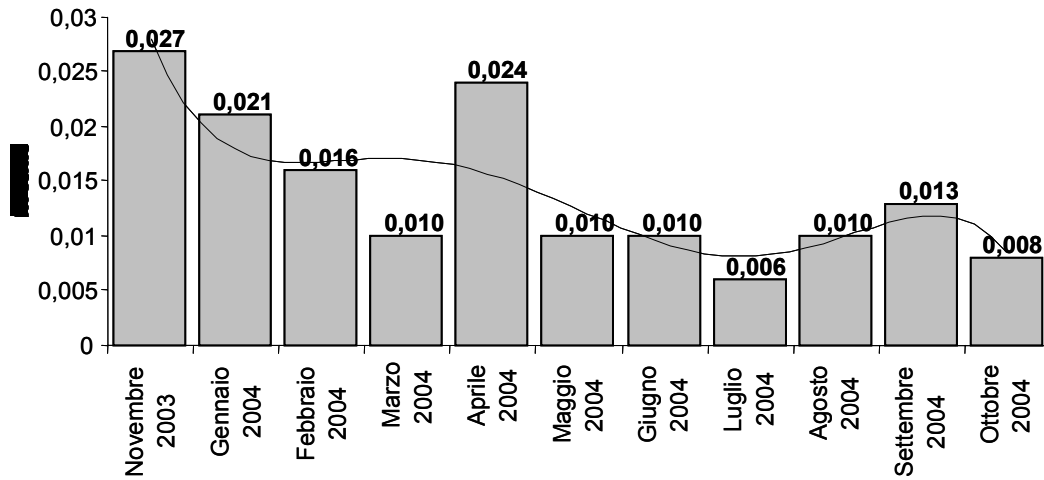


Figura 2. Andamento valori mensili medi M₁

Bibliografia

1. Italia. Circolare Ministero della Salute 9 giugno 1999, n. 10 Direttive in materia di controllo ufficiale sui prodotti alimentari: valori massimi ammissibili di micotossine nelle derrate alimentari di origine nazionale, comunitaria e Paesi terzi.
2. Edmond EC. Update of survey, regulation and toxic effect of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters* 2002;127(1-3):19-28.
3. Maurice OM. Risk assesment for aflatoxins in foodstuffs. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2002;50(3-4):137-142.
4. Pitt JI. Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin* 2000;56(1):184-192.

RUOLO DELL'AGRICOLTURA PER LA SICUREZZA E LA QUALITÀ DEGLI ALIMENTI

Marco Aurelio Pasti

Confagricoltura, Associazione Italiana Maiscoltori

Lo sviluppo recente della nostra agricoltura è stato fortemente condizionato dalla politica agricola comunitaria (PAC), che nel corso degli ultimi anni ha mutato profondamente i suoi orizzonti. Tappe fondamentali di questo cambiamento sono state la riforma Mc Sharry del 1992 e la riforma Fishler del 2003, che entrerà in vigore nel 2005. Con queste riforme, l'obiettivo della politica agricola è passato dalla quantità alla qualità, alla tutela dell'ambiente e alla sicurezza alimentare, in un crescendo di attenzioni e normative cui oggi è sottoposto l'agricoltore.

All'interno della filiera agroalimentare, la fase agricola è certamente il passaggio chiave: la qualità si costruisce a valle e a monte (e.g. miglioramento genetico), ma è la produzione agricola, che è soggetta al clima imprevedibile, che spesso ha un'importanza notevole nel determinare la qualità e la sicurezza di un prodotto. Pensiamo proprio alle micotossine del mais, a come variano da un anno all'altro, da una regione all'altra.

Per soddisfare le crescenti richieste in termini di qualità e sicurezza alimentare il produttore ha bisogno di indicazioni su come operare. Queste indicazioni devono essere poche, precise, efficaci e specifiche per ogni ambiente e coltura. Per questo c'è bisogno di una ampia sperimentazione diffusa sul territorio e continuata negli anni.

A tutt'oggi non abbiamo strumenti che garantiscono il raggiungimento dei limiti proposti a Bruxelles per le fumonisine nel mais. Tali limiti, oltre ad essere difficili da raggiungere per molti agricoltori (oltre la metà dal mais italiano è abbondantemente oltre 2000 µg/kg), non sono neppure necessari per tutelare la salute dei consumatori. Di questo abbiamo avuto la più ampia conferma questa mattina dai dati esposti dal Dottor Brera da cui si evince che il contenuto medio di fumonisine nelle farine di polenta è di 1,66 ppm contro un limite, seppur provvisorio di 1 ppm, e che, nonostante tale valore, considerando il 95^{mo} percentile nella regione più a rischio nel periodo più a rischio e nella fascia di età più a rischio si arriva ad un valore di assunzione media giornaliera di 0.7 µg/kg di peso corporeo, cioè poco più di un terzo della TDI. Questi dati non fanno altro che confermare il quadro rassicurante che era già emerso da studi precedenti. Mi domando, allora, se le persone che compongono la commissione, che a Bruxelles ha proposto tali limiti, siano a conoscenza di quanto abbiamo sentito questa mattina dal Professor Cantelli Forti, sulla valutazione del rischio che è necessariamente legata al rapporto costi benefici.

I messaggi che vengono dati ai produttori agricoli devono essere univoci e frutto di sperimentazione diffusa nel territorio. Troppe volte in passato sono state date indicazioni improvvisate, che venivano capovolte nel giro di pochi anni. Penso ad esempio alla coltura della barbabietola da zucchero, coltura in cui per alcuni anni l'industria saccarifera ha indirizzato la tecnica agronomica e la selezione genetica unicamente verso la qualità dei sughi a discapito della produttività e in pochi anni, grazie anche ad una buona dose di improvvisazione, siamo rimasti il fanalino di coda dell'Unione Europea, tanto che oggi con l'imminente riforma dell'OCM zucchero la barbabietola rischia di sparire dalle nostre campagne. O penso alla diatriba tra il professor Umberto Veronesi e il dottor Monasta, coordinatore dell'INRAN, sull'uso del mais BT per ridurre la presenza di aflatossine nel mais. Certo, per il produttore agricolo non è facile orientarsi di fronte a pareri così contrapposti.

Non possiamo, poi, non tener conto di altri due fattori che caratterizzano la maidicoltura nazionale: la polverizzazione aziendale e il lento, ma inesorabile, calo dei redditi. La media della superficie aziendale destinata a mais non arriva a tre ettari e il valore della produzione di un ettaro di mais è poco più di un terzo di quello di ventidue anni fa: e puriamo il prezzo del mais dall'inflazione. Questi due fattori hanno fatto sì che l'attenzione di molti imprenditori si sia concentrata su altre attività che rappresentano una fonte di reddito più importante rispetto al mais. Ciò ha comportato un rallentamento nello sviluppo della tecnica colturale ed, in parte, un abbassamento della professionalità degli operatori che affidano le cure del mais sempre più ai contoterzisti. Ciononostante, non si può ignorare che il mais sia la coltura più diffusa in Italia dopo il grano duro (che peraltro rischia di essere molto più ridimensionato del mais dalla riforma Fishler), e che il valore della sua produzione sia di gran lunga superiore a qualsiasi altra coltura, a parte la vite, che però sfrutta il valore aggiunto del vino. Credo che sia necessario riprendere il monitoraggio delle colture in campo, per valutare i punti critici in base a dati rilevati; personalmente, non credo molto all'adozione di alcune misure, come l'obbligo di raccogliere sempre e comunque il mais ad umidità superiori al 20%, per ridurre il contenuto di aflatoossine: il costo per il maiscoltore è certo, ma il risultato è incerto sia in caso di annate a rischio (quando probabilmente bisognerebbe anticipare ulteriormente la raccolta), sia nel caso di annate relativamente tranquille come il 2004.

In passato come produttori abbiamo già dimostrato il nostro impegno per migliorare la qualità e la sicurezza delle nostre produzioni e intendiamo dimostrarlo anche nel presente e nel futuro. Ricordo ad esempio che l'Italia è l'unico paese europeo dove l'umidità massima di commercializzazione del mais è il 14% e che i costi di tale operazione sono ricaduti completamente sulle spalle del produttore. Ricordo che dal primo gennaio entrerà in vigore la legge sulla tracciabilità obbligatoria, che permetterà di seguire il percorso delle merci all'interno della filiera agroalimentare.

Il nostro impegno quindi c'è stato c'è e ci sarà purché ci vengano posti degli obiettivi sensati e raggiungibili e la ricerca ci fornisca i mezzi per raggiungerli.

DECONTAMINAZIONE DA *FUSARIUM*-TOSSINE DELLA GRANELLA DI MAIS CON IL PROCESSO DI MOLITURA A SECCO

Amedeo Reyneri, Francesca Vanara, Laura Bertetto, Ugo Peila

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

(b) Molino F.lli Peila srl, Responsabili qualità e produzione, Valperga (TO)

Introduzione

Le fasi della trasformazione molitoria sono un processo in grado di separare la granella di mais per uso alimentare nelle sue componenti (germe, pericarpo, endosperma). Alla luce delle esigenze qualitative delle farine, questi processi debbono essere considerati anche per la loro azione decontaminante della materia prima con la ripartizione delle micotossine nei prodotti e sottoprodotti ottenuti dalla trasformazione. Studi internazionali condotti a livello pilota e industriale da diversi autori confermano l'importanza della trasformazione della granella per garantire la sanità delle farine ad uso alimentare (1, 2, 3).

Lo scopo di questa ricerca iniziata nel 2003 è la quantificazione della ripartizione e della riduzione del contenuto in micotossine nei prodotti finiti ottenuti con la trasformazione industriale tramite molitura a secco.

Materiali e metodi

Nella ricerca sono stati analizzati 11 lotti di lavorazione di granella proveniente dalle campagne 2002-03-04.

I prodotti sono stati campionati da punti di prelievo rappresentativi dell'intero processo. Si è prelevata la granella prima e dopo la fase di pulitura intensiva, il germe ottenuto dalla degerminazione e il fumetto e le farine ad uso alimentare ottenute a seguito della raffinazione. In ultimo si è prelevata la farinetta per uso zootecnico, contenente le crusche e gli scarti delle farine. Ogni sessione di campionamento, di circa 2 ore, ha preso in esame 10-15 t di prodotto lavorato con un totale di 5 sottocampionamenti per ognuno dei prodotti in esame.

I campioni sono stati analizzati sia per il contenuto in micotossine (fumonisine, zearalenone e deossinivalenolo) sia per la composizione chimica (umidità, ceneri e grassi). L'analisi delle micotossine è stata eseguita con la tecnica strumentale HPLC in 2 lotti e con saggi immunoenzimatici Elisa in 9 lotti.

Risultati

Ripartizione *Fusarium*-tossine

La ripartizione risultante dall'analisi dell'intero processo di lavorazione ha evidenziato la farinetta come il prodotto più contaminato. Il suo contenuto in *Fusarium*-tossine è risultato mediamente di 2-3 volte superiore rispetto alla granella di partenza (Tabella 1). Il germe è un

altro prodotto nel quale si ritrova ancora una presenza pari o di poco superiore di micotossine rispetto alla granella intera. La sua contaminazione è un indice della diffusione del fungo nelle frazioni interne, anche a causa del più elevato tenore in grasso per questa frazione. I diversi prodotti finiti (farine e grits) e il fumetto (farina a granulometria inferiore a 350 µm) sono, invece, risultati significativamente più puliti rispetto alla granella iniziale; in particolare sono state misurate riduzioni mediamente di 3 e 6 volte.

Le *Fusarium*-tossine si distribuiscono diversamente nelle frazioni ottenute con la trasformazione. In particolare, le fumonisine presentano un tasso di abbattimento superiore rispetto alle altre tossine mentre il deossinivalenolo è tendenzialmente più presente nell'endosperma e quindi nei prodotti derivati quali fumetto e farine.

Tabella 1. Distribuzione delle *Fusarium*-tossine nei prodotti della trasformazione*

Prodotto	Fumonisine	Zearalenone	Deossinivalenolo
Granella prima della pulitura	100 c	100 ab	100 ab
Granella pulita	72 bc	59 ab	110 ab
Germe	94 bc	123 b	197 b
Farinetta	251 d	367 c	339 c
Fumetto	36 ab	30 a	43 a
Farine-grits	12a	20ab	25a

* 2002 – 2004; valore indice : contaminazione iniziale = 100; Duncan's multiple range test (P < 0.05)

Il dettaglio della contaminazione dei prodotti finiti mette in evidenza una relazione inversamente proporzionale tra granulometria e prodotti finiti (Figura 1). Il fumetto, farina a granulometria più fine (< 350 µm) usato come ingrediente nelle preparazioni dolciarie, ha una riduzione del 60-70%. Le farine, con granulometria compresa tra 350 e 700 µm, hanno invece livelli di riduzione pari al 75-85%. Dal confronto tra farine prodotte nello stesso processo di lavorazione, come fioretto e bramata, e che si differenziano per avere il primo granulometria compresa tra 350 e 500 µm e la seconda tra 500 e 700 µm, la contaminazione del fioretto è superiore del 5% rispetto alla bramata.

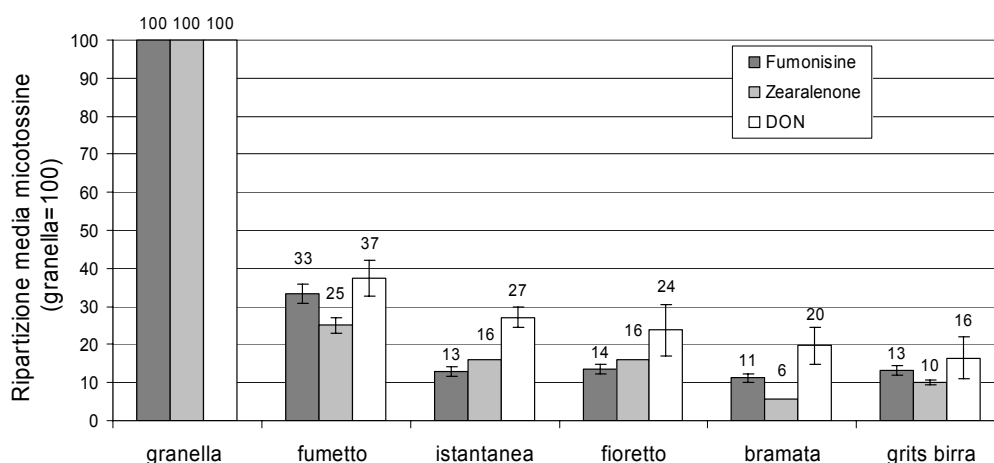


Figura 1. Distribuzione delle *Fusarium*-tossine nelle farine destinate al consumo umano diretto

Dall'analisi della composizione chimica dei campioni, risulta una relazione diretta tra contenuto in grassi e tenore in micotossine. Considerando le farine e il fumetto, quest'ultimo evidenzia un maggiore contenuto sia in grassi sia in micotossine. Questi valori superiori derivano dal suo contenuto in frazioni fini che si separano durante la raffinazione e che sono costituite dalle parti di endosperma più vicine al germe. L'elevata presenza di tossine in queste frazioni confermano la presenza dei contaminanti non solo nelle parti più esterne della cariosside, ma anche nel germe e nella frazione di endosperma vicina al germe.

Probabilità di superamento della soglia

I tassi di abbattimento ottenuti nel corso della ricerca sono uno strumento utile per la gestione del problema micotossine a partire dalla materia prima. Prendendo in considerazione le soglie di legge previste nel prossimo futuro per le farine ad uso alimentare e i limiti già in vigore in alcuni stati europei, il mulino potrà aggiungere come parametro necessario all'accettazione delle materie prime destinate alla macinazione anche il livello massimo di micotossine. Questo livello sarà infatti quello che gli consente di ottenere una farina ad uso alimentare con tenori di micotossine sotto il limite di legge.

Conclusioni

Il processo di molitura a secco si è rivelato un efficace sistema di decontaminazione dalle *Fusarium*-tossine. Il contenuto iniziale della granella macinata è ridotto di 2-6 volte nelle farine ad uso alimentare.

Un'attenta trasformazione molitoria costituisce un importante elemento per ottenere prodotti di migliore sanità, ma ulteriori e più decisivi miglioramenti si possono raggiungere solo tramite un approccio integrato di filiera.

Bibliografia

1. Bennett GA, Richard JL. Influence of processing on *Fusarium* mycotoxins in contaminated grains. *Food Technology* 1996;50(5):235-8.
2. Scudamore K, Banks J. *Meeting the mycotoxin menace-The fate of mycotoxins during cereal processing*. Wageningen: Academic Publishers; 2004. p. 165-179.
3. Broggi, *at al.* Distribution of fumonisins in dry-milled corn fractions in Argentina. *Food Additives and Contaminants* 2002;19:465-9.

GESTIONE DEL RISCHIO NELLE AZIENDE LOMBARDE

Nicoletta Rizzi, Paola Amodeo

(a) Laboratorio Foraggi, ARAL, Crema

(b) Alimentazione SATA della Lombardia, Milano

Le micotossine sono metaboliti fungini secondari.

L'elenco delle tossine identificabili si allunga di pari passo con la ricerca poiché numerosi sono i ceppi fungini in grado di produrre tossine. Questa massiccia attenzione per la ricerca di nuove tossine e delle tecniche analitiche in grado di determinarle, è indotta dalla correlazione sospetta o accertata con la cancerogenicità nell'uomo e negli animali.

L'azione cancerogena e citotossica della micotossina, come nel caso dell'aflatossina, può non essere provocata direttamente da essa ma dai suoi epossiderivati contro i quali l'organismo attua un processo di detossificazione.

Lo IARC (Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro), ha classificato l'aflatossina B₁ in classe 1 cioè cancerogena per l'uomo, e il suo derivato, l'aflatossina M₁, in classe 2B cioè potenzialmente cancerogena per l'uomo.

Nelle bovine da latte è noto che l'aflatossina B₁ contenuta negli alimenti ingeriti, passi nel latte, dopo trasformazione nel suo derivato (aflatossina M₁): questo meccanismo è denominato carry over.

Le varie specie animali, non presentano la stessa sensibilità nei confronti delle aflatossine: i monogastrici sono più sensibili dei ruminanti anche se in questi ultimi si possono presentare sintomatologie croniche legate all'immunosoppressione.

La possibile contaminazione degli alimenti che può iniziare in campo e mantenersi o aumentare durante le fasi di raccolta, stoccaggio e trasformazione, rende fondamentale l'attenzione ad ogni fase di produzione e trasformazione degli alimenti.

L'elevata stabilità termica di questi metaboliti fungini fa sì che i processi di pellettatura, tostatura, fiocatura, ecc. non siano in grado di ridurre la tossicità.

Per tutti questi motivi, numerose sono le richieste d'analisi che pervengono al laboratorio Agroalimentare dell'ARAL (Ass. Regionale Allevatori della Lombardia), e che provengono da tecnici del servizio di assistenza tecnica (SATA) delle Ass. Produttori Provinciali Allevatori (APA), da mangimifici, da caseifici, da tecnici che svolgono attività di consulenza nelle aziende e da singoli allevatori particolarmente sensibili al problema.

L'attenzione maggiore è rivolta al monitoraggio del latte prodotto e destinato alla trasformazione o al consumo umano diretto.

Relativamente alla ricerca delle micotossine negli alimenti, sulla base delle analisi effettuate presso il nostro laboratorio, dal 2001 ad oggi, le richieste sono indirizzate verso le tossine più note quali le aflatossine, deossinivalenolo, zearalenone, fumonisine e ocratossina. (Figura 1).

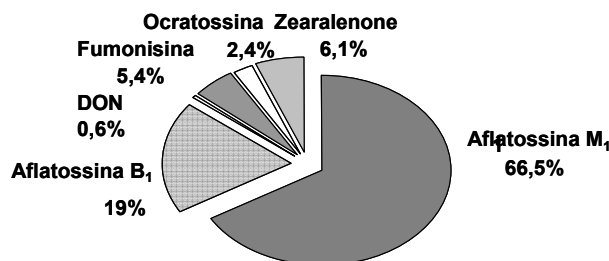


Figura 1. Distribuzione percentuale delle micotossine. Numero di analisi: 18.879

Nelle figure successive sono stati riportati i valori medi delle micotossine negli anni dal 2001 al 2004 riscontrate nei quattro alimenti principali: silomais (valori riferiti al secco), unifeed (valori riferiti al secco), mangimi o nuclei (valori riferiti al tal quale), mais farina o granella (valori riferiti al tal quale).

I valori sono espressi in ppm (parti per milione = mg/kg); ppb (parti per bilione = µg/kg); ppt (parti per trilione = ng/kg).

Nella Figura 2 sono riportati i valori medi dell'aflatossina B₁ sui quali possono essere fatte le seguenti considerazioni:

- i valori sono sempre sotto il limite di 5 ppb tranne che per il mais nell'anno 2003 (periodo dell'emergenza aflatossine)
- i valori del silomais sono sempre molto bassi
- i valori dei mangimi e dei nuclei sono dipendenti dalla formulazione
- i valori dell'unifeed dipendono strettamente dalla quantità di farina di mais inserita nella formulazione. Nel periodo dell'emergenza la media è comunque inferiore ai 5 ppb; ciò nonostante la quantità giornaliera di unifeed somministrata per bovina ha portato a valori di aflatossine nel latte vicini o anche superiori alla soglia definita per legge.

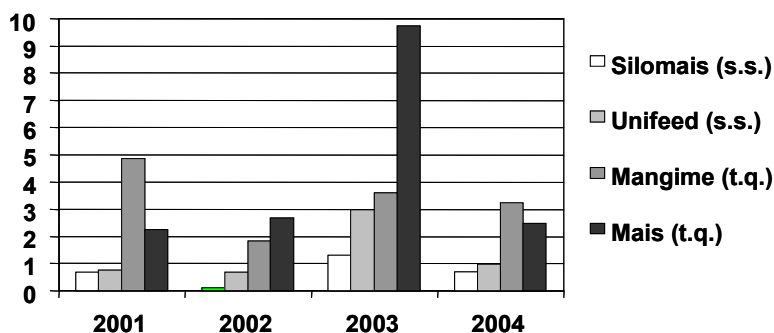


Figura 2. Livelli di aflatossina B₁ (test ELISA: valori medi espressi in ppb)

Nella Figura 3 sono riportati i valori medi del deossinivalenolo che è rimasto abbastanza costante negli anni 2001 e 2002 mentre è incrementato nel silomais e, conseguentemente, nell'unifeed negli anni successivi.

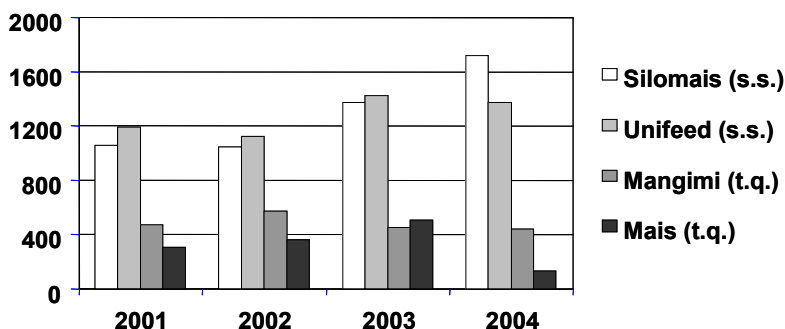


Figura 3. Livelli di deossinivalenolo (test ELISA: valori medi espressi in ppb)

Nella Figura 4 sono riportati i valori medi della fumonisina sui quali possono essere fatte le seguenti considerazioni:

- i valori, espressi in ppm, sono risultati particolarmente alti nell'anno 2002 nel silomais
- nell'anno 2003 i valori sono invece risultati più bassi in tutti gli alimenti a conferma che le condizioni meteorologiche favorevoli allo sviluppo di *Aspergillus*, sono poco favorevoli allo sviluppo di *Fusarium*.

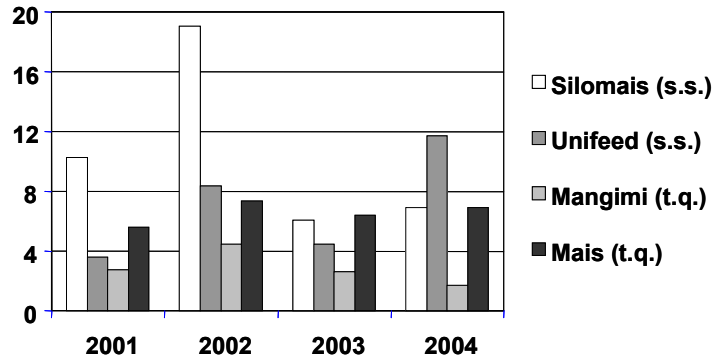


Figura 4. Livelli di fumonisina (test ELISA: valori medi espressi in ppm)

Nelle figure 5 e 6 sono riportati rispettivamente i valori medi dello zearalenone e dell'ocratossina: i livelli di zearalenone in generale si mantengono sotto i valori di 500 ppb; i valori di ocratossina variano nei mangimi in base alla formulazione. Entrambe queste micotossine possono creare maggiori problemi nelle specie più sensibili come il suino.

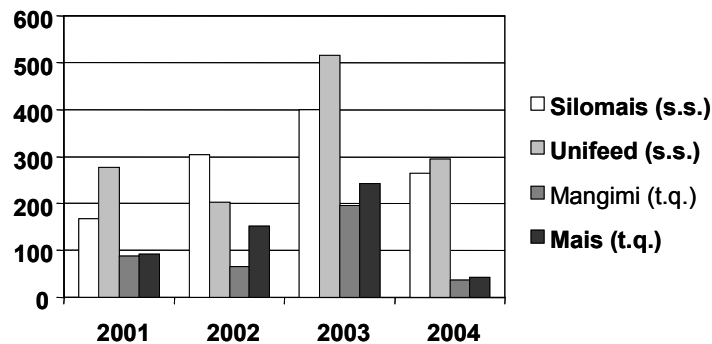


Figura 5. Livelli di zearalenone (test ELISA: valori medi espressi in ppb)

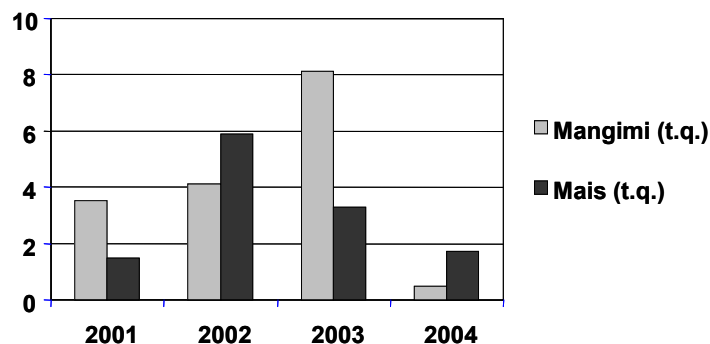


Figura 6. Livelli di ocratossina (test ELISA: valori medi espressi in ppb)

Il Progetto aflatossine

Il Regolamento CE 1525 emesso dalla Comunità Europea il 16 luglio 1998 (1), ha stabilito i tenori massimi ammissibili per alcuni contaminanti presenti nei prodotti alimentari, tra i quali figura per la prima volta l'aflatossina M₁ nel latte. Il valore limite viene fissato in 0,05 ppb.

Il decreto, direttamente applicabile a tutti gli Stati Membri, è entrato in vigore l'1° gennaio 1999.

La legislazione italiana, con il Decreto N 241 11 maggio 1998 (2), aveva definito i limiti per l'aflatossina B₁ nelle materie prime per mangimi e nei mangimi finiti destinati all'alimentazione delle varie specie animali e in particolare per le vacche da latte; con il Decreto 21 maggio 1999 ha disposto l'attuazione delle Direttive CE (3).

Sulla base di queste premesse, la Regione Lombardia – Direzione Agricoltura ha finanziato un progetto regionale (Ricerca dei determinanti la qualità del latte per l'applicazione del Reg. CE 1525 del 16 luglio 1998) che si è svolto negli anni 1999 e 2000, condotto dall'ARAL, con la collaborazione scientifica della Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Milano e dall'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza (4).

Il progetto, molto articolato, aveva vari obiettivi tra i quali: conoscere i valori medi di contaminazione da aflatossine su tutto il territorio lombardo, sia nel latte sia negli alimenti zootecnici, verificare il carry over tra l'aflatossina B₁ e M₁ nelle bovine da latte e definire le eventuali correlazioni tra la contaminazione di aflatossine e i parametri sanitari e gestionali dell'azienda, ecc.

In base ai risultati ottenuti, si sono suggerite alcune prassi da seguire per diminuire, sia in campo sia durante la fase di stoccaggio, la contaminazione da aflatossine degli alimenti ed eventuali accorgimenti da adottare per evitare o diminuire la contaminazione del latte.

Negli anni in cui si è svolto il progetto non è stato facile trovare allevamenti che rispondessero ai requisiti richiesti (aziende con valori di aflatossina M₁ nel latte intorno o superiori alla soglia dei 0,05 ppb) e per tale motivo si è optato di scegliere valori tra 0,02 e 0,03 ppb: questo a testimonianza del fatto che negli anni precedenti al 2003 il problema aflatossine non rappresentava in Italia un rischio e che, se presente, era un problema di "importazione" di materie prime contaminate provenienti da zone a rischio (per esempio zone tropicali, con clima caldo umido).

Il progetto aveva comunque messo in evidenza, tramite una classificazione degli alimenti in base ai livelli di contaminazione, che il mais e i suoi derivati, i panelli proteici, i concentrati e i nuclei, rappresentavano gli alimenti sui quali focalizzare l'attenzione laddove si intendeva approfondire la causa di contaminazione di aflatossina nel latte.

Emergenza aflatossine

Nell'autunno del 2003, dopo un'estate particolarmente calda e senza piogge, lo sviluppo dei ceppi di *Aspergillus flavus* e la conseguente contaminazione di aflatossina B₁ del mais da granella prodotto nella Pianura Padana, hanno portato in primo piano il problema delle micotossine e della necessità di saper gestire un'emergenza così vasta per evitare la contaminazione del latte.

I campioni controllati nel laboratorio ARAL sono stati numerosissimi (9504 analisi di aflatossina M₁ nel latte) e i livelli medi sono riportati nella Figura 7.

Come si può notare i valori medi hanno superato la soglia di 50 ppt nel mese di ottobre dell'anno 2003, in corrispondenza del blocco delle cisterne di latte che superavano la soglia di

legge; grazie all'esperienza derivata dal progetto aflatossine, i tecnici del servizio SATA, intervenendo sulle formulazioni in più di 4000 aziende, già nel mese successivo, hanno riportato i valori medi nel latte a 40 ppt, valori che sono ulteriormente scesi a 30 ppt nel mese di dicembre.

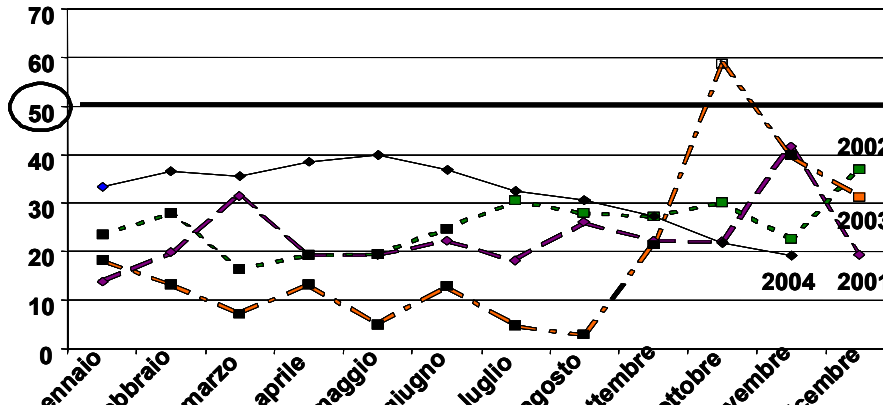


Figura 7. Livelli di aflatossina M₁ nel latte negli anni dal 2001 al 2004 suddivisi per mese (valori medi espressi in ppt)

Nella Tabella 1 vengono indicati i valori medi, le deviazioni standard, i valori massimi e minimi raggiunti, il numero di analisi eseguite e la percentuale di valori che hanno superato la soglia dei 50 ppt negli anni dal 2001 al 2004.

Tabella 1. Livelli di aflatossina M₁ negli anni 2001 – 2004 (valori espressi in ppt)

ANNO	MEDIA	DS	MAX	MIN	NUMERO ANALISI	% (> 50 ppt)
2001	22,63	19,98	190	0	331	5,7
2002	27,49	28,42	308	0	328	13,7
2003	38,27	32,24	259	0	9504	21,6
2004	34,48	19,08	100	0	6894	20,4
TOTALE	35,49	25,58	308	0	17057	20,5

In concomitanza con l'emergenza, nel mese di novembre del 2003, il servizio SATA ha effettuato un monitoraggio sul latte di massa di tutte le aziende della Lombardia iscritte al libro genealogico: ciò ha permesso ai tecnici di intervenire in maniera tempestiva laddove vi erano presenti situazioni a rischio. I risultati ottenuti sono riportati nella Tabella 2.

Tabella 2. Aflatossina M₁ (valori espressi in ppt). Monitoraggio sul latte di massa delle aziende sottoposte a controlli funzionali nel periodo 1/11 – 15/12 anno 2003

Provincia	Media	DS	Numero analisi	% (> 50 ppt)
Bergamo	33,4	66,4	260	13,5
Brescia	29,7	21,4	983	17,2
Como-Lecco	22,5	18,5	123	8,9
Cremona	29,6	19,8	999	15,1
Mantova	30,8	21,6	904	17,9
Milano-Lodi	30,6	18,7	578	14,4
Pavia	30,6	19,1	148	15,5
Sondrio	19,9	14,7	153	3,3
Varese	19,3	17,5	84	8,3
TOTALE	29,5	25,7	4232	15,3

Prevenzione e controllo

Date le ben note problematiche che le micotossine determinano, la loro presenza nelle razioni deve essere tenuta sotto controllo.

Un sistema rivelatosi efficace è il controllo preventivo degli alimenti da inserire nelle formulazioni; ciò impone un monitoraggio continuo, sia degli alimenti autoprodotti in azienda sia di quelli acquistati.

Tuttavia non è possibile analizzare tutte le consegne di alimenti costituenti le razioni, né si può essere certi, una volta analizzate le matrici alimentari di non aver commesso errori di campionamento o che la distribuzione della micotossina considerata sia uniforme nella massa.

Il problema del campionamento (5), e quindi di affidabilità del risultato analitico (6) è ben noto tanto che i legislatori si sono occupati del problema definendo modalità di prelievo molto complesse. Per gli alimenti autoprodotti, in particolare per il mais da granella, i punti critici possono essere individuati nella gestione della coltura in campo, nei tempi di attesa prima dell'essiccamento, nelle temperature di essiccamento, nell'umidità iniziale e finale del prodotto e nelle fasi di conservazione. Lo sforzo compiuto a livello delle produzioni aziendali non deve essere però vanificato dall'introduzione di alimenti acquistati sul mercato che non subiscano un uguale controllo di qualità; a tal fine diventa importante la selezione dei fornitori e la rintracciabilità di filiera.

Nella Tabella 3 sono riportati i valori di aflatossina B₁ nel mais (farina e granella) espressi in ppb sul tal quale, la deviazione standard e il numero di analisi effettuate considerando l'annata agraria del mais cioè dal periodo di raccolta (settembre) al periodo di raccolta dell'anno successivo (agosto).

I valori sono stati inoltre suddivisi in modo da indicare il numero di campioni che hanno superato i 2 ppb, i 5 ppb e i 20 ppb (limite fissato per le materie prime): come si evidenzia dalla Tabella 3 nell'annata agraria 2003 si riscontra un forte superamento della soglia di 5 ppb con una presenza di ben 107 campioni superiori a 20 ppb. Gli stessi dati sono rappresentati graficamente nella Figura 8.

Tabella 3. Livelli di aflatossina B₁ nel mais (valori medi espressi in ppb sul tal quale calcolati per annata agraria)

	MEDIA	DS	NUMERO	> 2 ppb	> 5 ppb	> 20 ppb
Annata 2000	2,16	4,57	43	13	5	1
Annata 2001	2,50	6,42	105	24	9	4
Annata 2002	2,39	7,45	79	20	9	2
Annata 2003	10,18	26,13	945	574	396	107
Annata 2004	1,55	3,40	152	34	15	1
TOTALE			1324	665	434	115

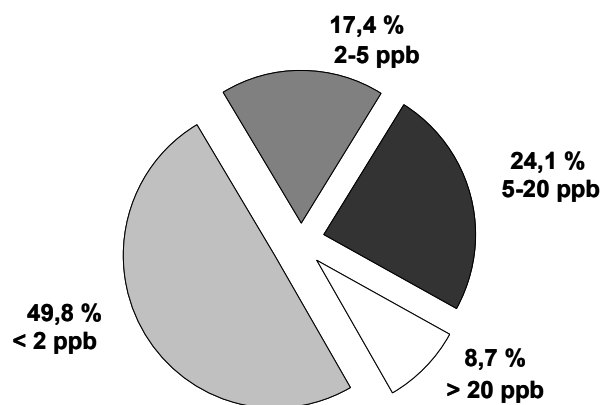


Figura 8. aflatossina B₁ in granella di mais: distribuzione dei valori (anni 2001-2004). Numero di campioni totali 1324

Parametri meteorologici

Ogni specie fungina richiede per lo sviluppo del micelio e per l'eventuale produzione di tossine condizioni di temperatura e di acqua libera ottimali.

Come ben noto, la contaminazione da micotossine in campo è direttamente correlata alla temperatura e umidità dell'ambiente, alle condizioni di stress della pianta (carenza idrica), ai danni da insetti, ecc.

Diventa allora estremamente interessante conoscere, durante il periodo dello sviluppo della cultura in campo, sulla base del rilevamento giornaliero di parametri meteorologici, i valori di temperatura e, umidità, i dati pluviometrici, ecc. in base ai quali poter attuare una previsione di rischio di sviluppo di ceppi fungini e, di conseguenza, di produzione di loro metaboliti tossici.

In tal modo, subito dopo la raccolta, si potrebbe attuare una verifica mirata delle contaminazioni presenti sugli alimenti.

Nelle figure 9, 10, 11 e 12 sono riportate le temperature e i dati pluviometrici giornalieri (Dati Astronomica Langrenus, Cremona) dei mesi primaverili/estivi nel corso degli ultimi 4 anni (7).

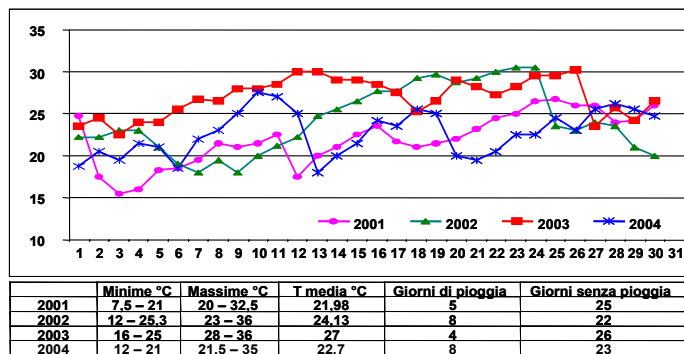


Figura 9. Temperatura media giornaliera e pluviometria nel mese di giugno (anni 2001-2004)

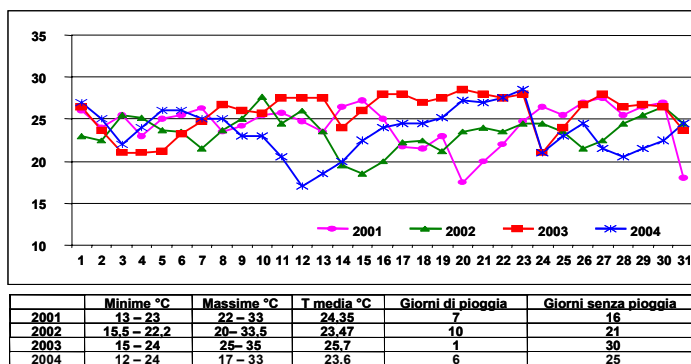


Figura 10. Temperatura media giornaliera e pluviometria nel mese di luglio (anni 2001-2004)

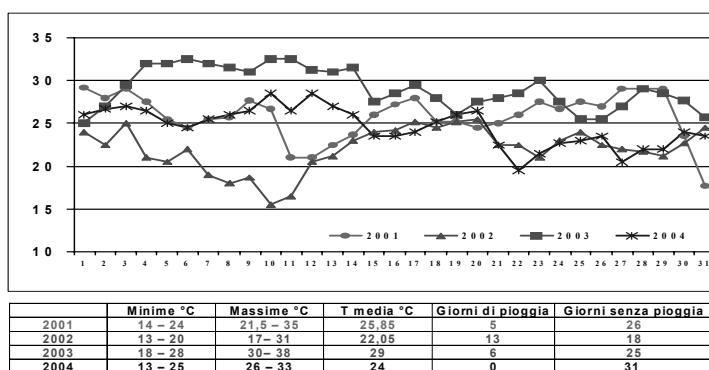


Figura 11. Temperatura media giornaliera e pluviometria nel mese di agosto (anni 2001-2004)

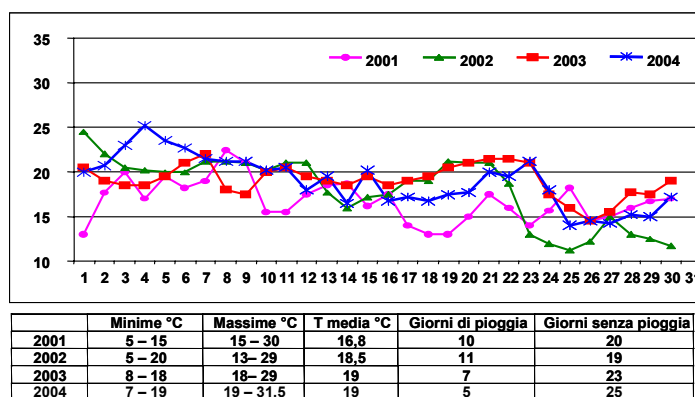


Figura 12. l' temperatura media giornaliera e pluviometria nel mese di settembre (anni 2001-2004)

Progetto TOSSMONIT

Sulla base dell'esperienza maturata e delle considerazioni finora effettuate, è iniziato nell'anno 2004, e si concluderà nel corso del 2005, un progetto denominato TOSSMONIT che si propone di:

1. verificare in tempi brevi l'inquinamento da micotossine negli alimenti zootecnici di produzione aziendale
2. verificare in tempi brevi l'inquinamento da micotossine negli alimenti zootecnici presenti sul mercato lombardo
3. verifica a campione dell'aflatossina M_1 nel latte come campanello di allarme relativamente alla qualità degli alimenti presenti in razione
4. costruzione di un circuito informativo per la diffusione delle informazioni ottenute agli allevatori e ai tecnici
5. verifica della corrispondenza tra previsioni di inquinamento basate sui rilievi climatologici e inquinamento effettivo misurato "in campo"
6. verifica dell'effetto di diverse gestioni di campagna e modalità di trasformazione e stoccaggio degli alimenti, con particolare riguardo ai cereali di autoproduzione.

Il progetto promosso e finanziato dalla Regione Lombardia vede la partecipazione di ARAL, SATA, Università di Milano e Istituto di Cerealicoltura di Bergamo. Tutte le analisi sono eseguite presso il laboratorio Agroalimentare dell'ARAL.

Il progetto abbraccia tutto il territorio Lombardo in quanto i campioni da analizzare sono prelevati in tutte le provincie della Regione ad opera dei tecnici SATA ed è articolato in due fasi:

- prima fase (analisi di circa 60 campioni di mais): verifica sul mais autoprodotta in azienda al momento della raccolta di aflatossina B_1 , fumonisina, zearalenone, deossinivalenolo, ocratossina;
- seconda fase:
 - controllo di ulteriori 200 campioni di mais: analisi dell'aflatossina B_1 e di altre 2 tossine più rappresentate sulla base dei dati raccolti nella prima fase;
 - verifica su 200 campioni di alimenti zootecnici (concentrati, silomais, fieni silo) e di alimenti proteici e cereali alternativi di micotossine eventualmente presenti
 - controllo dell'aflatossina M_1 su 200 campioni di latte.

Al termine della seconda fase sarà effettuata dall'Università di Milano una correlazione statistica tra le micotossine riscontrate e i parametri meteorologici forniti dalla Regione Lombardia per il periodo primaverile-estivo 2004.

Nella Tabella 4 sono riportati i risultati relativi alla prima fase, già conclusa, del progetto TOSSMONIT.

Tabella 4. Risultati della prima fase del progetto Tosmonit: mais granella (analisi eseguite con metodi ELISA e fluorimetrico espressi sul tal quale)

	MEDIA	MAX	DS	n. camp.
Aflatossina B1 (ppb)	0,86	14	2,14	83
Deossivalenolo (ppb)	61,94	606	131,45	62
Fumonisin (ppm)	7,23	15	3,31	85
Ocratossina (ppb)	0,43	6,70	0,95	79
Zearalenone (ppb)	18,15	110,00	25,03	68

Bibliografia

1. Regolamento (CE) N. 1525/98 della Commissione del 16 luglio 1998 che modifica il regolamento (CE) n. 194/97 che stabilisce i tenori massimi ammissibili per alcuni contaminanti presenti nei prodotti alimentari.
2. Italia. Decreto legislativo 11 maggio 1998, n. 241. Regolamento recante norme di attuazione delle direttive 98/88/CEE, 94/16CE 96/6/CE, relative alle sostanze ed ai prodotti indesiderabili nell'alimentazione degli animali.
3. Italia. Decreto legislativo 21 maggio 1999. Attuazione delle direttive 97/8 della Commissione, relative alle sostanze ed ai prodotti indesiderabili nell'alimentazione degli animali.
4. Regione Lombardia – Settore Agricoltura. Quaderni della Ricerca. Aflatossine nel latte e negli alimenti zootecnici: metodiche analitiche e anamnesi di allevamento; 2001.
5. Direttiva 98/53/CE della Commissione del 16 luglio 1998 che fissa metodi per il prelievo dei campioni e metodi d'analisi per il controllo ufficiale dei tenori massimi di taluni contaminanti nei prodotti alimentari.
6. Italia. Decreto legislativo 22 maggio 1995, n. 241. Approvazione dei "metodi d'analisi per il controllo ufficiale degli alimenti per animali", Supplemento n. 12.
7. Disponibile all'indirizzo: <http://www.rccr.cremona.it/monografie/luna/index.htm>; ultima consultazione 30/01/06.

AFLATOSSINA M₁ NEL LATTE: UN PROBLEMA RISOLVIBILE

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

Il problema dell'aflatossina M₁ nel latte

Il problema dell'aflatossina M₁ nel latte è salito alla ribalta durante l'autunno 2003, in quanto il raccolto di mais per uso zootecnico si è rivelato fortemente contaminato con aflatossina B e G, in seguito all'estate particolarmente calda e secca.

Alcune regioni, (es. Emilia Romagna, Lombardia e Veneto), hanno emanato regolamenti speciali aumentando i controlli ufficiali e obbligando le aziende ad intensificare le analisi sul latte per tenere monitorare la contaminazione.

Nonostante si sia riusciti a controllare il fenomeno, la necessità di misure d'urgenza ha evidenziato lacune, dovute ad un sistema di gestione del rischio aflatossina non continuativo e sistematico.

In primo luogo manca uniformità nel dato analitico. Un alto numero d'analisi da effettuare in tempi brevi ha imposto di affidarsi a metodi di screening rapidi con l'inconveniente di sovrastime e falsi positivi che hanno dovuto essere verificati all'HPLC; analisi con HPLC commissionate da aziende presso diversi laboratori hanno dato risultati spesso contraddittori per mancanza di uniformità di risposta degli strumenti o delle procedure d'analisi, provocando confusione, innalzamento dei costi d'analisi, e in alcuni casi blocco di latte risultato poi in regola.

In secondo luogo viene affrontato il problema concentrandosi sul latte, quando cioè la contaminazione ha già interessato largamente la filiera, mentre bisognerebbe prevenirla concentrandosi di più sui mangimi che ne sono all'origine.

Newlat srl impegnata da tempo nello studio dell'aflatossina M₁ nel latte, ha messo a punto nel corso degli anni un protocollo di gestione del rischio micotossine ad ampio spettro e continuativo, in grado di garantire livelli di contaminazione molto bassi e che si è rivelato efficace anche durante l'emergenza dell'autunno 2003.

Autunno 2003: l'emergenza nel latte

Presso i laboratori di Newlat srl il controllo dell'aflatossina M₁ nel latte crudo di raccolta e sul prodotto finito è operazione di carattere rutinario: settimanale o più ravvicinato fino ad essere anche giornaliero, nel caso in cui la situazione lo richieda.

Verso la metà del mese di settembre del 2003 le normali analisi di autocontrollo hanno evidenziato una situazione anomala: il contenuto di aflatossina M₁ nel latte si stava alzando in maniera generalizzata, anche in campioni provenienti da stalle che si sapeva essere molto attente al problema.

Avendo Newlat srl un limite di accettabilità di 20 ppt, è risultato subito chiaro che qualcosa non andava: avere il latte che superava costantemente 20 ppt, pur non arrivando a superare i 50 ppt di legge, non era normale.

Subito è stata formulata l'ipotesi di un innalzamento fisiologico dovuto all'autunno, tesi che però non ha retto poiché tale contaminazione è di solito occasionale e localizzata, mentre qui si era davanti ad un fenomeno diffuso.

Si è pensato allora ad un problema relativo al nuovo raccolto di alimenti per uso zootecnico: analisi sul mais e colloqui con gli allevatori hanno in breve confermato tale dubbio.

Autunno 2003: emergenza nelle panne per burrificazione

Newlat srl conduce analisi per l'autocontrollo anche sulle panne per burrificazione che usa nel proprio stabilimento.

Anche per tale prodotto caso si utilizzano i medesimi parametri del latte (contenuto massimo per legge 50 ppt, contenuto interno 20 ppt), e anche in questo caso si è avuto un comportamento anomalo rispetto agli anni precedenti.

Sono stati infatti registrati valori fino a 20 ppt (di solito non si riscontrano valori sopra 10 ppt) in un prodotto come la panna, che per sua natura è poco esposta al rischio aflatossina M₁ grazie al suo elevato contenuto di grasso e basso tenore di proteine.

Gestione del rischio micotossine

Appena intuito il problema Newlat srl ha subito intensificato i controlli e ha inviato una comunicazione informativa agli organi di vigilanza competenti, in cui si diceva che era in atto un qualche fenomeno che andava tenuto sotto controllo, pur se al momento non destava particolari preoccupazioni.

Dal punto di vista produttivo si è continuato a lavorare come sempre con grande attenzione al problema, secondo il protocollo di gestione del aflatossina M₁ nel latte che già da molti anni è operativo presso l'azienda:

Protocollo di gestione del rischio aflatossina nel latte

1. Limite operativo per il contenuto in aflatossina M₁ nel latte, fissato in 20 ppt contro i 50 ppt di legge
2. Controllo almeno settimanale del latte in entrata, giornaliero sul confezionato mediante H.P.L.C.
3. Sensibilizzazione e collaborazione con i produttori di latte, fornendo assistenza e analisi di latte e mangimi
4. Accuratezza e precisione del dato analitico, ring tests con vari laboratori e collaborazione con gli organi di controllo

1. Limite operativo inferiore alla soglia massima prevista per legge (20ppt contro 50 ppt)

Essendo l'aflatossina M₁ un molecola possibilmente cancerogena per l'uomo (secondo la classificazione in gruppo 2B stilata dalla International Agency for Research of Cancer) vale il principio generale che è sempre meglio averne la quantità più bassa possibile, inoltre restringendo tali limiti si contribuisce ad un miglioramento qualitativo generale del prodotto, da sempre obiettivo di Newlat srl

2. Controllo almeno settimanale di tutti i latti in entrata e giornaliero sul confezionato con H.P.L.C.

La prima cosa da tener presente è che non si può condurre un'efficace gestione del problema senza continuità d'azione.

Da studi condotti presso istituti di ricerca e da osservazioni fatte in azienda, risulta che il contenuto di aflatoxina M₁ nel latte raggiunge il suo valore massimo dopo sole 24 h dalla somministrazione di mangime contaminato con B₁ tornando, se la somministrazione viene interrotta, al livello di partenza in circa 72h e azzerarsi in 96h.

Variazioni con tale tempistica (da 1 a 3 - 4 giorni), che sono spesso occasionali per via di una contaminazione dei mangimi non uniforme ma “a macchia di leopardo”, possono cogliere di sorpresa o addirittura passare inosservate se non c'è un controllo serrato e costante.

Controllare ad inizio settimana i latti crudi in arrivo allo stabilimento, consente di avere una traccia continua da poter seguire nel tempo, e di poter programmare analisi mirate nei giorni successivi.

3. *Collaborazione coi produttori di latte*

L'aflatoxina nel latte rappresenta un costo, e quindi è necessario operare in maniera chiara e precisa riducendo al minimo perdite e disagi.

Per impostare il controllo in maniera funzionale bisogna operare direttamente sulla materia prima.

Il latte si contamina perché la bovina si nutre di mangime a sua volta contaminato con aflatoxina B₁: la qualità dell'alimento zootecnico è l'unico punto su cui si può e si deve intervenire in caso di problemi.

Sulla conoscenza di questo meccanismo si deve basare il rapporto con l'allevatore e le operazioni che devono essere fatte in caso di necessità: se la contaminazione è elevata bisogna cambiare l'alimento responsabile.

La chiarezza su questo punto è fondamentale per evitare che si possa cedere alla facile tentazione di acquistare un mangime economico trovandolo poi inquinato: se così fosse, infatti, il risparmio sarebbe vanificato dal momento che quell'alimento non potrebbe essere utilizzato.

4. *Accuratezza e precisione del dato analitico*

Il risultato di un'analisi deve essere preciso e accurato, ottenuto con un metodo rapido che dia la possibilità di analizzare in tempi ragionevoli un numero sufficientemente elevato di campioni.

Per i mangimi è necessario fornire un supporto analitico all'allevatore, allo scopo di individuare prodotti eventualmente contaminati presenti nella sua azienda, o anche come analisi preventiva, se richiesta, in caso di acquisto di una nuova partita di alimento.

Sul latte è necessario avere un dato preciso e affidabile, utile sia per gli allevatori sia per chi deve confezionare il prodotto, che dia un'idea certa dell'ordine di grandezza della contaminazione.

Newlat srl ha scelto di effettuare tutte le proprie analisi in H.P.L.C. essendo il metodo ritenuto più affidabile.

Inoltre partecipa a ring tests mensili in collaborazione con altri laboratori, sia pubblici che privati, ad ulteriore garanzia dell'affidabilità delle proprie misure, riducendo al massimo il rischio di incappare in dati contraddittori.

Infine il dialogo e la collaborazione con gli organi di controllo nel pieno rispetto della legge, consente di risolvere costruttivamente i problemi là dove si verificano, e creare le premesse per un costante miglioramento del prodotto (Tabella 2).

Tabella 2. Dosaggio dell'aflatossina M₁ nel latte: materiali e metodi

Dosaggio dell'aflatossina M₁ mediante H.P.L.C.	
Principio del metodo	Dosaggio mediante cromatografia liquida (HPLC) dopo estrazione con metodo ad immunoaffinità su campioni scremati per centrifugazione. Il campione sgrassato è fatto percolare, sotto vuoto, in una colonna ad immunoaffinità specifica per AfM ₁ ; successivamente si eluisce la micotossina con 2.5 mL di una miscela acetonitrile-metanolo L'eluato si chiarifica con filtro montato su una siringa, e si raccoglie in una provetta di plastica monouso. Si dosa in HPLC con colonna C18 a fase inversa e rivelatore a fluorescenza. Il risultato è espresso in ppt, e il metodo ha un limite di rivelazione di 5 ppt.
Reagenti	<ul style="list-style-type: none"> - Tutti i reagenti sono a grado HPLC, del tipo Baker HPLC analyzed; - Miscela eluente per l'estrazione: acetonitrile- metanolo (3:2 v/v); - Fase mobile per HPLC: acqua-acetonitrile-metanolo (68:24:8 v/v); - Soluzione standard di AfM₁; - Soluzione di ipoclorito di sodio per la decontaminazione delle siringhe.
Apparati	<ul style="list-style-type: none"> - Centrifuga; - Colonna ad immunoaffinità Rhone tipo Easy Extract Aflatoxin; - Giara per il vuoto I.S.T. Vac-Master 10; - Pompa da vuoto KNF N022; - Filtri siringa in Nylon Albet diametro 0.45 µm; - Siringhe senza ago da 5 mL; - Provette monouso in plastica; - Colonna per HPLC: C18 fase inversa mod. Beckman ultrasphere analytical; - Pompa per HPLC Perkin Elmer binary lc pump 250; - Fornetto HPLC: Alltech 330 Column Heater; - Rivelatore a fluorescenza: Merck-Hitachi F-1050; Software: HP 3365 Series II Chemstation.
Condizioni cromatografiche	<ul style="list-style-type: none"> - Miscela eluente per HPLC acqua-acetonitrile-metanolo (64:28:8 v/v) degasata con elio; - Colonna per HPLC: C18 fase inversa; - Volume del loop dell'iniettore: 20 µl; - Flusso fase mobile: 0.8 mL/min; - Temperatura fornello: 40 °C; - Parametri del rivelatore: λ eccitazione 360 nm, λ emissione 430 nm; - Tempo di eluizione massimo 15 minuti.

Regolamenti regionali

Nelle settimane successive all'inizio dell'emergenza del 2003 sono arrivate alcune circolari da parte del Ministero della Salute e delle regioni maggiormente interessate al problema allo scopo di controllare il fenomeno.

Sono citati di seguito a titolo d'esempio, alcuni stralci dei regolamenti emessi dalla Regione Emilia Romagna e dal Ministero della Salute.

La regione Emilia Romagna con la circolare del 31/10/03 parla tra l'altro di: "(omissis) Predisporre un programma di controllo e monitoraggio.....sul livello di contaminazione dei mangimi per animali....e innalzare il livello di attenzione sui prodotti derivati dal latte e destinati all'alimentazione umana".

"(omissis) Il campione ufficiale sarà esaminato con metodica ELISA. Nel caso il laboratorio evidenzi presenza di aflatossina oltre il livello di screening posto a 40 ppt (limite prudenziale), si procederà immediatamente a sostituire dalla dieta il mais in granella o in farina.

(omissis) Il veterinario ufficiale presso lo stabilimento effettuerà un sopralluogo documentato finalizzato a verificare che nell'autocontrollo aziendale, attivato ai sensi del D.P.R. 54/97, sia presente un programma specifico di monitoraggio sul latte crudo di massa che assicuri il rispetto dei limiti previsti per le aflatoxine. Il controllo potrà avere una periodicità settimanale quindicinale o mensile a seconda della capacità produttiva di ogni stabilimento”.

Ed ancora il ministero della salute in data 12 dicembre 2003 con la “Linee guida per il controllo delle aflatoxine nei mangimi e nel latte” dice tra l'altro: “(omissis) In merito alla possibile contaminazione da aflatoxina B₁ nella granella di mais e derivati attualmente in uso negli allevamenti, legata alle particolari condizioni atmosferiche verificatesi nella scorsa estate, e considerato che l'utilizzo dei suddetti mangimi contaminati può provocare la contaminazione da aflatoxina M₁ del latte a livelli superiori ai limiti previsti dalla normativa comunitaria, si ritiene opportuno che i servizi veterinari sensibilizzino gli allevatori che non attuano un vero e proprio piano di autocontrollo aziendale, affinché venga sospesa a scopo cautelativo la somministrazione alle bovine da latte di granella di mais, di mangimi contenenti granella di mais o altri derivati”.

A proposito dei metodi analitici si precisa: “(omissis) Per monitorare la situazione in modo da consentire la valutazione e la gestione del rischio in maniera efficace, qualora venissero utilizzati i test ELISA, questi dovranno essere di tipo quantitativo o semiquantitativo. In presenza di campioni ufficiali e, laddove ci si trovi in presenza di campionamenti che hanno comportato il sequestro della partita, è necessario eseguire una ricerca dell'aflatoxina M₁ con metodica HPLC per la conferma dei risultati ottenuti.

Il laboratorio nazionale di riferimento per i residui (presso l'ISS), predisporrà Ring Test periodici per gli ILZZ.SS.”.

Da ciò che si legge nelle circolari in oggetto emerge omogeneità tra il metodo di lavoro previsto dalla legge e la procedura già utilizzata da Newlat srl, a conferma dell'efficacia della strada percorsa.

Inoltre si pone chiaramente l'attenzione al fatto che l'emergenza sia imputabile ad un problema sui mangimi.

Questa presa di coscienza deve essere un primo importante passo verso un completo controllo della filiera, che parta dall'inizio e cioè dall'alimentazione bovina, per arrivare poi alla fine, cioè al latte, e non viceversa.

Analisi costi–benefici

Durante il periodo settembre 2003-settembre 2004 Newlat srl è stata chiamata ad uno sforzo notevole per tenere sotto controllo l'aflatoxina M₁ nel latte.

Solo tra il mese di Settembre e il Dicembre 2003, (il periodo più critico) sono state effettuate circa 400 analisi in HPLC.

Oltre alle analisi settimanali di tutti i latti di raccolta, è stato condotto il monitoraggio di singoli produttori non in linea coi valori di riferimento (che è addirittura arrivato ad essere giornaliero in alcuni casi), e uno screening periodico di tutti i singoli conferenti delle cisterne di latte di massa in arrivo (anticipando tra l'altro quanto richiesto dalla circolare della Regione Emilia Romagna del 13/04/2004 in tema di piano regionale di sorveglianza per la presenza di micotossine nei cereali).

Ad ulteriore garanzia della qualità e del rispetto delle norme vigenti, si è proceduto ad un controllo quotidiano dei serbatoi di latte crudo prima del trattamento termico e del confezionamento.

Il contatto costante coi produttori di latte e con i veterinari del servizio di igiene pubblica, ha permesso di avere sempre il controllo della situazione e un latte sicuro.

Questo modo di operare è sicuramente un costo per l'azienda, ma permette di mantenere uno standard qualitativo molto alto per i propri prodotti.

Riferendosi in particolare al 2003 è stato possibile far fronte ad una situazione sicuramente critica senza che il latte prodotto subisse delle variazioni preoccupanti, e senza che ne la materia prima né il prodotto finito, corressero il rischio di sfiorare i limiti di legge andando incontro alle sanzioni previste in questo caso.

Osservando il grafico seguente che riporta la media del contenuto in aflatossina M₁ relativamente al latte crudo di raccolta, si nota che questo valore è passato dai circa 20 ppt del biennio 2000- 2002 ai 30ppt del 2003, riscontrando un aumento tutto sommato contenuto dei livelli di contaminazione nonostante il periodo di crisi, grazie a questo sistema di controllo costante e dinamico (Figura 1).

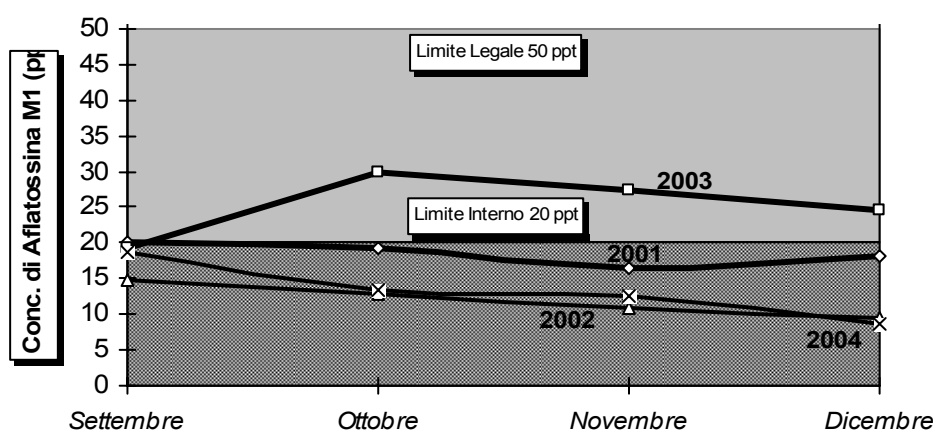


Figura 1. Contenuto medio di aflatossina M₁ in latte crudo di raccolta

Conclusioni

Una gestione del rischio aflatossina nel latte in grado di fornire uno standard qualitativo elevato è ormai sempre più necessario.

La qualità del latte deve sempre essere mantenuta a livelli alti, non solo per ovvi motivi di ordine sanitario, ma anche per reggere il confronto con altri produttori in una situazione di mercato globale (in alcuni paesi il problema aflatossina nel latte, sia pure anche per fattori climatici, è praticamente assente).

Inoltre bisogna essere attenti a non farsi cogliere impreparati qualora dovesse capitare nuovamente un'emergenza come quella del 2003, che potrebbe avere ripercussioni anche sull'opinione pubblica e sui consumatori.

C'è di fatto un problema di comunicazione allorché si debba o si voglia spiegare all'utente finale la questione micotossine, un tema sicuramente delicato di cui in futuro ci sarà dibattito e a cui l'industria dovrà dare risposte concrete.

Bibliografia

1. Antonio B. Muffè e micotossine nelle granaglie. In: Cravedi P. La difesa antiparassitaria nelle industrie alimentari e la protezione degli alimenti, Atti del 6° simposio. Piacenza 24 – 26 settembre 1997, Chiriotti Editore 1998 p. 201-27.
2. Borreani G, Tabacco E, Cavallarin L, Contaminazione da micotossine negli insilati di mais. *L'Informatore Agrario* 2003;31.
3. Commissione Europea. Regolamento (CE) n. 1525/98 del 16/07/1998 definizione dei tenori massimi ammissibili per alcuni contaminati presenti nei prodotti alimentari – *Gazzetta Ufficiale Comunità Europea* n. L 201 del 17/07/1998
4. Albertini A, Menguzzato G. Allarme aflatossine nel latte, le problematiche di un'emergenza annunciata. *Igiene Alimenti* 2004; 3.
5. Albertini A, Casarini E, Menguzzato G, Sillari L, Zaniboni A. Il controllo delle aflatossine nel latte Alimentare: un'esperienza di monitoraggio aziendale. *Igiene alimenti*2002;3.
6. International Agency for Research of Cancer, overall evaluations of carcinogenicity to humans: group 2B, possibly carcinogenic to humans. Lists of International Agency for Research of Cancer. Disponibile all'indirizzo [http// www.iarc.fr](http://www.iarc.fr); ultima consultazione 16 luglio 2003.
7. Tamba M. Metabolismo delle aflatossine nel bovino Centro Emiliano Romagnolo di Epidemiologia *Vetrinaria lettera di informazione* 2003;51.
8. Regione Emilia Romagna. Giunta Regionale Circolare prot. N. SAS/03/39806 del 31/10/2003: indicazioni per il monitoraggio e la prevenzione del riscontro di aflatossine nel latte e derivati.
9. Italia. Ministero della Salute, dipartimento della prevenzione e della comunicazione direzione generale sanità veterinaria e alimenti, ufficio IX: linee direttrici per il controllo delle aflatossine nei mangimi e nel latte circolare del 12/12/2003, Bollettino Assolatte del 16/12/2003.
10. Regione Emilia Romagna. Giunta Regionale Circolare prot. N. VET/04/13901 del 13/04/2004: Sistema regionale di sorveglianza per la presenza di micotossine nei cereali.

RICERCA E DETERMINAZIONE DI MICOTOSSINE IN CAMPIONI ALIMENTARI DERIVANTI DA AGRICOLTURA BIOLOGICA E CONVENZIONALE

Carlo Brera, Barbara De Santis, Francesca Debegnach e Marina Miraglia
*Reparto OGM e Xenobiotici di Origine Fungina, Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti
e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Introduzione

I funghi filamentosi microscopici comunemente noti come muffe, possono svilupparsi su alimenti e mangimi e, in particolari condizioni, produrre numerosi metaboliti. Tra questi le micotossine, sostanze dotate di elevata tossicità, possono esercitare un effetto dannoso sull'uomo e sugli animali da allevamento. Gli alimenti costituiscono la via principale attraverso la quale le micotossine possono raggiungere l'uomo. Vie addizionali di assunzione sono inoltre rappresentate dalla inalazione di polveri contaminate che possono rappresentare sia per gli animali che per l'uomo un rischio ancora maggiore data la loro più veloce e intensa assorbibilità da parte dell'organismo. Tra gli alimenti, i semi oleaginosi, i cereali, le carni suine e avicole, le spezie e la frutta secca ed essiccata rappresentano le classi in cui la contaminazione è maggiormente diffusa.

L'agricoltura biologica costituisce un modello di produttività che trova riscontri concettualmente differenti a seconda della realtà socio-economica a cui viene applicata. Infatti, mentre per i paesi in via di sviluppo essa costituisce una delle alternative possibili per un programma di educazione agricola autosostenibile, e gli attuali orientamenti di strutture quali la FAO e l'OMS si stanno indirizzando in tal senso, per i paesi industrializzati, invece, l'agricoltura biologica, regolamentata in Europa dal regolamento CEE/n 2092/91 e completata dalle successive modifiche (1, 2, 3, 4, 5), può costituire la risposta sia ad oggettivi problemi ecologici sia alle esigenze del consumatore sempre più attento alla qualità igienico-sanitaria e nutrizionale degli alimenti

In particolare, la contaminazione da micotossine, con specifico riferimento ad aflatossine e ocratossine, potrebbe in linea teorica essere più significativa nei prodotti biologici rispetto a quelli tradizionali in seguito alla sospensione o alla progressiva limitazione di pesticidi utilizzati per combattere le infestazioni fungine.

In letteratura, non esistono a tutt'oggi dati che stabiliscano in maniera attendibile una correlazione tra una maggiore incidenza di contaminazione da micotossine e tecniche di coltivazione biologica. Per quanto attiene alla contaminazione da aflatossine e ocratossina A, nel corso di recenti studi effettuati su alcuni prodotti biologici, si è riscontrata una tendenza ad una maggiore incidenza di contaminazione (per la sola ocratossina A) e a livelli della stessa superiori rispetto a campioni ottenuti da coltivazioni tradizionali (6, 7, 8, 9).

Lo scopo del lavoro è stato quello di individuare indicatori chimici di danno biologico che consentissero di caratterizzare la qualità dei prodotti alimentari oggetto dello studio tramite l'identificazione di eventuali differenze tra la produzione a disciplinare biologico e convenzionale. L'impostazione dell'attività sperimentale si è prefissata l'obiettivo di valutare la contaminazione di alcune micotossine, come la patulina e il deossinivalenolo, in prodotti agricoli ottenuti mediante tecniche colturali tradizionali e biologiche; in particolare le analisi per

la ricerca della patulina sono state effettuate su campioni di frutta fresca, mentre le analisi per la ricerca del deossinivalenolo sono state effettuate su campioni di grano tenero e duro.

Materiali e metodi

Campioni analizzati

Frutta

Le specie di frutta considerate sono state: pesche, pere, susine e arance, provenienti da due campi di confronto diversificati nella gestione agronomica. La frutta convenzionale proveniva da alberi cresciuti su un campo coltivato con prodotti di sintesi e con fertilizzanti minerali. La frutta biologica proveniva da alberi cresciuti su campi biologici protetti da parassiti con prodotti, specificatamente naturali, ammessi dalla Direttiva della Unione Europea 2092/91 (1) e fertilizzati con prodotti organici. Nell'ambito della coltivazione biologica sono stati analizzati campioni che avevano subito tre diverse lavorazioni del suolo: *Lavorato*, *Inerbito Naturale*, *Trifoglio*.

Al momento dell'arrivo, tutti i campioni sono stati conservati in congelatore a -20°C. I campioni sottoposti ad analisi sono stati preparati, dopo scongelamento ed eventuale sbucciatura, come indicato nella Tabella 1, omogeneizzando l'intero campione. Per alcune tipologie di frutta si è voluta valutare l'entità della contaminazione in quelle che erano le parti visibilmente ammaccate del frutto, come nel caso delle susine, o nelle diverse parti del frutto (polpa, buccia o succo ottenuto dopo sbucciatura) nel caso invece delle pere.

Grano

Sono state prese in esame le seguenti varietà di grano tenero: Serio, Guadalupe, Colfiorito, Etecho, Sagittario, Victo, Cezanne, Enesco, Vaiiolet, Eureka, Soissons, Mieti e Arnel. Per tutte le varietà elencate si disponeva di campioni provenienti da agrotecnica biologica e convenzionale. Inoltre sono stati analizzati anche campioni di grano duro provenienti da coltivazione biologica (DURBIOL); le varietà prese in esame sono state: S. Carlo, Neodur, Provenzal, Meridiano, Duilio e Gargano. Infine sono stati analizzati campioni di grano tenero (CONCIM 01) trattati con 4 diverse prove di concimazione (Tabella 3).

I campioni di grano al momento dell'arrivo e fino all'analisi sono stati conservati in congelatore a -20°C. Ogni singolo campione da sottoporre ad analisi è stato omogeneizzato mediante macinazione.

Procedura analitica

Frutta

La metodica di analisi impiegata è stata validata in laboratorio a partire dal metodo proposto dallo studio collaborativo di MacDonald (10). In breve, tale metodica prevede una fase di estrazione, effettuata mediante ripartizione liquido-liquido con acetato di etile, e successiva quantificazione con rivelazione UV-Diode-array alla lunghezza d'onda (λ) 267 nm.

Dopo l'omogeneizzazione del campione sono state pesate 6 aliquote di 10 grammi ciascuna (5 replicati più un campione fortificato per il calcolo del recupero) che, dopo essere state addizionate con 10 mL di acqua distillata, sono state messe ad incubare con 150 μ L di enzima endogalatturonasi per tutta la notte a temperatura ambiente (alternativamente si può incubare a

60 °C per 2 ore). Dopo centrifugazione (5 min a 10000 rpm) si è proceduto alla fase di estrazione su 10 mL di surnatante utilizzando tre porzioni di 20 mL di acetato d'etile; sulle fasi organiche riunite si è successivamente proceduto ad un lavaggio con una soluzione di carbonato di sodio all'1%; il campione è stato raccolto in un pallone solo dopo l'eliminazione delle tracce di acqua attraverso il passaggio della fase organica in un imbuto in cui sono stati sistemati 8 g di solfato di sodio.

Dal pallone di raccolta il solvente è stato allontanato mediante l'uso di un evaporatore rotante, (con una pressione intorno a 300 mbar a 40°C); l'analita, quindi, è stato ripreso con 1 mL di soluzione acida a pH = 4. Cinquanta µL di questa soluzione sono stati infine iniettati in un sistema HPLC a fase inversa, previamente condizionato ad un flusso di 1 mL/min, con una fase mobile di acetonitrile:soluzione acquosa acida per acido perclorico 80:20 (0.098 parti).

Il limite di rivelazione del metodo (LOD) è risultato pari a 5 µg/kg, mentre i fattori di recupero calcolati per le diverse tipologie di frutta hanno dato percentuali comprese fra 80 e 88.

Grano

La metodica di analisi impiegata per la quantificazione del deossinivalenolo (DON) è stata quella indicata dalla R-Biopharm (fornitrice delle colonnine di immunoaffinità per il DON) (11).

Il metodo prevede una fase di estrazione con acqua seguita dalla purificazione mediante l'impiego di colonnine di immunoaffinità.

La separazione viene effettuata in HPLC e la quantificazione con UV-Diode-array alla lunghezza d'onda (λ) 218 nm.

Dopo macinazione del campione, è stata pesata nel blender un'aliquota di 50g, a cui sono stati aggiunti 200 mL di acqua distillata. L'estrazione è stata effettuata avviando il blender alla massima velocità per 1 minuto.

L'estratto è stato sottoposto a due filtrazioni prima su filtro di carta, quindi su filtro a microfibra; 20 mL di estratto filtrato sono stati fatti passare in colonnina di immunoaffinità alla velocità di una goccia al secondo. Dopo il lavaggio della colonnina con 5 mL di acqua distillata, la tossina è stata eluita con 1 mL di metanolo.

Il campione è stato quindi concentrato portando a secco sotto corrente di azoto e ripreso con 300 µL di fase mobile (acqua:acetonitrile 90:10 v/v). Cinquanta µL di questa soluzione sono stati infine iniettati in un sistema HPLC a fase inversa, previamente condizionato ad un flusso di 1 mL/min con una fase mobile di acqua:acetonitrile 90:10 (v/v).

Il metodo impiegato presenta un LOD pari a 0.10 µg/kg, il fattore di recupero ricavato dalle analisi effettuate invece ha un valore medio del 90%.

Risultati e conclusioni

Frutta

I risultati della concentrazione media di patulina nei campioni di frutta esaminati sono riportati nelle Tabelle 1a e 1b unitamente alla deviazione standard (ds).

Tabella 1a. Concentrazioni ($\mu\text{g}/\text{kg}$) di patulina nei campioni di frutta esaminati

Campioni pervenuti		Campioni analizzati		Contaminazione	Recupero (%)
Frutta/ Lavorazione suolo	Peso (kg)	Tipo di campione	N. campioni replicati	($\mu\text{g}/\text{kg}$) Media \pm ds	
SUSINE - 1° lotto.					
L'intero quantitativo di ogni tipologia è stato scongelato, snocciolato e quindi omogeneizzato con la buccia. Per la tipologia di coltivazione convenzionale è stata analizzata separatamente la parte manifestamente ammaccata del frutto, Per la tipologia Inerbito Naturale è stato provato un metodo di estrazione semplificato.					
Lavorato	3,0	Omogeneizzato con buccia	6	252,0 \pm 29,0	80%
Inerbito Naturale	2,2	Omogeneizzato con buccia	6	13,0 \pm 1,2	
Trifoglio	2,1	Omogeneizzato con buccia	3	16,2 \pm 1,6	
Convenzionale	1,0	Parti ammaccate	3	35,1 \pm 1,2	
		Omogeneizzato con buccia	6	255,0 \pm 21	
SUSINE - 2° lotto					
Questa tipologia di frutta è stata mantenuta a T amb per due giornate. L'intero quantitativo di ogni tipologia è stato snocciolato quindi omogeneizzato con la buccia.					
Lavorato	2,3	Omogeneizzato con buccia	6	33,0 \pm 1,3	80%
Inerbito Naturale	2,5	Omogeneizzato con buccia	6	69,0 \pm 1,2	
Trifoglio	3,2	Omogeneizzato con buccia	6	56,0 \pm 1,5	
Convenzionale	2,2	Omogeneizzato con buccia	6	65,0 \pm 0,8	
PERE - 1°Lotto					
L'intero quantitativo di ogni tipologia è stato scongelato, snocciolato e quindi omogeneizzato con o senza buccia come indicato.					
Lavorato	0,50	Omogeneizzazione con buccia	3	< LOD	85%
Inerbito Naturale	0,58	Polpa	3	7,5 \pm 1,3	
		Succo	6	< LOD	
Trifoglio	0,99	Polpa	3	< LOD	
		Omogeneizzazione senza buccia	6	< LOD	
Convenzionale	1,30	Omogeneizzazione senza buccia	6	17,5 \pm 1,2	

Tabella 1b. Concentrazioni ($\mu\text{g}/\text{kg}$) di patulina nei campioni di frutta esaminati

Campioni pervenuti		Campioni analizzati		Contaminazione ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recupero (%)
Frutta/Lavorazione suolo	Peso (kg)	Tipo di campione	N. campioni replicati	Media \pm ds	
<i>Arance</i> - L'intero quantitativo di ogni tipologia è stato scongelato e sbucciato e quindi omogeneizzato.					
Convenzionale	2	Omogeneizzato senza buccia	6	< LOD	85%
Tarocco Giallo	5	Omogeneizzato senza buccia	6	< LOD	
<i>Arance</i> - L'intero quantitativo di ogni tipologia è stato scongelato e quindi omogeneizzato con la buccia al fine di riprodurre una situazione di spremitura di tipo industriale.					
Biologico Pianta	1,2	Omogeneizzato con buccia	6	< LOD	85%
Tarocco Giallo	circa 6	Omogeneizzato con/senza buccia	6/6	< LOD	
<i>Pesche</i> - L'intero quantitativo di ogni tipologia è stato scongelato, snocciolato e quindi omogeneizzato con la buccia.					
Lavorato	3,0	Omogeneizzazione con buccia	6	16,0 \pm 1,2	88%
Inerbito Naturale	3,0	Omogeneizzazione con buccia	6	126,0 \pm 3,7	
Trifoglio	3,3	Omogeneizzazione con buccia	6	51,3 \pm 1,2	
Convenzionale	3,2	Omogeneizzazione con buccia	6	7 \pm 1,6	

In Tabella 2 viene riportata la correlazione tra tipologia di frutta, tipologia di coltivazione e contaminazione da patulina.

Tabella 2. Contaminazione ($\mu\text{g}/\text{kg}$) di patulina in relazione alla tipologia di frutta e di coltivazione

Tipologia di frutta	Tipologia di coltivazione			
	Contaminazione media di patulina ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
	Convenzionale	Inerbito naturale	Trifoglio	Lavorato
Pesche	7,0	126,0	51,3	16,0
Pere	17,5	< LOD	< LOD	7,5
Arance	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Prugne				
<i>Lotto 1</i>	255,0	13,0	25,6	252,0
<i>Lotto 2</i>	65,0	69,0	56,0	33,0

In generale in questa campionatura non si è evidenziata una elevata contaminazione.

I risultati ottenuti non suggeriscono una diversificata entità di contaminazione in funzione della tecnica colturale impiegata per la produzione delle varie tipologie di frutta. Questi risultati, anche se da sottoporre ad ulteriori studi, non evidenzerebbero pertanto una maggiore

suscettibilità all'attacco delle muffe e alla formazione di tossine da parte dei prodotti biologici, che non sono trattati con sostanze antifungine di sintesi. Questo porterebbe a concludere che non è nella modalità di coltivazione, convenzionale o biologica, anche nelle sue diversificazioni, che si alterano le specifiche condizioni per cui il fungo cresce e incrementa o diminuisce la produzione di micotossina.

In particolare, tra le tipologie di frutta analizzate le susine e le pesche, sia convenzionali che derivanti da differenti tipologie di lavorazione del terreno, hanno mostrato livelli apprezzabili di patulina, mentre le arance e le pere non hanno mostrato livelli apprezzabili di questa micotossina. Susine e pesche hanno presentato tenori di contaminazione decisamente più elevati; la scelta dell'omogeneizzazione con la buccia, per queste due tipologie di frutta è da ricercarsi nelle generali modalità di consumo della stessa, per cui risulta edibile anche la buccia.

Si nota inoltre come tipologie di frutta con una buccia di una certa consistenza (arance e in maniera minore le pere), risultino prive di contaminazione o con contaminazione contenuta.

Infatti, dopo aver accertato l'assenza di patulina nelle arance private della buccia, si è voluto valutare l'eventuale contaminazione sulla buccia stessa facendo un omogenato del frutto intero: il risultato negativo fa pensare che l'arancia non sia un substrato suscettibile all'attacco della muffa. Per quanto riguarda le pere il fatto di quantificare concentrazioni di patulina nella polpa (più acquosa) piuttosto che sulla buccia (più legnosa) è coerente con la idrofilicità della micotossina.

Grano

I risultati ottenuti per i livelli di DON sui campioni di grano duro e tenero sono riportati nelle Tabelle 3a, 3b, 3c, 3d e 3e.

**Tabella 3a. Livelli di DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$) in campioni di grano tenero (2000-2001).
Località Lonato (BS)**

Varietà	Agrotecnica	
	Convenzionale	Biologica
Nome/Quantità	DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Serio A/4 kg	<LOD	290
Guadalupe/A 4 kg	<LOD	<LOD
Colfiorito/A 4kg	<LOD	150
Etecho B/4 kg	300	<LOD
Sagittario A/4 kg	<LOD	543
Victo A/4 kg	<LOD	<LOD
Cezanne B/4 kg	<LOD	<LOD
Enesco B/4 kg	<LOD	<LOD

**Tabella 3b. Livelli di DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$) in campioni di grano tenero e duro (2000-2001).
Località Villanova Sillaro (Lodi)**

Varietà Nome/Quantità	DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Violet/2 kg	<LOD
Serio/2 kg	<LOD
Colfiorito/2kg	<LOD
Eureka/2kg	521

**Tabella 3c. Livelli di DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$) in campioni di grano tenero (2000-2001).
Località Torrazza Coste (PV)**

Varietà nome/quantità	N. replica	Agrotecnica			
		Convenzionale		Biologico	
		N. Plot	Don ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	N. Plot	Don ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Soissons/0,3 kg	1	1	<LOD	48	<LOD
	2	19	<LOD	54	<LOD
	3	22	<LOD	68	<LOD
	4	39	<LOD	75	<LOD
Sagittario/0,3 kg	1	2	<LOD	46	<LOD
	2	15	300	53	<LOD
	3	27	321	62	<LOD
	4	32	520	76	<LOD
Guadalupe/0,3 kg	1	3	<LOD	49	440
	2	38	<LOD	56	<LOD
	3	21	<LOD	70	<LOD
	4	20	<LOD	74	<LOD
Enesco/0,3 kg	1	4	162	50	<LOD
	2	18	<LOD	59	<LOD
	3	24	<LOD	69	268
	4	36	<LOD	80	621
Serio/0,3 kg	1	5	<LOD	43	<LOD
	2	16	371	51	<LOD
	3	26	<LOD	64	<LOD
	4	35	<LOD	73	<LOD
Eureka/0,3 kg	1	6	<LOD	47	<LOD
	2	11	188	58	<LOD
	3	30	<LOD	61	631
	4	33	<LOD	71	<LOD
Colfiorito/0,3 kg	1	7	321	41	<LOD
	2	17	560	55	<LOD
	3	25	<LOD	65	<LOD
	4	31	670	78	<LOD
Mieti/0,3 kg	1	8	491	42	405
	2	14	<LOD	60	612
	3	29	<LOD	67	<LOD
	4	40	<LOD	72	360
Arnel/0,3 kg	1	9	<LOD	44	437
	2	13	<LOD	57	329
	3	28	281	63	478
	4	37	521	77	<LOD
Etecho/0,3 kg	1	10	<LOD	45	433
	2	12	<LOD	52	<LOD
	3	23	<LOD	66	<LOD
	4	34	569	79	<LOD

Tabella 3d. Livelli di DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$) in campioni di grano tenero CONCIM 01 (2000-2001) trattati con 5 diverse prove di concimazione

TRATTAMENTO	N. plot	DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Non trattato	1, 9, 17	<LOD
	12	478
Bioilsa green	2, 6, 11	<LOD
	16	533
Bioilsa 10 Chimico	3, 7, 13, 20	<LOD
	14, 19	<LOD
Pollina	4	436
	10	112
	5, 15	<LOD
	8	371
	18	1173

Tabella 3e Livelli di DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$) in campioni di grano duro biologico (DURBIOL) (2000-2001)

VARIETÀ	DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	N. plot
S. Carlo Neodur	<LOD	1, 8, 17, 21, 25, 31, 38, 44
	<LOD	2, 12, 26
	234	16
	309	24
	248	34
	167	40
	264	47
Provenzal Meridiano	<LOD	3, 10, 13, 22, 28, 32, 42, 45
	<LOD	11, 29, 33, 48
	321	4
	220	15
	533	18
	139	37
Duilio	<LOD	5, 14, 27, 35, 41
	360	9
	256	20
	346	43
Gargano	<LOD	6, 7, 19, 23, 36, 39, 46
	298	30

Dalle analisi condotte sui campioni di grano non si possono mettere in evidenza marcate differenze di contaminazione tra i campioni provenienti da coltivazione biologica e quelli provenienti da coltivazione convenzionale. Anche il confronto tra campioni di grano tenero e duro non indica una tendenza chiara. D'altronde, poiché nella coltura convenzionale del frumento per quel che concerne la protezione dall'attacco fungino si punta essenzialmente su pratiche di concia delle sementi e sulle buone pratiche agricole (buona lavorazione del terreno, eliminazione di residui di colture precedenti), è comprensibile che la differenziazione tra coltivazione biologica e convenzionale non si traduca in un diverso livello di contaminazione di deossinivalenolo nei diversi campioni analizzati. Da queste considerazioni si può ipotizzare che l'attacco fungino e la capacità del fungo stesso di produrre la tossina possono risiedere in altri fattori e non nella varietà di grano coltivata o nella tecnica agronomica impiegata.

I livelli di contaminazione riscontrati non sono preoccupanti in quanto tutti inferiori a 1750 µg/kg per il grano duro e 1250 µg/kg per il grano tenero che rappresentano i livelli di contaminazione attualmente suggeriti come limite di legge a livello comunitario. Tuttavia sono necessari ulteriori studi su questo argomento in quanto la contaminazione da deossinivalenolo, come peraltro da micotossine in generale, può variare significativamente nelle diverse annate in relazione a vari fattori quali quelli climatici e le condizioni del campo di coltura.

Bibliografia

1. Comunità Europea. Regolamento (CEE) n. 2092/91 del Consiglio, del 24 giugno 1991, relativo al metodo di produzione biologico di prodotti agricoli e alla indicazione di tale metodo sui prodotti agricoli e sulle derrate alimentari. G.U. n. L 198 del 22 luglio 1991.
2. Comunità Europea. Regolamento (CE) N. 473/2002 della Commissione del 15 marzo 2002 che modifica gli allegati I, II e VI del regolamento (CEE) n. 2092/91 del Consiglio relativo al metodo di produzione biologico di prodotti agricoli e all'indicazione di tale metodo sui prodotti agricoli e sulle derrate alimentari e che stabilisce norme dettagliate per quanto concerne la trasmissione di informazioni sull'impiego di composti di rame.
3. Comunità Europea. Regolamento (CE) N. 2491/2001 della Commissione del 19 dicembre 2001 che modifica il regolamento (CEE) n. 2092/91 del Consiglio relativo al metodo di produzione biologico di prodotti agricoli e all'indicazione di tale metodo sui prodotti agricoli e sulle derrate alimentari.
4. Comunità Europea. Regolamento (CE) N. 436/2001 della Commissione del 2 marzo 2001 che modifica l'allegato II del regolamento (CEE) n. 2092/91 del Consiglio relativo al metodo di produzione biologico di prodotti agricoli e all'indicazione di tale metodo sui prodotti agricoli e sulle derrate alimentari.
5. Comunità Europea. Regolamento (CE) N. 1073/2000 della Commissione del 19 maggio 2000 che modifica il regolamento (CEE) n. 2092/91 del Consiglio relativo al metodo di produzione biologico di prodotti agricoli e all'indicazione di tale metodo sui prodotti agricoli e sulle derrate alimentari.
6. Jestoi M, Somma MC, Kouva M, Veijalainen P, Rizzo A, Peltonen K. Levels of mycotoxins and sample cytotoxicity of selected organic and conventional grain-based products purchased from Finnish and Italian markets. *Mol. Nutr. Food Res.* 2004;48:299–307.
7. Biffi R, Munari M, Dioguardi L, Ballabio C, Cattaneo A, Galli CL, Restani P. Ochratoxin A in conventional and organic cereal derivatives: a survey of the Italian market, 2001–02. *Food Additives and Contaminants* 2004;21(6):586-591.
8. Czerwiecki L, Czajkowska D, Witkowska-Gwiazdowska A. On ochratoxin A and fungal flora in Polish cereals from conventional and ecological farms - Part 1: Occurrence of ochratoxin A and fungi in cereals in 1997. *Food Additives and Contaminants* 2002;19(5):470-477.
9. Finamore A, Britti MS, Roselli M, Bellovino D, Gaetani S, Mengheri E. Novel approach for food safety evaluation. Results of a pilot experiment to evaluate organic and conventional foods. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 2004;52(24):7425-7431.
10. MacDonald S, Long M, Gilbert J. Liquid Chromatographic Method for Determination of Patulin in clear and Cloudy Apple Juices Apple Puree: Collaborative Study. *JAOAC* 2000;83(6):1387-1394.
11. Cahill K, Mc Alice R, Prioli K. Quantification of deoxynivalenol in wheat using an immunoaffinity column and liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 1999;859:23-28.

Terza sessione
TECNOLOGIE ALIMENTARI

PRESENZA DI ZEARALENONE E CARATTERIZZAZIONE DI CEPPI DI *FUSARIUM* IN MANGIMI PER SUINI

Maria Cesarina Abete, Lucia Decastelli, Elisa Piccin, Stefania Gavinelli, Silvia Gallina, Giovanni Falsetta, Angelo Millone

(a) *Centro di Referenza Nazionale per la sorveglianza e il controllo degli alimenti per animali (C.Re.A.A.) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino*

(b) *Servizio Veterinario Area C ASL 17/2, Saluzzo*

Introduzione

Ultimamente negli allevamenti si osserva un sostanziale aumento di problemi sanitari riconducibili ad effetti tossicologici, probabilmente legati alla presenza di micotossine.

Le cause del fenomeno, di insolita intensità, potrebbero dipendere da mutate condizioni ambientali come rapide escursioni termiche con umidità elevata che creano un microclima favorevole allo sviluppo delle micotossine.

Da qui è partito un rinnovato interesse verso l'alimentazione zootecnica e le contaminazioni che possono interessarla.

Questa ricerca, finanziata dalla Regione Piemonte e organizzata dal Centro di Referenza Nazionale per la Sorveglianza e il controllo degli Alimenti per gli Animali (C.Re.A.A.) presso l'Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, si inserisce nel contesto della sicurezza alimentare con particolare riferimento all'alimentazione zootecnica e alle contaminazioni che possono interessarla.

La ricerca si propone di effettuare uno screening sulla presenza dello zearalenone nelle materie prime impiegate nei mangimifici e nei mangimi utilizzati dagli allevamenti suinicoli presenti nel territorio dell'ASL 17/2 del Piemonte. Lungi dall'essere esaustiva, ha lo scopo di fotografare la situazione di contaminazione di questa micotossina; inoltre vuole essere un tentativo di tracciare una mappa territoriale nell'area geografica in considerazione, con le zone più a rischio per poter effettuare controlli maggiormente mirati.

Quindi lo scopo principale è migliorare la conoscenza della realtà piemontese in termini di sicurezza alimentare, per far fronte, in tempi rapidi, ad eventuali emergenze conseguenti a segnalazioni di contaminazione di alimenti ad uso zootecnico.

Materiali e metodi

Al momento della progettazione il primo elemento considerato è stato la possibilità di effettuare un'indagine censuaria o campionaria. Si è determinata la numerosità campionaria attraverso il fattore "costo", quindi si è optato per un'indagine di tipo campionario la cui numerosità è di circa 200 unità.

Per il prelievo dei campioni (materie prime e mangimi composti) sono stati considerati tutti i cinque mangimifici industriali produttori di mangimi per suini e alcuni allevamenti presenti nel territorio di competenza del Servizio Veterinario dell'ASL 17/2 (area di Saluzzo). Per quanto riguarda gli allevamenti, questi sono stati selezionati mediante un campionamento stratificato in cui la variabile di stratificazione è il numero di capi presenti. Nel caso in cui l'allevamento

estratto possedesse l'annesso mangimificio aziendale, si è proceduto anche al prelievo delle materie prime eventualmente presenti. Complessivamente sono stati raccolti 201 campioni (45.3% materie prime e 54.7% mangimi composti) nel periodo marzo-agosto 2004. I campioni sono stati prelevati secondo le specifiche indicazioni riportate sia dal D.M. 23 dicembre 2000 sia dal Piano Nazionale Alimentazione Animale (PNAA).

Le analisi sono state condotte utilizzando un metodo immunoenzimatico reperito in commercio previa preparazione del campione che prevede una macinazione e un'estrazione con una miscela metanolo:acqua 70:30.

Le specifiche (riferite ai cereali e mangimi) del kit immunoenzimatico utilizzato sono:

- limite di quantificazione (LOQ): 1,75 µg/kg
- specificità (cross reaction):

zearalenone	100,0 %
α-zearalenolo	41,6 %
zeranolo	27,7 %
β-zearalenolo	13,8 %
- recupero medio: circa 80% (e con CV=15%)
- soluzioni standards: 0; 50; 150; 450; 1350; 4050 ng/kg (ppt)

Si è verificato il recupero medio (considerando anche il processo di estrazione) e la ripetibilità del saggio mediante un controllo negativo e due controlli positivi (mangimi positivizzati alla concentrazione di 50 µg/kg e 100 µg/kg).

Tutti i campioni che presentano una concentrazione di zearalenone superiore a 1.75 µg/kg (LOQ del kit per i cereali) vengono sottoposti all'isolamento e l'identificazione di ceppi di *Fusarium, spp.*

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando un programma computerizzato (SPSS 11.0) e ha previsto il calcolo della stima della concentrazione media dello zearalenone nei mangimi e nelle materie prime utilizzati per l'alimentazione dei suini. Il calcolo della stima è stato effettuato separatamente per materie prime e mangimi composti in quanto sono prodotti con caratteristiche troppo diverse per poter essere considerate insieme. Nei mangimi composti dove è stato applicato un campionamento stratificato degli allevamenti suini presenti nel territorio dell'ASL si è calcolato lo stimatore stratificato della concentrazione media di zearalenone; nelle materie prime invece come stimatore della concentrazione media di zearalenone si è utilizzata la media campionaria. L'elaborazione statistica dei risultati è stata condotta per mezzo dell'analisi della varianza (ANOVA), seguita dal test F di Fisher, dal test Levene e dal test Brown-Forsythe, con un livello di significatività fissato $\alpha = 0,05$ %.

Risultati

La concentrazione media di zearalenone riscontrata nei 201 campioni analizzati è stata di 15.87 µg/kg, con una deviazione standard di 33.96. La Tabella 1 riporta gli indici statistici calcolati:

Tabella 1. Indici statistici della concentrazione di zearalenone

	N.	Minimo	Massimo	Media	Deviazione standard	Cv (%)
Concentrazione di zearalenone (µg/kg)	201	1,83	238,64	15,87	33,96	204,0

Il valore minimo indica il limite di quantificazione (LOQ) del metodo di analisi utilizzato; per consentire l'elaborazione statistica, a tutti i records che presentavano una concentrazione inferiore al LOQ, è stato imposto un valore arbitrario di 0.88 µg/kg.

Per una migliore rappresentazione dei dati, la variabile viene raggruppata in 5 classi equiampie riportate nella Tabella 2 e ne viene presentata la rappresentazione grafica nella Figura 1.

Tabella 2. Divisione in classi equiampie della concentrazione di zearalenone

Concentrazione di zearalenone (µg/kg)	Tipo di materiale		Totale
	Materie prime	Mangime composto	
0-50	79 86,8 %	104 94,5	183 91,0 %
50-100	7 7,7 %	4 3,6 %	11 5,5 %
100-150	2 2,2 %	1 0,9 %	3 1,5 %
150-200	1 1,1 %	1 0,9 %	2 1,0 %
200-250	2 2,2 %	0 0 %	2 1,0 %
Totale	91 100,0 %	110 100,0 %	201 100,0%

La stima della concentrazione media di zearalenone nei mangimi composti è di 14.04 µg/kg il cui errore standard è 1.95 µg/kg. La media campionaria delle materie prime è 18.95 µg/kg il cui errore standard è 5.13 µg/kg.

Osservando i risultati ottenuti con i test statistici utilizzati, si è potuto riscontrare come le medie ottenute nelle materie prime e nei mangimi composti siano statisticamente uguali. Nella Tabella 3 vengono riportati i risultati relativi alla valutazione delle medie ottenute nelle materie prime in base al tipo di agricoltura (biologica/non biologica): le medie risultano significativamente diverse con il test di Brown-Forsythe.

Tabella 3. Test statistici (Test F, Levene test e Brown-Forsythe test) applicati alle medie nelle materie prime in base al tipo di agricoltura

ANOVA	Sum of Squares	df	Mean Square	Test F	Signif.	Levene test	Signif.	Brown-Forsythe Statistic	Signif
Tra gruppi	2783.50	1	2783.50	1.432	0.235	5.881	0.017	12.536	0.001
All'interno dei gruppi	165271.8	85	1944.37						

Nella Tabella 4 vengono riportati i risultati relativi alla valutazione delle medie ottenute nelle materie prime in base alla destinazione (suini riproduttori o ad ingrasso): le medie risultano significativamente diverse con il test di Brown-Forsythe.

Tabella 4. Test statistici (Test F, Levene test e Brown-Forsythe test) applicati alle medie nelle materie prime in base alla destinazione

ANOVA	Sum of Squares	df	Mean Square	Test F	Signif.	Levene test	Signif.	Brown-Forsythe Statistic	Signif.
Tra gruppi	3349.911	2	1674.96	0.889	0.415	3.805	0.026	3.558	0.034
All'interno dei gruppi	165765.8	88	1883.70						

Considerazioni e conclusioni

La concentrazione media di zearalenone ottenuta in questa indagine è 15.87 µg/kg con deviazione standard di 33.96 e coefficiente di variazione percentuale di 204.0 %. Si noti però come la maggior parte dei dati raccolti, il 91 %, presenta una concentrazione compresa tra 0 e 50 µg/kg; inoltre il 40 % dei dati (72.5 % nelle materie prime e 14.5 % nei mangimi composti) risulta inferiore al LOQ del kit corrispondente a 1.75 µg/kg.

Dall'ANOVA non si riscontrano differenze significative tra la concentrazione media dello zearalenone nei mangimi composti e quella delle materie prime, ossia le medie sono risultate significativamente uguali quindi materie prime e mangimi composti presentano stesso livello di contaminazione benché sia stata ritrovata una concentrazione di 238.64 µg/kg nelle materie prime (glutine di soia) e di 181.85 µg/kg nei mangimi composti.

Sempre in base all'ANOVA nei mangimi completi non si sono riscontrati effetti dovuti al tipo di impianto, alla forma fisica del mangime, al fatto se il mangime è di produzione aziendale, se proviene da agricoltura biologica e se contiene OGM.

Per lo stoccaggio non possiamo dare indicazioni in quanto il test di Levene (che indirizza la scelta tra il test F e quello di Brown-Forsythe) è al limite del livello di significatività prefissato (signif. = 0.052) e i due test danno indicazioni opposte.

Per quanto riguarda le materie prime possiamo dire, sempre in base all'ANOVA, che non si riscontrano differenze significative nelle concentrazioni medie di zearalenone dovute al tipo di impianto, al tipo di materia prima, alla forma fisica, alla provenienza (nazionale/estera), all'anno di raccolta e al tipo di stoccaggio.

Mentre se consideriamo il tipo di agricoltura (biologica/non biologica) possiamo concludere che le concentrazioni medie di zearalenone nei due gruppi sono significativamente diverse in base al test di Brown-Forsythe (signif < 0.05). Stesso discorso se consideriamo la destinazione delle materie prime.

Sono stati calcolati, inoltre, i coefficienti di correlazione (r) per valutare la presenza di un legame lineare tra la concentrazione di zearalenone e alcune variabili quantitative (esempio n. di suini, periodo di stoccaggio) e alcune caratteristiche chimico-fisiche (esempio umidità, proteine grezze, quantità di lisina) dei mangimi composti. Nessun coefficiente di correlazione è risultato però significativo ($p > 0.05$).

Si è quindi proceduto al calcolo delle correlazioni parziali per valutare la presenza di un legame tra due variabili isolando l'effetto dovuto ad una terza variabile.

Si sono trovati dei coefficienti di correlazione parziali significativi che dimostrano una proporzionalità diretta (+0.28) tra la concentrazione di zearalenone e il numero di suini isolando di volta in volta le variabili tipo di impianto, presenza di OGM e destinazione del mangime.

Al contrario si è riscontrata una proporzionalità inversa (-0.33) tra la concentrazione di zearalenone e la quantità di lisina contenuta nel mangime isolando la variabile agricoltura biologica.

Quindi si può concludere che per l'anno 2004 non si è riscontrata una contaminazione preoccupante di questa micotossina in quest'area, se pur ristretta, del Piemonte. Si suggerisce comunque un costante monitoraggio negli anni successivi per garantire questa condizione di sicurezza degli alimenti zootecnici e dell'igiene degli allevamenti e delle produzioni.

Per quanto riguarda, invece, la caratterizzazione dei ceppi di *Fusarium* le analisi sono ancora in corso presso la Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Milano.

CONTAMINANTI MICOTICI E OCRATOSSINA A SU UVE E SU VINO IN ITALIA

Michele Borgo, Michele Savino, Emilia Garcia Moruno
(a) CRA-Istituto Sperimentale per la Viticoltura, Conegliano, TV
(b) CRA-Istituto Sperimentale per l'Enologia, Barletta, BA
(c) CRA-Istituto Sperimentale per l'Enologia, Asti

Introduzione

Il problema della sicurezza alimentare, per migliorare la salubrità dei cibi e delle bevande a tutela dei consumatori, sta assumendo crescente interesse ed è incentrato principalmente ad escludere la presenza di sostanze tossiche esogene ed endogene. Tra queste si può inserire anche l'ocratossina A (OTA), la cui presenza su campioni di vino e di succo d'uva venne rilevata, per la prima volta, in indagini condotte nel 1996 in Svizzera (1) e confermata poi da altre ricerche (2,3,4).

L'importanza di questa scoperta venne recepita dall'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV), che immediatamente attivò i competenti Gruppi di esperti per lo studio della situazione relativamente alle produzioni viticole ed enologiche, afferenti alle aree produttive del bacino del Mediterraneo. Contemporaneamente anche il Ministero delle Politiche Agricole e Forestali (MiPAF) recepì la valenza del problema e intraprese alcune iniziative, finalizzate a valutare i possibili rischi di contaminazione da micotossine sui prodotti viticoli ed enologici nazionali. A partire dal 1999 vennero quindi avviate le prime ricerche per lo studio di alcuni aspetti basilari:

- individuazione dei punti critici del sistema produttivo nazionale;
- interventi per ridurre i rischi di contaminazione da funghi tossinogeni;
- interventi per abbattere la presenza di OTA sui prodotti enologici;
- livelli ammissibili di OTA su vino e su uve;
- potenziali rischi salutistici per i consumatori;
- definizione di linee-guida per la prevenzione dei rischi da contaminazioni micotiche.

Quest'ultimo aspetto venne subito preso in esame e portò alla stesura di prime misure urgenti, contenute nel Decreto 7.04.2000 (5).

L'attività di ricerca sono state quindi focalizzate sui seguenti aspetti:

- fitopatologia viticola: analisi della composizione della microflora del grappolo in relazione a differenti ambienti viticoli, alle varietà di vite, alla gestione delle tecniche colturali in vigneto e alla influenza dei piani di lotta antiparassitaria;
- aspetti enologici: studio dei processi di vinificazione in relazione al comportamento dell'OTA, messa a punto di sistemi di rilevamento della tossina, interventi finalizzati ad abbattere i contenuti di OTA su mosti e su vini;
- presenza di OTA su prodotti enologici nazionali;
- aspetti tossicologici e sperimentazioni per lo studio del destino dell'OTA su consumatori.

Ricerche in viticoltura

Le attività di ricerca e di sperimentazione, avviate a partire dal 1999, sono state finalizzate a valutare l'influenza degli ambienti e delle pratiche colturali sulla composizione delle micoflora del grappolo. Il lavoro ha interessato alcune regioni di maggiore interesse viticolo (Lazio, Lombardia, Piemonte, Puglia, Sardegna, Sicilia, Toscana, Veneto) e ha preso in esame vari aspetti: influenza dei piani di lotta convenzionale e biologica, effetti dei danni all'uva provocati da insetti, filiera di raccolta e trasformazione dell'uva, caratterizzazione degli isolati fungini, studio delle loro potenzialità tossinogene, selettività dei terreni di coltura per l'isolamento di specie fungine di maggiore interesse.

Risultati

Il lavoro svolto nel periodo 1999-2004 ha consentito di monitorare oltre 300 vigneti, distribuiti nelle varie regioni, per un totale di oltre 900 campioni di uve sottoposti alle analisi micologiche. A questi vanno aggiunti altri 600 campioni provenienti da prove fitoiatriche contro i marciumi del grappolo, condotte in un triennio in tre ambienti.

Relativamente alla composizione della flora fungina dell'uva, le ricerche hanno permesso di evidenziare un'ampia variabilità quali-quantitativa dei miceti isolati sulle colture dei mosti d'uva. Lo studio ha compreso l'esame e l'identificazione di specie fungine appartenenti ai generi *Aspergillus* e *Penicillium* (Tabelle 1 e 2). Tra le 17 specie di *Aspergilli* identificate, dodici vengono considerate potenziali produttrici di tossine, mentre nel gruppo dei 33 *Penicilli* identificati, nove sono tossinogeni.

Tabella 1. Specie di *Aspergillus* isolate su campioni di uva per aree di indagine

Specie	Nord	Centro	Sud
<i>A. candidus</i>	x		x
<i>A. carbonarius</i>	x	x	xx
<i>A. clavatus</i>	x		
<i>A. flavus</i>	x	x	x
<i>A. foetidus</i>	x		xx
<i>A. japonicus aculeatus</i>	xxx	x	xx
<i>A. japonicus japonicus</i>	xx	x	xx
<i>A. niger awamori</i>	xx	xx	xxx
<i>A. niger niger</i>	x	x	xxx
<i>A. niveus</i>	x		x
<i>A. ochraceus</i>	x	x	x
<i>A. parasiticus</i>	x		
<i>A. sydowii</i>	x		x
<i>A. terreus</i>	x		x
<i>A. ustus</i>	x		
<i>A. versicolor</i>	x	x	x
<i>A. wentii</i>	x		x

In particolare è emerso che la presenza di *A. ochraceus* e di *A. versicolor* è sporadica ed è limitata ad alcuni ambienti e al solo periodo estivo; *A. carbonarius*, altamente implicato nel rilascio di OTA, è costantemente presente nei campioni di uva delle aree meridionali; *A. niger*

viene isolato quasi sempre in tutte le condizioni. In alcuni campioni del Centro e del Nord Italia è stato trovato anche *A. flavus*. Tra i Penicilli si segnala che il temuto *P. verrucosum* non è mai stato isolato su campioni di uva.

I risultati preliminari conseguiti portano ad evidenziare che la micoflora risulta più abbondante e composita su grappoli posizionati in vicinanza del terreno, su quelli maggiormente esposti alla diretta insolazione e sugli acini danneggiati per lesioni causate da avversità biotiche, quali attacchi di tignole dell'uva, e da altri fattori abiotici. Su uve apparentemente sane la presenza di *Aspergillus* e di *Penicillium* può risultare abbondante, salvo che non si intervenga con prodotti specifici per il contenimento della muffa grigia e di altri marciumi dell'uva.

Tabella 2. Specie di *Penicillium* isolate su campioni di uva per aree di indagine

Specie	Nord	Sud
<i>P. aurantiogriseum</i>	xx	x
<i>P. bilaii</i>	x	x
<i>P. brevicompactum</i>	xx	xx
<i>P. canescens</i>		x
<i>P. chrysogenum</i>	xx	x
<i>P. citreonigrum</i>	x	
<i>P. citrinum</i>	xx	x
<i>P. comune</i>	x	
<i>P. crustosum</i>		x
<i>P. decumbens</i>		x
<i>P. expansum</i>		x
<i>P. fellutanum</i>	x	x
<i>P. glabrum</i>		x
<i>P. glandicola</i>	x	
<i>P. griseofulvum</i>		x
<i>P. janthinellum</i>		x
<i>P. lividum</i>		x
<i>P. paxilli</i>		x
<i>P. oxalicum</i>	x	x
<i>P. purpurescens</i>		x
<i>P. purpurogenum</i>		x
<i>P. raistrickii</i>		x
<i>P. simplicissimum</i>		x
<i>P. solitum</i>		x
<i>P. subg. Aspergilloi.</i>	xx	xx
<i>P. thomii</i>		x
<i>P. variabile</i>	x	
<i>P. viridicatum</i>		x
<i>P. waksmanii</i>		x
<i>P. aurantiogriseum</i>	xx	x
<i>P. bilaii</i>	x	x
<i>P. brevicompactum</i>	xx	xx
<i>P. canescens</i>		x
<i>P. chrysogenum</i>	xx	x
<i>P. citreonigrum</i>	x	
<i>P. citrinum</i>	xx	x
<i>P. comune</i>	x	
<i>P. crustosum</i>		x
<i>P. decumbens</i>		x
<i>P. expansum</i>		x
<i>P. fellutanum</i>	x	x
<i>P. glabrum</i>		x
<i>P. glandicola</i>	x	

segue

continua

Specie	Nord	Sud
<i>P. griseofulvum</i>		x
<i>P. janthinellum</i>		x
<i>P. lividum</i>		X
<i>P. paxilli</i>		X
<i>P. oxalicum</i>	x	X
<i>P. purpurescens</i>		X
<i>P. purpurogenum</i>		X
<i>P. raistrickii</i>		X
<i>P. simplicissimum</i>		X
<i>P. solitum</i>		X
<i>P. subg. Aspergilloi.</i>	xx	Xx
<i>P. thomii</i>		X
<i>P. variabile</i>	x	
<i>P. viridicatum</i>		x
<i>P. waksmanii</i>		x

Parte dei campioni di uva pigiata sono stati sottoposti ad analisi di laboratorio per la determinazione del contenuto di OTA. I risultati ottenuti mettono in evidenza che nei campioni raccolti in vigneti sperimentali delle regioni settentrionali, OTA è sempre assente, mentre in quelli del Centro e delle Isole la presenza della tossina è limitata solo a pochi campioni e sempre su valori molto bassi. Al contrario i rischi di contaminazione da OTA risultano più elevati per le uve raccolte in vigneti pugliesi (Tabella 3). Parallelamente è stato possibile constatare che la produzione di OTA su uve può dipendere dalle varietà coltivate, dal livello di sanità delle uve, dalle interazioni con altre avversità della vite e con gli effetti degli interventi agronomici.

Tabella 3. Numero di campioni di uva con presenza di OTA sul totale esaminati per aree

ZONA	2001	>1µg/L	2002	>1µg/L	2003	>1µg/L
Nord	0/13		0/54		0/45	
Centro	3/33		0/27		1/16	
Puglia	21/33	5	30/38	6	39/48	9
Isole	2/55		3/52		2/30	

Sperimentazione enologica

Tra vari aspetti delle attività di ricerca svolte dall'Istituto per l'enologia, oltre ad aver monitorato le uve delle regioni maggiormente interessate allo sviluppo di miceti tossinogeni, ha indirizzato gli studi alla ricerca di prodotti e di tecniche enologiche finalizzate a rimuovere l'OTA dai vini eventualmente contaminati. L'uso del carbone attivo decolorante in polvere, alla dose di 15g/hL, si è rilevato efficace in prove di laboratorio per asportare almeno l'85% dell'OTA presente (risultati non pubblicati). Le modalità dei trattamenti stabilite con le suddette prove di laboratorio su piccoli quantitativi, sono state successivamente trasferite su scala di cantina, per verificarne l'applicabilità. Sono stati realizzati tre tipi di intervento:

- trattamento dei mosti in fase pre-fermentativa;
- trattamenti nel corso della fermentazione;
- trattamento sui vini già ottenuti.

Per il primo tipo di intervento le prove sono state condotte su due diversi mosti bianchi, ottenuti da uve della Puglia, per valutare l'effetto del carbone attivo. I risultati dimostrano

l'efficacia del trattamento alle analisi eseguite sia su mosto che su vino (Figura 1). I vini corrispondenti ai mosti trattati in fase prefermentativa denotavano una diminuzione dell'intensità colorante e della saturazione, ma maggiore luminosità (effetto positivo per vini bianchi).

Risultati pressoché simili sono stati raggiunti in sperimentazioni effettuate su mosti rossi mediante trattamento con carbone solo del mosto sgrondato. Il metodo comunque non appare proponibile sul piano operativo in quanto, anche rimuovendo completamente l'ocratossina dal mosto, con la successiva macerazione delle bucce ancora contaminate si estrae nuova OTA, che va nuovamente a contaminare la massa in fase di macerazione.

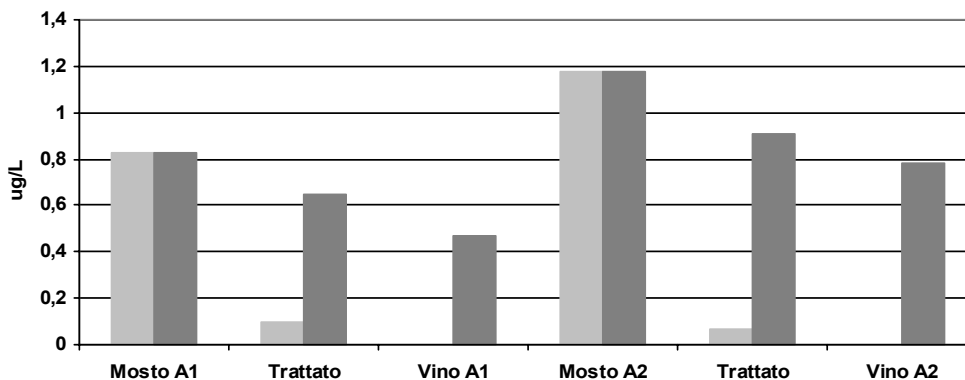


Figura 1. Effetto del trattamento pre fermentativo di due mosti con 20 g/hL di carbone decolorante: µg/L di OTA nelle diverse tesi e fasi di vinificazione

Il trattamento di mosti bianchi in fermentazione con 50g/hL di carbone attivo è risultato altrettanto efficace, senza causare alterazioni dei vini sotto il profilo visivo e gusto-olfattivo (Figura 2). Le dosi stabilite sono necessariamente più alte in relazione al maggior grado di torbidità del mosto.

e sperimentazioni con trattamento di chiarifica su vino rosso hanno evidenziato l'efficacia del carbone, anche se è stata riscontrata una caduta di intensità colorante di circa 36% rispetto al valore iniziale. Sotto l'aspetto gusto-olfattivo, i vini rossi a confronto non hanno evidenziato differenze statisticamente significative.

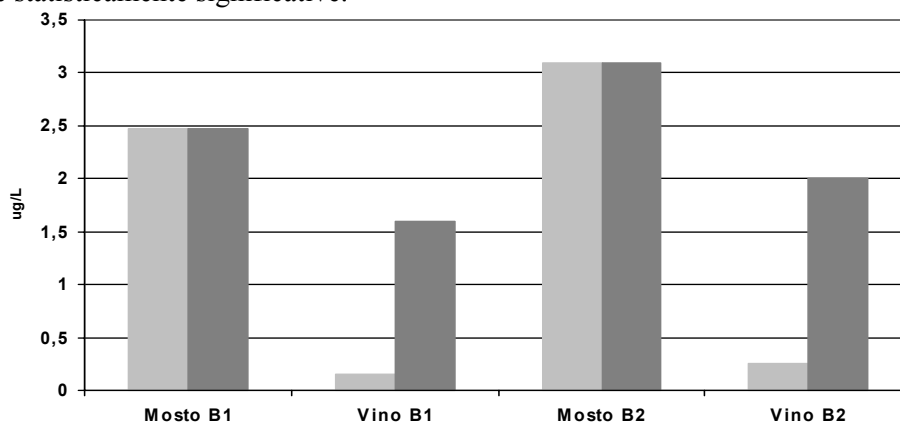


Figura 2. Effetto del trattamento di due mosti in fermentazione con 50 g/hL di carbone decolorante: µg/L di OTA nelle diverse tesi e fasi di vinificazione

Conclusioni

Le ricerche finora condotte per lo studio delle cause che portano alla formazione di ocratossina A sul vino hanno permesso di evidenziare che il fenomeno prende origine in vigneto e dipende fondamentalmente da vari fattori, tra i quali spiccano le variabili eco-pedologiche e climatiche, la suscettibilità varietale, le condizioni colturali e agronomiche, la sanità delle uve e i presidi fitosanitari utilizzati. L'assenza di ferite sulle bacche e l'impiego razionale di piani strategici di protezione di lotta antiparassitaria rappresentano due importanti presupposti per la prevenzione dei rischi sullo sviluppo di specie fungine considerate pericolose. Lo studio micologico, pur risultando assai complesso e specialistico, derivato principalmente dalla messa a punto di adeguate metodologie operative, ha consentito di isolare dalle uve una flora fungina molto diversificata e di identificare anche altre specie di miceti, considerati potenziali produttori di altre tossine in aggiunta a ocratossina A.

Il sistema enologico, d'altro canto, consente di ridurre eventuali livelli elevati di OTA, presenti nei mosti bianchi, sfruttando gli effetti decontaminanti del carbone attivo. Ulteriori studi sono in corso per quanto riguarda i trattamenti per i vini rossi.

Ringraziamenti

Le ricerche sono state condotte con il finanziamento del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali e con la partecipazione di:

- Dip.to di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata (F. Faretra e collaboratori) dell'Università di Bari;
- Dip.to . En. Fi. Mi. Zo., Sez. Patologia Vegetale e Microbiologia agraria (S. Burruano e collaboratori) dell'Università di Palermo;
- Dip.to Protezione delle Piante, Sez. Patologia Vegetale (S. Serra) dell'Università di Sassari;
- Istituto di Patologia Vegetale (A.M. Vercesi e collaboratori) dell'Università di Milano;
- Istituto Sperimentale per la Viticoltura: SOC Biologia-Difesa, SOP Arezzo e Turi (BA).

Bibliografia

1. Zimmerli B, Dick R. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assesement. *Food Addit. Contam.* 1996; 13 (6): 655-668.
2. Cazabeil M, Tricard C. L'Ochratoxine A dans les vins. *Rev. Fr. Oenol.* 1998;169:16-18
3. Burdaspal PA, Legarda TM. Ocratoxina A en vinos, mostos y zumos de uva elaborados en España y otros paises europeos. *Alimentaria.* 1999 enero-febrero:107-113.
4. Tricard C, Bourguignon JB, Labardin M, Cazabeil JM, Medina B. Dosage de l'ochratoxine A dans les vins validation interlaboratoire. *Feuillet Vert OIV.* 1999. 1090.
5. Decreto 7 aprile 2000. Linee guida nella produzione vitivinicola per la prevenzione della potenziale contaminazione da micotossine. *Gazzetta Ufficiale – Serie speciale n. 97, 27 aprile 2000.*

DEGRADAZIONE DI PATULINA AD OPERA DI UN AGENTE DI LOTTA BIOLOGICA

Valeria Morena, Vincenzo De Cicco, Raffaello Castoria
Dipartimento di Scienze Animali, Vegetali e dell'Ambiente, Università degli Studi del Molise, Campobasso

Introduzione

I potenziali rischi sanitari e ambientali legati all'uso di fitofarmaci di sintesi, i problemi legati al ritiro dal mercato di alcuni prodotti, e la progressiva perdita di efficacia di altri per l'insorgenza di ceppi resistenti di alcuni patogeni fungini, hanno stimolato la ricerca di alternative biologiche ai fungicidi. Un metodo promettente è l'utilizzo di microrganismi (batteri, funghi e soprattutto lieviti) agenti di lotta biologica (ALB) che hanno efficace attività antagonistica contro diversi patogeni del postraccolta (1). Nel nostro laboratorio sono stati selezionati i lieviti *Rhodotorula glutinis* LS11, *Cryptococcus laurentii* LS28, e il fungo lievitifforme *Aureobasidium pullulans* LS30, che hanno elevata attività antagonistica contro numerosi funghi, in particolare *P. expansum* (2-10), il più comune agente di marciumi di pomacee conservate, responsabile anche dell'accumulo della patulina, micotossina contaminante dei succhi derivati non fermentati. Infatti, anche se l'utilizzo di fungicidi, abbinato ad un'adeguata conservazione delle pomacee, riduce l'incidenza dei marciumi causati da *P. expansum*, una pur bassa percentuale di frutti è comunque infettata dal fungo, rappresentando così la fonte di contaminazione da patulina di succhi e altri prodotti a base di pomacee.

La presenza della tossina, oltre che di residui di fitofarmaci, in mele conservate e nei succhi derivati rappresenta uno dei principali problemi legati alla qualità e sicurezza alimentare. La patulina è una tra le più importanti micotossine, sia per la sua tossicità, sia perché contamina prodotti alimentari molto usati nell'infanzia (11-13). Sebbene non ci siano ancora dati sufficienti per poter attribuire alla patulina attività cancerogena nell'uomo, nel quale provoca gastrite e nausea a seguito di intossicazioni acute, essa è associata ad immunodepressione e ha effetto embriotossico, teratogeno, mutageno, inducendo danni al DNA di cellule umane coltivate *in vitro* (14, 15-18). Recentemente, la Commissione Europea ha stabilito i valori massimi ammissibili per patulina in succhi e prodotti a base di mela (Allegato I del Regolamento CE n. 1425/2003, riconfermato dal Regolamento 455/2004).

Scopo di questo lavoro è stato indagare la capacità di tre ALB di crescere *in vitro* in presenza di patulina, e l'influenza di questi microrganismi sulla persistenza della tossina nel mezzo colturale e in un sistema modello *pathogen-free* (marciume artificiale) che mimasse il tessuto di mela marcescente per l'infezione da *P. expansum*.

Materiali e metodi

Mele. In tutti gli esperimenti sono state utilizzate mele cv Annurca conservate a temperature comprese tra 0 e 4°C per 3-6 mesi. Prima di ogni esperimento, su un campione rappresentativo di mele sono stati determinati i principali indici di maturazione (durezza, gradi Brix e acidità titolabile) secondo il Disciplinare di Produzione Integrata (19).

Microrganismi. I lieviti *R. glutinis* (isolato LS11) e *C. laurentii* (isolato LS28) e il fungo lievitifforme *A. pullulans* (isolato LS30) sono i tre ALB utilizzati. Allevamento degli ALB e preparazione delle rispettive sospensioni cellulari sono stati eseguiti come descritto in precedenza (3).

Patulina. Stock solutions di patulina sono state preparate in acqua acidulata (pH 4) e, da queste, sono state successivamente ottenute le working solutions alle concentrazioni desiderate. Tutte le soluzioni sono state conservate a -20°C fino al momento dell'utilizzo.

Resistenza *in vitro* degli antagonisti alla patulina e persistenza della micotossina nel terreno colturale

Gli ALB LS11, LS28 ed LS30 sono stati incubati per 11 giorni a 6°C in piastre ELISA contenenti terreno colturale LB (20) con, alternativamente, 0, 100, 250 e 500 µg/mL di patulina. La rilevazione della crescita di ciascun lievito è stata effettuata giornalmente, misurando le O.D. a 595 nm al "micro-plate-reader" (21). I risultati sono stati espressi come unità formanti colonie per mL (ufc/mL). L'esperienza è stata eseguita tre volte. Dopo l'incubazione, i sovranatanti colturali dei tre isolati di lievito sono stati utilizzati per valutare, mediante estrazione e analisi HPLC (22-24), la persistenza della micotossina nel terreno. L'estrazione è stata eseguita, per ogni tesi, dal terreno colturale di 6 pozzetti, raggruppati a due a due (3 repliche per tesi), seguendo il metodo di MacDonald *et al.* (22) leggermente modificato. La concentrazione di patulina è stata riportata come recupero percentuale rispetto alla tossina aggiunta a LB non inoculato e immediatamente estratta. Le percentuali sono state convertite nei valori angolari di Bliss, prima di eseguire l'analisi della varianza e la comparazione delle medie (test di Duncan).

Assorbimento della patulina alle pareti di LS11

Il possibile adsorbimento della patulina alle pareti dell'isolato LS11 è stato valutato mediante incubazione di cellule del lievito vive o autoclavate in LB + patulina (100 µg/mL), estrazione e analisi HPLC del sovranatante colturale e del pellet cellulare.

La concentrazione di patulina è stata riportata come recupero percentuale rispetto alla tossina aggiunta a LB non inoculato e immediatamente estratta. Le percentuali sono state convertite nei valori angolari di Bliss e sottoposte ad analisi statistica. I valori medi dei recuperi totali di patulina relativi ad ogni singola tesi sono stati separati mediante il test di Duncan, mentre i valori medi relativi al sovranatante e al pellet delle tesi inoculate con cellule vive o autoclavate sono stati comparati mediante il test t di Student.

Degradazione della patulina nel marciume artificiale *pathogen-free*

Un sistema modello *pathogen-free* (marciume artificiale) è stato ideato per verificare la possibile riduzione della concentrazione di patulina, da parte dell'antagonista LS11 in tessuto di mela marcescente. Il marciume artificiale è stato preparato omogeneizzando spicchi di mela provenienti da frutti diversi e incubando l'omogeneizzato per 12 ore a 4°C, affinché procedesse il processo di imbrunimento dovuto all'ossidazione fenolica, per conferire al campione caratteristiche di macerazione simili a quelle del tessuto infettato da *P. expansum*. L'esperienza ha previsto l'incubazione a 23 °C di 3 tesi di 12 repliche ognuna; 3 repliche per ciascuno dei quattro tempi di estrazione fissati (dopo 1, 2, 4 e 6 giorni di incubazione). Tesi 1: marciume artificiale + patulina (concentrazione finale 250 µg/mL) tesi 2: marciume artificiale + LS11 (concentrazione finale 1x10⁷ ufc/mL); tesi 3: marciume artificiale + patulina

(concentrazione finale 250 µg/mL) + LS11 (concentrazione finale 1x10⁷ ufc/mL). Il recupero di patulina è stato espresso come percentuale della quantità di tossina addizionata al marciume artificiale e immediatamente estratta. Le percentuali sono state convertite nei valori angolari di Bliss prima di eseguire il test t di Student. I dati riportati in grafico rappresentano il valore medio di tre esperimenti.

Prima dell'estrazione, sono state prelevate aliquote di 50 µl per l'analisi HPLC. Fase stazionaria e mobile del sistema cromatografico erano, rispettivamente, una colonna Phenomenex C18 250 x 4.6 mm con diametro interno di 5 µm e una miscela 95:5 (v/v) di H₂O acidulata (con 1% di acido acetico) e metanolo; flusso: 1 mL/min.

Dinamica di popolazione di LS11 nel marciume artificiale *pathogen-free*

La crescita del lievito LS11 nel sistema modello è stata valutata mediante reisolamento su terreno semi-selettivo (Basal Yeast Agar + ampicillina e streptomicina), per comprendere la relazione tra livelli di persistenza della tossina e presenza dell'ALB. Il reisolamento è stato eseguito agli stessi tempi fissati per l'analisi quantitativa della patulina. I dati riportati rappresentano la media di tre esperimenti.

Risultati

Resistenza *in vitro* degli antagonisti alla patulina e persistenza della micotossina nel terreno colturale

Rhodotorula glutinis isolato LS11 è l'ALB più resistente alla patulina, evidenziando i più elevati livelli di crescita a tutte le concentrazioni di tossina testate, tranne la più elevata, secondo un andamento dose-dipendente (Figura 1).

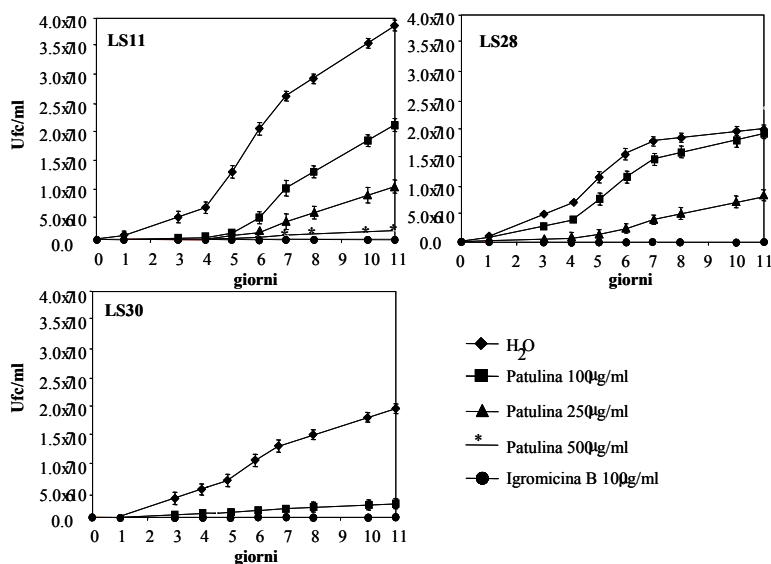


Figura 1. Crescita *in vitro* (ufc/mL) a 6°C dei tre agenti di lotta biologica LS11, LS28 ed LS30 in presenza di patulina 100, 250 e 500 µg/mL. I valori riportati rappresentano le medie ± DS di un esperimento

L'isolato LS28, pur raggiungendo nel controllo e in presenza di patulina 100 e 250 µg/mL, valori simili a quelli di LS11, non cresce a 500 µg/mL. Infine, l'isolato LS30 è in grado di svilupparsi solo nel controllo senza tossina. Come atteso, nessuno dei 3 ALB sopravvive in presenza dell'antibiotico Igromicina B (controllo positivo).

I livelli di patulina rilevati, espressi come recuperi percentuali rispetto alla tossina aggiunta al terreno colturale non inoculato con gli ALB ed estratta subito dopo, sono riportati in Figura 2.

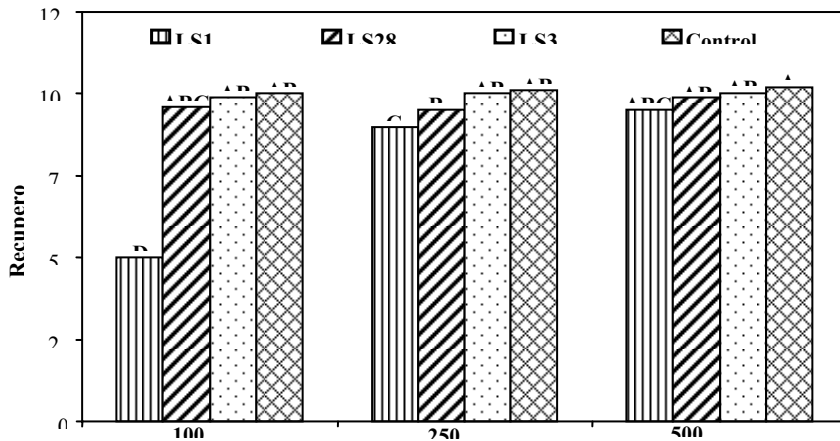


Figura 2. Recuperi percentuali di patulina da colture *in vitro* degli ALB LS11, LS28 ed LS30, dopo 11 giorni di incubazione a 6°C in presenza di patulina 100, 250 e 500 µg/mL. Le percentuali sono state convertite nei valori angolari di Bliss prima dell'analisi della varianza e i valori medi riportati in grafico sono stati comparati mediante il test di Duncan. I valori con lettere differenti sono statisticamente differenti per $P < 0,01$.

Solamente LS11 è capace di ridurre significativamente i livelli di patulina, determinando una notevole riduzione, circa il 50%, alla concentrazione più bassa, e un minor decremento, 10%, a 250 µg/mL di tossina. Alla concentrazione più elevata di 500 µg/mL la riduzione non è statisticamente significativa. Gli isolati LS28 e LS30, invece, non hanno determinato significative riduzioni dei recuperi di patulina a nessuna delle concentrazioni di tossina esaminate. La lastrina TLC relativa all'analisi qualitativa di campioni non sottoposti ad estrazione e provenienti da analoghi esperimenti *in vitro* eseguiti a 23 °C, fa rilevare, nel caso di LS11 in presenza di patulina 250 µg/mL, la graduale scomparsa dello spot della tossina e la contemporanea comparsa di altri due *spot* principali (R_f 0,38 e 0,46) (dati non mostrati).

Adsorbimento della patulina alle pareti di LS11

I risultati dell'esperimento riportati in Figura 3 mostrano che la patulina non è adsorbita alle pareti di LS11.

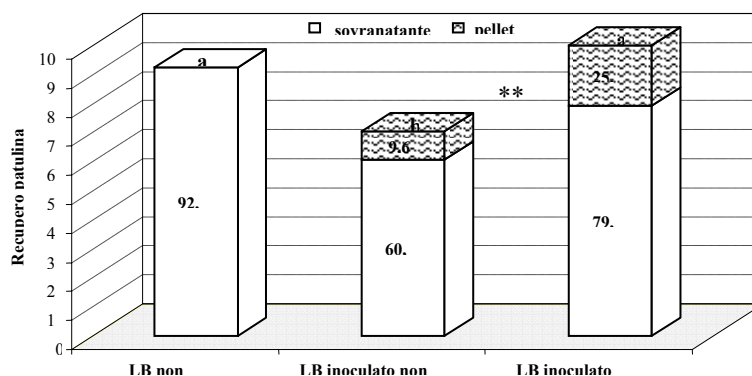


Figura 3. Recuperi percentuali di patulina aggiunta (100 µg/mL) a terreno LB non inoculato e inoculato con cellule vive o autoclavate di LS11. L'estrazione è stata eseguita separatamente dal sovrantante () e dal *pellet* (). Le percentuali totali di ogni tesi sono state convertite nei valori angolari di Bliss prima dell'analisi della varianza e i valori medi riportati in grafico sono stati comparati mediante il test di Duncan. I valori con lettere differenti sono statisticamente differenti per P < 0,05. I valori medi delle percentuali di patulina provenienti dal sovrantante e dal *pellet* sono state comparate mediante il test t di Student. I valori sono statisticamente differenti per P < 0,01 ()**

In particolare, i livelli di tossina recuperati dai campioni sono significativamente ridotti solo in presenza di cellule vive. Nel controllo e in presenza di cellule autoclavate, il recupero di patulina è quasi del 100%. Sebbene l'estrazione eseguita separatamente sul sovrantante e sul *pellet* cellulare mostri un basso recupero di tossina anche da quest'ultimo, la percentuale recuperata dal *pellet* di cellule vive è significativamente inferiore rispetto a quello di cellule autoclavate.

Recupero di patulina dal marciume artificiale *pathogen-free*

I risultati dell'analisi HPLC relativi agli esperimenti col sistema modello sono riportati in Figura 4.

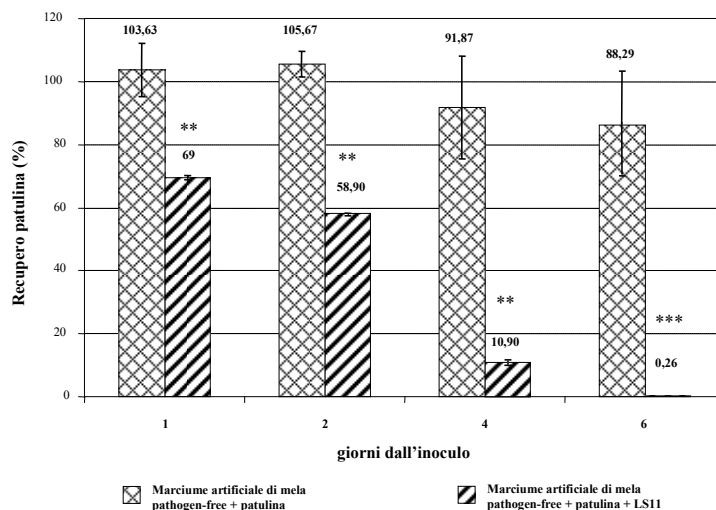


Figura 4. Recuperi percentuali di patulina aggiunta a tessuto omogeneizzato e imbrunito di mela (marciume artificiale *pathogen-free*). L'estrazione è stata effettuata dopo 1, 2, 4 e 6 giorni di incubazione a 23°C. Le percentuali sono state convertite nei valori angolari di Bliss prima dell'analisi statistica e i valori medi sono stati comparati per ogni intervallo di tempo mediante il test t di Student. Le barre indicano le DS I valori medi riportati sono statisticamente differenti per P < 0,01 () e per P < 0,001 (***). L'esperimento è stato eseguito 2 volte**

L'isolato LS11 ha determinato una chiara e graduale diminuzione di patulina durante il corso dell'esperimento. In particolare, i recuperi di tossina nei campioni trattati con il lievito sono del 69% e del 58,9%, rispettivamente dopo 1 e 2 giorni di incubazione, del 10,9% dopo 4 giorni e, dopo 6 giorni, è possibile rilevare solo tracce di patulina. Nei controlli il recupero è pressoché totale dopo 1 e 2 giorni dall'inizio dell'esperimento, mentre ai tempi successivi il recupero di micotossina è pari al 91,9% e al 88,3%. La lastrina TLC relativa all'analisi qualitativa dei campioni non sottoposti ad estrazione fa rilevare, nel caso della tesi LS11 + patulina dopo 4 giorni di incubazione, la graduale scomparsa dello spot della tossina e la contemporanea comparsa di altri due spot principali uguali a quelli rilevati nei precedenti esperimenti *in vitro* eseguiti a 23 °C. Dopo 6 giorni di incubazione, lo spot della patulina scompare completamente e i due nuovi spot appaiono di maggiore intensità rispetto al precedente tempo di analisi (dati non mostrati).

Nei cromatogrammi HPLC relativi a due diversi tempi di analisi (0 e 6 giorni) degli stessi campioni (Figura 5), dopo 6 giorni sono evidenti 2 nuovi picchi che presentano analogica cinetica di comparsa degli spot dell'analisi TLC: alla formazione dei due nuovi picchi corrisponde la pressoché totale scomparsa del picco della patulina.

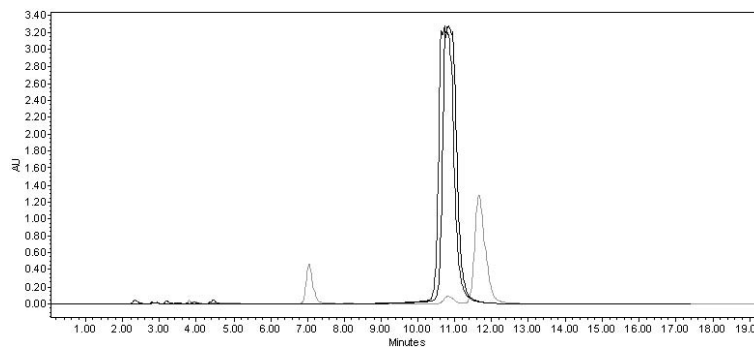


Figura 5. Analisi qualitativa dei sovrinatanti colturali dell'esperimento sul marciume artificiale *pathogen-free* eseguita mediante HPLC dopo 0 e 6 giorni di incubazione a 23°C. A 6 giorni, oltre al picco della patulina, sono visibili altri due picchi (X1 e X2) con Rt rispettivamente inferiore e superiore a quello della tossina

Dinamica di popolazione di LS11 nel marciume artificiale *pathogen-free*

I dati sono riportati in Figura 6.

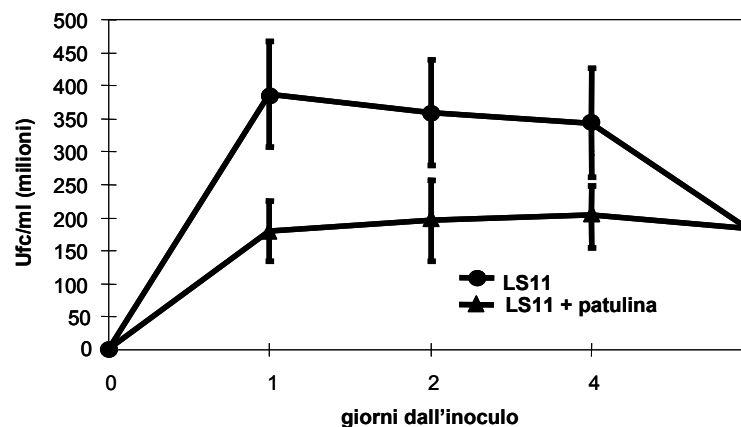


Figura 6. Dinamica di popolazione di LS11 in marciume artificiale *pathogen-free* Le colonie rilevate ufc/mL \pm DS I valori riportati rappresentano la media di tre esperimenti

L'antagonista LS11 è capace di crescere nel sistema modello, sia in presenza sia in assenza di patulina. In assenza di tossina, il lievito cresce rapidamente e in modo esponenziale fino al primo giorno d'incubazione. Successivamente, il numero di ufc/mL diminuisce progressivamente. In presenza di patulina, la crescita di LS11 ha inizialmente un andamento simile al controllo, ma con valori più bassi. Dopo il primo giorno però, la crescita dell'antagonista si arresta, eguagliando il numero di ufc/mL registrato al sesto giorno in assenza di tossina.

Discussione

I risultati delle analisi HPLC eseguite sugli estratti dei sovranatanti colturali relativi agli esperimenti *in vitro* a 6°C mostrano che la percentuale di patulina recuperata è inversamente correlata ai livelli di crescita dei 3 ALB, quindi inversamente correlata alla loro resistenza alla micotossina. Ciò suggerisce che la resistenza alla patulina sia legata alla capacità dei microrganismi di metabolizzare la tossina. In particolare, la maggiore riduzione è determinata dall'isolato LS11 in corrispondenza della concentrazione di patulina saggiata più bassa, mentre una minore, ma comunque evidente riduzione del recupero di tossina, si ha alla concentrazione immediatamente superiore (250 µg/mL).

L'ipotesi di una possibile metabolizzazione della patulina è supportata dai risultati degli esperimenti *in vitro* miranti a verificare l'adsorbimento della patulina alle pareti di LS11. I dati relativi al recupero della tossina, estratta separatamente dal sovranatante colturale e dal pellet cellulare, mostrano che solo nel terreno inoculato con cellule vive del microrganismo si verifica una sensibile riduzione del recupero di tossina rispetto al controllo. Nello stesso controllo non inoculato e nel campione contenente cellule autoclavate di LS11 si registra, invece, un recupero pressoché totale di patulina. Ciò indica un ruolo attivo dell'antagonista nella riduzione della concentrazione di tossina. Inoltre, la frazione di tossina estratta dal pellet di cellule vive è significativamente inferiore a quella proveniente da cellule morte (autoclavate). Un adsorbimento di patulina sembra quindi verificarsi solo nel caso delle cellule morte, presumibilmente per una modificazione dei polimeri costitutivi della parete di LS11 dovuta al trattamento termico.

Un'indicazione sulla validità dell'ipotesi della metabolizzazione viene dall'analisi TLC (dati non mostrati) relativa agli esperimenti *in vitro* descritti sopra, che mostra la graduale scomparsa dello spot della patulina e la contemporanea e altrettanto graduale formazione di due nuovi spot principali, quando LS11 è allevato in presenza di patulina. È noto che *S. cerevisiae* metabolizza la patulina ad E-ascladiolo (10). Nel nostro caso è però possibile escludere che si tratti di E-ascladiolo, poichè gli Rf dei metaboliti formati nel caso di LS11 sono diversi da quello riportato per il metabolita prodotto da *S. cerevisiae*.

Negli esperimenti eseguiti sul marciume artificiale *pathogen-free*, l'antagonista determina una rapida riduzione della concentrazione di patulina. Il reisolamento delle cellule di LS11 dal sistema modello mostra la sua capacità di crescere anche in tessuto di mela omogeneizzato e imbrunito in presenza di patulina, a conferma della correlazione tra presenza del lievito e riduzione di tossina. Anche in queste condizioni sperimentali è possibile che la riduzione di patulina sia dovuta alla sua metabolizzazione da parte di LS11. I risultati dell'analisi qualitativa in TLC (dati non mostrati) e HPLC dei campioni degli stessi esperimenti, infatti, mostrano la graduale scomparsa della tossina e la concomitante formazione di nuovi composti, che in TLC sono apparentemente uguali a quelli riscontrati allevando LS11 in LB con patulina (dati non mostrati).

In conclusione, questo studio dimostra che il lievito *R. glutinis* LS11 agente di lotta biologica ha la potenzialità di detossificare la patulina, poiché è apparentemente in grado di metabolizzare la tossina sia *in vitro* (terreno colturale), sia in mela marcescente *pathogen-free*. La purificazione e la caratterizzazione dei metaboliti prodotti sono in corso per a) sviluppare le idonee procedure analitiche per valutare la metabolizzazione della tossina anche *in vivo*, cioè in mele pretrattate con l'antagonista ma comunque infettate dal fungo in cui si è registrata una chiara riduzione dell'accumulo di tossina (dati non mostrati), b) per condurre studi tossicologici su questi composti.

Bibliografia

1. Janisiewicz WJ, Korsten L. Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits. *Annual Review of Phytopathology* 2002; 40: 411-441.
2. Castoria R, De Curtis F, Lima G, De Cicco V. β -1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possibile mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. *Postharvest Biology and technology* 1997; 12: 293-300.
3. Castoria R, De Curtis F, Lima G, Caputo L, Pacifico S, De Cicco V. *Aureobasidium pullulans* (LS30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. *Postharvest Biology and technology* 2001; 22: 7-17.
4. Castoria R, Caputo L, De Curtis F, De Cicco V. Resistance of Postharvest Biocontrol Yeasts to Oxidative Stress: A possible New Mechanism of Action. *Phytopathology* 2003; 93: 564-572.
5. Lima G, De Curtis F, Castoria R, De Cicco V. Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against postharvest rots on different fruits. *Biocontrol Science and Technology* 1998a; 8: 269-279.
6. Lima G, Arru S, De Curtis F, Arras G. Influence of antagonist, host fruit, and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeasts. *Journal of industrial microbiology and biotechnology* 1999; 23: 223-229.
7. Prieta J, Moreno MA, Diaz S, Suarez G, Dominguez L. Survey of patulin in apple juice and children's apple food by diphasic dialysis membrane procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1994; 42: 1701-1703.
8. Larsen TO, Frisvad JC, Ravn GE, Skaaning T. Mycotoxin production by *Penicillium expansum* on blackcurrant and cherry juice. *Food Additives and Contaminants* 1998; 15 (6): 671-675.
9. Beretta B, Gaiaschi A, Galli CL, Restani P. Patulin in apple-based foods: occurrence and safety evaluation. *Food Additives and Contaminants* 2000; 17 (5): 399-406.
10. Moss MO, Long MT. Fate of patulin in the presence of yeast *Saccharomices cerevisiae*. *Food Additives and Contaminants* 2002; 19 (4): 387-399.
11. IARC. Patulin. In Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France, 1986; 40: 83-98.
12. Bourdiol D, L Escoula. Effect of Patulin on microbicidal activity of mouse peritoneal macrophages. *Food Chemistry and Toxicology* 1990; 28: 29-33.
13. Liu BH, Yu FY, Wu TS, Li SY, Su MC, Wang MC, Shih SM. Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2003; 191: 255-63.
14. FAO/WHO (Food and Agricultural Organisation of United Nations/World Health Organisation). The use of hazard analysis and critical points (HACCP) in food control. Food and Nutrition Paper, 1995; NO. 58, Food and Nutrition Division. FAO. Roma.

15. Betina V. Biological effects of mycotoxins. In: Betina V (Ed.). *Mycotoxins production, Isolation, Separation and Purification*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1984; p. 25-26.
16. McKinley ER, Carlton WW. Patulin. In: Sharma RP, Salunkhe DK (Eds.). *Mycotoxins and phytoalexins*. CRC Press, Boca Raton, FL; 1991. p. 191-236.
17. Bottalico A. Funghi tossigeni e micotossine: aspetti generali. Speciale micotossine. Estratto da *Informatore Fitopatologico* 2002, Anno LII – n. 12/12.
18. Logrieco A, Solfrizzo M, Castoria R. Funghi tossigeni e micotossine: filiera orto-frutticola. Speciale micotossine. Estratto da *Informatore Fitopatologico*. 2002; Anno LII- n- 12/12.
19. Disciplina di Produzione Integrata. Frutticole. Fase di Post-raccolta. Prodotto Fresco. Soc. Coop. a r. l., Centro Ricerche Produzioni Vegetali, 2002; p. 46-48.
20. Lilly VG, Barnett HL. *Physiology of the fungi*. McGraw-Hill, New York, N.Y, 1951.
21. Lopez-Garcia B, Gonzales-Candelas L, Perez-Paya E, Marcos JF. Identification and characterization of a hexapeptide with activity against phytopathogenic fungi that cause postharvest decay in fruits. *Molecular Plant-Microbe interaction* 2000; 13: 837-846.
22. MacDonald S, Long M, Gilbert J. Liquid Chromatographic method for determination of Patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 2000; 83: 1387-1394.
23. Shephard GS, Leggott NL. Chromatographic determination of the mycotoxin Patulin in fruit and fruit juice. *Journal of Chromatography A* 2000; 882: 17-22.
24. AOAC (Association of Official Analytical Chemists) Official Methods of Analysis. Thin-Layer Chromatography; Liquid Chromatographic Method. *Natural Toxins*, 2000; 49: 51-53.

INFLUENZA DELLA MODALITÀ DI COLTIVAZIONE, DELL'ESSICCAMENTO E DELLO STOCCAGGIO SULLA PRESENZA DI AFLATOSSINE IN GRANELLA DI MAIS

Franco Cinti, Fiorindo Gaspari, Mirco Casagrandi

(a) Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali (DiSTA), Università di Bologna

(b) DAST-CNR, Roma, c/o DiSTA – Università di Bologna

(c) AgriOK S.p.A, Bologna

Introduzione

La presenza di aflatossine in granella di mais è la risultante di numerosi fattori tra i quali rivestono particolare importanza la modalità di coltivazione, la “lavorazione” post-raccolta (pulitura ed essiccamento) e lo stoccaggio (1, 2, 3).

Lo scopo della ricerca è stato quello di valutare l'applicazione di un protocollo nella filiera coltivazione – stoccaggio di granella di mais al fine di contenere la presenza di micotossine.

Materiali e metodi

Nel 2003-2004 è stata condotta una ricerca in 3 province emiliane (Reggio Emilia, Modena, Bologna) seguendo 8 partite di granella di mais consegnate a quattro diversi stoccatrici, di dimensioni comprese tra 12 e 1.151 t (totale: 3.926 t) e aventi un contenuto medio di umidità compreso tra 14 e 25,1%. Quattro di queste partite sono state ottenute con le tecniche agronomiche ordinarie della zona e quattro si sono ottenute seguendo un protocollo predisposto da AgriOK ispirato all'applicazione complessiva delle “buone pratiche agronomiche”, come ad esempio l'impiego di ibridi a ciclo medio e trattamenti antiparassitari (soprattutto contro la seconda generazione di *Ostrinia nubilalis* Hb.).

È stato effettuato un campionamento di granella sia all'atto del conferimento delle partite alle aziende stoccatrici, sia, dopo periodi diversi di conservazione (mediamente 260 giorni), alla consegna del prodotto agli utilizzatori. È stato prelevato un campione globale di 30 kg ogni 200 tonnellate di granella conferita, composto ognuno da 100 campioni elementari di 300 grammi. Ogni campione globale, dopo accurata miscelazione, è stato suddiviso in 3 campioni per il laboratorio. Nel complesso si è operato su 40 campioni globali (20 al conferimento, 20 alla consegna).

Su tutti i campioni si sono determinati i contenuti di aflatossine B₁ - B₂ - G₁ - G₂. Le determinazioni analitiche sono state effettuate in cromatografia liquida ad alta risoluzione con rilevatore spettrofluorimetrico (HPLC/ FLD) dopo purificazione degli estratti mediante l'uso di colonnine ad immunoaffinità basate sull'impiego di anticorpi mono o policlonali specifici per questo gruppo di micotossine. seguita da una derivatizzazione post colonna.

Risultati e discussione

La granella ottenuta con il protocollo AgriOK ha presentato un contenuto di aflatossina B₁ nettamente inferiore a quello registrato sulla granella di provenienza “convenzionale” (10,7 contro 28,4 ppb, pari ad una riduzione del 62%) (Figura 1).

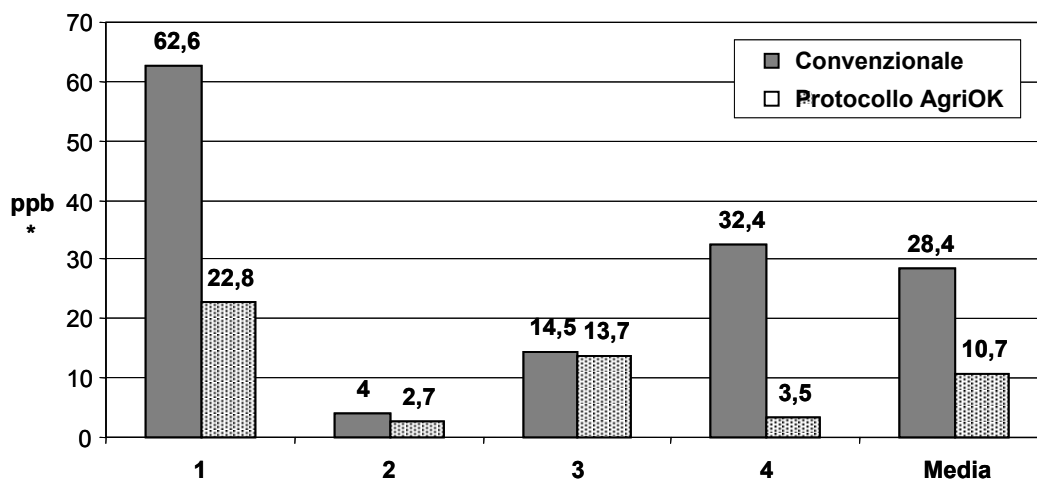


Figura 1. Contenuti di aflatossina B₁ in granella di mais convenzionale e da protocollo AgriOK
* ($\mu\text{g kg}^{-1}$ al 12% di umidità)

In media la granella all’uscita ha presentato un tenore di aflatossina B₁ inferiore a quello rilevato all’atto del conferimento (16,0 contro 19,6 ppb, pari ad un calo del 18%, Figura 2).

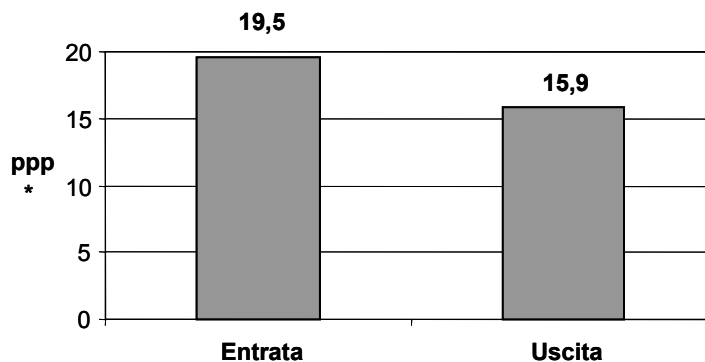


Figura 2. Contenuti medi di aflatossina B₁ in granella di mais in entrata e in uscita dai sili di stoccaggio
* ($\mu\text{g kg}^{-1}$ al 12% di umidità)

Poiché non si sono verificati andamenti significativi sui valori dei prelievi successivi dai sili di stoccaggio, è da ritenere che la riduzione della contaminazione nei centri di stoccaggio vada attribuita pressoché totalmente alla pulitura.

Conclusioni

In definitiva, un'attenta gestione dei seminati e delle fasi di stoccaggio appaiono in grado di ridurre il livello di contaminazione da aflatossine della granella di mais.

Ringraziamenti

Ricerca condotta nell'ambito della convenzione "Alma Mater Studiorum Università di Bologna e Granarolo S.p.A."; responsabile scientifico: Prof. Mauro Vecchietini.

Bibliografia

1. Bottalico A. Riflessi degli attacchi dei funghi tossigeni alle colture agrarie, sulla qualità finale dei prodotti alimentari. In: I rischi microbiologici del 2000 nel settore alimentare: muffe, lieviti e micotossine. Unipath Editore, Milano, 1994; 11-28.
2. Avantaggiato G, De Girolamo A, Fanelli C, Ricelli A. Funghi tossigeni e micotossine: metodi di decontaminazione delle derrate. *Informatore Fitopatologico* 2002; (12): 4349.
3. Avantaggiato G, Visconti A. Misure di controllo della contaminazione da micotossine e strategie di detossificazione. *Tecnica-Molitoria* 2003; 54(10): 1025-1038.

INFLUENZA DELL'UMIDITÀ ALLA RACCOLTA E DELLA SOSTA IN ATTESA DELL'ESSICCAMENTO SULLA CONTAMINAZIONE CON AFLATOSSINE DELLA GRANELLA DI MAIS

Fiorindo Gaspari, Marco Bortolotti, Franco Cinti **Errore. Il segnalibro non è definito.**

(a) *DAST-CNR, Roma, c/o DiSTA, Università di Bologna*

(b) *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali (DiSTA), Università di Bologna*

Introduzione

Raccolte tendenzialmente anticipate (23-25% di umidità) e rapido essiccamento sono considerate due condizioni da un lato antitetiche (più umida è la granella maggiori sono infatti i tempi di essiccamento), dall'altro favorevoli per ottenere granella di mais con bassi livelli di contaminazione con aflatoSSine (1, 2, 3); la prima consentirebbe di evitare eventuali condizioni di stress alla coltura (evento altamente predisponente per la produzione delle tossine) nella fase finale del ciclo, mentre la seconda permette di scongiurare o ridurre fortemente l'attività di tutti gli organismi aerobi in grado di attaccare e deteriorare la derrata.

Lo scopo della ricerca è stato quello di valutare l'influenza dell'umidità alla raccolta e della sosta in attesa dell'essiccamento sulla contaminazione da aflatoSSine della granella di mais.

Materiali e metodi

Nel 2003 è stata condotta una prova, presso un'azienda sperimentale dell'Università di Bologna (AUB-Terreni di Cadriano), utilizzando un'ordinaria coltura di mais da granella (ibrido a ciclo medio Pioneer PR34N43; densità di semina 7 piante \times m²), sulla quale sono state eseguite due raccolte (11 agosto 2003, granella avente il 23,7% di umidità; 19 agosto con il 13,5% di umidità), prevedendo l'essiccamento immediato e dopo 24, 48 e 72 ore. La conservazione della granella in attesa di essiccamento è stata realizzata sia in contenitori di cemento (0,8 t), parzialmente isolati, sia in cassoni di plastica (0,4 t).

Per ognuno dei trattamenti è stato prelevato un campione globale di 30 kg per la determinazione, via HPLC, del contenuto di aflatoSSine (B₁ - B₂ - G₁ - G₂). Ogni campione globale era composto da 100 campioni elementari di 300 grammi., e dopo accurata miscelazione, è stato suddiviso in 3 campioni 2 dei quali sono giunti al laboratorio.

Lo schema sperimentale adottato per l'analisi statistica dei risultati (ANOVA) è quello fattoriale con la combinazione di 2 repliche, 2 epoche di raccolta (11 agosto e 19 agosto), quattro tempi di attesa (immediato, dopo 24, 48 e 72 ore) e 2 tipi di contenitori per la granella in attesa di essiccamento (contenitore di cemento da 0,8 t parzialmente isolato e cassone di plastica da 0,4 t).

Le determinazioni analitiche sono state effettuate in cromatografia liquida ad alta risoluzione con rilevatore spettrofluorimetrico (HPLC/FLD) dopo purificazione degli estratti mediante l'uso di colonnine ad immunoaffinità basate sull'impiego di anticorpi mono o policlonali specifici per questo gruppo di micotossine, seguita da una derivatizzazione post colonna.

Risultati e discussione

La granella della prima raccolta in attesa di essiccamento ha subito un innalzamento termico notevole, segno evidente di attività aerobica, il quale è risultato più elevato nel caso dei contenitori di cemento rispetto ai cassoni di plastica (Figura 1).

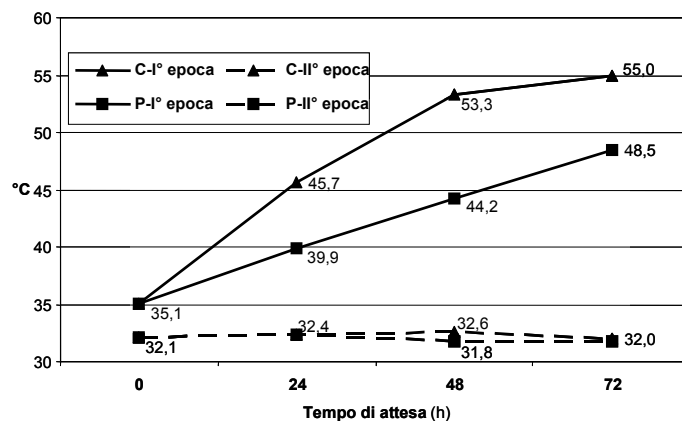


Figura 1. Andamento della temperatura in funzione dell'epoca di raccolta della granella e della modalità di conservazione in attesa dell'essiccamento

La granella della seconda raccolta era già secca e non ha subito alcuna alterazione e perciò nessuna variazione termica.

La presenza di aflatossine è risultata piuttosto contenuta (la media per la B₁ è stata 5,9 ppb) e nessuna differenza significativa si è riscontrata tra le tesi (Figure 2 e 3).

È probabile che il basso livello di contaminazione abbia mascherato l'efficacia dei trattamenti.

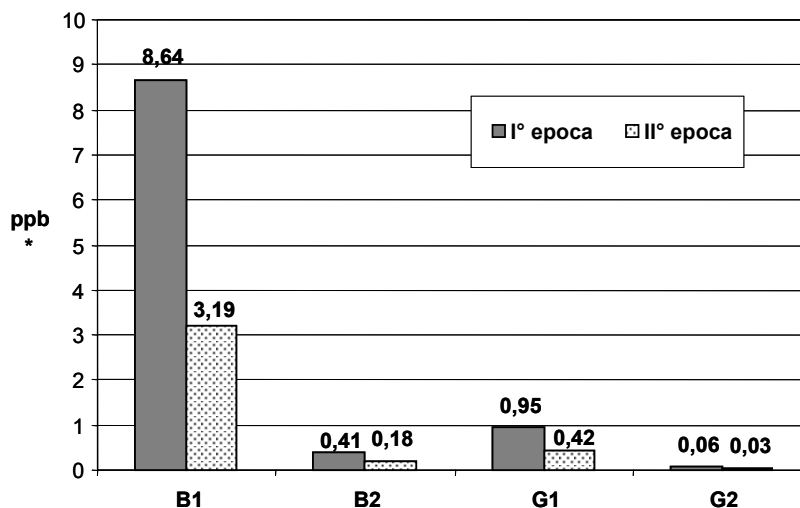


Figura 2. Contenuti medi di aflatossine in funzione dell'epoca di raccolta della granella
* ($\mu\text{g kg}^{-1}$ al 12% di umidità)

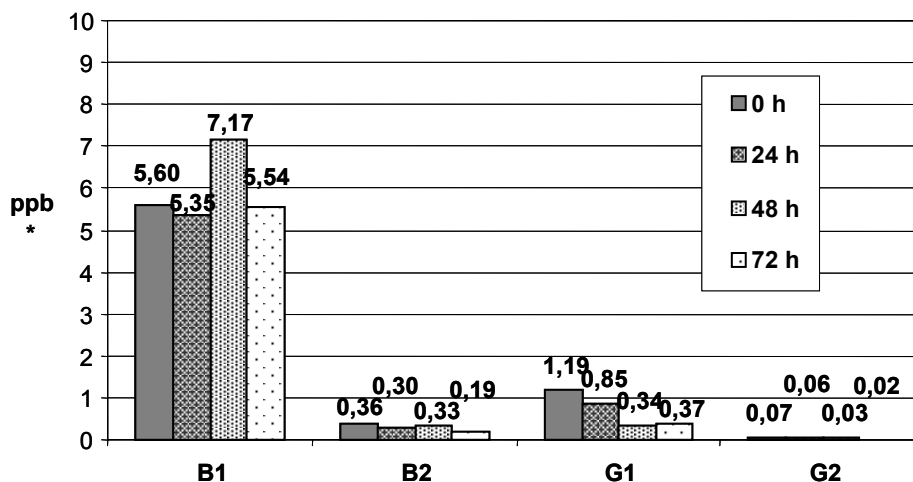


Figura 3. Contenuti medi di aflatoxine in funzione dei tempi di attesa prima dell'essiccamento
* ($\mu\text{g kg}^{-1}$ al 12% di umidità)

Conclusioni

Raccolte tardive della granella e soste prolungate in attesa di essiccamento non sempre si traducono in un aumento della presenza di aflatoxine.

Ringraziamenti

Ricerca condotta nell'ambito della convenzione "Alma Mater Studiorum Università di Bologna e Granarolo S.p.A."; responsabile scientifico: Prof. Mauro Vecchietini.

Bibliografia

1. Ferrero C. Effetti della raccolta e dei trattamenti post-raccolta sulla granella di mais. *L'Informatore agrario* 1997; (7): 45-48.
2. Bertoncini G, Amodeo P, Verderio A. Prevenire il rischio di aflatoxine nel latte. *L'Informatore agrario* 2002; 58(10): 65-70.
3. Reyneri A, Blandino M, Ferrero C, Bersani L. Effetto delle operazioni di post-raccolta sulla contaminazione da micotossine nel mais. *Tecnica Molitoria* 2002; 53 (10): 977-994, 1001.

RELAZIONE TRA CONTENUTI DI AFLATOSSINE DELLA GRANELLA DI MAIS E DEI MANGIMI CHE LA CONTENGONO

Franco Cinti, Marco Bortolotti, Mirco Casagrandi

(a) Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali (DiSTA), Università di Bologna

(b) AgriOK S.p.A, Bologna

Introduzione

La presenza di aflatossine nei mangimi è generalmente la conseguenza dell'impiego di materie prime contaminate. Per questo motivo le aziende mangimistiche si impegnano fortemente per rifornirsi di prodotti "sani" e per conservarli correttamente, onde poter garantire la produzione di mangimi conformi alle vigenti normative e comunque di elevata qualità.

Lo scopo della ricerca è stato quello di verificare la relazione tra i contenuti di aflatossine della granella di mais e quelli dei mangimi che la contenevano.

Materiali e metodi

Negli anni 2003 e 2004 otto stabilimenti mangimistici di primario interesse nazionale sono stati coinvolti in uno studio preliminare per valutare l'adeguatezza dei sistemi di garanzia della qualità delle materie prime e la suscettibilità dei processi tecnologici alla contaminazione diretta o indiretta da micotossine nel prodotto contenente quantità rilevanti di granella di mais. Sono stati monitorati sette mangimifici nel 2003 (riforniti di granella di mais prodotta nel 2002, annata notoriamente poco favorevole alla presenza di aflatossine), e un mangimificio nel 2004 (granella del 2003, annata con forte contaminazione). In quest'ultimo caso sono stati controllati due lotti di granella, uno prodotto ed essiccato in modo ordinario, l'altro seguendo il disciplinare AgriOK (un insieme di "buone norme agronomiche"). Presso ogni mangimificio è stato prelevato un campione sia di granella di mais che di mangime per lattifere contenente la suddetta granella (in media il 32%), formato ognuno da 100 campioni di 300 g rappresentativi della produzione giornaliera. Sono state determinate le aflatossine (B₁-B₂-G₁-G₂), l'ocratossina A, le fumonisine (B₁-B₂), il deossinivalenolo e lo zearalenone. In questa sede si presentano i dati delle sole aflatossine.

Le determinazioni analitiche sono state effettuate in cromatografia liquida ad alta risoluzione con rivelatore spettrofluorimetrico (HPLC/FLD) dopo purificazione degli estratti mediante l'uso di colonnine ad immunoaffinità basate sull'impiego di anticorpi mono o policlonali specifici per questo gruppo di micotossine, seguita da una derivatizzazione post colonna.

Risultati e discussione

Per quanto riguarda i primi sette mangimifici, il contenuto di aflatossina B₁ in granella di mais (campagna 2002) è risultato mediamente inferiore a 1 ppb (Tabella 1), mentre l'ocratossina A e il deossinivalenolo erano presenti in tracce, le fumonisine avevano valori di 5 e 4 ppm (rispettivamente per la B₁ e la B₂) e lo zearalenone raggiungeva i 120 ppb.

Tabella 1. Prova 2002-03 - Contenuti medi di micotossine in prodotti al 12% di umidità

	Mais	Mangime	Limiti analitici
Aflatossina B1 (ppb)	0,81	0,41	LOD=0,1 LOQ=0,196
Aflatossina B2 (ppb)	0,06	0,03	LOD=0,03 LOQ=0,063
Aflatossina G1 (ppb)	nr *	0,10	LOD=0,1 LOQ=0,196
Aflatossina G2 (ppb)	0,03	0,03	LOD=0,03 LOQ=0,055
Ocratossina A(ppb)	0,33	0,59	LOD=0,1 LOQ=0,5
Deossinivalenolo (ppm)	0,34	0,29	LOD=0,2 LOQ=0,5
Fumonisin B1 (ppm)	3,75	2,76	LOD=0,1 LOQ=1
Fumonisin B2 (ppm)	3,06	1,24	LOD=0,1 LOQ=1
Zearalenone (ppb)	110,43	60,46	LOD=6 LOQ=17

* nr= (X<LOD) tr= (X<LOQ)

** I valori di aflatossine sono medie di 3 repliche. Le medie sono state calcolate utilizzando LOD/2 per i risultati inferiori a LOD (LOD= Limite di Rivelazione) e LOQ/2 per i risultati compresi tra LOQ e LOD (LOQ=Limite di Quantificazione)

La presenza di tossine nei mangimi è risultata strettamente connessa alla contaminazione del mais. Facendo riferimento alle aflatossine, le uniche a presentare limiti di legge, questo andamento sta ad indicare un comportamento molto attento e responsabile delle aziende mangimistiche nella fase di approvvigionamento delle materie prime (granella di mais e altro).

In merito all'indagine del 2004 (granella 2003) si è rilevata una netta differenza di contaminazione con aflatossina B₁ della granella di mais prodotta ordinariamente (35 ppb di B₁; Tabella 2) oppure con protocollo AgriOK (15 ppb), che si è riflessa in modo quasi proporzionale sul livello di contaminazione del mangime, che nel caso della granella "convenzionale" ha raggiunto valori di 8 ppb, superiore a quanto stabilito dalle norme vigenti (5 ppb per il mangime complementare destinato alle vacche da latte).

Tabella 2. Prova 2003-04 - Contenuti medi di aflatossine in prodotti al 12% di umidità (ppb)

	Mais		Mangime	
	Convenzionale	AgriOK	Convenzionale	AgriOK
Aflatossina B ₁	35,2	14,7	8,0	5,2
Aflatossina B ₂	2,7	0,8	0,6	0,4
Aflatossina G ₁	1,7	0,3	0,7	0,7
Aflatossina G ₂	0,1	tr	tr	tr

Conclusioni

Queste indagini evidenziano che operando in modo corretto, sia in campo che nella preparazione dei mangimi, è possibile contenere in misura apprezzabile la contaminazione con tossine delle derrate.

Ringraziamenti

Ricerca condotta nell'ambito della convenzione "Alma Mater Studiorum Università di Bologna e Granarolo S.p.A."; responsabile scientifico: Prof. Mauro Vecchietini.

RIDUZIONE DI OCRATOSSINA A NEI VINI MEDIANTE BATTERI LATTICI

Maria Daria Fumi, Roberta Galli, Angela Silva

Istituto di Enologia e Ingegneria Alimentare, Università Cattolica "Sacro Cuore", Piacenza

Introduzione

Studi recenti hanno evidenziato che la fermentazione malolattica può ridurre il contenuto di ocratossina A (OTA) nei vini (1). Tale fermentazione rientra, in particolare, nella tecnologia di preparazione dei vini rossi in quanto la metabolizzazione dell'acido malico ne riduce l'acidità con un conseguente miglioramento delle caratteristiche gusto-olfattive del prodotto. Generalmente la fermentazione malolattica segue la fermentazione alcolica ed è operata dai batteri lattici naturalmente presenti nei vini, ma l'impiego di *starters* selezionati, per una migliore gestione del processo, è una pratica enologica sempre più utilizzata. Scopo della ricerca, di cui si presentano alcuni risultati, è la selezione di batteri lattici in grado non solo di metabolizzare l'acido malico, ma anche di ridurre l'OTA presente nei vini. Ceppi di *Lactobacillus plantarum* sono stati caratterizzati per la capacità di degradare l'OTA in vini con diverso contenuto di etanolo e di OTA ed è stata valutata la cinetica di detossificazione in relazione alla composizione azotata del substrato.

Materiali e metodi

Lactobacillus plantarum : ceppi V16, V22, PCS30, PCS31 isolati da vini in fermentazione malolattica (2)

Mosti e vini rossi ottenuti da Negroamaro e Primitivo (Puglia-Italia) naturalmente contaminati con OTA: Mosto (zucchero 233 g/L; pH 3.41; acido malico 4.77 g/L; OTA 1 µg/L); Vino 1 (etanolo 14 vol%; OTA 5.4 µg/L; pH 3.29; acido malico 1.16 g/L); Vino 2 (etanolo 6 vol%; OTA 16.6 µg/L; pH 3.14; acido malico 1.75 g/L)

Simil - vino (SV): etanolo 11.5 vol.%; acido L-malico 2 g/L; acido tartarico 2 g/L portato a pH 3.2 con NaOH 1 N e addizionato, separatamente, di: a) 0.17 g/100 mL di Yeast nitrogen base (con aminoacidi, ammonio solfato e vitamine); b) 0.67 g/100 mL di Yeast nitrogen base w/o (privo) amino acids ; c) 0.67 g/100mL di Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco-USA)

Allestimento delle prove

Le cellule di *Lactobacillus plantarum* dopo presviluppo (48h a 28°C) in MRS broth (Difco-USA) sono state recuperate per centrifugazione (5000 g per 20 min), lavate con soluzione fisiologica e inoculate nel mosto, nei vini o nel simil-vino, a diversa composizione azotata, in ragione di 108 CFU/mL. Il mosto e i vini sono stati caratterizzati per i seguenti parametri: zuccheri, acido malico, pH, etanolo (3). La determinazione dell'OTA è stata effettuata mediante analisi HPLC (4). Il numero di cellule (UFC) all'inoculo è stato determinato usando una curva

di calibrazione precedentemente ottenuta correlando la densità ottica e le UFC in seguito a sviluppo in piastra con MRS agar (Difco-USA).

Risultati e discussione

Tutti i ceppi testati nel mosto hanno mostrato la capacità di degradare l'OTA anche se la maggiore attività è stata registrata a carico dei ceppi appartenenti al gruppo V rispetto al PCS (Figura 1).

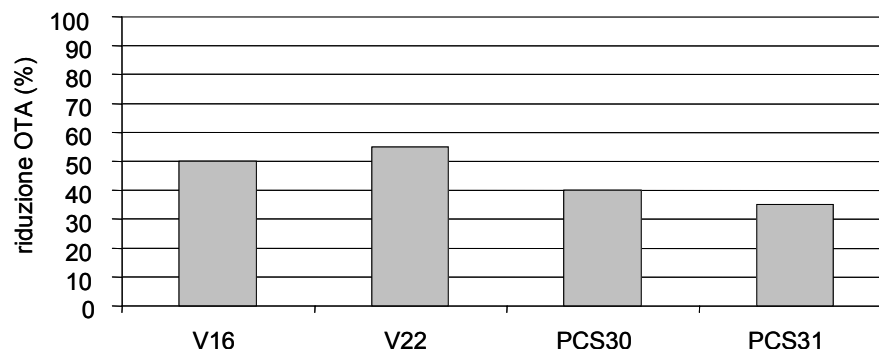


Figura 1. Percentuale di degradazione dell'ocratossina A operata da ceppi di *Lactobacillus plantarum* in mosto (OTA = 1 µg/L)

Nel vino la capacità di ridurre l'OTA è risultata indipendente dalla gradazione alcolica e dal contenuto di tossina, ma in relazione al ceppo. Infatti, in entrambi i vini, nell'arco di tempo considerato (12 giorni), è stato riscontrato un decremento superiore al 40% e di circa il 30% a carico del ceppo V22 e del ceppo PCS 31, rispettivamente (Figura 2).

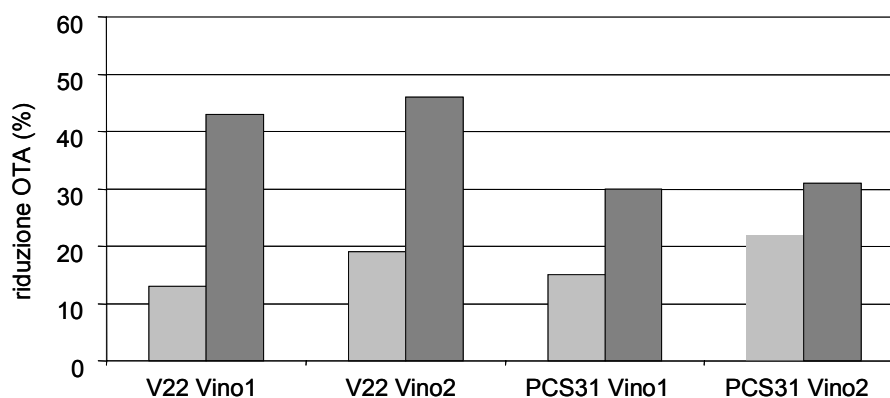


Figura 2. Degradazione dell'ocratossina A in vini a differente contenuto di alcool e di ocratossina A operata dai ceppi V22 e PCS31 di *L. plantarum*

Come si può notare la diversa composizione azotata del substrato influenza non solo la quantità di OTA degradata, ma anche la cinetica di diminuzione della tossina (Figura 3).

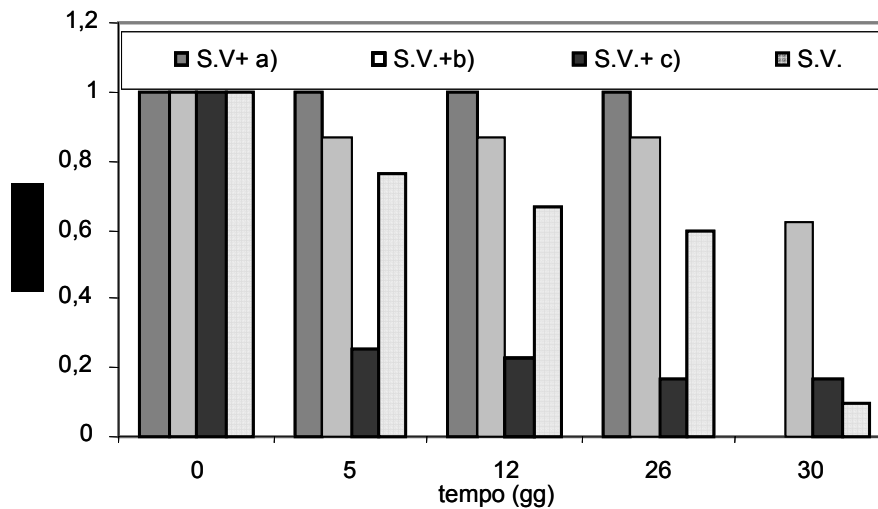


Figura 3. Degradazione dell'ocratossina A in relazione alla composizione azotata del substrato. SV = simil vino privo di fonti azotate a) Yeast nitrogen base (con aminoacidi, ammonio solfato e vitamine); b) Yeast nitrogen base w/o (privo) amino acids ; c) Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate

In particolare, dopo 30 giorni dall'inoculo, il minor contenuto di tossina (- 38%) si registra nel simil-vino privo di aminoacidi, ma addizionato di sali ammoniacali e vitamine, mentre decrementi dell'83%; 90.5% e 99% sono correlati, rispettivamente, al simil-vino privo di composti azotati, ma addizionato di vitamine; al simil-vino (SV) privo sia di composti azotati sia di vitamine, al simil-vino addizionato sia di composti azotati sia di vitamine.

Inoltre, nell'arco dei 30 giorni considerati, si nota che: 1) in assenza di composti azotati, ma in presenza di vitamine si ha un rapido decremento di tossina nell'arco dei primi 5 giorni dall'inoculo (-75%) seguito da una ulteriore continua diminuzione di OTA fino al 26° giorno (-32%); 2) in presenza sia di vitamine sia di composti azotati non vi è alcuna diminuzione della tossina fino al 26° giorno dall'inoculo, ma la molecola non è più rilevabile al 30° giorno; 3) in presenza di soli sali ammoniacali si evidenzia un iniziale debole decremento (-13%) di OTA, non più rilevato dal 5° al 26° giorno, successivamente si registra una diminuzione della tossina che, tuttavia, è presente in quantità importante (0,62 µg/L) al termine della prova; 4) in assenza sia di composti azotati sia di vitamine si osserva un continuo decremento nell'arco di 26 giorni, seguito da una rapida diminuzione di OTA che, al 30° giorno, presenta valori di 0.10 µg/L. I dati indicano che la presenza di forme azotate facilmente assimilabili, quali sali ammoniacali e aminoacidi, interferisce con il metabolismo dell'OTA e che solamente livelli limitanti o l'assenza di tali composti possono indurre l'idrolisi della tossina rendendo disponibile la fenilalanina quale fonte azotata per l'attività dei batteri lattici.

Conclusioni

Lo studio ha messo in evidenza che la capacità dei batteri lattici di ridurre l'OTA dipende dal ceppo, ma non è influenzata significativamente dal contenuto di OTA, di etanolo e dal pH del

vino. Inoltre, la performance dei batteri lattici nei confronti dell'OTA è condizionata dal contenuto e dalla natura delle forme azotate presenti. Studi sono in corso per chiarire il meccanismo di riduzione della tossina al fine di ottimizzare l'uso del *Lactobacillus plantarum* nel processo di vinificazione e di ottenere un prodotto a basso rischio.

Bibliografia

1. Grazioli B, Galli R, Fumi MD, Silva A. Influence of winemaking on ochratoxin A (OTA) content in red wines. In: Book of Abstract *XI International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*. Bethesda Maryland-(USA), 17- 21 May 2004. p.85.
2. Fumi MD, Zacconi C, Silva A. Identificazione e caratterizzazione di batteri lattici isolati da vini. in *Atti 5° Convegno sulle Biodiversità*. Caserta, 9-10 settembre 1999. Napoli: SeS.I.R.C.A. Editore; 2001.-p.768-774.
3. Gazzetta Europea. Regolamento (CEE), 17 settembre 1990, n 2676. Metodi di analisi comunitari da utilizzare nel settore del vino. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee* L 272, 3 ottobre 1990.
4. Visconti A., Pascale M., Centoze G. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography *Journal of Chromatography A*.1999; 864: 89-101.

Progetto finanziato da EU, QLK1-CT-2001-01761-WINE-OCHRA RISK; Università Cattolica Sacro Cuore PC

INDAGINE SULLA PRESENZA DI AFLATOSSINE IN MANGIMI PRODOTTI DA DIVERSE AZIENDE

Roberta Piccaglia, Silvia Grandi, Alessandra Canever, Erika Trasnerici
(a) *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali (DiSTA), Università di Bologna*
(b) *Granarolo S.p.A, Bologna*
(c) *AgriOK S.p.A, Bologna*

Introduzione

La presenza di aflatossine nella razione per le bovine da latte è quasi sempre la conseguenza dell'impiego di alimenti contaminati, tra i quali la granella di mais e i mangimi sono quelli più a rischio. È perciò evidente l'importanza per gli allevatori di far riferimento a fornitori "sicuri", e per questi ultimi di operare in modo corretto e rigoroso per soddisfare la clientela.

Lo scopo della ricerca è stato quello di verificare la presenza di aflatossine in mangimi prodotti da diverse aziende.

Materiali e metodi

Negli anni 2003 e 2004 sono stati monitorati 17 mangimifici di rilevanza nazionale o regionale, prelevando campioni di mangime in periodi successivi distanti almeno 21 giorni, passando da un minimo di tre prelievi (1 mangimificio), ad un massimo di nove (3 ditte), per una media di 7 "ispezioni", e per un totale di 118 campioni.

La distribuzione geografica dei 17 mangimifici era la seguente: 3 in Lombardia, 1 in Veneto, 1 in Friuli Venezia Giulia, 3 in Emilia Romagna, 2 in Umbria, 1 in Molise, 1 in Basilicata, 5 in Puglia.

Ogni campione globale, del peso di 10 kg, era la risultante di numerosi campioni elementari (30-50) prelevati sulla linea produttiva dei mangimi per lattifere.

In tutti i campioni si sono determinati in cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC), i tenori di aflatossine (B₁ - B₂ - G₁ - G₂) secondo un procedimento assai diffuso che prevede la purificazione degli estratti con colonnine ad immunoaffinità, la derivatizzazione post colonna e la determinazione HPLC/FLD.

Risultati e discussione

L'aflatossina maggiormente presente è stata la B₁ (Figura 1): essa ha raggiunto valori medi di 1,96 ppb, un limite, tuttavia, nettamente inferiore a quello massimo consentito per i mangimi composti per lattifere (5 ppb).

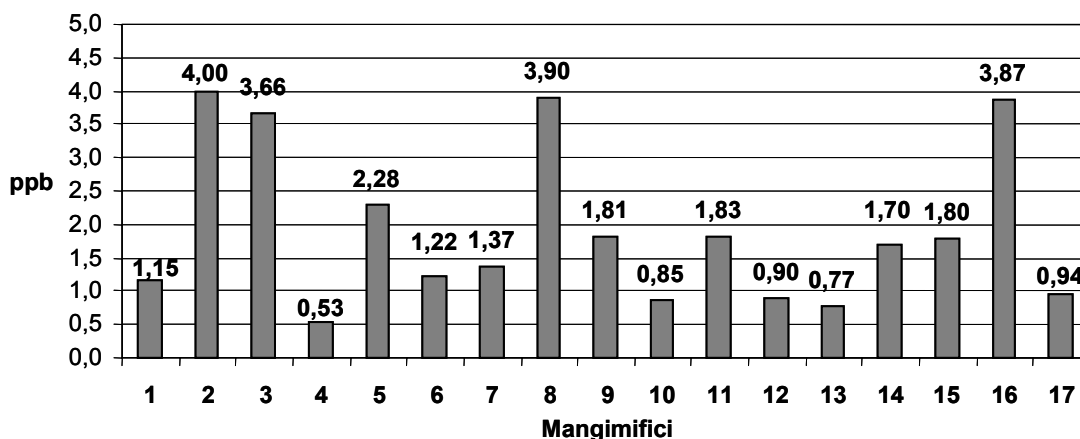


Figura 1. Valori medi di aflatoxina B₁ nei mangimi dei diversi mangimifici

Nel 15% dei campioni tale tossina era presente a livelli indeterminabili, mentre nel 7,6% dei rilievi essa superava il limite di legge (valore medio di tali campioni: 7,9 ppb).

La media delle osservazioni in ciascun mangimificio non ha mai superato il valore soglia di 5 ppb.

Conclusioni

Il complesso delle osservazioni testimonia un buon livello di attenzione delle imprese mangimistiche monitorate, le quali si sono rivelate molto attente nel rifornirsi di materie prime poco contaminate con aflatoxine (si rammenta che nel 2003 la granella di mais è sovente risultata ad elevato tasso di aflatoxine) e in grado di operare molto correttamente nelle fasi di conservazione e lavorazione di tali materie prime. Nel contempo non vanno taciuti i casi di “sforamento” dei valori di legge, per cui non sembra fuori luogo considerare il monitoraggio non già quale evento straordinario bensì come una prassi da consolidare.

Ringraziamenti

Ricerca condotta nell’ambito della convenzione “Alma Mater Studiorum Università di Bologna e Granarolo S.p.A.”; responsabile scientifico: Prof. Mauro Vecchietini.

INFLUENZA DEL SEQUESTRANTE “ATOX™-BENTONITE” SULLA RIDUZIONE DI AFLATOSSINA M₁ NEL LATTE

Fiorindo Gaspari, Roberta Piccaglia, Andrea Borsari, Anna Tampieri (d)

(a) DAST-CNR, Roma, c/o DiSTA – Università di Bologna

(b) Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali (DiSTA), Università di Bologna

(c) Granarolo S.p.A, Bologna

(d) AgriOK S.p.A, Bologna

Introduzione

Può verificarsi, nonostante le attenzioni poste nelle fasi di produzione, acquisto e stoccaggio degli alimenti, un'eccessiva presenza di aflatoossina M₁ nel latte. In questi casi l'intervento più immediato per riguadagnare la qualità dell'alimento è rappresentato dall'impiego nella formulazione della razione di “sequestranti” (1, 2), cioè di sostanze in grado di catturare l'aflatoossina, riducendone il *carry-over* (cioè il “passaggio” nel latte), favorendo il superamento della “crisi” e consentendo di predisporre gli accorgimenti (individuazione ed esclusione degli alimenti contaminati) per rientrare in condizioni di normalità.

Lo scopo della ricerca è stato quello di valutare l'efficacia del sequestrante Atox™-bentonite nella riduzione dell'aflatoossina M₁ nel latte.

Materiali e metodi

Negli anni 2003 e 2004 è stata condotta una ricerca presso dieci allevamenti di bovine da latte dislocate in Emilia-Romagna e Veneto. In tali allevamenti si è determinata la presenza di aflatoossina M₁ nel latte, campionando altresì sia i singoli componenti della razione che l'unifeed (cioè la razione già mescolata). Successivamente si sono distribuiti per 4 giorni 120 g × capo⁻¹ × giorno⁻¹ di Atox™-bentonite, riverificando poi il livello di M₁ nel latte.

Ciascun allevamento è stato visitato preliminarmente 2 volte per valutare l'adeguatezza delle condizioni ambientali e tecniche agli scopi della ricerca e per concordare i rifornimenti di alimenti concentrati in modo tale che al momento della sperimentazione fossero presenti in magazzino partite rappresentative e quantitativamente significative di tutti i componenti della razione.

Di ciascun alimento zootecnico e della dieta completa (*unifeed*) sono stati prelevati un campione globale di 30 kg (composto da 100 campioni elementari di 300 g) interessando l'intero stock nel caso degli alimenti concentrati, mentre nel caso dei foraggi secchi o insilati il campionamento ha interessato il quantitativo utilizzato in 7-10 giorni. Il campione globale della dieta completa (*unifeed*) è stato prelevato circa 12 ore prima dell'inizio della produzione giornaliera di latte. Il campione di latte (1 litro) di entrambe le mungiture è stato prelevato mediante un latto-campionatore automatico durante l'intero flusso di scarico dal contenitore refrigerato all'autocisterna.

La preparazione dei campioni per l'analisi ha richiesto l'essiccamento a 60°C dei componenti umidi prima della loro macinatura e omogeneizzazione dell'intero campione

globale mediante mescolatore automatico. Ciascuno dei campioni, dopo accurato mescolamento, è stato suddiviso in tre campioni di laboratorio da 10 kg. Complessivamente sono stati prelevati e preparati 90 campioni globali di alimenti/foraggi (oltre 270 kg) e 20 campioni di latte.

Tutte le determinazioni analitiche sono state effettuate in cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) dopo purificazione degli estratti mediante l'uso di colonnine ad immunoaffinità basate sull'impiego di anticorpi mono o policlonali specifici per ogni micotossina o gruppo di micotossine. Per le aflatossine B₁, B₂, G₁, G₂ è stata effettuata la derivatizzazione post colonna e la determinazione mediante HPLC con rivelatore spettrofluorimetrico (FLD), mentre per l'aflatossina M₁ la determinazione HPLC/FLD non prevedeva alcuna derivatizzazione.

Risultati e discussione

La presenza media di aflatossina B₁ nella razione è risultata 4,09 ppb (Tabella 1), corrispondenti ad un'ingestione giornaliera di 99,4 mg per capo (si è registrata una sostanziale analogia tra il valore ottenuto analizzando l'unifeed, oppure i singoli alimenti).

Tabella 1. Caratteristiche della razione e del latte nelle 10 aziende controllate

Allevamento	Consumo di sostanza secca (kg capo ⁻¹ .d ⁻¹)	Presenza AFB ₁ nell'unifeed (ppb) su s.s.	AFB ₁ nella razione unifeed (µg capo ⁻¹ .d ⁻¹) su s.s.	Produzione di latte (kg capo ⁻¹ .d ⁻¹)
Allevamento 1	24,3	2,37	57,6	28,8
Allevamento 2	21,7	2,61	56,6	24,0
Allevamento 3	21,5	13,68	294,1	26,0
Allevamento 4	20,3	3,81	77,4	33,5
Allevamento 5	25,9	0,55	14,3	31,0
Allevamento 6	23,1	9,41	217,6	29,9
Allevamento 7	19,2	0,33	6,3	25,0
Allevamento 8	27,2	2,12	57,7	32,0
Allevamento 9	27,1	3,36	90,8	30,0
Allevamento 10	32,2	2,68	86,5	23,0
Medie	24,3	4,09	99,4	28,3

Le componenti che hanno maggiormente determinato la presenza di aflatossina B₁ nella razione e quindi di M₁ nel latte, sono state la farina di mais (con un'incidenza ponderata del 57% nelle nove realtà in cui era presente), i semi di cotone e girasole (30%), il mangime (17%) e le polpe esauste di bietola da zucchero (13%), mentre irrilevante è risultato l'apporto dei foraggi (es. il silomais ha contribuito per appena il 3%).

La presenza di aflatossina M₁ nel latte (Tabella 2), prima del trattamento, è mediamente risultata di 169 ppt, pari a 4,71 mg escreti da ogni bovina al giorno, con un *carry-over* del 5,29% (valore min 2,39%, valore max 11,26%).

Il trattamento con AtoxTM-bentonite ha abbassato il livello di contaminazione del latte a valori medi di 61,1 ppt, cui corrisponde un *carry-over* medio di 1,74%.

Tabella 2. Caratteristiche della razione e del latte nelle 10 aziende controllate

Allevamento	AF-M ₁ nel latte (ng · kg ⁻¹ o ppt)		AFM ₁ nel latte al T ₀ (µg · capo ⁻¹ · d ⁻¹)	Carry-over (%)	Riduzione AFM ₁ nel latte (%)
	T ₀	T ₁ *			
Allevamento 1	72,2	18,6	2,08	3,61	74,2
Allevamento 2	73,3	30,0	1,76	3,11	59,1
Allevamento 3	732,9	228,5	19,06	6,48	68,8
Allevamento 4	144,0	67,2	4,82	6,23	53,3
Allevamento 5	51,8	25,7	1,61	11,26	50,4
Allevamento 6	321,2	91,4	9,60	4,41	71,5
Allevamento 7	21,0	8,8	0,53	8,41	58,1
Allevamento 8	43,0	23,0	1,38	2,39	46,5
Allevamento 9	137,0	85,0	4,11	4,53	38,0
Allevamento 10	94,0	32,6	2,16	2,50	65,3
Medie	169,0	61,1	4,71	5,29	63,9

* dopo il trattamento

Conclusioni

Il trattamento con il sequestrante si è rivelato molto efficace, determinando un calo del livello di contaminazione del latte con aflatoxina M₁ di ben il 64%.

Ringraziamenti

Ricerca condotta nell'ambito della convenzione "Alma Mater Studiorum Università di Bologna e Granarolo S.p.A."; responsabile scientifico: Prof. Mauro Vecchietini.

Bibliografia

1. Pietri A, Morlacchini M, Bertuzzi T, Pallaroni L. Performances of growing pigs fed mycotoxin contaminated diets containing a new additive. In: Piva G, Bertoni G, Masoero F, Bani P, Calamari L (Eds). Recent progress in animal production science. Franco Angeli srl., Milano (Italy), 1999; 333-5.
2. Piva G, Galvano F, Pietri A, Piva A. Detoxification methods of aflatoxins. Zootecnica International 2000; 23(7-8): 48-53.

LA PROTEINA B32 DI MAIS: RUOLO NELLA PROTEZIONE CONTRO PATOGENI FUNGINI

Mario Motto, Carlotta Balconi, Tiziana Triulzi, Chiara Lanzaova, Luca Gualdi, Fabio Forlani, Nicola Berardo, Elisabetta Lupotto

(a) Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Bergamo

(b) Dipartimento di Scienze Molecolari Agroalimentari, Università degli Studi di Milano

La proteina *b32* di mais è un'albumina monomerica con peso molecolare apparente di 32 KDa, presente nel citoplasma delle cellule endospermiche. La proteina è sintetizzata e immagazzinata nell'endosperma in coordinazione temporale e quantitativa con le proteine di riserva (1). Il clonaggio e il sequenziamento di 3 geni *b32* hanno evidenziato che essi formano una famiglia genica polimorfica (2). I geni *b32*, come quelli delle zeine, sono sotto il controllo di *Opaque-2(O2)*, un attivatore trascrizionale appartenente alla famiglia *bZIP*, specifico per il seme; è stato altresì accertato che in linee mutate per questo fattore trascrizionale la proteina *b32* è prodotta a livelli molto bassi (3). Un'analisi di sequenza ha inoltre mostrato omologie tra il clone *lb-32.66* e proteine che inattivano i ribosomi (Ribosome Inactivating Protein, RIP) (4, 5).

Linee mutate *opaque-2* sono generalmente più suscettibili all'attacco di insetti e funghi (6,7); è stato ipotizzato che tale suscettibilità è associata alla mancanza della *b32*, suggerendo che questa proteina gioca un ruolo difensivo contro gli insetti e i funghi (5,8). Saggi biochimici hanno confermato che la proteina *b32* è dotata di attività RIP; in aggiunta, piante di tabacco trasformate con il gene *b32*, hanno mostrato un aumento della protezione contro il patogeno fungino *Rhizoctonia solani* rispetto al controllo non trasformato (9).

Il mais è suscettibile all'attacco di vari funghi patogeni presenti in tutte le aree coltivate a mais. Tra le patologie più importanti, sicuramente i marciumi dello stocco, della spiga e della granello, causate da *Fusarium verticillioides*, rappresentano la principale fonte di perdita produttiva della coltura (10,11). Spesso lo sviluppo dei marciumi è associato a danni preesistenti, causati da stress ambientali o da insetti. La patologia fungina si innesca sui tessuti danneggiati, aumentando il danno finale sia come diminuzione della resa produttiva sia come deterioramento qualitativo. I *Fusarium*, insieme ad altri funghi patogeni quali *Penicillium* e *Aspergillus*, sono produttori di micotossine, metaboliti secondari del fungo, la cui sintesi inizia in campo sulla pianta e prosegue durante lo stoccaggio (12). Le micotossine, che differiscono per la loro natura chimica e azione tossica, rappresentano un rischio per la salute umana e animale (13). Pertanto, l'ottenimento di genotipi di mais resistenti a *Fusarium*, e altri patogeni fungini, si riflette positivamente sia sulla produttività della pianta che sulla qualità della stessa quale alimento.

L'obiettivo di questa ricerca mira a valutare se piante di mais dotate di *b-32* a livello di tutti i tessuti hanno una maggior resistenza all'attacco di patogeni fungini, rispetto a piante che esprimono la *b-32* solo nel seme. In quest'ottica, piante transgeniche di mais sono state ottenute via trasformazione genica, utilizzando il plasmide *pSCI.b32*. In tale vettore il promotore costitutivo 35S del virus del mosaico del cavolfiore (CaMV-35S) guida l'espressione del gene *b32*. Le piante trasformate (T0) sono state ottenute da eventi di rigenerazione da callo e caratterizzate per la resistenza all'erbicida Basta. La linea T1 (*Tt*) corrisponde a semi risultanti dall'incrocio tra la linea T0 (*Tt*) e la B73 (*tt*) di mais. Le plantule derivanti da semi T1 sono state trattate con erbicida Basta e le piante resistenti (*Tt*) sono state autofecondate ottenendo progenie che esprimono *b32* nei diversi tessuti.

In questo studio sono state valutate per un'analisi fitopatologia sei progenie PCR-*b32* positive e western-*b32* positive (SM1, SM3, SM4, SM16, SM19, SM20) e una progenie PCR positiva e western negativa (SM8). Le piante *Tt* e/o *TT* di ciascuna progenie sono state allevate in una serra a contenimento. Allo stadio di fioritura, due piante di ciascuna progenie sono state analizzate a livello di tessuto fogliare per quanto riguarda l'espressione della *b32* e la risposta ad attacco di *Fusarium verticillioides*.

L'espressione di *b32*, valutata tramite immuno-blot, è risultata differenziata tra le varie progenie. Come atteso, nella progenie SM8 l'espressione della *b32* è risultata assente: tale progenie rappresenta quindi il controllo negativo anche nell'ambito degli esperimenti di patogenicità, mentre tutti gli altri individui saggiati sono risultati western positivi. Il confronto dell'espressione di *b32* tra i vari individui è stata effettuata, dopo acquisizione dell'immagine del filtro immuno-blot mediante scansione, con un'analisi densitometrica dell'immagine digitale acquisita, utilizzando il software IMAGE MASTER 1D Elite Version 3.01 (NonLinear Dynamic Ltd). L'espressione di *b32* è risultata differenziata tra le varie progenie; SM1 risulta la progenie con la maggior espressione di *b32* (SM1.1 la pianta con il contenuto più abbondante, è stata scelta come riferimento per la valutazione dell'abbondanza relativa di *b32* nei tessuti fogliari), seguita dalla pianta SM3.1 (89,2% rispetto a SM1.1). Le progenie SM20 ed SM4 mostrano, rispettivamente, un contenuto di *b32* pari a circa il 70% e il 50% di quanto osservato in SM1.1. Tutte le piante appartenenti alle progenie SM16 e SM19 hanno mostrato un contenuto di *b32* inferiore al 25% di quanto osservato in SM1.1.

Tale indagine ha consentito di identificare allo stadio di fioritura progenie con alta (SM1, SM3, SM20), intermedia (SM4) e bassa (SM16, SM19) espressione di *b32* in tessuti fogliari, utili nell'ambito di esperimenti di patogenicità volti a valutare la risposta differenziale all'attacco di *Fusarium*. A tale scopo, contemporaneamente al prelievo di tessuto fogliare destinato all'indagine di immuno-blot, sono stati prelevati campioni da utilizzare per biosaggi *in vitro* di resistenza a *Fusarium*.

Esperimenti preliminari, su tessuti fogliari appartenenti alla progenie SM8, ove l'espressione della *b32* è risultata assente, hanno consentito di identificare le condizioni di saggio (concentrazione di inoculo, tempo di rilevamento) utili per un'accurata valutazione dei materiali. Il ceppo di *F. verticillioides* (MRC826 fornito da PRI-Wageningen), è stato cresciuto a 26°C in piastra su PDA (Potato Dextrose Agar) fino al raggiungimento della copertura della superficie della piastra da parte del micelio ed è stato utilizzato per la produzione di un inoculo fresco di spore. Modificando quanto riportato da Yates e Jaworski (14), le foglie sono state sterilizzate e tagliate in quadratini (lato circa 1cm); 4 campioni di foglia sono stati posizionati su PDA e inoculati con 5µl di una sospensione contenente quattro diverse concentrazioni di spore fungine (10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 /mL). Sono state considerate almeno tre repliche per ogni condizione sperimentale. A vari stadi dopo l'inoculo è stato rilevato il procedere dell'infezione, misurando il diametro della colonia fungina in crescita attorno al campione di foglia inoculato. Come controlli sono stati considerati campioni di foglia sterile non inoculati o inoculati con acqua sterile. Questo esperimento preliminare ha consentito di identificare la concentrazione di inoculo idonea (105spore/mL) e tempo di rilevamento (3-5 giorni dopo l'inoculo) utili per la valutazione dei materiali. In particolare, questa concentrazione di spore consente una crescita fungina sulla foglia inocolata rilevabile in modo graduale nell'ambito dei primi 4 giorni di osservazione. In seguito (7 giorni dopo l'inoculo) la dimensione della colonia fungina risulta troppo elevata (diametro circa 20 mm) per procedere ad una corretta valutazione a causa della confluenza tra le colonie in crescita attorno alle 4 foglie inoculate e collocate sulla stessa piastra. In aggiunta, utilizzando per l'inoculo la concentrazione prescelta (10^5 spore/mL), il fungo, inizialmente si espande partendo dai lati della foglia che hanno subito il taglio nel corso della preparazione dei campioni, e successivamente (2-3 giorno dopo l'inoculo) ricopre anche la

superficie della foglia, oltre ad espandersi attorno ai lati. Questa osservazione non è rilevabile utilizzando per l'inoculo la concentrazione di spore pari a 10⁴/mL. I controlli non inoculati o inoculati con acqua sterile non hanno mostrato alcuna crescita fungina. Pertanto, le condizioni di sterilizzazione dei tessuti fogliari adottate sono risultate idonee nell'eliminare contaminazioni esterne. Tali condizioni di biosaggio (5µl contenenti spore 10⁵/mL, valutazione da 3 a 5 giorni dopo l'inoculo) sono state impiegate per l'esperimento di patogenicità riguardante, oltre al controllo negativo SM8 anche gli individui appartenenti alle progenie precedentemente analizzate per l'espressione di *b32* nei tessuti fogliari.

Il controllo negativo SM8 che non esprime *b-32*, valutato 4-5 giorni dopo l'inoculo, risulta più suscettibile all'attacco di *F. verticillioides* rispetto a tutte le altre progenie saggate; in tal senso il diametro fungino misurato attorno al tessuto fogliare inoculato, appare significativamente superiore a quello notato per le progenie che esprimono *b-32*. È stata altresì riscontrata una buona correlazione tra il livello di *b-32* rilevato nelle foglie e il grado di resistenza all'attacco di *Fusarium*. Gli individui appartenenti alle progenie SM16 e SM19 con un contenuto di *b32* inferiore alle altre progenie, hanno mostrato un grado di resistenza a *Fusarium* significativamente inferiore, con crescita fungina elevata (diametro della colonia ≥15 mm, 5 giorni dopo l'inoculo). Infine, nel caso di tali progenie (SM16, SM19) e del controllo negativo SM8, come indicato precedentemente, è stata osservata un'estensione della crescita del fungo su tutta la superficie della foglia. Nel caso delle progenie con alto (SM1, SM3, SM20) e intermedio (SM4) contenuto di *b-32*, in aggiunta ad una ridotta crescita attorno ai lati (diametro della colonia ≤ 10mm), è stata rilevata una scarsa tendenza da parte del micelio a ricoprire la superficie fogliare, anche oltre 5 giorni dall'inoculo. Per ciascun genotipo sono state registrate le osservazioni relative alle diverse modalità di attacco e di invasione da parte del *Fusarium* ed è stata rilevata una completa documentazione fotografica dei materiali.

Attualmente sono in corso esperimenti mirati ad estendere i saggi di resistenza a *Fusarium* a livello di altri tessuti e a vari stadi di sviluppo della pianta. In aggiunta, è in atto la valutazione della specificità d'azione della *b-32* nella protezione di piante di mais dall'attacco di altri patogeni fungini (es.: *Aspergillus*, *Penicillium*). L'ulteriore proseguimento dell'indagine sarà rivolta ad effettuare test fitopatologici sulla pianta adulta (ad es. inoculo artificiale tramite il canale delle setole: Silk Channel Inoculation Assay), per verificare più in dettaglio il ruolo della proteina *b32* nella protezione contro patogeni fungini nell'ambito del ciclo di sviluppo vegetativo e riproduttivo della pianta.

Bibliografia

1. Soave C, Tardani L, Di Fonzo N, Salamini F. Zein level in maize endosperm depends on a protein under control of the opaque-2 and opaque-6 loci. *Cell* 1981;27:403-10
2. Hartings H, Lazzaroni N, Rossi V, Ribaldi GR, Thompson R, Salamini F, Motto M. Molecular analysis of opaque-2 alleles from zea mays L. reveals the nature of mutational events and a presence of a hypervariable region in the 5' part of the gene. *Genet Res Camb* 1995;65:11-19
3. Lohmer S, Maddaloni M, Motto M, Di Fonzo N, Hartings H, Salamini F, Thompson R. The maize regulatory locus Opaque-2 encodes a DNA-binding protein which activates the transcription of the b-32 gene. *EMBO J* 1991;10:617-24
4. Maddaloni M, Barbieri L, Lohmer S, Motto M, Salamini F, Thompson R. Characterization of an endosperm-specific developmentally regulated protein synthesis inhibitor from maize seeds. *J Genet Breed* 1991;45:377-80
5. Bass HW, Webster C, O'Brien GR, Roberts JK, Boston RS. A maize-ribosome-inactivating protein is controlled by the transcriptional activator Opaque-2. *Plant Cell* 1992;4:225-34

6. Gupta SC, Asnani VL, Khare BP. Effect of the opaque-2 gene in maize (*Zea mays* L.) on the extent of infestation by *Sitophilus oryzae* L. *J Stored Prod Res* 1970;6:191-4
7. Balconi C, Lanzanova C, Conti E, Gualdi L, Pisacane V, Valoti P, Berardo N, Motto M, Lupotto E. Screening di genotipi di mais per la resistenza a *Fusarium verticillioides*. In: *Le micotossine nella filiera agroalimentare*. Convegno Istituto Superiore di Sanità. Roma, "9-30 Novembre 2004. p. 50-51
8. Nielsen K, Payne GA, Boston RS. Maize Ribosome-Inactivating protein inhibits normal development of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus flavus*. *Mol Plant Microbe Interaction* 2001;14(2):164-72
9. Maddaloni M, Forlani F, Balmas V, Donini G, Stasse L, Corazza L, Motto M. Tolerance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* AG4 of transgenic tabacco expressing the maize ribosome-inactivating protein b-32. *Trans Res* 1997;6:393-402
10. Munkvold GP, McGee DC, Carlton WM. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 1997;87:209-17
11. Reid LM, Nicol RW, Ouellet T, Savard M, Miller JD, Young JC, Stewart DW, Schaafsma AW. Interaction of *Fusarium graminearum* and *F.moniliforme* in maize ears: Disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. *Phytopathology* 1999;89:1028-37
12. Munkvold GP. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annu Rev Phytopathol* 2003;41:99-116
13. Rodricks JV, Hesseltine CW, Mehlman MA (Ed.). *Mycotoxins in Human and Animal Health*. Pathotox Publishers. Park Forest South, IL (USA); 1977
14. Yates IE, Jaworski AG. *Fusarium moniliforme* colonization of maize *in vitro*. (ICPP98 Paper Number 1.3.17)

La ricerca si è sviluppata nell'ambito del progetto Eu-finanziato SAFEMAIZE (ICA4-CT2000-30033, Coordinatore: Prof. Dave Berger, University of Pretoria, SA) in FP5.

AFLATOSSINE NELLA FILIERA DEL LATTE: PROGRAMMI E METODOLOGIE DI PREVENZIONE

Costante Pinelli, Lucio Scianchi, Francesco Venè
Parmalat S.p.A. Assicurazione Qualità, Collecchio, Parma

La Normativa CE in materia Igenico-Sanitaria degli alimenti ha introdotto ormai da più di 10 anni il principio della “Gestione in autocontrollo” da parte dei Responsabili delle Imprese Alimentari.

Tale principio basato sulla **individuazione obbligatoria e gestione del rischio** deve comandare tutto il sistema di controllo alimentare dell’Unione.

Sarà completato dal controllo Veterinario Ufficiale sul sistema di garanzia preventiva imputato al produttore.

Autocontrollo (quadro normativo)

Norme cogenti

Di seguito si elencano le norme cogenti ai fini dell’autocontrollo:

- Direttive CEE Verticali (latte = Dir 92/46, D.p.r. 54/97);
- Direttive CEE Orizzontali: Direttiva IGIENE (Dir.93/43, D.L.vo 155/97) = HACCP;
- Dir. CEE 89/397, recepita con D.L.vo 123/93 (Controlli);
- Dir. CEE 374/85 e Dir. CEE 34/99 (Responsabilità danno da prodotti difettosi);
- Regolamento CE 1525/98 (Alimentazione Zootecnica);
- Regolamento CE 178/2002 (Sicurezza Alimentare).

Norme per l’autocontrollo volontario

Si elencano le norme su Norme su la **rintracciabilità**:

- UNI 10939 (2001) (Filieri Agroalimentari);
- UNI 11020 (2002) (Aziende);
- MANUALI VOLONTARI previsti da Dir CE 93/43 e Reg. CE 178/2002.

Punti chiave

La tracciabilità e rintracciabilità sono gli elementi di chiarezza, documentazione, trasparenza e responsabilità.

L’HACCP è il sistema di gestione del rischio, quale metodo di prevenzione e garanzia almeno dei requisiti minimi di sicurezza degli alimenti.

La sicurezza e l’economia globale del sistema non può che richiedere alla **produzione primaria** (ed ai suoi afferenti), essa stessa definibile, a tutti gli effetti, **azienda alimentare** l’estensione delle stesse garanzie preventive applicate alla trasformazione, con sistemi analoghi.

Responsabilità

Il produttore è responsabile del danno cagionato dai difetti del suo prodotto: “produttore è il fabbricante del prodotto finito o di una sua componente, il produttore della materia prima, nonché, per i prodotti agricoli del suolo e per quelli dell’allevamento, della pesca e della caccia, rispettivamente l’agricoltore, l’allevatore, il pescatore e il cacciatore”, oltre al fornitore, a vario titolo, di alimenti e mangimi per animali.

Rintracciabilità

A questo si aggiunge per ragioni sanitarie e di trasparenza (Art.18 del Reg.CE n.178):

“l’obbligo di tracciare e quindi la Rintracciabilità di tutti i flussi materiali della filiera alimentare, dal produttore di mangimi alla vendita al consumo, in modo da poter mettere a disposizione delle autorità competenti che le richiedano le informazioni al riguardo”, decorre inderogabilmente a partire dal 1 Gennaio 2005.

In caso di pericolo per la salute pubblica l’obbligo di rintracciare era comunque già in vigore sulla base della direttiva IGIENE 93/43 (D.L.vo) 155/97).

Soggetti responsabili

Tra i soggetti responsabili troviamo:

- il produttore di latte (produzione-autocontrollo);
- il produttore di mangimi e alimenti complementari (produzione-autocontrollo);
- i fornitori alimenti per vaccine da latte (acquisto);
- l’autorità veterinarie (controllo ufficiale);
- l’azienda di trasformazione (autocontrollo).

L’Industria trasformatrice, essendo più strutturata e aggiornata nei sistemi organizzativi di controllo, scientifico e analitico, può essere di valido supporto diretto e di indirizzo al partner agricolo nell’individuazione dei pochi, veri punti critici di controllo e nell’osservanza costante delle G.M.P.

Per i produttori di latte Parmalat ha messo a punto un MANUALE G.M.P. ALLA STALLA relativo a:

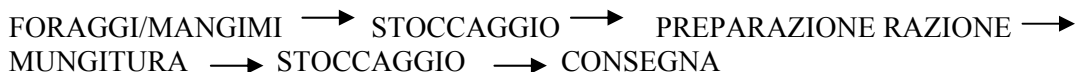
- gestione delle pratiche agricole e di tutti i prodotti utilizzati in agricoltura;
- produzione di alimenti idonei all’alimentazione degli animali da reddito;
- acquisto oculato e responsabile di alimenti e integratori zootecnici;
- addestramento e igiene del personale- gestione degli ambienti di lavoro e degli impianti;
- gestione degli animali (stabulazione, igiene, alimentazione.....);
- gestione responsabile dei trattamenti farmacologici, protezione da agenti patogeni e disinfezione;
- gestione e manipolazione dei prodotti di origine animale;
- gestione corretta di scarti e di effluenti.

Nel manuale G.P.M., fra l’altro, vengono previste le regole per:

- gestione dei residui di trattamenti fitosanitari e di sostanze farmacologicamente attive;
- gestione degli impianti di mungitura per evitare stress agli animali, prevenire le mastiti e migliorare quantitativamente e qualitativamente la produzione di latte;

- gestione dei mangimi di produzione e di acquisto per la protezione da inquinamenti di origine fungina (aflatossine), al fine di proteggere la salute degli animali, e dello stesso personale, nonché la salubrità del latte;
- gestione dei punti di controllo (CP) e dei Punti Critici di controllo (CCP) nell'ottica della gestione del rischio sanitario (HACCP) ma anche del rischio economico dell'Azienda Agricola.

Infatti in un processo produttivo del latte così rappresentato:



le attività veramente critiche (CCP) sono identificate in:

- sanità animale (zoonosi, afta, infezioni mammarie);
- trattamenti farmacologici (residui di trattamenti);
- alimenti inquinanti (aflatossine, trattamenti in campo).

Il tema critico di cui siamo chiamati oggi a parlare, è quest'ultimo. Le granaglie (principalmente Mais), specie se attaccate dalla Piralide, possono essere affette, anche pesantemente, da infestazioni di muffe tossinogene, in particolari condizioni di temperatura e umidità, con produzioni di tossine (B₁-B₂-G₁-G₂, fumonisina, Zeralenone), sino a superare livelli critici per l'animale da latte e il latte. È il caso di infestazioni già attive sul campo, o presso gli essiccatoi di mais, o nei silos/trincee di stoccaggio o nei mangimi/integratori acquistati.

La più pericolosa di queste tossine è la B₁, fra le sostanze a più elevata azione cancerogena, anche per l'uomo, in fase inalatoria (particolarmente critico per l'operatore agricolo l'utilizzo del carro miscelatore).

L'animale da latte alimentato con mangime inquinato, oltre a rimanerne intossicato, espelle gradualmente la tossina, dopo averla idrossilata ad AFM₁ per renderla più solubile, nei liquidi organici, fra cui il latte.

Nel 1998, a seguito di un massiccio monitoraggio sul latte di raccolta e di acquisto, la situazione rilevata era la seguente:

Tabella 1. Situazione italiana

Situazione Italiana al 1998	Reg. CE 1525 /98	DM.11.598 N.241
Medie latte di raccolta Nazionale M1 25 ppt Singoli produttori fuori limite (50 ppt)~ 10% produttori a ~ 20 ppt 50%	Applicabile dall'1/1/1999	limiti di legge in alimenti per animali da latte: AFB ₁ < 5 ppb Circ. MINISAN n.1° 9.6.1999 limite per il latte AFM ₁ < 50 ppt

Situazione CEE

Da diverse migliaia di analisi consolidate, eseguite dal 1998 in poi, il latte di massa prodotto nel Centro Europa (es. Francia, Germania, Austria) dove il problema è stato affrontato su larga scala fin dagli anni 80, risulta praticamente privo di AFM₁, costantemente inferiore al limite di rilevabilità analitica (circa 5 ppt): diversa la situazione più a sud, sia per ragioni climatiche che per un diverso approccio al problema con appositi programmi di prevenzione.

Aflatossina M₁ 1998 - 2004
medie per nazione - latte di massa

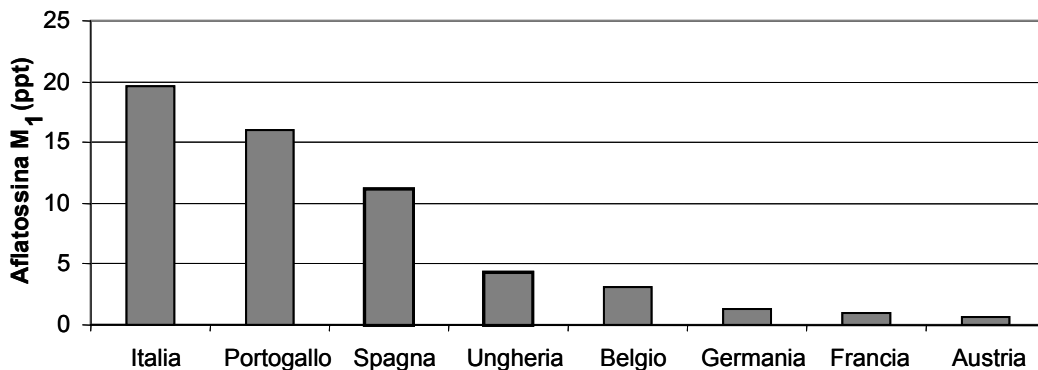


Figura 1. Concentrazione media per nazione di aflatossina M1 nel latte di massa (1998-2004)

Prevenzione da aflatossine

A fronte di tale situazione è stato fissato fra i primari obiettivi della Parmalat attraverso le seguenti azioni:

- dotarsi di un POTENZIALE ANALITICO ADEGUATO e SICURO per AFM₁ e AFB₁ (5000 analisi/anno in HPLC)
- monitoraggio quindicinale del latte di raccolta e periodico del latte comunitario
- limiti di intervento alle stalle tra 20 e 30 ppt
- individuazione alimenti inquinati
- assistenza alle aziende agricole

È stato approntato un MANUALE PREVENZIONE AFLATOSSINE per addestrare, previo incontri di sensibilizzazione dedicati, i Nostri Partners Agricoli per la gestione del rischio secondo il criterio HACCP.

Negli incontri, in cui si è notata una buona attitudine alla comprensione del comune interesse e alla collaborazione, è stata portata l'esperienza di Studiosi Autorevoli ed è stato lanciato un PIANO DI PREVENZIONE CONDIVISO

comprendente azioni di monitoraggio analitico con assistenza alle stalle, correttezza di trattamento dei mangimi autoprodotti, oculato rifornimento di mangimi e integratori complementari.

Contemporaneamente è stata fatta sensibilizzazione dell'Industria mangimistica e delle Autorità Sanitarie a tutti i livelli.

Temi trattati

- Cosa sono le aflatossine?
- Quali pericolo presentano per l'allevatore?
- Cosa provocano agli animali?

- Cosa provocano al latte?
 - Riflessi Normativi
 - Alimentazione animale e alimenti a rischio di contaminazione (elevato/medio, possibile, trascurabile)
 - Condizioni di rischio, come contrastarle (controllo alimenti aziendali, silos, tecniche agricole, alimenti acquistati)
 - Scelta e gestione degli alimenti d'acquisto e di quelli complementari (criteri di sicurezza)
 - Gestione dell'emergenza in collaborazione con l'Azienda di Trasformazione
- Attenzione a cosa si compra e come comprare: a prezzi troppo bassi di prodotti reperiti sul mercato L'AZIENDA AGRICOLA rischia di spendere soldi per merce scadente e dannosa!

Risultati

I positivi risultati dell'azione di miglioramento intrapresa per la Nostra Azienda hanno permesso di fissare, e rispettare, in tutti i casi, un limite massimo interno di 20 ppt per il prodotto finito destinato al consumo, largamente inferiore al limite di legge e pari al limite svizzero per l'alimentazione dei bambini (ora stabilito a 25 ppt nella CE).

I casi di rifiuto di latte alle stalle si sono ridotti drasticamente, e in parallelo riteniamo migliorata la salute e la produttività del relativo bestiame.

Nel 2001, con un andamento climatico estivo particolarmente umido, si è osservata come prevedibile un'inversione di tendenza, ma prontamente compensata dai n.s interventi, mentre nel 2002 è continuata l'azione di miglioramento.

Contemporaneamente abbiamo esteso alla determinazione dell'aflatossina M₁ nel latte il nostro ben noto circuito interlaboratoriale a largo raggio.

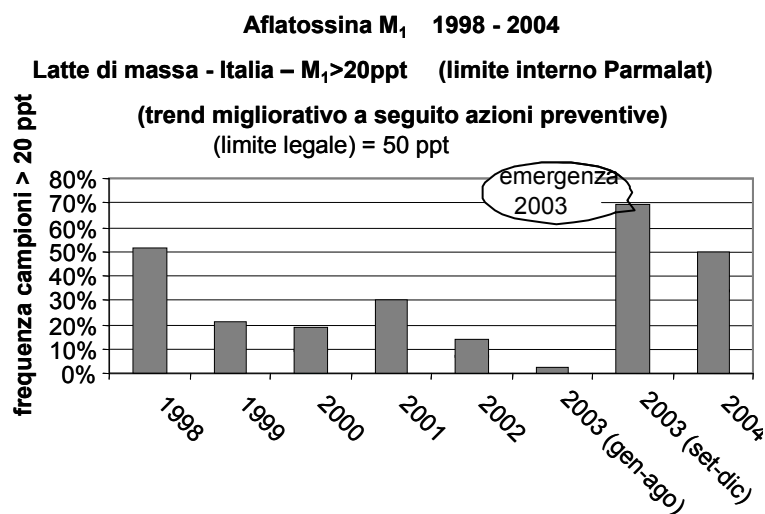


Figura 2. Percentuale annua italiana di campioni di latte di massa con contaminazione da aflatossina M₁ maggiore di 20 ppb (1998-2004)

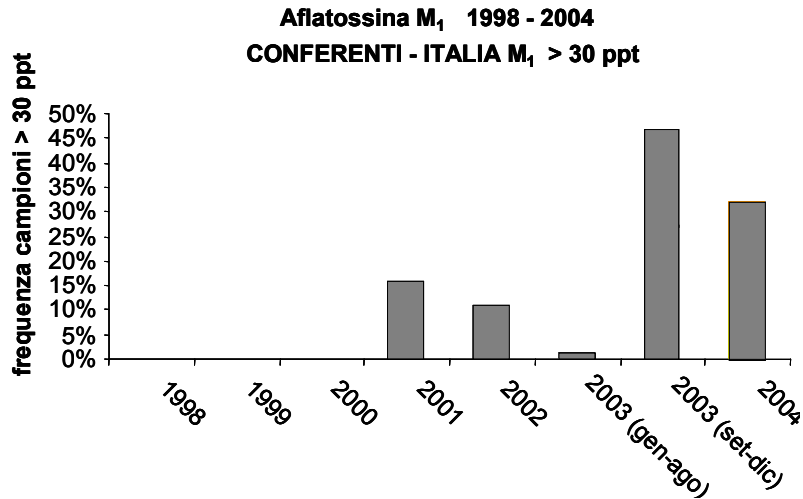


Figura 3. Percentuale annua di campioni con contaminazione da aflatossina M1 maggiore di 30 ppb (1998-2004)

Supporti di indagine

Sempre nel 2002 abbiamo aggiunto il tema della prevenzione da aflatossine alla collaborazione già precedentemente fruttuosa per gli inibenti con un produttore di kit analitici rapidi, allo scopo di poter disporre, oltre che di precisi metodi quantitativi ufficiali, anche di sistemi di screening di livello veloci, semplici, di uso ubiquitario ed estemporaneo da parte di personale non addestrato, relativamente poco costosi.

Nelle Nostre indicazioni, sulla base di dati storici, il kit doveva essere in grado di dare l'allarme, in soli 15 minuti, al superamento del valore di soglia identificato intorno al 25 – 30 ppt di AFM₁ nel latte per poter dare il via ad ulteriori indagini, senza sovraccaricare il sistema HPLC del N.s Laboratorio Centrale.

Al secondo prototipo il kit CHARM corrispondeva alle aspettative, lo stavamo validando con calma da qualche mese, semmai con la difficoltà di reperire campioni idonei, quando, con i campionamenti dei primi di settembre 2003 sono scattati i primi allarmi in coincidenza con l'inizio dell'utilizzo degli alimenti della sfortunata annata agricola estiva.

Il piano di emergenza è scattato, accompagnato da un sostenuto e talvolta frenetico sforzo analitico di conferma con dati certi al 100% da parte del Laboratorio Centrale della Parmalat, sono stati intensificati i piani di controllo, moltiplicati gli interventi a sostegno dei fornitori latte nonostante le veramente notevoli difficoltà, con una pressochè generale pronta risposta dei N.s fornitori latte, e anche nell'emergenza, pur con un impegno di lavoro e di costi elevato, Parmalat è riuscita a garantire livelli di AFM₁ nel prodotto finito entro il valore medio di 20 ppt a garanzia di tutti i propri consumatori.

Nel grafico seguente è evidente il risultato dell'azione preventiva e correttiva nelle condizioni di emergenza da Settembre 2003 in poi.

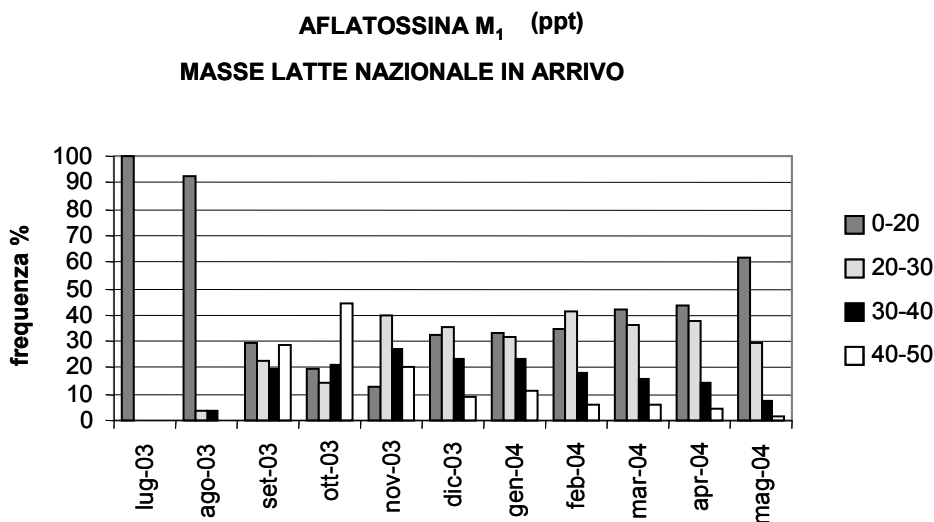


Figura 4. Percentuale di campioni di latte di massa per classe di contaminazione da aflatoxina M1

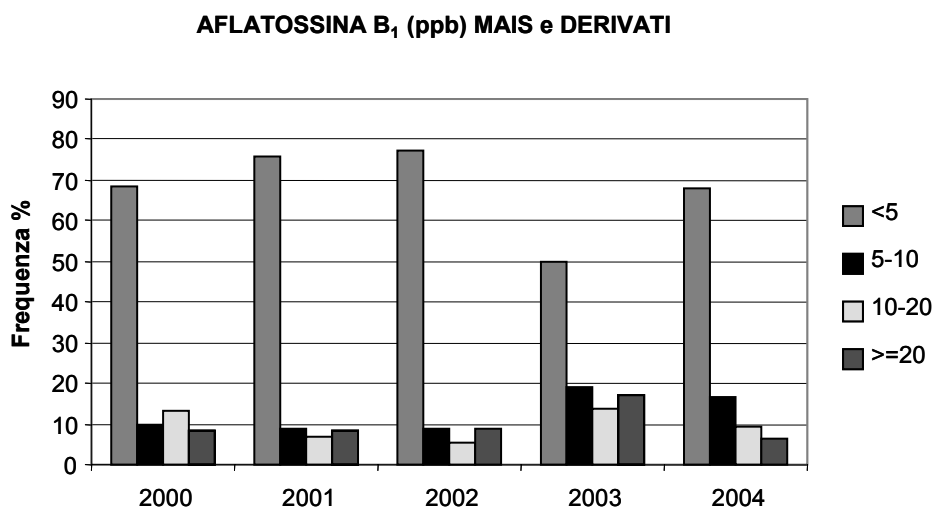


Figura 4. Percentuale di campioni di latte di massa per classe di contaminazione da aflatoxina M1 e anno (2000-2004)

Il tutto è stato fatto in completa trasparenza con il Veterinario Aziendale Ufficiale. La situazione attuale permette di confermare la validità dei N.S progetti e la capacità preventiva del piano di azione e di collaborazione con i Fornitori latte. Quasi identico piano è stato ufficializzato in seguito dalle autorità sanitarie regionali.

Conclusioni

L'attenzione deve essere continua e permanente, poiché i casi di contaminazione possono essere improvvisi per varie cause, con valori anche molto elevati, e particolarmente significativi per masse destinate a lavorazioni di dimensioni ridotte. L'azione di miglioramento continua, ma riteniamo vi sia bisogno della massima collaborazione del comparto Agricolo, del Veterinario dell'Azienda Agricola al pari dell'Autorità Veterinaria pubblica per un controllo giusto e rigoroso degli alimenti critici nei luoghi di produzione, nonché delle materie prime utilizzate e della loro provenienza: infatti trattasi di un problema prevalentemente agronomico.

L'obbligo della tracciabilità e rintracciabilità conseguente, quindi delle relative responsabilità, fornirà un valido strumento in tal senso: è il tipico caso dove solo la prevenzione può avere un valido effetto.

Tutto questo sta a significare che il mondo della Produzione primaria ha acquistato e sta acquistando un livello culturale idoneo alla gestione delle proprie problematiche, ma può capitare che l'assillo dei costi di produzione e della quadratura di bilancio faccia invece compiere degli errori e trascurare talvolta controlli necessari e comportamenti più idonei, solo in apparenza costosi, ma in grado alla fine di pagare in termini di qualità, quantità e utile anche nell'ottica della futura normativa igienico-sanitaria.

Compito della grande, ma anche piccola Azienda di Trasformazione è di considerare la produzione Primaria un proprio patrimonio, un partner di elezione, cui fornire il massimo di assistenza e aiuto in ottica di filiera, con il quale condividere gli sforzi per la produzione di alimenti sempre più sicuri e di migliore qualità nell'interesse comune di economia globale e della necessaria fiducia e soddisfazione del consumatore.

AFLATOSSINE NELLA FILIERA DEL LATTE: METODOLOGIE DI MONITORAGGIO ANALITICO

Andrea Messori, Elisabetta Bassi, Ivana Gandolfi, Patrizio Cagnasso
Parmalat S.p.A. Laboratorio Centrale-Ricerca e Sviluppo, Castellaro di Sala Baganza (Parma)

L'efficacia di un capillare monitoraggio della presenza di aflatossina M₁(AFM₁) nel latte è data dalla disponibilità di un sistema di controllo analitico in grado di fornire dati affidabili in tempo utile, per risalire rapidamente agli allevamenti responsabili di un aumentato livello di contaminazione e intervenire all'occorrenza sulla qualità e origine degli alimenti zootecnici impiegati.

A tal fine, già dal 1994/95, è stato ottimizzato un sistema HPLC, in grado di eseguire migliaia di determinazioni/anno di AFM₁. Il metodo risultante prevede una fase di purificazione/estrazione in cromatografia di immunoaffinità (IAC), una separazione su colonna a fase inversa e rivelazione fluorimetrica.

Presenta limite di rilevabilità e di quantificazione pari a 2 e 5 ng/L rispettivamente, recupero dell'85%, linearità con r^2 pari a 0,999 e ripetibilità con coefficienti di variazione compresi tra il 6 e il 14% (relativi a concentrazioni di AFM₁ compresa tra 4 e 25 ng/L), confrontabili con quelli riportati sul metodo FIL IDF 171:1995.

I risultati sono stati correlati con quelli ottenuti con il metodo AOAC: il coeff. di correlazione risultante è 0,9318, Figura 1.

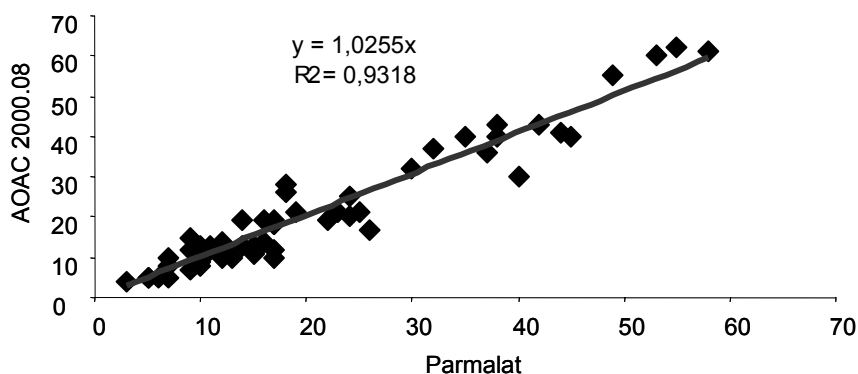


Figura1. Correlazione tra dati di AFM₁ ottenuti impiegando metodo AOAC e Parmalat

L'affidabilità del dato nel tempo viene monitorata attraverso l'utilizzo delle carte di controllo delle medie e dei range, che richiedono l'inserimento di campioni a titolo noto nella normale attività lavorativa (uno ogni venti campioni incogniti), Figura 2

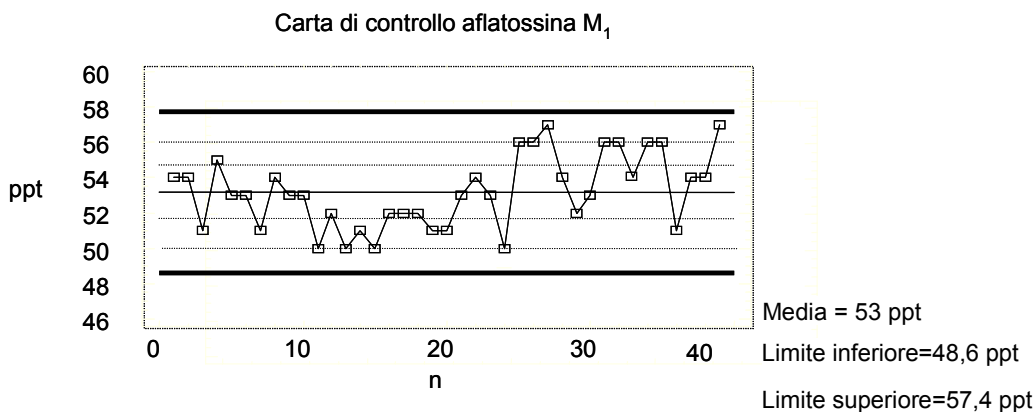


Figura 2. Carta di controllo delle medie

e la partecipazione a circuiti interlaboratoriali; i risultati di un Proficiency test sono riportati in Figura 3.

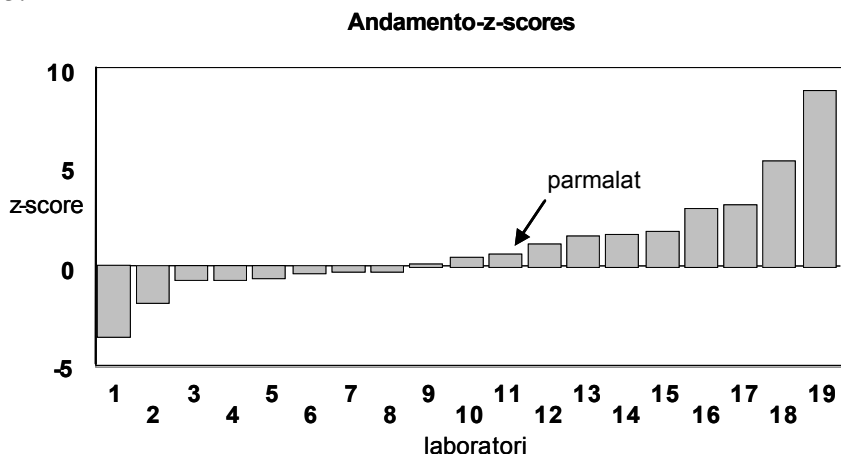


Figura 3. Proficiency test (organizzato dall'Istituto Zooprofilattico di Brescia)

È stato valutato il recupero del metodo utilizzando diversi sistemi di purificazione (semiautomatico e automatico) e di colonnine di Immunoaffinità di ditte diverse; è stata inoltre verificata la possibilità di riciclare le colonnine di IAC.

Uno studio eseguito su colonnine impiegate per purificare campioni contaminati con concentrazioni di aflatoxine < 40ng/L ha rivelato che le colonnine riciclate presentano un recupero inferiore, variabile tra il 5 e il 15%.

Si è osservato inoltre un lieve incremento della variabilità del risultato, probabilmente dipendente dalle caratteristiche e dal livello di contaminazione del primo campione processato. I risultati del confronto tra l'impiego di colonnine di IAC nuove e riciclate, per due differenti ditte A e B, sono riportati in Figura 4, A e B.

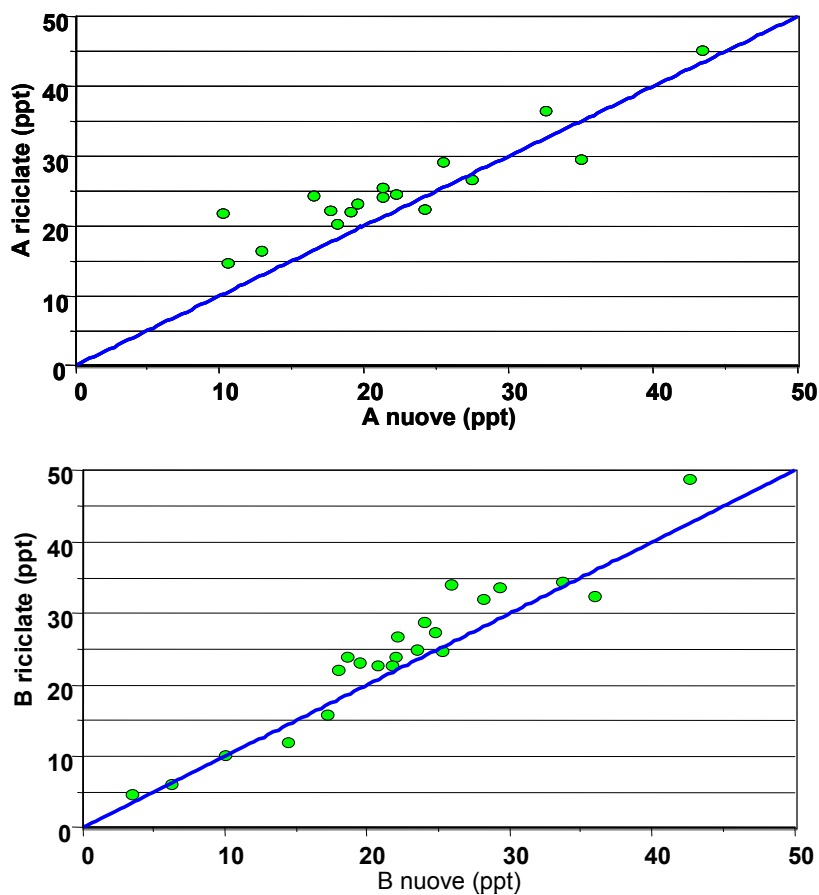


Figura 4 A e B. Correlazione tra l'impiego di colonnine di IAC nuove e riciclate di due diverse ditte produttrici (A e B)

Questa attività di controllo, che dal 1998 al 2004 ha richiesto la ricerca di AFM₁ in HPLC su 28000 campioni di latte, è stata affiancata da un test di screening (Charm, tempo di analisi 15min.) che presenta un valore on/off intorno a 50 ng/L, sperimentato sul campo e opportunamente validato in parallelo con analisi HPLC.

I dati ottenuti (n. 320) indicano che il test in esame non genera falsi negativi, ma tende solo a fornire falsi positivi, con % variabile in funzione del livello di contaminazione del campione.

È stato inoltre messo a punto un metodo fluorimetrico per valutare il contenuto di aflatossine totali (B₁, B₂, G₁, G₂) negli alimenti delle lattifere, indispensabile per attuare un'azione preventiva o di intervento.

Il metodo, che prevede la purificazione del campione per IAC e lettura fluorimetrica con uno strumento dedicato, presenta un limite di determinazione pari a 5 ng/L.

CONTROLLO DELLA CONTAMINAZIONE DA MICOTOSSINE NELLA FILIERA DEL MAIS

Amedeo Reyneri, Massimo Blandino, Andrea Maiorano, Francesca Vanara
Dipartimento di Agronomia, Selvicoltura e Gestione del territorio, Università di Torino, Grugliasco (TO)

Introduzione

La prevenzione delle micotossine nella granella è uno dei problemi di maggior attualità e importanza del settore cerealicolo, che opera per valorizzare le proprie produzioni attraverso il raggiungimento di un'elevata qualità igienico-sanitaria.

Tra i funghi tossigeni dei cereali grande importanza hanno assunto specie del genere *Fusarium* che, richiedendo elevati livelli di umidità nei tessuti, si sviluppano soprattutto in campo e sono pertanto fortemente condizionate dall'andamento climatico e dall'agrotecnica della fase di coltivazione (1-3). Queste specie sono responsabili della produzione di numerose micotossine tra le quali deossinivalenolo (DON), zearalenone e fumonisine (4, 5). È stato osservato inoltre che anche la produzione di aflatossine e ocratossine da parte di funghi dei generi *Aspergillus* e *Penicillium*, generalmente considerati agenti di ammuffimento nel post-raccolta, può avvenire durante le fasi di maturazione della coltura (6, 7).

Nel mais il rischio di contaminazioni di micotossine emerge come più rilevante per la suscettibilità della coltura a svariate specie fungine e per il frequente verificarsi di condizioni sfavorevoli ad una corretta maturazione della granella.

Al momento non sono state ancora individuate tecniche praticabili di detossificazione e risanamento dei prodotti contaminati per l'elevata stabilità che caratterizza queste molecole. Infatti, l'ottenimento di un'accettabile detossificazione richiede interventi molto intensi e tali da compromettere la qualità dei prodotti trattati o da risultare comunque economicamente non convenienti (8-10). Allo stato attuale, quindi, la miglior strategia di controllo risulta essere la prevenzione in ogni fase della filiera, dalla coltivazione, alla prima e seconda trasformazione, dello sviluppo di queste specie fungine e della contaminazione da queste tossine (11, 12).

In questo lavoro vengono evidenziate e quantificate per le fasi colturali, del post raccolta e della trasformazione le possibilità di controllare la contaminazione da micotossine durante tutta la filiera del mais da granella.

I dati riportati in questo lavoro sono stati ottenuti nell'ambito di ricerche svolte in Piemonte con il contributo principale della Regione a partire dal 1996. Nel corso della sperimentazione sono stati determinati con la metodica HPLC i contenuti di 8 metaboliti (zearalenone, deossinivalenolo - Don -, fumonisina B₁, ocratossina A, aflatossina B₁, B₂, G₁ e G₂) in oltre 2000 campioni di granella di mais prelevati da 9 centri di essiccazione e stoccaggio, 2 molini, 40 campi di ordinaria coltivazione e da 9 campi sperimentali. In questi ultimi sono stati posti a confronto ogni anno differenti e fondamentali aspetti di tecnica colturale per evidenziare itinerari in grado di ridurre la probabilità di elevate contaminazioni di micotossine. In questa nota si riportano in breve sintesi i principali elementi di prevenzione emersi in fase di coltivazione, di post-raccolta e di lavorazione.

Coltivazione

Dal confronto tra cultivar è emerso che gli ibridi di classe FAO 600 e 700 hanno presentato livelli di contaminazione per zearalenone e DON da 3 a 4 volte superiori rispetto agli ibridi medio-precoci (classe FAO 500). Al contrario, le fumonisine sono risultate correlate significativamente principalmente con altri aspetti varietali, quali il peso ettolitrico.

In tutti gli anni considerati è stata evidenziata una differenza significativa nel contenuto in fumonisina B₁ in funzione dell'epoca di semina. Le semine di maggio (1/5-20/5) hanno sempre avuto un contenuto in fumonisina B₁ significativamente più elevato che le epoche di semine precedenti, con una concentrazione media 4 volte maggiore per semine effettuate alla fine di marzo o l'inizio di aprile (Tabella 1). Dai dati emerge una sicura interazione con l'andamento climatico; infatti nel 2000 e nel 2001 non si sono osservate differenze significative tra le semine anticipate (15/3 – 31/3) e quelle convenzionali (1/4 – 25/4), mentre risultano rilevanti le differenze nel 2002 con vantaggi per la semina anticipata. Il contenuto di zearalenone, scarsamente trovato nel 2000 e 2001, appare non influenzato in maniera significativa dall'epoca di semina anche nel 2002.

Tabella 1. Effetto dell'epoca di semina sulla presenza di fumonisina B₁ e zearalenone nella granella di mais*

Micotossina	Epoca di semina	2000		2001		2002	
Fumonisina B ₁ (ppb)	Marzo	277	a	157	a	1532	a
	Aprile	218	a	320	a	2801	b
	Maggio	1325	b	4097	b	4468	c
Zearalenone (ppb)	Marzo	8	ns	NR	ns	20	ns
	Aprile	NR	ns	NR	ns	34	ns
	Maggio	NR	ns	NR	ns	21	ns

* 2000-2002, ibrido Pioneer 3235 (classe FAO 600). Valori medi in colonna seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per il test Student-Newman-Keuls ($P < 0.05$). NR = concentrazione < 10 ppb.

Nel 2000 e 2001 si sono rilevate differenze significative per la densità di semina nel contenuto in fumonisina B₁ tra densità normale (6.5 piante/m²) e alta (8.0 piante/m²), con una presenza di questa tossina 2 volte più alta nella tesi ad alta densità (Tabella 2). Durante il 2003 non si sono osservate differenze significative, a causa del clima estivo molto caldo e asciutto che ha ridotto la taglia delle piante e l'epoca di maturazione. zearalenone e deossinivalenolo sono stati trovati solo nel 2002, a seguito di condizioni fresche e umide nel corso della maturazione. Anche per queste tossine si è osservata un'elevata contaminazione della granella con densità colturale di 8.0 piante/m² (rispettivamente + 84.6% e + 27.1% per zearalenone e deossinivalenolo rispetto alla densità di 6.5 piante/m²).

Dall'esame di più condizioni pedo-climatiche è emerso che la fertilizzazione azotata elevata incrementa significativamente il contenuto di zearalenone. Da 0 a 400 kg/ha di azoto si osserva che il contenuto di questa tossina cresce di oltre 10 volte. All'opposto le fumonisine crescono con elevate fertilizzazioni azotate ma soprattutto con carenze di N (+ 80%). In generale fertilizzazioni bilanciate sembrano garantire le contaminazioni minori in ogni ambiente.

Fumonisina B₁ (+55.6%) e zearalenone (+43.5%) crescono con il ritardo dell'epoca di raccolta negli ibridi a ciclo lungo (classi FAO 600-700), mentre non sono state osservate differenze significative in ibridi a ciclo medio (classe FAO 500).

Tabella 2. Effetto dell'investimento culturale sul contenuto in fumonisina B₁, zearalenone, deossinivalenolo e ocratossina A nella granella di mais

Micotossina	Investimento culturale (piante/m ²)	2001		2002		2003	
Fumonisina B ₁ (ppb)	6.5	914	a	2231	b	1761	ns
	8	1986	b	4924	a	1852	ns
Zearalenone (ppb)	6.5	NR	ns	118	b	NR	ns
	8	NR	ns	217	a	NR	ns
Deossinivalenolo(ppb)	6.5	NR	ns	325	b	NR	ns
	8	NR	ns	1195	a	NR	ns
Ocratossina A (ppb)	6.5	NR	ns	5	b	NR	ns
	8	NR	ns	14	a	NR	ns

2001-2003, ibrido Pioneer 3235 (classe FAO 600). Valori medi in colonna seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per il test Student-Newman-Keuls (P < 0.05). NR = concentrazione < 10 ppb per fumonisina B₁, zearalenone e deossinivalenolo, < 1 ppb per ocratossina A.

A conferma dei dati di Masoero *et al.* (13), le fumonisine risultano correlate con l'attacco della piralide. La stima dell'effetto della seconda generazione sulla presenza di micotossine è stata eseguita in un quadriennio per 3-4 siti. Si è osservato che le pannocchie danneggiate dalle larve di seconda generazione hanno un livello di contaminazione da fumonisina B₁ 10 volte superiore rispetto alle pannocchie sane. Non si è osservata nessuna differenza significativa per il contenuto di zearalenone.

L'effetto degli insetticidi è stato testato contro la seconda generazione delle larve di piralide. È stata usata deltametrina alla dose di 0.7-0.8 l/ha. Il trattamento chimico è stato distribuito per mezzo di macchine irroratrici a trampolo. Questo trattamento ha avuto successo nel controllo della piralide, che è stata ridotta in media del 55%. Il controllo chimico dell'insetto ha ridotto significativamente il contenuto di fumonisina B₁ ogni anno, ma ha anche evidenziato l'assenza di effetto sul contenuto di zearalenone e di altre tossine (Tabella 3).

Tabella 3. Effetto del trattamento chimico contro la piralide del mais sul contenuto in fumonisina B₁ e zearalenone.

Anno	Trattamento chimico	Fumonisina B ₁ (ppb)	Zearalenone (ppb)		
2000	Testimone non trattato	284	a	NR	ns
	Trattato con insetticida	55	b	NR	ns
2001	Testimone non trattato	348	a	NR	ns
	Trattato con insetticida	NR	b	NR NR	ns
2002	Testimone non trattato	2236	a	65	ns
	Trattato con insetticida	117	b	83	ns
2003	Testimone non trattato	2660	b	NR	ns
	Trattato con insetticida	3640	a	NR	ns

2000-2003, ibrido Pioneer 3235 (classe FAO 600). Valori medi in colonna seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per il test Student-Newman-Keuls (P < 0.05). NR = concentrazione < 10 ppb.

Post raccolta e prima trasformazione

Con prima trasformazione vengono intese tutte le operazioni a cui è sottoposta la granella di mais dalla raccolta presso i centri di essiccazione e stoccaggio, fino al desilamento della stessa per l'utilizzazione.

La fase di prestoccaggio della granella umida è una fase critica a causa del potenziale sviluppo di molte tossine. Spesso durante il periodo cruciale della raccolta, è possibile che la granella di mais sia accumulata in attesa del processo di essiccazione. I dati raccolti nella prova sperimentale mostrano che dopo 7 giorni dalla raccolta (umidità della granella alla raccolta del 25%) si osserva un significativo aumento delle fumonisine (+77%) e, soprattutto, del contenuto in zearalenone (+452%) (Tabella 4). A 4 giorni dalla raccolta solo lo zearalenone presenta una differenza significativa rispetto al momento iniziale del prestoccaggio (+226%). Il deossivalenolo non cresce in modo significativo durante tutto il periodo di prestoccaggio considerato.

Per quanto riguarda le operazioni di pulizia della granella, esaminate presso diversi centri di stoccaggio, lo zearalenone e in particolare le fumonisine si sono sempre ridotte con una doppia pulizia effettuata prima e dopo l'essiccazione. Si è osservata anche un'ulteriore importante riduzione del 20 e 43% rispettivamente per la fumonina B₁ e lo zearalenone se si inserisce un altro processo di pulizia alla fine dello stoccaggio. La pulizia, ventilazione e setacciatura, risulta quindi un passaggio senz'altro di notevole efficacia nel ridurre le contaminazioni di tutte le tossine del mais, ma, in ogni caso, non in grado di trasformare prodotti che arrivano dal campo con un elevato grado di contaminazione.

Tabella 4. Effetto del prestoccaggio della granella umida prima dell'essiccazione sull'evoluzione del contenuto in micotossine (valore indice; contenuto iniziale di tossina al momento iniziale prestoccaggio = 100)

Durata prestoccaggio (h)	Fumonina B ₁		Zearalenone		DON	
2	100	b	100	c	100	ns
96	121	b	326	b	108	ns
168	177	a	552	a	110	ns

2002, Valori medi in colonna seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per il test Student-Newman-Keuls (P < 0.05).

Seconda trasformazione

Con seconda trasformazione vengono intese tutte le operazioni di lavorazione effettuate nei molini, nei mangimifici o nelle amiderie

La trasformazione della granella di mais è in grado di migliorare la qualità dei prodotti finiti concentrando le tossine in sottoprodotti con diversi livelli di efficacia a seconda delle trasformazioni poste in atto.

L'analisi effettuata sul processo di molitura a secco ha evidenziato in particolare una riduzione pari al 60-85% del contenuto in micotossine nelle farine ad uso alimentare. Le micotossine contenute nella granella trasformata si concentrano invece nelle farinette ad uso zootecnico (2-3 volte superiori rispetto alla contaminazione della granella) e nel germe, in cui si riscontra una contaminazione pari o di poco superiore a quella iniziale. In alcune polveri, non

commercializzate in quanto scarti, si hanno invece concentrazioni estremamente elevate che consentono di interpretare il bilancio di massa del processo lavorativo.

Discussione e Conclusioni

L'esame del processo produttivo dal campo al confezionamento delle farine alimentari, ha posto in evidenza l'efficacia di diversi interventi, ma anche dei loro limiti; nel complesso la necessità è quella di costruire percorsi di filiera secondo programmi di gestione (disciplinari) che seguano la buone pratiche agricole (GAP) e di lavorazione e gestione del prodotto (GMP).

Le conoscenze acquisite nei vari punti della filiera hanno permesso di individuare 4 diversi percorsi gestionali (Tabella 5) corrispondenti a livelli crescenti di attenzione e dettaglio di possibili programmi GAP:

- Gestione Convenzionale (GC)
- Gestione Rischiosa (GR)
- Gestione di Filiera Corretta (GFC)
- Gestione di Filiera Attenta (GFA)

Il percorso **GC** rappresenta la gestione attuale e più diffusa della filiera. Tutti i fattori dell'agrotecnica, della conservazione e della lavorazione del prodotto hanno come unico obiettivo la massimizzazione della produzione, con scarsa o inesistente attenzione nei confronti dell'aspetto igienico-sanitario. Essendo il più diffuso è il percorso gestionale di riferimento per la valutazione degli altri percorsi.

Il percorso **GR** rappresenta la situazione peggiore di gestione di una filiera: scarsa attenzione e scelta sbagliata dei fattori della tecnica agronomica, ed errori, accidentali e non, durante le fasi di gestione agronomica, conservazione e trasformazione del prodotto. Il risultato di questo tipo di gestione è l'ottenimento di una granella di pessima qualità igienico-sanitaria, con concentrazioni di *Fusarium*-tossine in media 4 volte superiori rispetto al percorso GC.

Il percorso **GFC** è il percorso gestionale che permette, mantenendo un elevato livello produttivo, di ottenere una granella di buona qualità igienico sanitaria. È il percorso gestionale che prevede una corretta gestione tecnica dei fattori della tecnica agronomica, della conservazione e della trasformazione, evitando situazioni che possano favorire la crescita fungina e la contaminazione da micotossine. Il risultato del percorso GFC è un prodotto di buona qualità igienico-sanitaria con livelli produttivi identici a quelli del percorso GC. In media si attende una riduzione del livello di contaminazione da *Fusarium*-tossine stimata intorno al 60%.

Il percorso **GFA** rappresenta l'insieme di scelte agronomiche, di conservazione e lavorazione ideali per una filiera dedicata alla produzione di un prodotto di altissima qualità igienico-sanitaria e quindi destinato alle produzioni alimentari, a fronte però di una perdita produttiva stimata intorno al 20% rispetto alla gestione GC o GFC dovuta essenzialmente ad alcune scelte nella fase di coltivazione in campo (ibridi a ciclo breve e basso investimento alla semina). È il percorso gestionale che ha come primo obiettivo quindi quello di limitare al massimo le condizioni favorevoli allo sviluppo delle tossine. In media il percorso gestionale GFA è in grado di abbattere dell'80% il livello di contaminazione da *Fusarium*-tossine.

Tabella 5. Buone pratiche agricole (GAP): confronto tra diversi disciplinari

Gestione	Caratteristiche	Effetti sul prodotto
GR	Agrotecnica, conservazione e lavorazione non accurate. Errori nella gestione della filiera. Ibrido a ciclo lungo (FAO 600 – 700) e con granella a frattura farinosa. Semina tardiva (fine aprile). Raccolta tardiva. Concimaizioni non equilibrate. Non trattamento contro la piralide. Investimento alla semina elevato (> 8piante/m2). Non selezione delle partite. Non essiccazione del prodotto. Errori durante la fase di stoccaggio e trasformazione.	Pessima qualità igienico-sanitaria
GC	Agrotecnica, conservazione e lavorazione convenzionale. Ibridi a ciclo lungo (FAO 600). Semina a inizio aprile. Raccolta ritardata. Non trattamento contro la piralide. Apporti azotati non equilibrati. Investimento alla semina elevato (> 8 piante/m2). Lunghi tempi di attesa prima dell'essiccazione.	Elevate produzioni. Scarsa qualità igienico-sanitaria
GFC	Agrotecnica, conservazione e lavorazione corretta. Ibridi a ciclo medio (FAO 500) a frattura compatta. Semina a marzo. Raccolta al 24% di umidità. Trattamento contro la piralide. Investimento alla semina medio – basso (7 – 8 piante/m2). Essiccazione tempestiva. Processo di pulitura della granella. Rimozione della "carota".	Elevate produzioni. Buona qualità igienico-sanitaria della granella.
GFA	Agrotecnica, conservazione e lavorazione attenta. Ibridi a ciclo corto (FAO 300) a frattura compatta. Semina a marzo. Raccolta al 24% di umidità. Trattamento contro la piralide. Basso investimento alla semina (6,5 – 7 piante/m2). Essiccazione tempestiva. Doppio processo di pulitura della granella. Eliminazione della "carota". Condizionamento dei depositi di stoccaggio. Procedura HACCP per tutte le fasi della filiera.	Riduzione della produzione del 20%. Ottima qualità igienico-sanitaria della granella. Filiera dedicata alla produzione di un prodotto di alta qualità.

Dall'esame dei diversi disciplinari GAP e GMP a confronto è emerso che tali programmi debbono essere definiti in funzione dell'utilizzazione finale del prodotto, della tossina obiettivo e, per la fase GAP, dell'ambiente culturale. Infatti, individuata in funzione dell'utilizzazione finale del prodotto la/e micotossine/e target di ciascuna filiera produttiva, sarà necessario specificare con attenzione i punti critici e le conseguenti strategie per la prevenzione e il controllo della qualità delle produzioni cerealicole in tutte le sue fasi, dal campo al trasformatore, in un sistema di gestione integrato, secondo le specificità ambientali, della componente agricola e industriale.

Il controllo del tenore in micotossine è possibile solo con il coordinamento di tutti i soggetti della filiera, attraverso la costituzione di filiere controllate in grado di applicare disciplinari di produzione in campo e poi mantenere la tracciabilità del prodotto al centro di stoccaggio e negli impianti di seconda trasformazione.

Bibliografia

1. Bilgrami KS, Choudhary AK. Mycotoxins in preharvest contamination of agricultural crops. In: Sinha KK, Bhatnaga D (Ed.). *Mycotoxins in agriculture and food safety*. Bhatnaga, 1998: p. 1-43.
2. Chelkowski J. Distribution of *Fusarium* species and their mycotoxins in cereal grains. In: Sinha KK, Bhatnaga D (Ed.). *Mycotoxins in agriculture and food safety*. 1998; p. 45-64.
3. AA.VV. Impiego di tecniche agronomiche per contenere le micotossine nella granella di mais. *L'Informatore Agrario* 2004;6:45-50.
4. Bottalico A. *Fusarium* diseases of cereals: Species complex and related mycotoxins profiles in Europe. *Journal of Plant Pathology* 1998;80:85-103.
5. Logrieco A, Mulè G, Moretti A, Bottalico A. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 2002;108:597-609.

6. Pietri A, Piva G. Occurrence and control of mycotoxins in maize grown in Italy. In: *Proceeding of the 6th International Feed Production Conference. Piacenza, 27-28 Novembre 2000*, p. 226-236.
7. Blandino M, Reyneri A. 2003, una campagna a rischio per le aflatossine. *L'Informatore Agrario* 2004; 6:49.
8. Avvantaggiato G, De Girolamo A, Fanelli C, Ricelli A. Funghi tossigeni e micotossine: metodi di decontaminazione delle derrate. *Informatore fitopatologico* 2002;12:43-49.
9. Scott PM. Possibilities of reduction or elimination of mycotoxins present in cereal grains. In: Chelkowski J (Ed.). *Cereal grain – Mycotoxins, Fungi and Quality in drying and storage*. Amsterdam: Elsevier; 1991. p. 529-559.
10. Sinha KK. Detoxification of mycotoxins and food safety. Mycotoxins in agriculture and food safety. In: Sinha KK, Bhatnaga D (Ed.). *Mycotoxins in agriculture and food safety*; 1998. p. 381-405.
11. Brown RL, Bhatnagar D, Cleveland TE, Cary JW. Recent advances in preharvest prevention of mycotoxin contamination. In: Sinha KK, Bhatnaga D (Ed.). *Mycotoxins in agriculture and food safety*; 1998. p. 381-398.
12. Nicholson P, Gosman N, Draeger R, Steed A. Control of Fusarium and Aspergillus species and associated mycotoxins on wheat and maize. In: Barug D, van Egmond HP, Lopez-Garcia R, van Osenbruggen WA, Visconti A (Ed.). *Meeting the mycotoxins menace*, 2004; p. 113-132.
13. Masoero F, Moschini M, Rossi F, Prandini A, Pietri A. Nutritive value, mycotoxin contamination and in vitro rumen fermentation of normal and genetically modified corn (Cry1A(B)) grown in northern Italy. *Maydica* 1999; 44:205-209.

OCRATOSSINA A: DECONTAMINAZIONE FISICA DEI VINI MEDIANTE USO DI CARBONE ENOLOGICO

Michele Savino, Massimo Morassut, Francesca Cecchini, Emilia Garcia Moruno, Domenico Tiberi, Barbara Boccaccino

(a) CRA-Istituto Sperimentale per l'Enologia sezioni di Barletta, Bari

(b) CRA-Istituto Sperimentale per l'Enologia sezioni di Asti

(c) CRA-Istituto Sperimentale per l'Enologia sezioni di Velletri

Introduzione

Il carbone enologico è carbone vegetale dotato di un elevato potere adsorbente la cui azione sui principali costituenti aromatici (carboni deodoranti) e polifenolici (carboni decoloranti) dei vini e dei mosti è ampiamente nota (1). Diverse attività di ricerca hanno evidenziato la capacità dei carboni di adsorbire anche composti diversi come ad esempio eventuali residui di molecole ad azione anticrittogamica impiegate nella difesa della vite o composti ad azione antifermentativa. Il carbone esplica la sua azione per contatto: è quindi necessario che la massa sottoposta a trattamento sia agitata ripetutamente per garantire un'adeguata efficacia del trattamento. Diverse attività preliminari hanno confermato già a bassi dosaggi l'efficacia del carbone nell'abbattimento del contenuto di ocratossina A (OTA) dei mosti e dei vini.

In questo lavoro si è voluto verificare se il trattamento proposto, a diverse dosi, modifica significativamente le caratteristiche organolettiche del prodotto finale e se può di conseguenza rappresentare uno strumento utile per ridurre il tenore di OTA nei vini. Attualmente, dal punto di vista legislativo, il trattamento con carbone enologico è consentito solo nei vini provenienti da uve a bacca chiara, mentre né risulta esplicitamente vietato l'impiego nei mosti da uve rosse. Pertanto, a livello applicativo, nel caso di vini rossi, l'impiego del carbone ai fini della decontaminazione dei vini presuppone una rivisitazione della normativa.

Materiali e Metodi

Per verificare l'effetto del carbone sui composti volatili e sui polifenoli responsabili, rispettivamente dell'aroma e del gusto dei vini, le prove sono state impostate su diverse tipologie di vini, bianchi e rossi. In questo lavoro sono riportati i dati relativi ad un vino rosso giovane (Barbera), un vino bianco (Cortese) e su un vino caratterizzato da un significativo profilo aromatico Passito di Moscato di Pantelleria (Passito).

Su tutti i vini è stata preventivamente operata l'aggiunta di OTA fino alla concentrazione di 2 µg/L. Sui vini Barbera e Cortese sono stati realizzati trattamenti con carbone decolorante, a dosi variabili nell'intervallo da 5 a 15 g/hL, in Passito è stato effettuato un trattamento solamente a 10 g/hL. Al termine del trattamento, eseguito con modalità predefinite e riproducibili, è stata effettuata l'analisi dell'OTA (2) e l'analisi chimica a carico dei costituenti aromatici e fenolici.

In particolare su tutti i vini sono stati determinati i composti volatili di origine fermentativa (3). Nel caso del Passito di Pantelleria trattandosi di un vino aromatico sono stati determinati

anche i composti terpenici sia in forma libera che glicosilata (4). Infine, solo su Barbera, trattandosi di un vino rosso è stata valutato l'impatto del trattamento rispetto al colore dei vini (5).

Risultati e discussione

In Tabella 1 sono riportati i dati relativi all'abbattimento di OTA nei diversi campioni ai diversi livelli di trattamento.

Tabella 1. Abbattimento del contenuto di OTA ($\mu\text{g/L}$) in Barbera, Cortese e Passito*

Vini	Teste	5 g/hL	10 g/hL	15 g/hL
Cortese 2000	1,65 (100)	0,12 (92,7)	0,08 (95,1)	0,07 (95,7)
Barbera 2000	1,49 (100)	0,58 (61)	0,32 (79)	0,22 (86)
Moscato Passito di Pantelleria	1,84 (100)	-	0,08 (95)	-

*tra parentesi sono riportate le percentuali di abbattimento

Nelle Tabelle 2, 3 e 4 sono riportati i dati relativi ai composti volatili in Barbera, Cortese e Passito. I dati presentati mostrano chiaramente che, per certi composti, la variabilità analitica è superiore alle differenze indotte dal trattamento. In altri casi il trattamento determina una evidente diminuzione della concentrazione iniziale. In particolare si conferma su tutti un maggiore assorbimento a carico di composti lipofili come ad esempio gli acidi grassi. Riguardo al Cortese per effetto del trattamento con la dose massima di carbone si è avuta una diminuzione del 67% dell'isoamil-acetato, del 40,8% di etil-esanoato, del 79,4% di etil-ottanoato e dell'89% di etil-decanoato. Sensibili diminuzioni, superiori agli altri vini, si registrano anche a carico degli acidi grassi a media catena e di altri composti a carattere liofilo. Trattandosi di composti responsabili dell'aroma di fruttato, questa circostanza, a fronte di un abbattimento di OTA superiore al 90%, induce a ritenere più che sufficiente un trattamento entro i 5 g/hL, nel caso di vini bianchi caratterizzati da un profilo aromatico prevalentemente di origine fermentativa. Nel caso del Passito si osserva che il trattamento con dose di carbone di 10 g/hL porta a una diminuzione limitata dei composti varietali (terpeni liberi), responsabili dell'aroma di Moscato, con più bassa soglia olfattiva quali: linalolo, α -terpineolo, citronellolo, nerolo e geraniolo. Come nel caso del Cortese, assorbimenti più elevati si segnalano a carico degli esteri etilici degli acidi grassi a media catena. Nel complesso le variazioni appaiono non rilevanti tanto da far ritenere una irrilevante influenza sull'aroma del vino.

Anche i composti varietali sottoforma glicosilata, Tabella 5, vengono parzialmente assorbiti dal carbone decolorante, tuttavia, alla dose di 10 g/hL di carbone, sia hanno abbattimenti modesti. Ad esempio i glicosidi del linaiolo, composti dotati di soglia di percezione olfattiva più bassa, diminuiscono del 6,6%, quelli del nerolo del 4,6%, quelli del geraniolo del 6,6%. Pertanto la carica aromatica di questi vini, rimane, di conseguenza praticamente inalterata.

Questa osservazione associata a quella dei terpeni liberi, porta alla conclusione che malgrado la perdita di una parte dei composti aromatici lipofili di fermentazione, il trattamento con dosi limitate di carbone, rispetta la composizione e la qualità del vino.

Tabella 2. Composti volatili di fermentazione ($\mu\text{g/L}$) in Barbera annata 2000*

Composti volatili di origine fermentativa		Teste	5 g/hL	10 g/hL	15 g/hL
Acetati degli alcoli superiori	isoamil acetato	350	256	391	378
	1,3-propandiolo	174	179	200	171
	monoacetato				
	1,4-butandiolo	34	67	45	34
	monoacetato				
	<i>Somme</i>	<i>558</i>	<i>502</i>	<i>636</i>	<i>583</i>
Esteri etilici degli acidi grassi	etil piruvato	182	161	176	160
	etil esanoato	172	115	158	149
	etil ottanoato	232	185	189	191
	etil decanoato	86	75	65	65
	<i>Somme</i>	<i>1788</i>	<i>1540</i>	<i>1860</i>	<i>1731</i>
Acidi grassi	isobutirrico	566	554	594	522
	butirrico	141	132	161	135
	isopentanoico	1098	1143	1235	1136
	esanoico	1258	1352	1284	1183
	ottanoico	1683	1482	1263	1347
	decanoico	483	416	294	250
	9-decenoico	55	45	42	44
	<i>Somme</i>	<i>8860</i>	<i>8204</i>	<i>8593</i>	<i>8079</i>
Esteri ossidrilati	etil 3-OH butirrato	323	340	340	339
	etil 4-OH butirrato	1783	1786	1948	1820
	etil3-fenil-2-OH-propionato	525	528	451	444
	monoetil-2-OH-glutarato	2024	2174	1939	1959
Esteri etilici degli acidi fissi	etile lattato				
	dietil succinato	4453	3731	4110	4121
	monoetil succinato	33026	32009	36257	33458
	dietil malato	2123	2153	2037	1985
Alcoli fenilici	2-feniletanolo	126003	135449	126731	122025
Lattoni	γ -butirrolattone	6082	5504	6320	5620
	pantolattone	94	127	137	119
	sherry lattone 1	494	565	554	501
	sherry lattone 2	316	300	333	291
Vinil-fenoli	4-etil-guaiacolo	125	121	113	125
	4-etil-fenolo	346	344	299	350

* trattato con carbone in dosi crescenti

Tabella 3. Composti volatili di fermentazione ($\mu\text{g/L}$) in Cortese annata 2000*

Composti volatili di origine fermentativa		Teste	5 g/hL	10 g/hL	15 g/hL
Acetati degli alcoli superiori	isoamil acetato	1914	1928	1566	1144
	1,3-propandiolo monoacetato	490	478	528	396
	1,4-butandiolo monoacetato	60	51	55	55
	<i>Somme</i>	<i>2464</i>	<i>2457</i>	<i>2149</i>	<i>1595</i>
Esteri etilici degli acidi grassi	etil piruvato	184	190	182	201
	etil esanoato	591	560	393	350
	etil ottanoato	964	656	340	247
	etil decanoato	218	74	38	24
	<i>Somme</i>	<i>6885</i>	<i>6394</i>	<i>5251</i>	<i>4012</i>
Acidi grassi	isobutirrico	190	184	209	158
	butirrico	323	325	346	337
	isopentanoico	225	240	240	175
	esanoico	4587	4616	4501	4021
	ottanoico	7720	7322	6653	5789
	decanoico	1571	914	494	306
	9-decenoico	-	-	-	-
	<i>Somme</i>	<i>28386</i>	<i>28386</i>	<i>56772</i>	<i>113544</i>
Esteri ossidrilati	etil 3-OH butirrato	178	163	159	132
	etil 4-OH butirrato	395	379	410	317
	monoetil-2-OH-glutarato	1099	1195	1107	1213
	etil3-fenil-2-OH-propionato	48	43	35	28
Esteri etilici degli acidi fissi	etile lattato	-	-	-	-
	dietil succinato	268	264	270	258
	monoetil succinato	4936	4648	5181	5364
	dietil malato	1100	1148	1042	1232
Alcoli fenilici	2-feniletanolo	14759	15032	14380	13789
Lattoni	γ -butirrolattone	1936	1946	2011	1946
	pantolattone	34	27	33	30
Dioli	2,6-dimetil-3,7octadien-2,6-diolo	72	79	45	43
	3,7-dimetil-1,7-octadien-3,6-diolo	47	18	23	Nd
	3,7-dimetil-1,7-octandiolo	27	tracce	nd	Nd
	2,6-dimetil-7-octen-1,6-diolo	24	tracce	nd	Nd
	E-2,6-dimetil-2,7-octadien-1,6-diolo	158	37	nd	Nd
	Z-2,6-dimetil-2,7-octadien-1,6-diolo+I.G.	300	50	36	Nd
	Vari	α -terpineolo	30	21	19

* trattato con carbone in dosi crescenti

Tabella 4. Composti volatili di fermentazione ($\mu\text{g/L}$) in Passito*

	Composti volatili di origine fermentativa	Teste	10 g/hL
Acetati degli alcoli superiori	isoamil acetato	489	413
	2-feniletil acetato	60	54
	<i>Somme</i>	<i>549</i>	<i>467</i>
Esteri etilici degli acidi grassi	Etil esanoato	98	75
	Etil ottanoato	61	34
	Etil piruvato	230	217
	Etil decanoato	68	nd
	<i>Somme</i>	<i>1555</i>	<i>1555</i>
Acidi grassi	acido isobutirrico	188	195
	acido butirrico	114	145
	esanoico	685	638
	ottanoico	733	702
	<i>Somme</i>	<i>4830</i>	<i>3235</i>
Esteri ossidrilati	Etil-3-OH-butirrato	77	96
	Etil-2-OH-4-metil pentanoato	80	27
	Etil-4-OH-butirrato	1893	2248
	Dietil-2-OH-glutarato	333	193
Esteri etilici degli acidi fissi	dietil succinato	442	17
	dietil malato	828	751
	Etil decanoato	68	nd
Alcoli fenilici	2-feniletanolo	24933	23988
Lattoni	γ -butirrolattone	3521	3999
Terpeni	Furan linalol ox. isom 1	52	52
	Furan linalol ox. isom 2	19	28
	Linaiolo	692	647
	α -terpineolo	369	322
	Citronellolo	83	67
	Neroli	66	57
	Geraniolo	158	135
	OH- citronellolo	260	252
	OH-geraniolo	79	98
	8-OH-diidrolinalolo	111	95
	Trans-8-OH-linalolo	287	191
	Cis-8-OH-linalolo	197	170

* trattato con dose unica di carbone

Tabella 5. Composti aromatici glicosilati ($\mu\text{g/L}$) in Passito*

Composti aromatici	Teste	5 g/hL
Furan linalol ox. isom. 1	470	442
Furan linalol ox. isom. 2	113	107
OH-trienolo	24	20
Linalolo	703	657
α -terpineolo	286	274
Geraniale	86	88
Piran linalol ox. isom. 1	247	229
Nerale	78	84
Piran linalol ox. isom. 2	284	270
Nerolo	671	640
Citronellolo	29	29
Geraniolo	989	924
Alcol benzilico	278	268
2- feniletanolo	440	408
2,6-dimetil-3,7-octadien-2,6-diolo	252	236
2,6-dimetil-7-octen-2,6-diolo	300	289
Terpina 1	57	42
3,7-dimetil-1,7-octadien-3,6-diolo	243	216
Eugenolo	34	26
4- vinil guaiacolo	82	92
OH-citronellolo	96	88
8-OH-diidrolinalolo	123	112
OH- nerolo	294	243
Trans-8-OH linalolo	588	515
OH-geraniolo+cis-8-OH-linalolo	1586	1145
Ac.geranico	1145	1070
p-ment-1-ene-7,8-diolo	37	50
3-OH- β -damascone	49	62
Metossi eugenolo	40	56
8-OH-nerolo	37	48
8-OH-geraniolo	165	207
3-oxo- α -ionolo	103	146
3,9-diidrossimegastigma-5-ene	82	118
3-OH- β -ionone	77	109
Alcol diidroconiferilico	73	84
Ac.2,6-dimetil-6-OH-2,7-octadienoico	187	247

* trattato con dose unica d carbone

In Figura 1, sono rappresentati i risultati delle analisi dei composti fenolici e dell'OTA effettuate su un vino rosso (Barbera) caratterizzato da una intensa colorazione testimone.

Il grafico mostra che si hanno buoni abbattimenti di OTA anche alla dose di 10 g/hL. Con 15 g/hL si ha una diminuzione di antociani dell'11,5% che nella forma di monomeri arriva fino al 18,8%, mentre le proantocianidine diminuiscono del 9,5%, i polifenoli totali del 5,3% e la reazione con vanillina del 4,7% (dati non riportati). L'intensità colorante subisce però una flessione del 14,8%, pari a quella degli antociani monomeri. I contributi all'assorbanza a 520 nm degli antociani monomeri (dAl), dei pigmenti sensibili all'anidride solforosa (dAT) e dei pigmenti non sensibili all'anidride solforosa (dTAT), al pH del vino, restano invariati.

Tutto questo indica che la dose massima di carbone impiegata nel vino rosso giovane ha determinato una diminuzione dell'intensità colorante del 15 % a fronte di una riduzione di OTA pari a 86%.

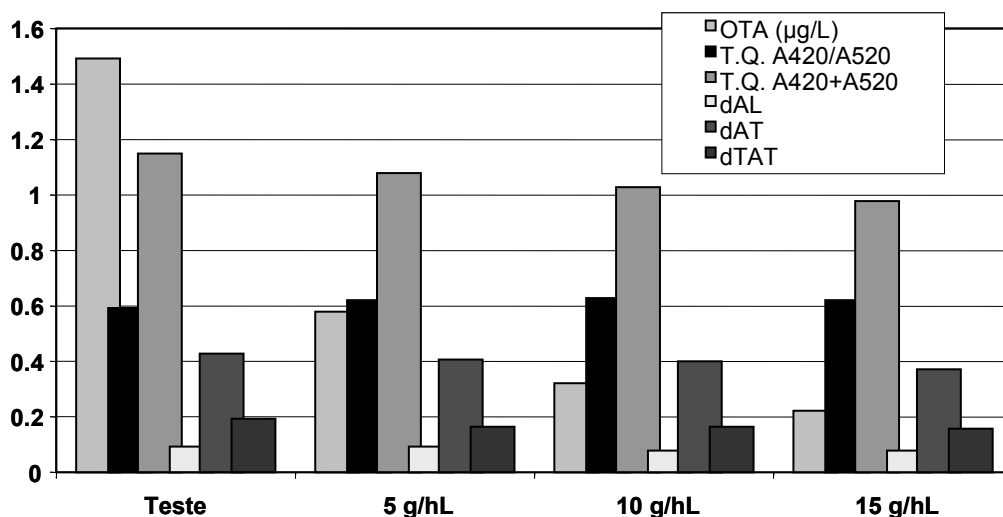


Figura 1. Istogrammi della concentrazione OTA e indice del colore in funzione del trattamento con carbone in Barbera

Conclusioni

I dati esposti indicano che la dose massima di carbone (15 g/hL) utilizzata in un vino con intenso profilo aromatico (Passito) e un vino rosso giovane (Barbera) ha portato sempre ad un significativo abbattimento della OTA presente. L'influenza del trattamento sul tenore in polifenoli è ancora minore alle dosi più basse di carbone. A differenza di quanto osservato per i precedenti nel vino Cortese la dose massima di carbone porta ad una sensibile riduzione dei composti responsabili dell'aroma di fruttato, in questo caso comunque alla dose di 5 g/hL si ha una riduzione di circa il 93% di OTA senza modificazioni significative della componente aromatica. Si conferma, pertanto, che è possibile asportare l'OTA dai vini impiegando carbone enologico a bassi dosaggi senza modificarne la qualità organolettica, ma migliorando complessivamente la qualità igienico-sanitaria.

Bibliografia

1. Paronetto Lamberto. Paronetto L. (Ed). *Ausiliari chimici e biologici in enologia*. Verona: INTEC editrice; 1986.
2. Visconti A, Pascale M, Centonze G. Determination of Ochratoxin A in wine and beer by immunoaffinity clean-up and HPLC analysis with fluorometric detection. *Journal of chromatography* 1999;A864:89-101.
3. Giannotti S, Di Stefano R. Metodo per la determinazione dei composti volatili di fermentazione. *L'Enotecnico* 1991;10:61-4.
4. Di Stefano R. Proposition d'une methode de preparation de l'echantillon pour la determination des terpenes libres et glycosides des raisins et des vins. *Bulletin de l'OIV* 1991; 4:721-5.
5. Di Stefano R, Cravero MC. I composti fenolici e la natura del colore dei vini rossi. *L'Enotecnico* 1989;10: 81-7.

DESTINO DELL'OCRATOSSINA A NELLA VINIFICAZIONE IN ROSSO

Angela Silva, Barbara Grazioli, Roberta Galli, Maria Daria Fumi
Istituto di Enologia e Ingegneria Alimentare, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza

Introduzione

L'ocratossina A è un metabolita secondario prodotto da alcune specie di funghi appartenenti ai generi *Penicillium* e *Aspergillus* (1, 2). Questa micotossina rappresenta un fattore di rischio potenziale per la salute umana e la sua presenza nel vino deve essere controllata sistematicamente (3, 4). La contaminazione da OTA è maggiore nei vini rossi rispetto ai bianchi e ai rosati e, in Europa, sembra essere in correlazione con l'area geografica di produzione. L'incidenza di contaminazione e la concentrazione di tossina sono infatti maggiori nei vini del sud Europa (Tabella 1). Partendo dal presupposto che l'OTA è presente nel vino solamente quando l'uva risulta contaminata (5) e che spesso gli interventi di buona pratica viticola non sono sufficienti ad evitare il problema, risulta importante verificare quale influenza possa avere la pratica enologica sul livello di OTA del vino e quali strategie tecnologiche possono essere attuate per limitare la presenza di tale micotossina. Questo aspetto diventa importante anche in previsione dei limiti di ocratossina A che la Comunità Europea intende fissare per il vino. Lo scopo di questo lavoro è stato lo studio del comportamento dell'OTA durante le operazioni principali del processo di vinificazione e dell'influenza dei trattamenti tecnologici sulla concentrazione della micotossina al fine di identificare i CCP nell'ambito enologico.

Tabella 1. Livelli di OTA nelle diverse zone viticole europee; modificato da Otteneder *et al.* (6)

Area geografica	Concentrazione OTA ($\mu\text{g/L}$)	
	Min	Max
A, B, CI (Europa del Nord)	<0.01	0.80
CII (Europa Centrale)	<0.01	2.60
CIII (Europa del Sud)	<0.01	3.30

Materiali e Metodi

Prove di vinificazione in rosso sono state eseguite su scala reale in diverse cantine in Puglia, con due cultivars (Negroamaro e Primitivo) e in tre vendemmie (2001-2002-2003). I campionamenti hanno riguardato le fasi seguenti: diraspa-pigiatura, macerazione e fermentazione alcolica fino alla svinatura, fermentazione malolattica, trattamenti di illimpidimento post-fermentativi, imbottigliamento e 3, 6 e 12 mesi di conservazione in bottiglia. Le analisi dell'OTA sono state fatte dopo centrifugazione e filtrazione del campione, in doppio e seguendo il metodo indicato da Visconti *et al.* (7). Il metodo prevede la separazione di OTA dalla matrice mediante colonne di immunoaffinità e l'analisi mediante HPLC con rivelazione fluorimetrica.

Risultati

I risultati ottenuti in ciascuna vendemmia, illustrati nelle figure 1, 2, 3, mostrano che l'OTA non è prodotta durante la vinificazione.

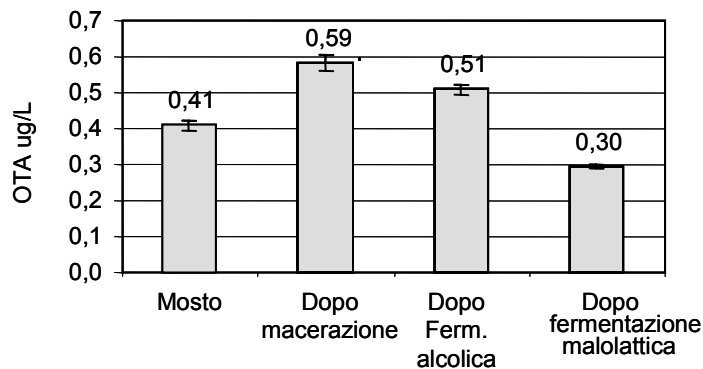


Figura 1. Comportamento dell'OTA durante la vinificazione del Primitivo 2001

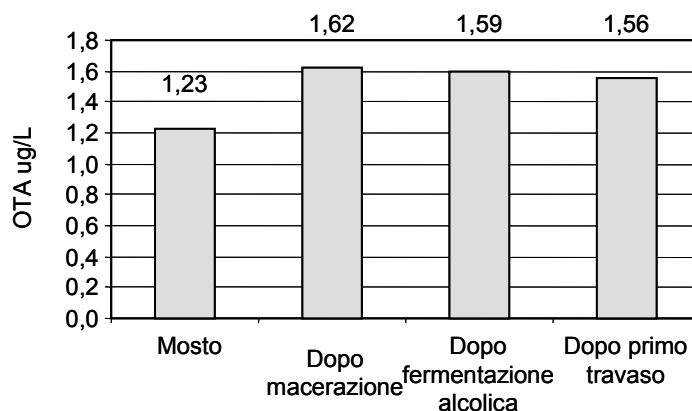


Figura 2. Comportamento dell'OTA durante la vinificazione del Negroamaro 2002

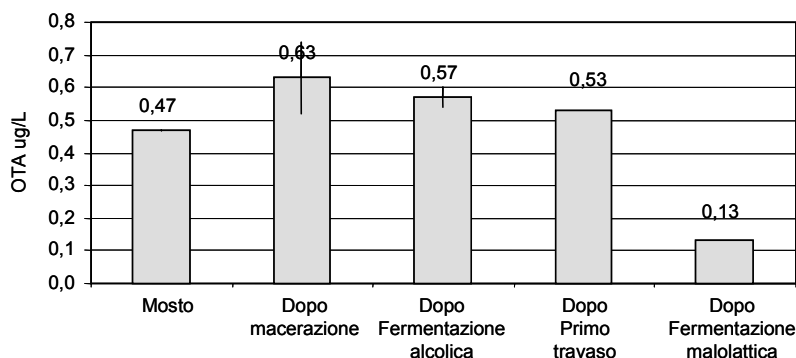


Figura 3. Comportamento dell'OTA durante la vinificazione del Negroamaro 2003

Se la pigiatura è l'operazione che determina il passaggio dell'OTA nel mosto, la macerazione può contribuire ad un incremento dell'OTA variabile dal 32 al 44%. Tale

comportamento indica che la micotossina viene solubilizzata in tempi relativamente rapidi. Gli stadi successivi della lavorazione portano ad una riduzione del livello di OTA nei vini rossi. Il completamento della fermentazione alcolica senza vinacce, dopo la svinatura, e il primo travaso (figure 2 e 3) provocano una lieve riduzione della concentrazione di OTA (4-20%). La fermentazione malolattica è la fase che induce un reale abbattimento dell'OTA (figure 1 e 3), variabile dal 40 al 75 %. Questo conferma l'effetto decontaminante dei batteri lattici, responsabili della disacidificazione biologica del vino, riscontrato anche in altre prove (8). Nella Figura 4 è riportato l'andamento dell'OTA durante la macerazione e la fermentazione alcolica per le tre annate. L'evoluzione è simile ma nel 2002 la concentrazione della tossina è molto più alta che nel 2001 e nel 2003. Questo conferma l'importanza dell'annata sul livello di contaminazione delle uve e dei vini.

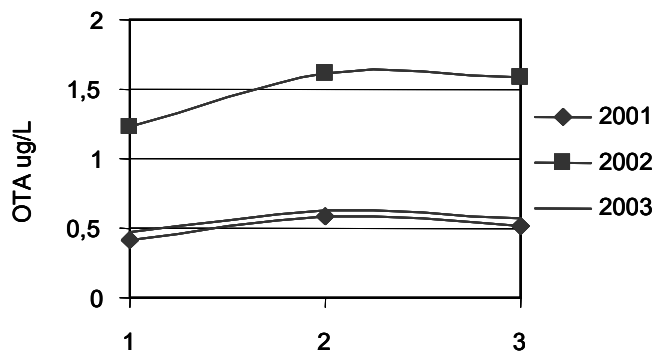


Figura 4. Trend della tossina dal pigiato alla fine della fermentazione alcolica (Negroamaro). 1= pigiato; 2= dopo macerazione; 3= dopo fermentazione alcolica

Per quanto concerne gli interventi correttivi, la maggior parte dei coadiuvanti di uso comune in enologia è poco efficace nel determinare una reale riduzione di OTA, mentre i formulati attivi in tale direzione sono per lo più a base di carbone vegetale (Atos, Micosorb, Toxicol) (Figura 5). L'uso di coadiuvanti contenenti carbone vegetale pone, però, alcuni problemi legati all'alta affinità di tale sostanza per i composti polifenolici che determinano il colore del vino. 8. La problematica può diventare rilevante quando i tenori di OTA sono elevati e richiedono alti livelli di coadiuvante che causano una perdita importante di pigmenti.

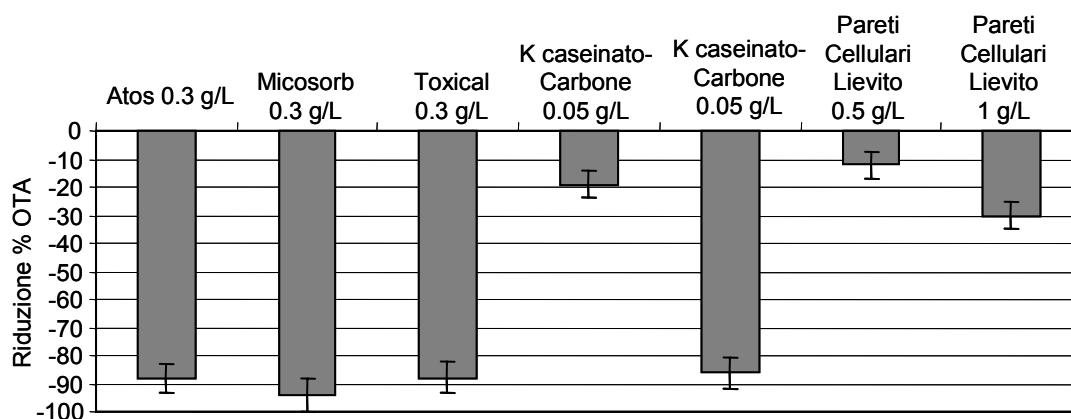


Figura 5. Riduzione % dell'OTA per mezzo di diversi coadiuvanti

Conclusioni

La prevenzione prima della raccolta è il metodo migliore per controllare la contaminazione da ocratossina A, ma è importante anche la gestione dei rischi associati alla tossina attraverso le procedure di post-raccolta. Lo studio evidenzia che nella vinificazione le separazioni solido-liquido, le fermentazioni alcolica e malolattica rappresentano punti critici di controllo (CCPs). In particolare, la fermentazione malolattica costituisce la fase più rilevante ma la sua gestione per la decontaminazione sarà possibile solo quando il meccanismo d'azione dei batteri lattici (adsorbimento e/o degradazione) sarà noto. Per controllare il rischio in vinificazione è fondamentale pianificare l'analisi della tossina prima e dopo la fermentazione alcolica. Ciò serve anche a prevedere se il livello dell'OTA nel vino sarà inferiore al massimo raccomandato dall'OIV (2 ug/L), in quanto le operazioni post-fermentative causano la riduzione della micotossina.

Bibliografia

1. Battilani P, Languasco L, Pietri A, Bertuzzi T, Giorni P. Ochratoxin A in grape and wine: causes and conditions of production. Preliminary results, In: *Journal of Plant Pathology*. Proceeding 5th Congress of the European Foundation for Plant Pathology, Giardini Naxos, Italy; 2000. p. 89.
2. Battilani P, Giorni P, Languasco L, Pietri A, Bertuzzi T. Dynamic of fungi responsible for ochratoxin A in grape. Results from a survey on their presence in Italy in 2000, In: Book of Abstract "Bioactive fungal metabolites-Impact and Exploitation", Swansea, Wales; 2001. p. 47.
3. Delage N, d'Harlingue A, Colonna Ceccaldi B, Bompeix G. Occurrence of mycotoxins in fruit juices and wine, *Food Control* 2003;14:225-7.
4. Grazioli B, Galli R, Fumi MD, Silva A. Influence of winemaking on ochratoxin A (OTA) content in red wines. In: Book of Abstract XI International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Bethesda, Maryland (USA), May 17-21 2004. p. 85.
5. Morassunt M, Cecchini F. Riduzione del contenuto di ocratossina A nei vini. Applicazione del sistema HACCP, *Industrie delle Bevande* 2003;32:357-61.
6. Otteneder H, Majerus P. Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin, *Food Additives and Contaminants* 2000;17(9):793-8.
7. Visconti A, Pascale M, Centonze G. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 864 1999;1:89-101.
8. Silva A, Galli R, Grazioli B, Fumi M. D. Metodi di riduzione di residui di ocratossina A nei vini, *Industrie delle Bevande* 2003;32(187):467-72.

Lavoro finanziato da: EU, QLK1-CT-2001-01761-WINE-OCHRA RISK; Università Cattolica del Sacro Cuore.

LOTTA ALLA PIRALIDE E RACCOLTA ANTICIPATA PER RIDURRE LE MICOTOSSINE IN MAIS

Mariolino Snidaro, Giorgio Barbiani, Marco Signor, Francesco Del Zan
ERSA, Servizio ricerca e sperimentazione, Pozzuolo del Friuli (UD)

Il mais è la principale coltura della regione Friuli Venezia Giulia e Udine è la provincia con la maggior produzione di granella di mais tra le province italiane. La produzione regionale è di oltre 900.000 tonnellate e la maggior parte è destinata al mercato extra regionale.

In relazione alla necessità di commercializzare il mais, tra gli operatori è sempre stata molto viva l'attenzione per la qualità della granella. Infatti, già da diversi anni, con la collaborazione di molti essiccatoi regionali, viene realizzato dall'ERSA un monitoraggio teso ad evidenziare i rischi di diffusione di micotossine. Accanto al monitoraggio sono state intraprese anche diverse sperimentazioni agronomiche abbinata al controllo della qualità per verificare quali tecniche potevano aiutare l'operatore a contenere la diffusione delle stesse.

Con le prime prove e il monitoraggio condotti negli anni dal 1996 al 1999 è stato possibile rilevare la variabilità dei livelli riscontrabili di micotossine e la complessità della prevenzione. Queste indagini preliminari hanno consentito di evidenziare che i rischi di contaminazione sono elevati ma che, nello stesso tempo, alcuni interventi agronomici potevano dare un grande contributo alla risoluzione del problema.

Negli anni dal 2000 al 2003 sono state così organizzate ulteriori indagini presso gli essiccatoi regionali con prelievi sistematici e relative analisi. Negli stessi anni sono state allestite in più località delle prove sperimentali tese a verificare l'efficacia di alcune tecniche agronomiche di prevenzione.

Monitoraggio

Nel quadriennio 2000-2003 sono stati fatti annualmente prelievi di granella presso dieci essiccatoi regionali che lavorano circa il 50% della produzione regionale. Sono state individuate tre epoche di raccolta: precoce, normale e tardiva. Il primo prelievo, abbinato alle raccolte precoci della zona, è stato fatto quando i conferimenti corrispondevano a circa il 20% della produzione prevista per l'anno. Il secondo è stato fatto in piena campagna di raccolta, quando era già stato raccolto il 50% della produzione. Il terzo e ultimo prelievo è stato fatto verso la fine della campagna di raccolta.

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

Dal campione giornaliero di oltre 50 chilogrammi, dopo accurata miscelazione, sono stati prelevati cinque chilogrammi di granella verde e posti in cella di essiccazione a 70° C per portare il valore dell'umidità attorno al 14%.

Ogni anno sono stati prelevati dai diversi centri di essiccazione 10 campioni per ogni epoca di raccolta per complessivi 120 nel quadriennio.

Dopo macinazione della granella un chilogrammo di farina integrale è stato consegnato per le analisi al Laboratorio Chimico Merceologico, Azienda Speciale della CCIAA di Pradamano (UD). Le analisi sono state effettuate con il metodo ELISA, kit immunoenzimatico Neogen distribuito da Diessechem srl, Milano. Le micotossine analizzate sono state: aflatoxine,

fumonisine, deossinivalenolo, ocratossina A e zearalenone. Per una verifica della ripetibilità dei dati è stato inserito un campione doppio scelto a caso tra dieci. I risultati sono presentati in Tabella 1.

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

L'ocratossina A è stata rilevata solamente nel 2000 sui raccolti tardivamente. In questo caso il livello massimo rilevato è di 4,2 ppb, di poco inferiore al limite consentito.

Tabella 1. Micotossine rilevate su granella di mais. Dati medi di diversi ibridi provenienti da 10 località della regione Friuli Venezia Giulia

Anni	Epoca raccolta	Aflatossine (ppb)	Fumonisine (ppm)	Zearalenone (ppb)	Don (ppm)	Ocratossina (ppb)
2000	Settembre	0	3.8	4.1	0	0.1
2000	Ottobre	0	5.2	0	0.2	0.5
2000	Novembre	0	11.6	9.3	0.5	4.2
2001	Agosto	0	5.8	0	0.2	0
2001	Agosto	0	5.8	0	0.2	0
2001	Settembre	0	13.7	7.0	0.2	0
2001	Ottobre	0	12.9	34.8	0.5	0
2002	Novembre	0	6.1	28.0	0	0
2002	Ottobre	0	11.3	27.5	0	0
2002	Novembre	0	14.2	53.5	0	0
2003	Agosto	5.3	3.7	0	0	0
2003	Settembre	3.2	8.1	0	0	0
2003	Ottobre	0	11.7	0	0	0

Il deossinivalenolo è stato invece riscontrato per due anni consecutivi, 2000 e 2001 con un livello massimo di 0,5 ppm, che è meno di $\frac{1}{3}$ del limite consentito per uso zootecnico.

Lo zearalenone è stato rilevato in tre anni. I dati più alti corrispondono alle raccolte tardive. I 53,5 ppb del 2002 sono pari a $\frac{1}{4}$ del limite che sarà posto dall'Unione Europea nel 2007.

La fumonisinina è stata invece rilevata tutti gli anni con un minimo 3,7 ppm nella raccolta anticipata del 2003 e un massimo di 14,2 ppm nella raccolta tardiva del 2002. Per la fumonisinina i valori rilevati nel quadriennio sono superiori ai limiti che saranno imposti dalla Comunità nel 2007 ma inferiori ai limiti indicati dalla FDA per l'uso zootecnico.

Prove per il contenimento della fumonisinina

Stante le indicazioni del monitoraggio, che evidenziavano un livello abbastanza sostenuto solamente di fumonisinina, le prove agronomiche sono state impostate con l'obiettivo di ridurre soprattutto il livello di contaminazione della granella di mais da questa micotossina.

Per la realizzazione delle prove agronomiche è stato utilizzato uno schema sperimentale a blocco randomizzato con almeno quattro ripetizioni per tesi. Le parcelle sperimentali erano costituite da quattro file di mais lunghe otto metri, più un metro di stradino. La raccolta dei campioni per le analisi è stata effettuata prelevando a caso 10 spighe all'interno della parcella, escludendo le spighe di testa. Le spighe sono state essiccate in stufa a 70 °C per portare l'umidità della granella al 14%. La granella delle 10 spighe è stata macinata e la farina integrale

è stata consegnata al Laboratorio Chimico Merceologico, Azienda Speciale della CCIAA di Pradamano (UD).

Le analisi sono state effettuate per il quadriennio dallo stesso Laboratorio utilizzando il metodo ELISA, come per il monitoraggio, per la determinazione della fumonisina. Solo su parte dei campioni è stata fatta la determinazione anche delle altre micotossine per una conferma dei valori riscontrati con il monitoraggio.

Epoche di semina - epoche di raccolta – controllo piralide – 2000 e 2001

Per due anni consecutivi, in due località della regione, sono state condotte delle prove di epoche di semina utilizzando 8 ibridi di ciclo medio. Le semine sono state effettuate nella prima decade di aprile e prima decade di maggio. Alla fioritura femminile degli ibridi, quattro delle otto ripetizioni sono state trattate con un insetticida piretroide. La distribuzione è stata fatta con un trampolo diluendo il prodotto previsto per un ettaro in 500 litri di acqua. La raccolta è stata effettuata in due momenti, quando il mais aveva mediamente il 28% e 22% di umidità. Le raccolte anticipate sono quindi state effettuate in settembre e quelle posticipate in ottobre.

I dati della Fumonisina rilevati nelle diverse tesi sono riportati nella Figura 1. Il valore minimo riscontrato è di 1,2 ppm e corrisponde alla tesi che prevedeva la semina anticipata, difesa dalla piralide con un trattamento insetticida e raccolta presto. Il valore più alto, di 8,7 ppm invece corrisponde alla tesi che prevedeva la semina tardiva, non difesa dalla piralide e raccolta tardi.

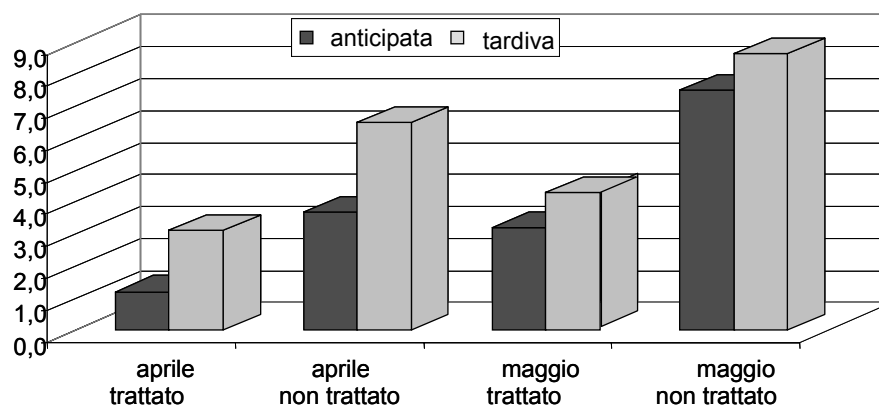


Figura 1. Confronto tra epoche di semina, aprile e maggio e due epoche di raccolta. Fumonisine (ppm): dati medi di 8 ibridi non trattati e trattati con insetticida per il controllo della piralide.

Concimazione - epoca di raccolta – controllo piralide – 2001 e 2002

In tre località della regione, su terreni irrigui, nel 2001 e 2002, sono stati posti a confronto due livelli di azoto: 220 e 300 kg per ettaro. Sono stati utilizzati cinque ibridi di ciclo medio. La semina è stata effettuata in aprile in tutte le località nei due anni. Alla fioritura femminile degli ibridi, quattro delle otto ripetizioni sono state trattate con un insetticida piretroide. Anche in

questo caso la raccolta è stata effettuata in due momenti, quando il mais aveva mediamente il 28% e 22% di umidità ovvero in settembre e in ottobre.

I dati rilevati nelle diverse tesi sono riportati nella Tabella 2. Molto contenuta è la differenza di fumonisina al variare della quantità di azoto che passa infatti da 7,5 ppm, nella media di tutte le tesi concimate con 220 kg/ha di azoto, a 8,4 ppm nella media delle tesi concimate con 300 kg/ha. Più importante è risultata la differenza tra le tesi trattate e quelle non trattate contro la piralide. Il valore medio passa infatti da 4,7 ppm per le tesi difese dalla piralide a 11,2 ppm nelle tesi non trattate. Anche per l'epoca di raccolta ci sono importanti variazioni, infatti la media delle tesi raccolte presto è pari a 4,5 ppm contro 11,4 ppm delle tesi raccolte tardi. Il valore medio più basso di fumonisina è 2,0 ppm che corrisponde alle tesi trattate contro la piralide e raccolte anticipatamente.

Tabella 2. Cinque ibridi di mais a confronto con due livelli di azoto, 220 e 300 kg/ha di azoto, trattati o no con insetticida e due epoche di raccolta. Fumonisine (ppm): dati medi di tre località e due anni, 2001 e 2002

kg/ha azoto	ibridi	non trattato		trattato	
		raccolta anticipata	raccolta tardiva	raccolta anticipata	raccolta tardiva
220	PR34F02	3.6	6.6	0.0	10.9
220	Tevere	3.7	19.0	0.9	4.3
220	Vertice	4.6	8.7	3.4	5.1
220	PR32W92	7.1	19.6	0.6	3.2
220	Eleonora	13.3	20.4	1.6	12.8
300	PR34F02	7.4	15.8	0.0	4.6
300	Tevere	4.5	20.3	6.9	8.0
300	Vertice	7.1	8.8	3.1	5.5
300	PR32W92	7.6	15.8	0.8	12.1
300	Eleonora	12.0	18.5	2.4	7.5
Media		7.1	15.4	2.0	7.4

media 220 kg/ha azoto = 7,5 ppm

media 300 kg/ha azoto = 8,4 ppm

media difeso con un trattamento insetticida = 4,7 ppm

media non trattato = 11,2 ppm

media raccolta anticipata = 4,5 ppm

media raccolta tardiva = 11,4 ppm

Controllo piralide con diversi insetticidi - epoche di raccolta - 2002 e 2003

Per verificare se potevano esserci delle differenze nell'attività degli insetticidi nel controllo della piralide e quindi anche della fumonisina sono stati messi a confronto cinque diversi insetticidi, in due località del FVG negli anni 2002 e 2003. La semina di due ibridi di ciclo medio è stata effettuata nella prima quindicina di aprile. Anche per questa prova la raccolta è stata effettuata in due diversi momenti, ovvero abbastanza presto, con mais avente una umidità superiore al 28% e circa un mese dopo la prima raccolta. Nella Tabella 3 sono riportati i dati della produzione di granella al 15% di umidità e i rilievi effettuati.

Tabella 3. Dati medi di due ibridi di mais coltivati in due località del Friuli nel 2002 e 2003

Insetticidi	Produzione granella (t/ha)	Piante spezzate (%)	Larve per spiga	Fumonisine (ppm)	
				Raccolta anticipata	Raccolta tardiva
Non trattato	11.16	4.3	2.8	7.1	11.3
<i>Bacillus thuringiensis</i>	11.50	2.1	2.5	6.9	10.8
Teflubenzuron	11.85	2.2	2.5	6.5	10.3
Chlorpyrifos-methyl	11.91	1.5	1.9	4.5	8.7
Deltamethrin	12.67	1.6	1.5	2.6	7.2
Lamda-cyhalothrin	12.95	1.6	1.2	1.6	6.9
Media	12.01	2.2	2.1	4.9	9.2
DMS 5%	1.06	-	0.4	-	-
CV%	7.20	-	11.8	-	-

Le rese conseguite con il mais non trattato sono le più basse. Produzioni sensibilmente superiori, anche se non significativamente diverse, si registrano per *Bacillus thuringiensis*, Teflubenzuron e Clorpyrifos-methyl. Rese significativamente superiori si hanno invece con gli insetticidi piretroidi Deltamethrin e Lamda-cyhalothrin.

I valori delle piante spezzate non sono molto elevati e comunque non sono significativamente diversi tra di loro. Il numero di larve rilevate per spiga è in media pari a 2,1. I valori più bassi e significativamente diversi dal testimone non trattato si rilevano nelle tesi difese con gli insetticidi piretroidi. I valori della fumonisina sono bassi nelle tesi con i trattamenti piretroidi e quando la raccolta è anticipata.

Tre diversi sistemi di coltivazione – 2002 e 2003

Nel 2002 e 2003 sono stati posti a confronto tre diversi sistemi di coltivazione.

Per le prove sono stati seminati tre ibridi di ciclo medio nella prima quindicina di aprile. Le tecniche colturali utilizzate per mettere a confronto i tre sistemi sono state: quella normalmente utilizzata in zona per il sistema convenzionale, quella prevista dal disciplinare del Piano di Sviluppo Rurale della Regione FVG e quella indicata dal disciplinare del biologico.

Per ogni sistema colturale sono state previste otto ripetizioni di cui quattro sono state trattate con insetticida. Nella Tabella 4 vengono sintetizzate le principali differenze tra i sistemi colturali.

Tabella 4. Le principali differenze tra i sistemi colturali

Sistema colturale	kg/ha di azoto	tipo di concime	erbicidi	insetticida
Convenzionale	310	minerale	pre e post emergenza	piretroide
PSR	240	minerale	post emergenza	piretroide
Biologico	170	organico	niente	<i>bacillus t.</i>

Nella Figura 2 sono riportati i valori di fumonisina rilevati come media di tre ibridi nei due anni di prova. Per le tesi non trattate la fumonisina è di 10,5 - 9,0 e 9,9 ppm mentre per le tesi trattate è di 2,5 - 3,0 - 9,7 ppm rispettivamente per il sistema convenzionale, PSR e biologico.

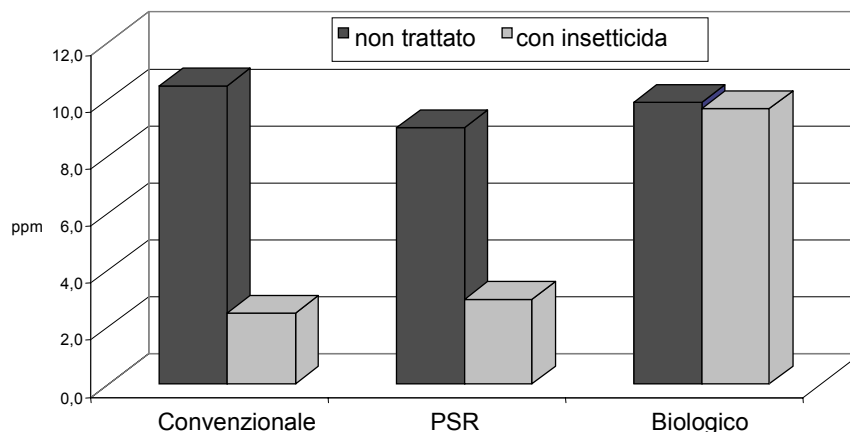


Figura 2. Confronto tra diversi sistemi culturali. Fumonisine ppm: dati medi di 3 ibridi di mais allevati in due località del Friuli nel 2002 e 2003, non trattati e difesi contro la piralide

Epoche di trattamento contro la piralide – 2003 e 2004

Da molte nostre esperienze condotte in passato è emerso che le trappole a feromoni utilizzabili per individuare il momento ideale di lotta all'insetto non sono attendibili. Nello stesso tempo è emerso che i trattamenti effettuati per il controllo della prima generazione di piralide non sortiscono effetti positivi per il contenimento della seconda generazione. Ciò comporta che non è facile decidere quando fare il trattamento insetticida. Stante questa situazione ci è sembrato importante cercare di collegare il trattamento ad uno stadio fenologico della pianta di mais.

Nel 2003 e 2004 sono state condotte delle prove utilizzando un prodotto insetticida piretroide per verificare con un unico trattamento quale poteva essere il momento migliore di intervento. In due località, utilizzando due ibridi, è stato distribuito l'insetticida in quattro diversi momenti: dieci giorni prima della fioritura, all'inizio della fioritura femminile (IFF), dieci giorni dopo e venti giorni dopo la fioritura femminile.

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

I dati rilevati, riportati nella Figura 3, hanno messo in evidenza che il trattamento contro la piralide offre un interessante contributo nel contenimento della diffusione delle larve sulla spiga di mais diminuendo da 5,3 larve per spiga del testimone non trattato a 2,5 larve per spiga come media dei quattro momenti di intervento. L'intervento effettuato all'inizio della fioritura femminile differisce significativamente dagli altri momenti di trattamento con un contenimento dell'85% delle larve che scendono a 0,8 larve per spiga.

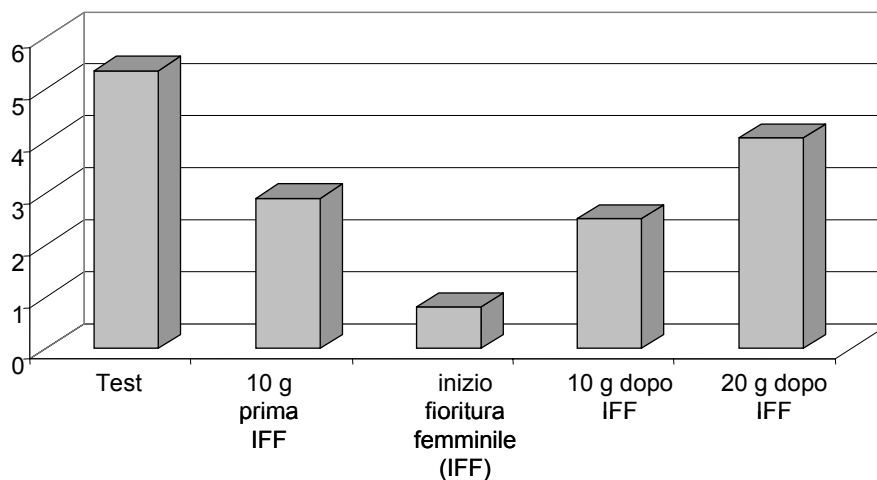


Figura 3. Numero larve di piralide per spiga di mais. Dati medi di due ibridi, due località di prova del Friuli e due anni, 2003 e 2004. Il trattamento insetticida è stato effettuato con Lamda-cyhalothrin in quattro diverse fasi fenologiche del mais. DMS 5% = 0,5.

Conclusioni

Dal monitoraggio effettuato per un quadriennio in regione è emerso che la principale fonte di preoccupazione per la produzione regionale di granella di mais è la fumonisina. Le altre micotossine sono presenti nei campioni di mais solamente in annate particolari oppure quando l'epoca di raccolta è tardiva.

I livelli di aflatossina rilevati sono stati bassi anche nel 2003. Lo zearalenone è presente soprattutto nei campioni di mais raccolti tardi e in ogni caso i livelli raggiunti sono abbastanza bassi. Le altre micotossine sono spesso a livelli irrilevanti o modesti.

Alcune delle tecniche agronomiche sperimentate hanno dato un aiuto limitato nel contenere le infezioni da micotossine. La riduzione della quantità di azoto e la semina anticipata contribuiscono in misura modesta nel limitare lo sviluppo delle micotossine. Un trattamento insetticida con piretroide all'inizio della fioritura femminile del mais e la raccolta anticipata sono le due tecniche cui si ritiene ragionevole attribuire il migliore contributo nella riduzione della fumonisina in mais, riduzione che in alcuni casi è stata superiore al 75%.


APPROCCIO INTEGRATO NELLA FILIERA AGRO-ALIMENTARE PER LA PREVENZIONE DEL RISCHIO MICOTOSSINE

Maurizio Zucchi, Chiara Faenza, Davide Garbini, Claudio Mazzini
Coop Italia S.C., Bologna

Introduzione

Per tutta la filiera agro-alimentare le micotossine rappresentano attualmente uno dei problemi più critici, da tenere sotto controllo per scongiurare gli ormai ben noti e pericolosi effetti avversi sulla salute umana e animale.

Tabella 1. Ranking dei rischi per la salute derivanti dagli alimenti

	ACUTI	CRONICI
RISCHIO ALTO	Microbiologici	Micotossine
	Ficotossine	Contaminanti ambientali
	Fitotossine	Fitotossine
	Micotossine	Dieta sbilanciata
	Contaminanti ambientali	Ficotossine
	Additivi	Microbiologici
	Residui pesticidi	Additivi
	RISCHIO BASSO	Dieta sbilanciata

Nota: tratto da Kuiper-Goodman (1)

L'evoluzione del sistema di gestione del rischio

Dagli anni '90 ad oggi le metodologie attuate per la gestione del rischio micotossine hanno subito una importante trasformazione. Fondamentale è diventato il controllo di filiera. Infatti, è proprio risalendo la filiera che ci si può rendere conto della debolezza di taluni sistemi, incentrati soltanto su analisi di laboratorio saltuarie, magari con metodiche discutibili, su una griglia non completa, e con metodi campionari non rappresentativi della massa.

Oggi un sistema di garanzie efficace deve evolvere verso un approccio integrato basato su disciplinari di filiera, definiti dopo un'attenta analisi dei rischi, con individuazione di GMP e punti critici di monitoraggio efficaci e praticabili, verificati con piani di controllo affidabili.

L'impegno di COOP, circa le azioni intraprese in fatto di prevenzione, può essere riassunto secondo la seguente cronologia:

1989: Sotto le feste natalizie a seguito di auto-controlli di routine di Coop emerge una presenza di aflatossine su fichi secchi provenienti dalla Turchia; fu pertanto deciso il ritiro dalla vendita di svariati lotti incriminati; l'azione correttiva implementata comportò interventi direttamente alla fonte con contatti sia con la produzione sia con gli organi di controllo pubblici turchi, al fine di organizzare l'adozione di adeguati sistemi di controllo e prevenzione in vista della campagna successiva.

1990: Si inizia la campagna di sensibilizzazione nei confronti dei fornitori di materie prime più critiche dal punto di vista del rischio di contaminazione da micotossine, sollecitando nei fornitori la messa a punto di sistemi di autocontrollo atti ad evitare immissioni sul mercato di prodotti potenzialmente non conformi: in particolare, si concentra l'attenzione sui cosiddetti "coloniali" (cacao e caffè).

Si organizza un controllo diretto da parte di Coop, tramite il coinvolgimento del Laboratorio Chimico interno, consistente in:

a) Messa a punto di metodi analitici affidabili per l'analisi micotossine con verifica tramite partecipazione a ring-test e definizione di criteri razionali di campionamento dei prodotti per garantire l'omogeneità dei campioni;

b) Valutazione e selezione di laboratori chimici esterni identificati come idonei per eseguire le analisi di controllo micotossine su materie prime e prodotti finiti;

1999: Viene attivato un approccio di lavoro sistematico per la gestione del rischio, con precise richieste nei confronti del mondo della produzione, tramite l'instaurazione di adatti piani di controllo di campionamento e analisi, e con obiettivo finale quello della possibilità di risalire la filiera (supply chain);

Di seguito vengono emesse le prime linee-guida Coop per la gestione del rischio micotossine sulle materie prime, a cui seguirono diverse revisioni; viene preso come riferimento uno specifico documento FAO/WHO su buone pratiche agricole.

Viene attivato un presidio interno specialistico e permanente relativamente al know-how sulle micotossine e per il controllo analitico su vari tipi di matrici;

2004: Nuova linea-guida Coop per la gestione del rischio micotossine su specifiche matrici (a partire da mais e grano tenero) ampliata, aggiornata e integrata rispetto alla precedente, tramite l'apporto di un Comitato Tecnico-Scientifico specifico per coltura costituito da un team di esperti multi-disciplinare, in grado di affrontare l'argomento da differenti punti di vista; si è focalizzata l'attenzione su un approccio di filiera per la gestione del rischio tramite la definizione di Linee Guida generali di valutazione del rischio, allegati GAP e GMP e istruzioni operative.

Verso la filiera: ocratossina A in caffè e cacao

Grazie alla campagna di sensibilizzazione attuata nei confronti dei fornitori relativamente alla gestione del rischio micotossine, alcuni di essi con filiere critiche quali caffè e cacao hanno iniziato il loro percorso di gestione a ritroso lungo la filiera.

Caffè

Il fornitore COIND nel periodo 2002-2004, con opportuni piani di campionamento e analisi, ha verificato che si poteva ottenere una riduzione del contenuto di ocratossina A (OTA) grazie ad un efficace controllo delle operazioni di raccolta e prime lavorazioni, mentre il processo di torrefazione convenzionale non influiva su un eventuale abbattimento del contaminante in questione.

È stato verificato che la contaminazione del caffè è correlata direttamente all'origine e alla varietà: il "robusta" risulta infatti molto più contaminato rispetto all'"arabica"; relativamente alle origini, si è visto che i caffè africani sono certamente quelli a più alto contenuto di OTA (poi, a scalare, vi sono i caffè asiatici e infine quelli americani che risultano essere i meno contaminati).

Alla luce di questi dati, COIND ha definito una differenziazione di campionamento “arabica” vs “robusta” (sul robusta il campionamento è stato rinforzato) e ha effettuato efficacemente una selezione delle origini di approvvigionamento.

È stato inoltre condotto da parte uno studio sul caffè in Vietnam che ha considerato:

- aree agronomiche (4);
- stadi di sviluppo (prima della maturazione, alla piena maturazione, raccolta del prodotto a terra, prodotto avviato alla de-polpazione, prodotto appena essiccato);
- tempi conservazione prodotto (1-3-6-9-12 mesi);
- T ed HR% (variabili considerate in fase di stoccaggio e lavorazione, considerando anche i fattori ambientali e meteorologici al momento della raccolta);

I risultati del lavoro hanno evidenziato che, per tutte le piantagioni, i valori più elevati di OTA si hanno dopo la fase di essiccazione della drupa e si associano mediamente a valori più elevati di umidità (causa essiccamenti mal condotti).

Cacao

Il fornitore ICAM nel periodo 2001-2003 ha concluso che il fattore critico per l'OTA nelle fave di cacao è la filiera corta, ovvero la minimizzazione del tempo che intercorre tra la raccolta e il ricevimento delle fave.

Con accurati piani analitici e di campionamento, si è potuto stabilire che il cacao africano è certamente più contaminato rispetto a quello centro-sud americano.

Una collaborazione ICAM + UNIMI (Univ.Milano) ha portato alla definizione di un piano HACCP all'origine, con la conseguente definizione di punti critici quali la raccolta, la fermentazione, l'essiccamento.

Micotossine: progetto di filiera Coop 2004

La missione del “Progetto di filiera Coop 2004” è quella di innalzare ulteriormente il livello di garanzie in merito al rischio micotossine, individuando e testando un sistema di prevenzione basato su un approccio integrato specifico per ciascuna filiera.

In particolare le fasi critiche sotto esame sono quelle di pre-trasformazione delle derrate, vale a dire quelle di produzione agricola, prima lavorazione (essiccazione, molitura ecc.) e stoccaggio, per le quali vengono richieste specifiche buone pratiche di lavorazione.

Nello specifico, si è seguito il seguente schema logico:

- 1) Revisione della ns. attuale linea guida con conseguente specializzazione per specifico rischio/coltura (mais, grano tenero, grano duro, cacao, caffè, vino; ecc.);
- 2) Validazione / integrazione delle GAP da parte del Comitato Tecnico-Scientifico;
- 3) Avviamento di due filiere sperimentali : mais (già dal 2003) e grano tenero (dal 2004);
- 4) Test esteso della linea guida già dalle semine 2004/2005;
- 5) Review scientifica di terza parte indipendente delle evidenze oggettive raccolte e loro pubblicazione.

Il Comitato tecnico scientifico (CTS) ha coinvolto i seguenti vari esperti di settore:

- Prof Piva - Prof Pietri - Università di Piacenza;
- Dr Visconti - Dr Lo Grieco - Dr Moretti - CNR di Bari;
- Prof Vecchietini - Prof Cinti - Università di Bologna;

- Dr Delogu - Dr Terzi - Dr Berardo – Istituto di Cerealicoltura di Fiorenzuola e Bergamo;
- Prof Reyneri – Università di Torino;

Sono state individuate e avviate due filiere sperimentali sul mais specificatamente per uso umano (Molino Nicoli, con proprio centro di stoccaggio) e per uso alimentazione animale (CALV Verona).

La documentazione prodotta da Coop, come risultato dell'intero percorso di sperimentazione, è costituita da una linea guida (LG) generale: tale documento descrive la modalità di conduzione dell'analisi del rischio potenziale per le varie materie prime, l'individuazione di differenti classi di rischio, le modalità di campionamento, le azioni preventive, di controllo e correttive per una corretta gestione. Vi è infine una sezione dedicata all'analisi dei dati.

A completamento di tale documentazione, che individua e quantifica il rischio in termini generali, sono stati redatti inoltre alcuni allegati che dettagliano le GAP e le istruzioni operative relativamente alla specifica coltura (al momento mais e grano).

Nell'allegato GAP mais, ad esempio, vengono specificate modalità di trattamento terreni (avvicendamento colturale, gestione delle lavorazioni del terreno), qualità del seme, concimazione, densità di semina, gestione delle infestanti, difesa dalle nottue terricole e dalla piralide, irrigazione, raccolta e post raccolta (controlli al ricevimento, pulitura, essiccazione, stoccaggio, trasporto).

Nel medesimo documento è presente una analisi del rischio basata sull'approccio HACCP con definizione di punti critici di controllo che nel caso specifico del mais risultano essere: trattamento piralide, modalità e tempi di raccolta e fase di essiccazione.

L'allegato istruzioni operative fornisce invece indicazione di quali e quanti principi attivi utilizzare per la concia del seme, la gestione delle infestanti, la difesa dalle nottue terricole, la difesa dalla piralide.

Nell'allegato limiti di legge sono stati infine riportati i valori di riferimento cogenti suddivisi per alimentazione umana e animale.

Una prima sperimentazione della linea guida mais nel 2003, ha portato ad una riduzione, per quanto riguarda il contenuto di aflatossina B₁, superiore al 50% sia sul "verde" che sull'essiccato.

Relativamente ai controlli analitici, sono state definite specifiche istruzioni operative a disposizione dei laboratori chimici coinvolti e dei fornitori.

In particolare, i controlli analitici di routine, eseguiti tutti secondo metodica ufficiale, si basano sulla seguente griglia di controllo: tutte quelle micotossine già sottoposte a legislazione + DON, fumonisine, T2 ed HT2 (per queste ultime non sono ancora stati definiti limiti di legge).

In cifre, le analisi sui prodotti finiti e semilavorati sono di oltre 700 campioni nel biennio 2002/2003, e più di 750 nel solo 2004.

Sono stati previsti controlli analitici rafforzati sulle seguenti matrici: pasta, latte, prodotti base mais, latticini, frutta secca, cacao, cioccolato e caffè.

Eventi transgenici e micotossine

Sul tema prevenzione del rischio da micotossine, altro aspetto in fase di approfondimento è quello relativo agli effetti indotti da eventi transgenici.

Alcuni studi (2) hanno enfatizzato il beneficio collaterale del mais Bt nel ridurre le infestazioni di *Fusarium* e quindi l'attacco sulla granella, indicando una possibile correlazione tra i danni provocati dalla piralide e le infezioni fungine.

A partire dal 1999 sono stati condotti degli studi in campo con cloni transgenici resistenti alla piralide dove si misurava, oltre che i livelli di danni prodotti dagli insetti, anche l'entità dell'infezione fungina e i livelli di micotossine. Le prove condotte, sia negli Stati Uniti (3, 4, 5, 6) che in Europa (7, 8), ad oggi non risolvono i dubbi in quanto i risultati sono discordanti o spesso parziali.

Infatti, se in alcuni casi si trovava un minore livello di tossine nelle piante transgeniche, in altri casi non si rilevavano variazioni di rilievo.

I risultati che correlano gli eventi transgenici con le micotossine pare siano positivi e apprezzabili solo relativamente alle infezioni da *Fusarium* e solo limitatamente alle fumonisine. I risultati pare siano infatti influenzati dal genotipo transgenico (ad esempio Mon810 è superiore all'evento 176), dalle condizioni pedo-climatiche e ambientali, dalla presenza di altre infestazioni e/o di specie opportuniste (insetti e/o funghi).

In conclusione non esistono al momento dati che confermino una correlazione tra evento transgenico e contenuto di micotossine relativamente a aflatoxine, DON, OTA e tricoteceni (9).

Bibliografia

1. Kuiper-Goodman T. Approaches to the risk analysis of mycotoxins in the food supply. Disponibile all'indirizzo http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/X2100T/X2100t03.htm.
2. Pietri A, Piva G. Presenza e controllo delle micotossine in mais coltivato in Italia-"6th International Feed Production Conference" Piacenza 27-28 Novembre 2000-Comunicazione.
3. Munkvold GP, Hellmich RL, Tice LG. Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt maize hybrids and not transgenic hybrids. *Plant Disease* 1999;83 (2):130-8.
4. Dowd PF. Indirect reduction of ear moulds and associated mycotoxins in *Bacillus thuringiensis* corn under controlled and open field conditions: utility and limitations. *Ecotoxicology* 2000; 96 (6):1669-1779.
5. Dowd PF. Biotic and abiotic factor limiting efficacy of Bt corn in indirectly reducing mycotoxin levels in commercial fields. *Ecotoxicology* 2001;94 (4):1067-74.
6. Hammond BG, Campbell KW, Pilcher CD, DeGooyer TA, Robinson AE, McMillen BL, Spangler SM, Riordan SG, Rice LG, Rochard JL. Lower fumonisin mycotoxin levels in the grain of Bt corn grown in the United States in 2000-2002. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:1390-7.
7. Bakan B, Melcion D, Richard-Moland D, Cahagnier B. Fungal growth and *Fusarium* mycotoxin content in isogenic traditional maize and genetically modified maize grown in France and Spain. *Agric. Food Chem.* 2002;50:728-731.
8. Magg T, Melchinger E, Klein D, Bohn M. Relationship between European corn borer resistance and concentration of mycotoxins produced by *Fusarium* spp. in grains of transgenic Bt maize hybrids, their isogenic counterparts, and commercial varieties. *Plant Breeding* 2002;121:146-154.
9. INRAN, MIPAF Ricerche sugli OGM in agricoltura lavori in corso. Sottoprogetto "Centro di documentazione OGM" Roma: Sala delle statue di Palazzo Rospigliosi; 5 ottobre 2004.

Quarta sessione
METODI DI ANALISI E CAMPIONAMENTO

PROBLEMATICHE LEGATE ALLA FASE ANALITICA NELLA DETERMINAZIONE DELLE MICOTOSSINE NEI PRODOTTI ALIMENTARI

Carlo Brera e Marina Miraglia

Reparto OGM e Xenobiotici di Origine Fungina, Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

La valutazione della concentrazione di un analita eterogeneamente distribuito, come le micotossine, in una derrata alimentare, riveste particolare importanza e attenzione in quanto gli errori associati ad ogni elemento della fase diagnostica sono in grado di rendere non attendibile il dato analitico finale osservato.

Le difficoltà che si riscontrano per la determinazione delle micotossine nasce dalla natura estremamente eterogenea della contaminazione che obbliga ad osservare, all'atto del prelievo del campione, una serie di procedure per garantire la caratteristica principale che un campione prelevato da una massa deve possedere, vale a dire la rappresentatività. Scegliere un campione da una popolazione significa effettuare un «campionamento».

Indipendentemente dagli obiettivi, raramente in uno studio è possibile esaminare ogni singolo elemento dell'intera popolazione da campionare (risorse economiche limitate, personale, laboratori ecc.). Pertanto, l'esame di un campione, ossia di un numero ridotto di osservazioni, piuttosto che della intera popolazione, consente di superare i problemi ora accennati. Un campione non è altro che un sottoinsieme della popolazione.

La normativa europea e nazionale degli ultimi anni è stata formulata sulla base di alcuni criteri omogenei quali la tutela della salute pubblica, la praticabilità da un punto di vista tecnologico, l'esistenza di un metodo di analisi validato e di un metodo di campionamento caratterizzati da componenti di natura statistica e pragmatica.

In particolare, a livello comunitario, la fase diagnostica è stata ampiamente regolamentata sia con l'emanazione di Direttive ad hoc, verticali e orizzontali, sia con norme riguardanti la definizione di metodi validati e la fissazione delle caratteristiche di efficienza dei metodi per la determinazione delle micotossine (1). La diagnostica relativa alla valutazione delle micotossine in una derrata alimentare si compone delle seguenti fasi: campionamento, preparazione del campione e determinazione quali/quantitativa.

Nella valutazione di un analita in una derrata alimentare in massa, l'errore totale riferibile all'intera "filiera analitica" deve essere considerato come la somma dei contributi dovuti all'errore del campionamento, della preparazione del campione e quello dell'analisi (Figura 1).

Gli errori associati a ciascuna fase sono stati ampiamente caratterizzati anche se non univocamente quantificati da numerosi studi a partire dagli anni '70.

Fonti di errore

Il campionamento

Per quanto concerne la fase di campionamento, essa riveste una particolare importanza in quanto è in grado di condizionare fortemente l'accuratezza della misura associata al contenuto di micotossina in una derrata alimentare.

Esistono diverse tipologie di campionamento come il campionamento di tipo casuale, sistematico, a grappolo e stratificato, di carattere probabilistico e non probabilistico. Per le micotossine la tipologia di campionamento più idonea è quella di tipo "casuale", in cui la condizione essenziale è che ogni campione elementare abbia la stessa probabilità di essere scelto (*Random sampling*).

Un'ulteriore differenziazione è quella che si riferisce al campionamento statico e a quello dinamico. Per le micotossine, il campionamento dinamico è senz'altro quello che offre le maggiori garanzie di praticabilità.

Per una sostanza o materiale eterogeneamente distribuiti in una derrata alimentare, come nel caso delle micotossine, studi effettuati su basi statistiche hanno evidenziato che nella valutazione della loro concentrazione all'interno della partita, l'errore attribuibile al campionamento costituisce, nella stima dell'errore totale, un contributo di gran lunga superiore a quello riferibile agli altri stadi del ciclo analitico, vale a dire la preparazione del campione e l'analisi quantitativa (Figura 2) (2).

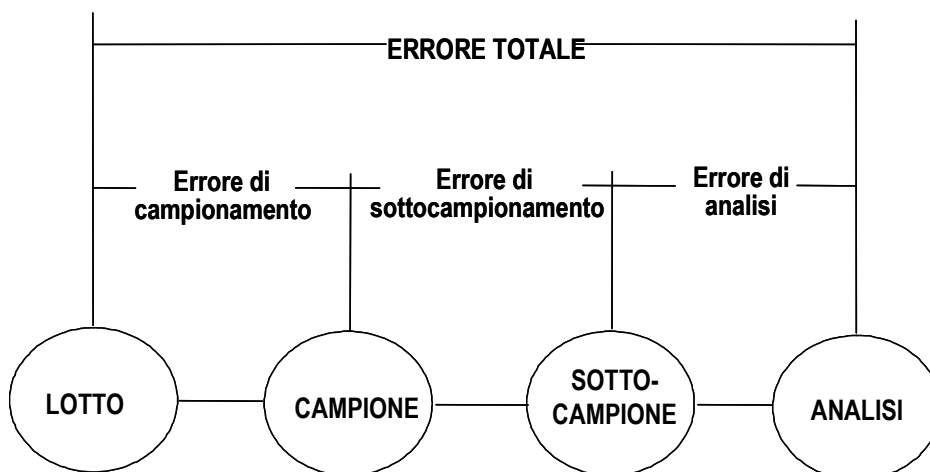


Figura 1. Somma dei contributi all'errore totale nella filiera analitica

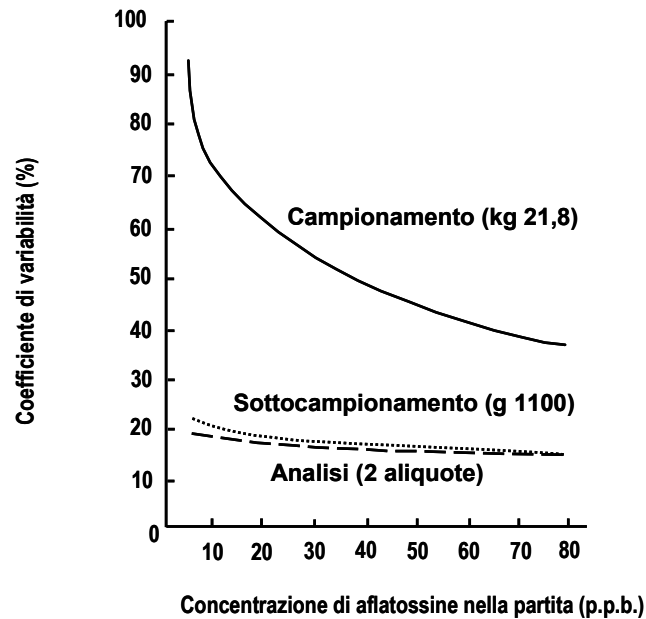


Figura 2. Errore associato alla fase di campionamento ed errori riferibili alle altre fasi del ciclo analitico per le aflatoxine nelle arachidi

In considerazione della percentuale di grani contaminati da micotossine che in media si riscontra nelle merci sfuse, che varia dall'1 al 3%, e della distribuzione estremamente eterogenea è stato calcolato un errore dovuto al campionamento pari al 90%.

La variabilità associata alla misura della contaminazione da aflatoxina B1 è stata recentemente quantificata correlandola alla grandezza del campione globale (2). Riducendo la grandezza di tale campione si osserva un aumento dell'intervallo di concentrazione e conseguente aumento dell'errore dovuto ad un non corretto campionamento come riportato in Tabella 1.

Tabella 1. Errore di campionamento associato alla grandezza del campione globale

Grandezza del campione (kg)	Numero di semi	Variabilità ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
5.0	30,000	11.6 - 28.4
2.5	15,000	8.1 - 31.9
1.25	7,500	3.2 - 38.8
0.5	3,000	1 - 46.9

Questo andamento può essere visualizzato dalle curve delle caratteristiche operative standards (OC) di cui in Figura 3 viene dato un profilo esemplificativo. In generale tali curve, caratteristiche per ogni tipo di modalità di campionamento e per ogni matrice alimentare, riportano l'errore del campionamento in funzione della concentrazione dell'analita. Pertanto, unitamente all'andamento ideale, le curve OC individuano il rischio (linea tratteggiata) che si può avere, utilizzando quel piano di campionamento, di rifiutare lotti che dovrebbero essere

accettati o di accettare lotti che dovrebbero essere rifiutati (rispettivamente rischio per il produttore o per il consumatore).



Figura 3. Curve caratteristiche operative standard (curve OC) per la programmazione di piani di campionamento

Le principali fonti di errore sono riconducibili ai seguenti aspetti:

- basso numero dei campioni incrementali;
- scarsa rappresentatività dei punti di campionamento;
- inadeguata grandezza del campione globale.

La riduzione dell'errore del campionamento pertanto è generalmente effettuabile solo attraverso lo sviluppo di piani di campionamento messi a punto in maniera adeguata.

Il problema del campionamento è stato studiato dal punto di vista statistico e in maniera esaustiva solo per le aflatoossine. Per le altre tossine si considerano validi gli stessi criteri, anche se non esistono trattazioni specifiche basate su principi statistici. Gli studi effettuati per le aflatoossine hanno dimostrato che piani di campionamento in grado di ridurre l'errore del campionamento a valori vicini all'errore analitico sarebbero troppo onerosi dal punto di vista pratico ed economico. Pertanto, le disposizioni legislative emanate a livello comunitario si sono basate non solo sui principi statistici, ma anche su principi di applicabilità.

Preparazione del campione

La macinazione del campione riduce la matrice in parti granulari più piccole. Il numero di particelle per unità di massa dipende dalla tipologia di mulino impiegato. La concentrazione delle micotossine risulta disomogenea tra le varie parti molite; pertanto la relativa concentrazione derivante da analisi replicate può variare significativamente. L'errore associato alla preparazione del campione, come detto in precedenza è comunque largamente inferiore a quello del campionamento. Tuttavia questa fase riveste particolare importanza in quanto una non corretta omogeneizzazione del campione può portare a scarsa precisione in termini di ripetibilità e riproducibilità nell'analisi quantitativa. Anche in questa fase, pertanto, si devono applicare i concetti e i principi esposti per il campionamento, cercando di effettuare procedure

applicare i concetti e i principi esposti per il campionamento, cercando di effettuare procedure che garantiscano la massima rappresentatività dell'aliquota da saggio rispetto al campione di appartenenza. Le principali fonti di errore in questa fase sono essenzialmente da attribuire ad una scarsa omogeneità dell'aliquota macinata, ad una disomogeneità delle dimensioni delle parti granulari dell'aliquota da sottoporre all'analisi e ad un errato prelievo dell'aliquota stessa. Per ridurre la varianza associata alla scarsa omogeneità delle parti granulari dell'aliquota si può sia effettuare una macinazione più fine o a secco o mediante aggiunta di acqua (tecnica dello slurry), sia aumentare la grandezza del campione e il numero delle aliquote prelevate. Inoltre, l'aliquota deve essere sempre formata, specie nel caso di macinazioni a secco, da piccole aliquote prelevate a caso in varie parti del campione, in modo da ottenere un'aliquota finale il più rappresentativa possibile.

Analisi quantitativa

L'aliquota destinata all'analisi dopo opportuna omogeneizzazione, subisce i seguenti passaggi: estrazione dalla matrice e/o centrifugazione, filtrazione, diluizione, purificazione, essiccamento e quantificazione. Pertanto, l'errore totale associato alla fase di analisi quantitativa sarà la sommatoria di tutti gli errori associati ad ogni singola fase. La variabilità analitica può essere ridotta aumentando il numero di aliquote analizzate, utilizzando strumentazione tecnologicamente avanzata (in termini di variabilità HPLC < ELISA < TLC) e impiegando personale qualificato.

Più dettagliatamente, i principali errori attribuibili alla fase della analisi quantitativa sono da ricondurre essenzialmente ad un limitato uso di materiali di riferimento (certificati), ad un limitato uso dei fattori di recupero nel calcolo della concentrazione, all'uso di metodi non validati internamente o esternamente al laboratorio, alla mancanza di carte di controllo per la verifica della precisione, e alla mancata partecipazione a studi collaborativi interlaboratorio (proficiency testings) per la verifica della efficienza del laboratorio.

I parametri che solitamente caratterizzano le procedure analitiche sono i seguenti:

- esattezza;
- precisione (ripetibilità e riproducibilità);
- robustezza;
- selettività;
- sensibilità;
- versatilità;
- buon rapporto costo/efficienza.

La normativa

Sulla base delle considerazioni precedentemente menzionate, a livello comunitario si è deciso di impiegare un piano di campionamento elaborato su basi pragmatiche, in grado di conciliare l'effettuazione pratica delle operazioni di campionamento con l'esigenza di ottenere un campione per l'analisi sufficientemente rappresentativo dell'intera partita. Questo piano di campionamento è descritto in alcune Direttive Comunitarie che si riferiscono, peraltro, come criterio di formulazione di base, alla normativa specifica che regola il controllo delle aflatossine in alcune derrate alimentari, segnatamente la Direttiva 98/53/CE, che è stata recepita a livello nazionale con il Decreto Legislativo 23 dicembre 2000 e successivamente emendata dalla Direttiva 2002/27/CE della Commissione del 13 marzo 2002 recepita con il Decreto

Ministeriale del 31 maggio 2003, dalla Direttiva 2003/121/CE della Commissione del 15 dicembre 2003 recepita con il DM 17 novembre 2004, e dalla Direttiva 2004/43 del 13 aprile 2004 non ancora recepita a livello nazionale. Inoltre, sono state emanate Direttive Comunitarie e nazionali anche per altre micotossine come l'ocratossina A (D.M. 31 maggio 2003, Direttiva CE 2004/43 del 13 aprile 2004 e Direttiva CE 2005/5 del 26 gennaio 2005) e la patulina (DM 17 novembre 2004). Sono inoltre in fase di discussione analoghi provvedimenti legislativi per le fusariotossine. Le procedure di campionamento citate si applicano sia per le merci alla rinfusa o in containers (importazione, silos, mezzi di trasporto, ecc.) sia per le merci vendute al dettaglio. Nelle Tabelle 2-4 sono riassunti i provvedimenti legislativi citati.

Tabella 2. Legislazione comunitaria e nazionale sul campionamento - Aflatossine

Normativa CE	Normativa Nazionale
Mais – Direttiva 2003/121/CE del 15.12.2003	Decreto 17 novembre 2004 - (GU n. 9 del 13-1-2005)
Spezie – Direttiva 2002/27/CE del 13 March 2002	Decreto 31 maggio 2003 (GU n. 161 del 14-7-2003)
Cereali, frutta secca – Direttiva 1998/53/CE DEL 16.7.1998	DM 23.12.2000 (GU n. 33 del 09-02-2001)
Prodotti per l'infanzia – Direttiva 2004/43/CE del 13.4.2004 - <i>Gazzetta ufficiale dell'Unione europea n. L 113 del 20/04/2004, pag. 14 - 16</i>	-----
Mangimi – Direttiva 1976/371/CE del 1.3.1976	DM 20.4.1978 (GU 15 giugno 1978, n. 165)

Tabella 3. Legislazione comunitaria e nazionale sul campionamento - ocratossina

Normativa CE	Normativa Nazionale
Vino, Succo d'uva, Uve secche, Cereali - Direttiva 2005/5/CE del 26.1.2005 - <i>Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, n. L27 del 29.1.2005, pag. 38-40</i>	-----
Cereali, Uve secche – Direttiva 2002/26/EC del 13 Marzo 2002	DECRETO 31 maggio 2003 (GU n. 167 del 21.07.2003)
Prodotti per l'infanzia – Direttiva 2004/43/CE del 13.4.2004 - <i>Gazzetta ufficiale dell'Unione europea n. L 113 del 20/04/2004, pag. 14 - 16</i>	-----

Tabella 4. Legislazione comunitaria e nazionale sul campionamento - Patulina

Normativa CE	Normativa Nazionale
Succhi di frutta, composte di frutta Direttiva 2003/78/EC dell'11 Agosto 2003 (inclusi i prodotti destinati all'infanzia)	DM 17 novembre 2004 (GU n. 9 del 13-1-2005)

Bibliografia

1. 1. Comité Européen de Normalisation (CEN) - Food analysis - Biotoxins - Criteria of analytical methods for mycotoxins. CR 13505; 1999.
2. 2. Whitaker TB. Sampling for mycotoxins. In: Magan N, Olsen M (Eds.). Mycotoxins in food: detection and control. Cambridge (UK): Woodhead Publishing Limited; 2004.p.704. 2004.

CAMPIONAMENTO DI GRAPPOLI IN VIGNETO PER LA STIMA DEL CONTENUTO DI OCRATOSSINA A NEL MOSTO

Carlo Barbano, Paola Battilani, Vittorio Rossi, Terenzio Bertuzzi, Amedeo Pietri

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

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

Introduzione

Il campionamento rappresenta una considerevole fonte di errore nella quantificazione del contenuto di micotossine nelle derrate agrarie, a causa della notevole eterogeneità con cui le micotossine si distribuiscono nei prodotti (1, 2). In particolare, nelle uve il contenuto di ocratossina A (OTA) in acini dello stesso grappolo e in grappoli della stessa pianta può essere molto diverso (3).

La stima corretta del livello di contaminazione delle uve in vigneto consentirebbe una migliore gestione del rischio nella filiera viti-vinicola (4, 5).

Lo scopo di questo lavoro è stato mettere a punto un protocollo di campionamento per la stima del livello di contaminazione da OTA delle uve prima della raccolta.

Materiali e metodi

Campionamento dei grappoli e analisi dell'OTA

Nel 2002, alla vendemmia, sono stati raccolti grappoli in due vigneti pugliesi, situati in località San Pancrazio Salentino (BR). Nel vigneto 1 (V1) erano coltivate uve di varietà Negroamaro, allevate ad "Alberello", nel vigneto 2 (V2) uve di varietà "Sangiovese", allevate a "Tendone" (Figura 1).

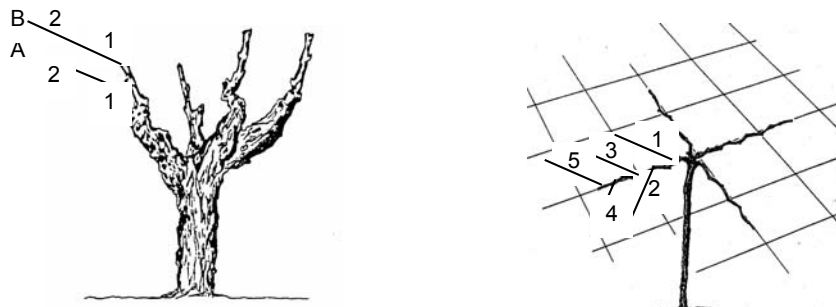


Figura 1. Rappresentazione schematica delle forme di allevamento "Alberello" e "Tendone". Le linee rappresentano i tralci, e i numeri progressivi indicano i grappoli

I grappoli sono stati raccolti da dieci piante individuate lungo le diagonali e dieci individuate lungo le perpendicolari passanti per il centro del vigneto, per un totale di 20 piante campionate in ciascun vigneto. Le piante distribuite lungo le diagonali sono state numerate da 1 a 10; le piante distribuite lungo gli assi perpendicolari sono state numerate da 11 a 20.

Dalle piante contrassegnate sono stati prelevati tutti i grappoli presenti su un capo a frutto scelto a caso, sia nell'Alberello che nel Tendone.

I grappoli prelevati dalle piante da 1 a 10 sono stati numerati progressivamente, a partire da quelli più vicini al ceppo, secondo lo schema riportato in Figura 1. I grappoli raccolti sono stati pesati e pigiati singolarmente; il mosto ottenuto da ciascuno di essi è stato analizzato per quantificare il contenuto di OTA per grappolo. Il contenuto di OTA per pianta è stato calcolato ponderando il contenuto di OTA di ciascun grappolo di una pianta per il suo peso e sommando i valori relativi a tutti i grappoli con la seguente equazione:

$$OTA_{pianta} = \frac{\sum_{x=1}^n (OTA_x * peso_x)}{\sum_{x=1}^n (peso_x)} \quad (1)$$

dove n è il numero di grappoli prelevato da ogni pianta.

I grappoli prelevati dalle piante da 11 a 20 sono stati pigiati insieme e il mosto ottenuto è stato analizzato per misurare il contenuto di OTA per pianta.

Il contenuto di OTA dei mosti è stato determinato mediante HPLC (6). I valori di contenuto di OTA sono espressi in $ng\ kg^{-1}$.

Elaborazione dei dati

Prima di eseguire l'elaborazione statistica, i 20 valori di contenuto di OTA per pianta, relativi ai due vigneti, sono stati trasformati nei rispettivi valori logaritmici (secondo la funzione logaritmo naturale). Sui valori trasformati è stato eseguito il test di Kolmogorov-Smirnov per un campione, al fine di verificare se la distribuzione dei dati fosse conforme a quella normale. Quindi, accertata la normalità dei dati, sono stati calcolati media, deviazione standard e intervallo di confidenza (al 95% di probabilità) per ciascun vigneto.

I valori ottenuti sono stati inseriti in un database, mantenendo i riferimenti al vigneto, alla pianta e al numero del grappolo. Quindi, sono state eseguite simulazioni di campionamento, per valutare la capacità dei diversi disegni di stimare correttamente il contenuto di OTA delle uve direttamente in vigneto. Sono stati testati tre diversi schemi:

1. campionamento casuale di 10, 20 o 40 grappoli;
2. campionamento di tutti i grappoli di una pianta;
3. campionamento da piante diverse di grappoli che occupano la medesima posizione sulla pianta.

Lo schema di campionamento 1. è stato testato solo nel vigneto 1. Sono stati campionati casualmente 10, 20, e 40 grappoli, scelti tra tutti quelli raccolti dalle piante 1 – 10, mediante la funzionalità di Microsoft Excel in grado di generare numeri casuali. La simulazione è stata ripetuta in tutti i casi 10 volte. Lo schema di campionamento 2. è stato testato in entrambi i vigneti. I campioni sono stati ottenuti raccogliendo tutti i grappoli di una pianta, pertanto sono state condotte 20 simulazioni per ciascun vigneto. Lo schema di campionamento 3. è stato testato in entrambi i vigneti. I campioni sono stati formati prelevando grappoli che occupavano sempre la medesima posizione sulla pianta, secondo diverse combinazioni. Sono state condotte 11 simulazioni in V1 e 10 in V2.

Il contenuto medio di OTA dei campioni formati è stato calcolato ponderando il contenuto di OTA di tutti i grappoli del campione per il loro peso, secondo l'equazione 1. I valori ottenuti sono stati confrontati con le statistiche relative al vigneto, valutando la frazione di campioni compresi entro i limiti dell'intervallo di confidenza della media del vigneto e calcolando lo scostamento percentuale dalla media ($\Delta\%$):

$$\Delta\% = \frac{(OTA_{campione}) - (OTA_{vigneto})}{(OTA_{vigneto})} * 100 \quad (2)$$

Il valore medio di OTA del vigneto è stato stimato come media delle 20 piante campionate in ciascun vigneto.

Risultati

Sono stati raccolti 81 grappoli in V1 e 71 grappoli in V2, dalle piante da 1 a 10. Il contenuto di OTA dei singoli grappoli è risultato molto variabile. In V1 si è registrato un valore minimo di 12 ng kg^{-1} e un massimo di $355886 \text{ ng kg}^{-1}$. In V2 non è stata rilevata presenza di OTA, almeno in un grappolo, in otto piante su dieci; valori superiori a 1000 ng kg^{-1} sono stati rilevati solo sporadicamente; un solo grappolo conteneva più di $100000 \text{ ng kg}^{-1}$. Il livello medio di contaminazione di V1 è risultato pari a 5531 ng kg^{-1} mentre quello di V2 è stato pari a 980 ng kg^{-1} . In V1 la media dei valori trasformati è stata 7.88 ± 0.585 , mentre in V2 è stata 5.23 ± 0.675 .

Lo schema di campionamento 1. ha stimato il livello di contaminazione del vigneto entro l'intervallo di confidenza in 5 casi su 10 quando erano stati campionati 10 grappoli, in due casi su dieci quando erano stati campionati 20 grappoli, e in 5 casi su 10 quando erano stati campionati 40 grappoli. La differenza dalla media si è attestata tra +25% e -18% quando erano stati campionati 10 grappoli, tra +18% e -9% quando erano stati prelevati 20 grappoli, tra +15% e -5% nel caso di 40 grappoli.

Lo schema di campionamento 2. è stato in grado di stimare correttamente il livello di contaminazione delle uve nel 30% delle simulazioni effettuate in V1, e nel 40% delle simulazioni effettuate in V2. La differenza dalla media è stata compresa tra -25% e +33% in V1, e -48% e +73% in V2.

Nelle simulazioni condotte utilizzando lo schema di campionamento 3. si è riusciti a stimare correttamente il valore di contenuto di OTA di V1 in 4 casi su 11, registrando scostamenti dalla media compresi tra un minimo di -12% e un massimo +14% (Figura 2).

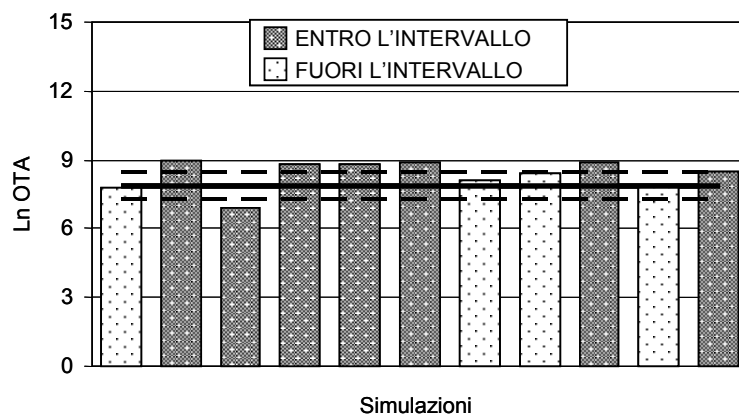


Figura 2. Risultato delle simulazioni effettuate in V1 con lo schema di campionamento 3. Le linee tratteggiate rappresentano i limiti dell'intervallo di confidenza e la linea continua la media di V1

In V2, lo stesso metodo ha portato a stimare correttamente il livello di contaminazione del vigneto 7 volte su 10; nei tre casi in cui il valore stimato non era compreso nell'intervallo di confidenza calcolato, lo scostamento della media è stato pari a +13%, +76%, -41% rispettivamente (Figura 3).

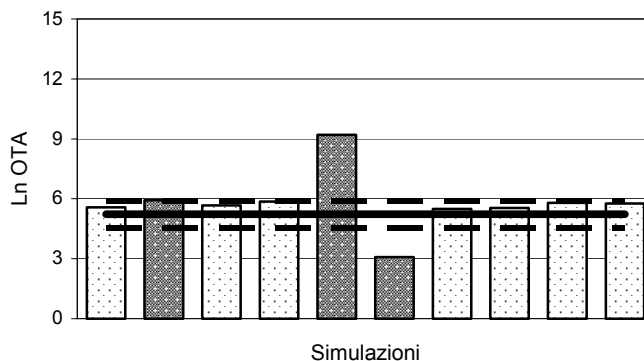


Figura 3. Risultato delle simulazioni effettuate in V2 con lo schema di campionamento 3. Le linee tratteggiate rappresentano i limiti dell'intervallo di confidenza e la linea continua la media di V2

Discussione e conclusioni

I due vigneti considerati nella prova presentavano un contenuto di OTA delle uve molto diverso, e in particolare sensibilmente più elevato in V1.

Le prestazioni dello schema di campionamento 1., testato solo sulle uve molto contaminate di V1, sono migliorate progressivamente passando dal prelievo di 10 grappoli al prelievo di 40 grappoli, sia in termini di corretta stima della media sia in termini di scostamento percentuale del valore stimato dalla media.

Lo schema di campionamento 2. è risultato essere il meno efficace nello stimare il valore di contenuto medio di OTA del vigneto; inoltre, la percentuale di scostamento dalla media è risultata in entrambi i vigneti sensibilmente più elevata rispetto a quella osservata con gli altri metodi testati. Gli scostamenti dalla media più elevati si sono comunque registrati in V2, dove la presenza di grappoli molto contaminati è stata inferiore.

Utilizzando lo schema di campionamento 3. si è riusciti a stimare correttamente il livello medio di contaminazione delle uve in più del 50% delle simulazioni effettuate nei due vigneti. Quando il valore stimato non è rientrato nell'intervallo di confidenza calcolato, la differenza dalla media è stata comunque inferiore al 15%, ad eccezione di due simulazioni effettuate in V2. Pertanto, questa metodologia di campionamento può essere considerata la più soddisfacente per la determinazione del contenuto di OTA delle uve prima della raccolta, dato che i risultati sono stati accettabili sia con livelli di contaminazione alti che bassi.

Bibliografia

1. Whitaker TB. Sampling for mycotoxins. In: Magan N, Olsen M (Ed.). *Mycotoxins in food: detection and control*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2004. p. 69-87.
2. Battilani P, Giorni P, Pietri A. Epidemiology of toxin producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. *European Journal of Plant Pathology* 2003;109:715-722.

3. Battilani P, Pietri A, Giorni P, Bertuzzi T, Barbano C. Growth and ochratoxin A production of *Aspergillus* section *Nigri* isolates from Italian grapes. *Aspects of Applied Biology* 2003;68:175-180.
4. Battilani P, Pietri A, Logrieco A. Risk assessment and management in practice: ochratoxin in grapes and wine. In: Magan N, Olsen M (Ed.). *Mycotoxins in food: detection and control*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2004. p. 244-261.
5. Battilani P, Pietri A, Mulè G, Controllo dei funghi tossigeni nella vite. *Informatore fitopatologico* 2004;54(4):16-19.
6. Battilani P, Logrieco A, Giorni P, Cozzi G, Bertuzzi T, Pietri A. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties grown in Italy. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2004;84:1736-1740.

CONTROLLO CON IL METODO ELISA DEL TENORE DI OCRATOSSINA A NEL CAFFÈ VERDE IN ARRIVO ALLA TORREFAZIONE DOPO SDOGANAMENTO

Faustina Marcella Bertollo, Luca Gradassi, Emiliano Dragoni, Serena Pancioni
Laboratorio CSA Srl, Arezzo

Introduzione

La torrefazione presa in esame è presente sul mercato italiano da più di cinquanta anni ed è ormai una delle più importanti realtà del panorama aziendale del settore.

La maggior parte dell'attività è rivolta alla produzione di caffè macinato e in grani, la cui commercializzazione viene diversificata a seconda delle varie fasce di mercato. Affiancata alla produzione di caffè vi è poi il confezionamento e la commercializzazione anche di zucchero ed estratto d'orzo, sempre in diverse referenze in funzione del mercato a cui è indirizzato.

I prodotti, oltre ad essere commercializzati sul mercato nazionale, vengono venduti in numerose nazioni europee ed extra europee, dall'America all'Asia.

Le fasi di lavorazione dell'azienda sono strutturate in modo tale da rispondere ai requisiti delle norme ISO 9001:2000 e BRC, secondo le quali è certificata.

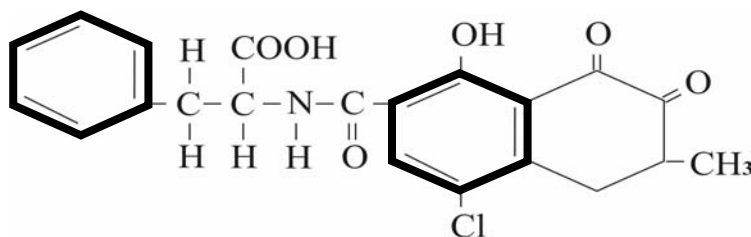


Figura 1. Formula di struttura chimica del ocratossina A

Le materie prime utilizzate dall'azienda sono rappresentate quasi esclusivamente da caffè verde. Il caffè verde arriva presso lo stabilimento generalmente in sacchi di juta, disposti su pallets in legno. Prima di arrivare allo stabilimento di produzione, il caffè viene sottoposto alle operazioni di "sdoganamento" presso un deposito portuale dove avvengono anche le prime attività di controllo visive e il prelievo, secondo specifiche aziendali normative (Direttiva 2002/26/CE del 13/03/2002), di un campione da sottoporre ad esame per la determinazione del tenore di ocratossina A. Il campione prelevato viene inviato direttamente al laboratorio di analisi tramite corriere.

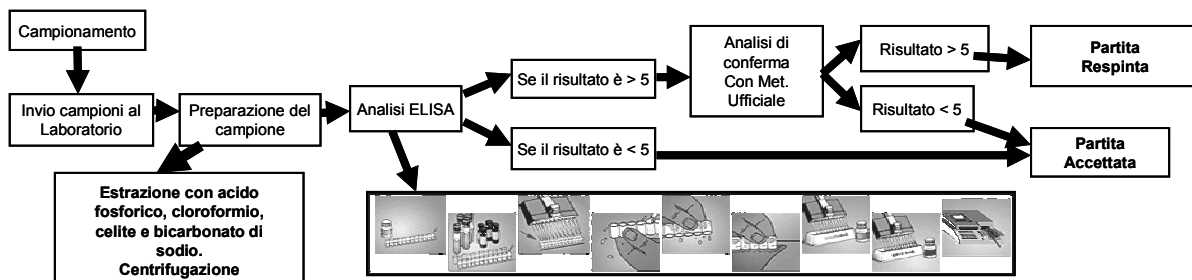


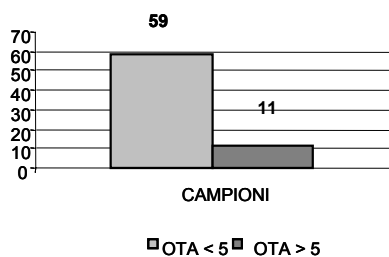
Figura 2. Schema di controllo

Risultati

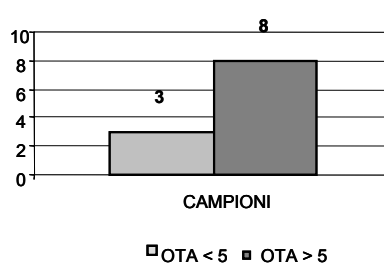
Sono state controllate n. 70 partite di caffè verde, tra varietà Arabica e Robusta, in arrivo alla torrefazione; l'84% di queste, pari a 59 campioni, ha evidenziato un contenuto di ocratossina A inferiore al limite critico imposto dalle procedure aziendali ($5 \mu\text{g}/\text{kg}$), mentre il 16% è risultato avere un contenuto di ocratossina A superiore al limite prefissato dall'azienda; questi sono stati successivamente testati con metodo ufficiale (HPLC).

Le analisi eseguite con metodo ufficiale hanno confermato che il 72% dei campioni, pari a 8, ha un contenuto di ocratossina A superiore a $5 \mu\text{g}/\text{kg}$, mentre nel 26% dei casi, pari a soli 3 campioni, l'esito è stato invertito; dei campioni con contenuto superiore a $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ di ocratossina A il 75% è di varietà Robusta e il 25% di varietà Arabica.

TOTALE CAMPIONI ESAMINATI



ESITO ANALISI HPLC



VARIETA' CON ESITO NEGATIVO

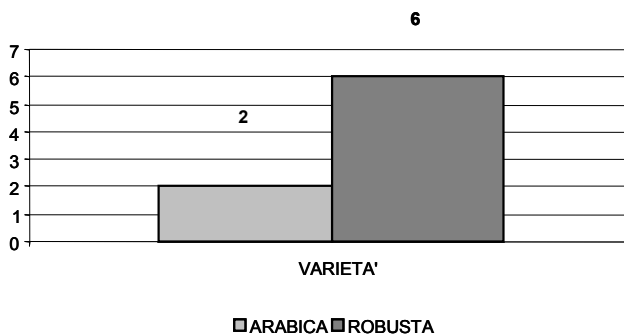


Figura 3. Risultati finali

Conclusioni

Il problema della contaminazione dei prodotti agroalimentari da micotossine è talmente complesso che spesso la sua risoluzione dipende dall'efficacia dei programmi di monitoraggio, a sua volta legata al corretto campionamento e al numero dei campioni analizzati per ogni partita. Benchè i metodi classici chimico-fisici (HPLC, GC-MS) garantiscano un'elevata sensibilità e specificità, è necessario disporre di metodi di analisi rapidi, sensibili e accurati che permettano una fase di screening atta a velocizzare il processo di controllo. Inoltre molte aziende non sono in grado di fare gli investimenti necessari per attivare le analisi cromatografiche e hanno comunque la necessità di verificare rapidamente la qualità delle materie prime impiegate.

Per le sue caratteristiche l'ELISA ha trovato in particolare grande riscontro come test di screening laddove è presente la necessità di ottenere risultati in tempi brevi per poter utilizzare partite di merci che altrimenti giacerebbero per tempi troppo lunghi nei container di trasporto o nei magazzini delle aziende, comportando ritardi di produzione e di consegna dei prodotti finiti con conseguente perdita economica.

DETERMINAZIONE DELL'AFLATOSSINA M₁ NEL LATTE: ORGANIZZAZIONE E RISULTATI DI PROFICIENCY TEST

Barbara Magnani, Laura Monaco, Ugo Paggi
Associazione Italiana Allevatori, Laboratorio Standard Latte, Maccarese (RM)

Introduzione

Le aflatossine sono metaboliti secondari (non essenziali per la crescita fungina) con attività tossica prodotte, in opportune condizioni climatiche, da funghi ubiquitari (*Aspergillus Flavus* e *Aspergillus Parasiticus*). Frumento, mais, orzo, avena, granaglie e mangimi ad uso zootecnico rappresentano i substrati ideali per l'accrescimento dei funghi produttori delle micotossine.

La possibile contaminazione degli alimenti che può iniziare in campo e mantenersi durante la raccolta, lo stoccaggio e il trasporto, rendono obbligatoria l'attenzione ad ogni fase di produzione e trasformazione di un alimento (le infestazioni sono favorite dalle alte temperature, i cui limiti sono tra i 12-41°C e da una elevata umidità relativa).

Le aflatossine che più frequentemente si rintracciano come contaminanti naturali sono i sottotipi B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ e M₂. Le prime quattro si trovano soprattutto nei prodotti di origine vegetale, mentre l'M₁ e M₂ si rintracciano nel latte e sono il prodotto a livello epatico dell'idrossilazione metabolica rispettivamente della B₁ e della B₂.

Il loro meccanismo di azione prevede l'inibizione della sintesi di DNA con blocco della sintesi proteica, alterazione della crescita e moltiplicazione cellulare determinando cancerogenesi e teratogenesi.

La comunità europea con il Regolamento CE 1525/98 ha stabilito i tenori massimi ammissibili per l'aflatoossina M₁ nel latte pari a 0,05 µg/kg e negli alimenti destinati all'infanzia pari a 0,01µg/kg.

Ruolo del Laboratorio Standard Latte e organizzazione dei Proficiency Test

L'autunno 2003 è stato caratterizzato da una preoccupante emergenza aflatossine. In seguito alla contaminazione degli alimenti ad uso zootecnico il livello di aflatoossina M₁ ha superato, in alcuni casi, il limite di legge stabilito dal Reg(CE) 1525/98. Conseguentemente alla richiesta di analisi, l'Associazione Italiana Allevatori, con il proprio Laboratorio Standard Latte, ha organizzato già da Novembre 2003 il primo Proficiency Test a livello nazionale con metodica ELISA a cui hanno partecipato 32 laboratori con 40 strumenti. Successivamente a Dicembre 2003, è stato realizzato un secondo Proficiency Test anche per metodica HPLC (40 laboratori con 45 strumenti per ELISA e 25 laboratori per HPLC) seguito poi dal terzo ad Aprile 2004 (37 laboratori con 46 strumenti per ELISA e 19 laboratori per HPLC) e l'ultimo ad Ottobre 2004 (51 laboratori con 59 strumenti per ELISA e 23 laboratori per HPLC).

Obiettivo dei Proficiency Test è quello di consentire ai laboratori di valutare la propria accuratezza analitica, verificare i valori di ripetibilità (r) e riproducibilità (R) tra i laboratori e

validare la produzione di campioni di latte a concentrazione nota di aflatossina M₁ da utilizzare per il controllo di qualità delle analisi.

Realizzazione dei campioni per i Proficiency Test e risultati

Soluzioni di aflatossina M₁ in acetonitrile sono state opportunamente aggiunte ad 1 litro di latte scremato per ottenere una soluzione madre ad una concentrazione di 11000 ppt (ng/kg) che è stata successivamente congelata e liofilizzata. La soluzione madre, per ciascun Proficiency Test, è stata ricostituita per contaminare campioni di latte crudo scremato a diversi livelli di concentrazione (range tra 15-70 ppt). Nei primi due Proficiency Test sono stati prodotti campioni di latte scremato liofilizzati, mentre nei successivi due, per evitare di modificare la matrice del latte, i campioni sono stati congelati. Effettuando prove di confronto con altri laboratori si è verificato che non esistono variazioni nel contenuto di M₁ tra campioni liofilizzati e congelati. Inoltre per valutare la stabilità dei campioni nel tempo sono state eseguite prove di congelamento e scongelamento della stessa provetta nell'arco di 6 mesi, che non hanno evidenziato variazioni nella concentrazione dell'aflatossina.

Nel confronto tra le quattro prove interlaboratorio risulta evidente che i valori di ripetibilità e di riproducibilità, per entrambi i livelli di concentrazione (25 ppt e 50 ppt) e per entrambe le metodiche, resta pressoché invariato, evidenziando un'ampia dispersione dei risultati di analisi (valori di ripetibilità e riproducibilità elevati). Nel Proficiency Test di Ottobre è stato incluso un campione contaminato naturalmente ad un livello di 25ppt che presenta un valore di ripetibilità apparentemente migliore del contaminato artificialmente. Questo è dovuto alla presenza di un maggiore numero di laboratori outliers (6 outliers per il contaminato "artificiale" contro i 12 per il contaminato naturale). Il confronto tra i due campioni di latte può essere avvalorato dal valore della deviazione standard pari a 4ppt per il campione artificiale e pari a 3ppt per il campione naturale, dimostrando così che non ci sono sostanziali differenze. Di seguito sono riportati i valori di ripetibilità e riproducibilità ottenuti dagli ultimi tre Proficiency Test.

Tabella 1. Valori di ripetibilità e riproducibilità

ELISA-25ppt	r*	R*	HPLC-25ppt	r*	R*
Dicembre '03	4,2	12,7	Dicembre '03	7,3	14,3
Aprile '04	8,6	14,2	Aprile '04	5,9	16,1
Ottobre '04**	7,9	12,9	Ottobre '04**	6,6	13,1
Ottobre '04***	5,4	9,3	Ottobre '04***	3,9	14,1
ELISA-50ppt	r*	R*	HPLC-50ppt	r*	R*
Dicembre '03	7,0	36,8	Dicembre '03	8,5	33,6
Aprile '04	15,6	29,4	Aprile '04	14,4	30,0
Ottobre '04	18,5	30,2	Ottobre '04	10,9	33,0

*r ripetibilità, R riproducibilità

**campione contaminato artificialmente

***campione contaminato naturalmente

Indicatore dell'andamento dell'accuratezza dei laboratori è il valore dello "z-score" calcolato dal rapporto tra la differenza della media del laboratorio dalla media del valore di riferimento e lo scarto tipo (ds) delle medie di tutti i laboratori.

Z < 2	soddisfacente
2 < Z < 3	dubbio
Z > 3	insoddisfacente

In altri termini, i laboratori con un valore di z-score compreso tra 0 e 1 sono in una situazione auspicabile, quelli compresi nella fascia tra 1 e 2 hanno una posizione soddisfacente, i laboratori compresi tra 2 e 3 sono nella fascia di allarme e quelli situati oltre il 3 sono “fuori controllo”. Di seguito vengono riportati i grafici dell’andamento dei laboratori per i Proficiency Test di dicembre ‘03 e aprile e ottobre ‘04.

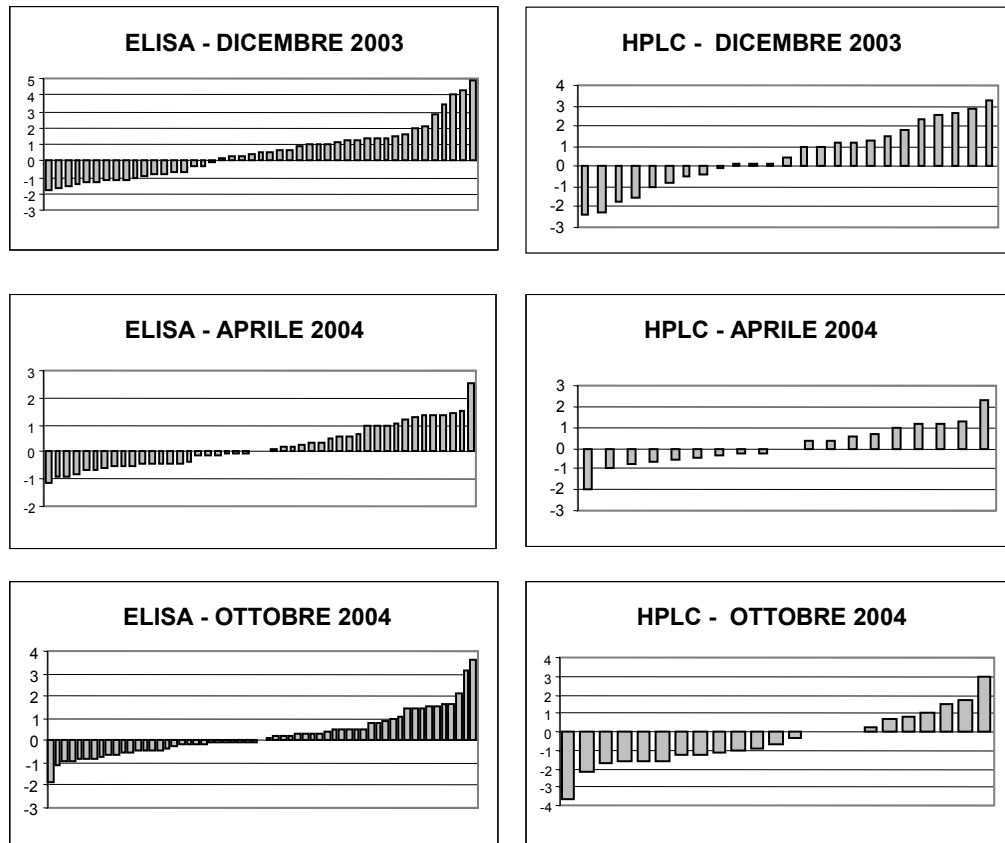


Figura 1. Andamento dell’accuratezza dei laboratori (z-score) nei Proficiency Test di Dicembre 2003 Aprile e Ottobre 2004

Osservando i valori di ripetibilità e riproducibilità dei Proficiency Test si evidenzia una notevole variabilità e, nonostante l’HPLC presenti una ripetibilità migliore, la riproducibilità del metodo di screening è sufficientemente sovrapponibile con quella del metodo di riferimento.

I risultati ottenuti evidenziano una difficoltà nella standardizzazione dei metodi, rendendo chiara la necessità dell’utilizzo di materiali di riferimento e il confronto continuo con altri laboratori.

Grazie alla validazione dell’ultimo Proficiency Test, il Laboratorio Standard Latte ha, quindi, realizzato campioni a titolo noto di aflatoxina M_1 per il controllo della qualità delle analisi per ELISA.

Bibliografia

1. UNI EN ISO 9001:2000 *Sistemi di gestione per la qualità*. Milano. Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2000.
2. ILAC – G13:2000. *Guidelines for the requirements for the competence of providers of proficiency testing schemes* International Laboratory Accreditation Cooperation; 2000.
3. UNI 9225:88. Precisione dei metodi di prova – Determinazione della ripetibilità e riproducibilità di un metodo di prova normalizzato mediante esperimenti interlaboratorio. Milano. Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 1988.
4. The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical laboratories. *Pure & Appl.Chem.* 1993;9:2123-2144.
5. ISO 5725-2. *Accuracy, trueness and precision of measurement methods and results*. Geneva: International Organization for Standardization; 1994.
6. Fearn T, Thompson M. A new test for sufficient homogeneity. *Analyst* 2001;126:1414-1417.

IMMUNOSENSORI PER LA DETERMINAZIONE DELL'AFLATOSSINA M₁ NEL LATTE

Laura Micheli, Silvia Piermarini, Antonio Radoi, Danila Moscone, Giuseppe Palleschi
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma "Tor Vergata", Roma

Introduzione

Le aflatossine sono micotossine prodotte da funghi appartenenti alla classe degli Ascomiceti, genere *Aspergillus* (1, 2). In condizioni ambientali favorevoli le spore degli *Aspergillus* germinano, colonizzando facilmente varie sostanze, fra cui cereali, arachidi e altri semi oleaginosi, mais, fieno. Esistono numerosi tipi di aflatossine, di cui le principali sono la B₁, la B₂, la G₁, la G₂ e i loro derivati metabolici M₁ e M₂. L'aflatossina M₁ è il metabolita 4-idrossiderivato dell'aflatossina B₁. Se presente nei mangimi e foraggi contaminati, l'aflatossina B₁ viene ingerita dagli animali dove, nel loro fegato, viene idrossilata ad aflatossina M₁. Questa tossina è destinata inevitabilmente ad essere ingerita dall'uomo, sia con il latte che con i suoi prodotti derivati, poiché nessun trattamento è in grado di eliminarla (M₁ è una molecola termostabile). L'azione cancerogena e l'azione mutagenica delle aflatossine B₁ e M₁ sono il risultato della formazione dell'eossido, un intermedio metabolico particolarmente reattivo, in grado di formare legami covalenti con gli acidi nucleici. Il Regolamento CE ha fissato un limite massimo ammissibile per l'aflatossina M₁ nel latte pari a 0,05 µg/kg (latte crudo, latte destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte). Negli alimenti per la prima infanzia, la Circolare del Ministero della Sanità indica un valore limite per l'aflatossina M₁ pari a 0,01 µg/kg (3).

La tossicità dei cereali, foraggi e latte viene valutata, attualmente, mediante metodi cromatografici, quali l'HPLC e la TLC con rivelazione fluorimetrica, che presentano tempi lunghi e metodologie complesse e dispendiose (4, 5).

Obiettivo di questo lavoro è la realizzazione di immunosensori elettrochimici monouso (basati sull'uso di elettrodi stampati o screen printed - SPE), selettivi per l'aflatossina M₁, che si propongono come metodi alternativi e rapidi per la determinazione di questa tossina direttamente in latte, senza necessità di diluizione e di purificazione. A tale scopo sono stati studiati e confrontati saggi immunoenzimatici diretti (ELISA - enzyme linked-immunosorbent assay) utilizzando come marcatori la *Perossidasi* (HRP) e la *Fosfatasi Alcalina* (AP), coniugati all'aflatossina M₁.

Materiali e Metodi

Anti-mouse IgG (H+L) è stato fornito dalla Vector Laboratories Inc. (USA), l'anticorpo monoclonale specifico per l'AFM₁ (MAb) dalla Maine Biotechnology Services (USA) e l'AFM₁ dalla Vinci-Biochem (Italia). Il coniugato AFM₁-HRP (aflatossina M₁- perossidasi) è stato acquistato dalla r-Biopharma (Germania). Le colonne Strata SAX sono della Phenomenex (USA). Tutti gli altri materiali e reagenti sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich (Italia).

Apparati

Gli elettrodi stampati (*screen-printed electrodes*, SPEs) sono stati forniti dall'EcoBioService and Research (Firenze). Gli SPE sono costituiti da un elettrodo di lavoro di grafite, uno pseudoriferimento di argento e un controlettrodo di grafite. Le misure elettrochimiche sono state realizzate con un polarografo computerizzato AUTOLAB modello PGSTAT 12. Gli elettrodi stampati sono stati connessi all'AUTOLAB mediante connettori speciali realizzati in laboratorio. La corrente viene misurata e registrata tramite il software GPES e i valori vengono elaborati successivamente mediante il software Sigma Plot Jandel Scientific.

Coniugazione dell'aflatossina M₁ con la Fosfatasi alcalina (AFM₁-AP)

La reazione di coniugazione fra AFM₁ e AP avviene dopo previa derivatizzazione della tossina in AFM₁-ossima, il cui scopo è di introdurre un gruppo carbossilico sulla molecola. La trasformazione in ossima è avvenuta in accordo con un protocollo modificato da quello messo a punto per l'AFB₁ da Chu nel 1990 (6, 7). In un esperimento tipico, 1 mg di AFM₁ e 2 mg di carbossimetilammina, in una miscela di piridina:metanolo:acqua (1:4:1), vengono prima fatte reagire in riflusso per 2 ore a 80°C e poi a temperatura ambiente per tutta la notte. La soluzione di reazione finale viene successivamente concentrata in "rotary vapor" e passata su una colonnina a scambio ionico (Strata SAX, fase mobile: 0.1 M tampone fosfato, pH 7.0), il cui uso ha lo scopo di separare la tossina derivatizzata, contenente un gruppo acido, dalla tossina non modificata. Successivamente il gruppo carbossilico introdotto nella struttura dell'AFM₁ viene trasformato in un gruppo estereo attivo, pronto per il successivo legame con il gruppo -NH₂ dell'enzima, utilizzando l'1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) - carbodiimide (EDC) in presenza di una quantità equimolare di N-idrossisuccinimide (NHS). La reazione di esterificazione avviene in presenza di 50 µL AP (10000 UI). La miscela di coniugazione viene lasciata reagire per 24 h a 4°C sotto agitazione. Il prodotto desiderato, AFM₁-AP viene separato e purificato cromatograficamente dalla rimanente soluzione su colonna Sephadex G-25 (fase mobile: 0.01 M tampone fosfato pH 7.0). La soluzione finale di AFM₁-AP è stata concentrata mediante "Speed Vac Concentrator" e conservata a 4°C.

Tutti i prodotti ottenuti durante le diverse fasi della reazione di coniugazione sono stati studiati per via spettrofotometrica e fluorimetrica. La concentrazione residua dell'AP legata è stata estrapolata dalle misure di concentrazione di proteina mediante il metodo BCA per la determinazione del contenuto proteico (*Bicinchonic acid protein assay* - Pierce). Misure di attività enzimatica sono state effettuate a $\lambda = 405$ nm al fine di poter stimare l'attività residua dell'AP. Misure di affinità, in termini di capacità della tossina, presente nel coniugato, di legare ancora l'anticorpo utilizzato, sono state condotte mediante un saggio ELISA di *binding*.

Saggio ELISA competitivo diretto

La determinazione dell'AFM₁ è stata eseguita attraverso un saggio ELISA competitivo diretto. In questo saggio, 8 µL di una soluzione di 10 µg/mL di anti-IgG (mouse) in tampone carbonato 0.1 mol/L a pH 9.6, vengono depositati per tutta la notte a 4°C (*precoating*) sull'elettrodo di lavoro dell'elettrodo stampato. L'elettrodo viene successivamente lavato con PBS-T (PBS + 0.05 % Tween 20) per due volte e poi con solo PBS (lavaggio). Dopo una fase di bloccaggio con PVA 1% per 30 min a temperatura ambiente, l'elettrodo viene lavato come sopra. Una soluzione 10 µg/mL di anticorpo monoclonale specifico per l'AFM₁ in PBS viene depositata sull'elettrodo fino a sua completa evaporazione (*coating*). Dopo lavaggio, la reazione

di competizione avviene addizionando concentrazioni fisse di AFM₁-enzima sull'elettrodo di lavoro, dove l'AFM₁ (standard o campione) è stata precedentemente messa ad interagire con l'anticorpo immobilizzato per 25 min. La durata complessiva della reazione di competizione è di 50 min a temperatura ambiente in camera umida.

La concentrazione di coniugato viene definita da misure di *binding*, in cui dopo la fase di coating si aggiungono diluizioni successive di AFM₁-enzima in PBS per 30 min a temperatura ambiente.

La reazione enzimatica per l'HRP avviene con 80 µL di TMB 2×10^{-4} M + H₂O₂ 10^{-3} M in tampone citrato-fosfato, pH 4.5. La misura cronopotenzimetrica è eseguita dopo 25 min registrando il valore di corrente dopo 1 s dall'applicazione di un potenziale di -100 mV.

Nel caso dell'AP, 80 µL di substrato (1mg/mL di 1-naftilfosfato in tampone DEA) sono stati addizionati sulla superficie dell'elettrodo per 2 min. La tecnica elettrochimica scelta è la voltammetria ad impulsi differenziali (DPV).

Trattamento del campione

Il latte fresco viene centrifugato a 6000 rpm per 30 min al fine di separare la fase grassa (tappo) dalla fase acquosa. Solo quest'ultima viene prelevata e utilizzata per il saggio immunoenzimatico.

Al fine di valutare l'effetto della "matrice" latte sulle misure elettrochimiche e sul saggio ELISA, curve di calibrazione per l'aflatoxina M₁ sono state costruite addizionando concentrazioni note di tossina alla fase acquosa di latte "bianco" (ovvero in cui è assente l'analita di interesse).

Analisi dei dati

Le curve di calibrazione possono essere calcolate mediante il modello della "curva logistica a 4 parametri" (8), che è la procedura più utilizzata per l'elaborazione dei dati per gli immunosaggi. Questo metodo utilizza la seguente equazione:

$$y = (a - d) / [1 + (x/c) \cdot b] + d$$

dove a e d sono rispettivamente i valori asintotici del massimo e del minimo (dose massima e dose 0), b è il valore della pendenza del tratto rettilineo della sigmoide, c è il valore al punto di flesso, ovvero il valore di IC₅₀ definito come la concentrazione dell'analita nel campione in grado di legare il 50% dell'anticorpo. I quattro parametri vengono stimati mediante una funzione matematica del programma Sigma Plot con regressione non-lineare.

Il limite di rivelazione viene definito come la concentrazione corrispondente alla differenza tra il valor medio del punto di non competizione e due volte la deviazione standard dello stesso punto (valore medio - 2σ).

Risultati e discussione

La reazione di coniugazione fra l'AFM₁ e l'AP è stata condotta secondo il metodo dell'estere attivo via succinimide, sfruttando il gruppo carbossilico introdotto sulla tossina mediante

derivatizzazione. La resa finale è circa il 60% rispetto alla quantità di tossina-ossima utilizzata. Questa quantità è stata definita da misure spettrofotometriche a $\lambda = 262$ nm (max caratteristico di questa molecola) e fluorimetriche con $\lambda = 365$ nm come lunghezza d'onda di eccitazione. L'attività enzimatica dell'enzima coniugato, determinata con il metodo Boehringer Mannheim (9), è risultata di 29 U/mL rispetto a 100 U/mL di AP nativo, mentre la sua concentrazione è uguale a 660 $\mu\text{g/mL}$ (metodo BCA).

Misure di binding sono state realizzate al fine di definire la capacità della tossina coniugata di riconoscere ancora il suo anticorpo specifico, immobilizzato sulla superficie dell'elettrodo di lavoro di un elettrodo stampato. In parallelo un identico saggio è stato portato a termine aggiungendo sull'elettrodo diluizioni successive di solo enzima libero.

Per stimare la stabilità del coniugato nel tempo, misure di attività enzimatica e saggi di binding elettrochimici sono stati effettuati giornalmente per 60 giorni. Purtroppo i risultati mostrano una progressiva riduzione dell'attività enzimatica (Figura 1) e dell'affinità di AFM₁-AP (dati non mostrati).

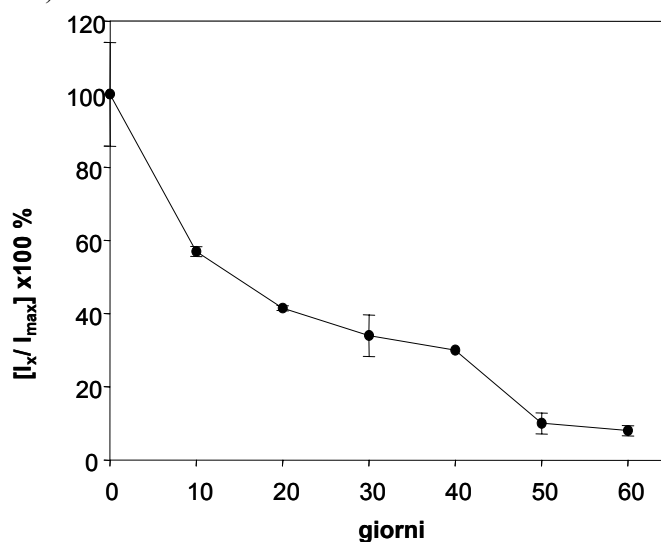


Figura 1. Misure di binding per la stima della stabilità del coniugato AFM₁-AP nel tempo

Il secondo coniugato, AFM₁-HRP, utilizzato come competitore per l'AFM₁ è un prodotto commerciale, prodotto dalla Ridascreen (r-Biopharm).

Con questi due coniugati sono stati realizzati inizialmente saggi competitivi in tampone, studio preliminare fondamentale prima di analizzare l'analita di interesse nella sua matrice.

Il format scelto del saggio ELISA è di tipo competitivo diretto, in cui l'anticorpo (MAB) specifico per l'analita, viene immobilizzato sull'elettrodo di lavoro e la reazione di competizione avviene successivamente fra l'analita libero (standard o campione) e quello coniugato con l'enzima marcatore (a concentrazione costante).

I parametri operativi (concentrazione dei reagenti, tamponi, temperatura e tempo di reazione dei reagenti) del saggio ELISA elettrochimico, sono stati valutati al fine di avere il miglior rapporto segnale/rumore e la più alta sensibilità.

Dagli studi di coating e di binding, effettuati immobilizzando diluizioni decrescenti di MAB e di AFM₁-enzima, rispettivamente, sono state estrapolate le concentrazioni ottimali da utilizzare in un saggio competitivo con sensibilità soddisfacente. Tali valori sono risultati pari a 10 $\mu\text{g/mL}$ di MAB e 1:10 v/v di AFM₁-HRP per la misura cronoamperometrica, mentre 5 $\mu\text{g/mL}$ di MAB e 1:4 v/v di AFM₁-AP per la determinazione voltammetrica.

Sperimentalmente è stato osservato che il saggio competitivo effettuato secondo la procedura classica, ovvero aggiungendo contemporaneamente standard e AFM₁-enzima sull'elettrodo di lavoro, non consentiva di osservare la concentrazione limite definita dalla CE per l'AFM₁ nel latte, ovvero 50 pg/mL. Infatti, i risultati ottenuti mostravano un intervallo di lavoro compreso nei ng/mL. È stato osservato che se viene favorita l'interazione fra la tossina libera e l'anticorpo, incubandola sull'elettrodo un certo intervallo prima del coniugato, il limite di rilevabilità del metodo si spostava verso concentrazioni più basse. A tal fine sono stati studiati diversi intervalli di incubazione e i migliori risultati sono stati ottenuti quando l'AFM₁ veniva aggiunta 25 min prima del coniugato.

Sono state, quindi, costruite curve di calibrazione per l'AFM₁ aggiungendo concentrazioni crescenti di tossina sull'elettrodo di lavoro e incubate per 25 min, per poi aggiungere concentrazioni fisse di coniugato. Il tempo di totale della reazione di competizione è risultato pari a 50 min. In Figura 2 e 3 sono riportati i risultati finali ottenuti utilizzando il coniugato prodotto durante questo studio, AFM₁-AP, sia il coniugato commerciale, AFM₁-HRP.

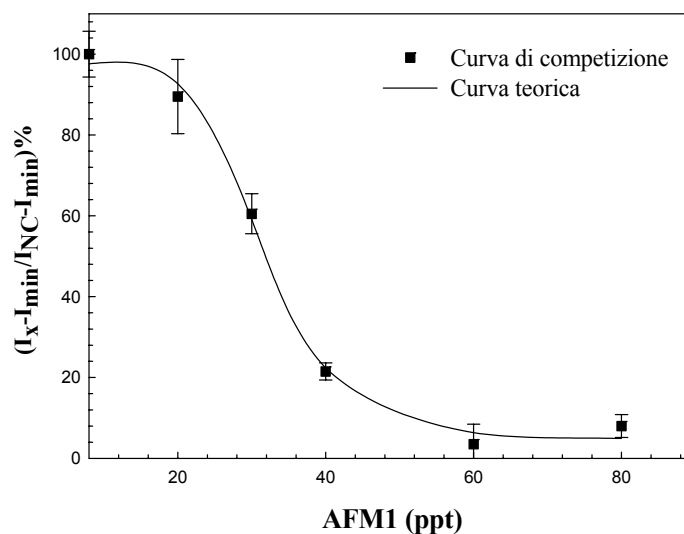


Figura 2. Curva di competizione ottenuta in tampone utilizzando il coniugato AFM₁-AP

Gli intervalli di lavoro ottenuti sono compresi tra 40 – 250 pg/mL, con limite di rilevabilità di 35 pg/mL, quando viene utilizzato il coniugato con l'HRP, e 20 – 60 pg/mL per AFM₁-AP.

L'effetto matrice e l'efficienza dell'estrazione dell'AFM₁ sono stati valutati prima di lavorare direttamente con i campioni, al fine di poter osservare l'interferenza da parte di sostanze presenti nella matrice sulle analisi e la bontà del recupero.

I primi due parametri sono stati studiati aggiungendo concentrazioni note di tossina a campioni di latte "bianco" prima e dopo il trattamento.

In parallelo studi di voltametria ciclica sono stati condotti sul latte tal quale, sul latte trattato e in tampone, utilizzando gli SPE tal quali (senza nulla di immobilizzato sopra).

Alla luce dei risultati ottenuti si deduce che la determinazione dell'AFM₁ può essere condotta senza particolari interferenze da parte della matrice "latte" e che il campione può essere utilizzato senza necessità di diluizione o di ulteriori trattamenti.

L'applicazione dell'immunosensore, alla "matrice" latte è stata limitata all'uso del solo coniugato AFM₁-HRP.

Curve di competizione in latte sono state realizzate lavorando con campioni fortificati, ovvero campioni cui sono state aggiunte concentrazioni note di AFM₁ dopo la centrifugazione, e confrontate con quelle analoghe costruite nel solo tampone. I risultati ottenuti (Figura 3) mostrano che le due curve tendono a sovrapporsi, indice di assenza di “effetto matrice”, e sono caratterizzate da un confrontabile intervallo di lavoro.

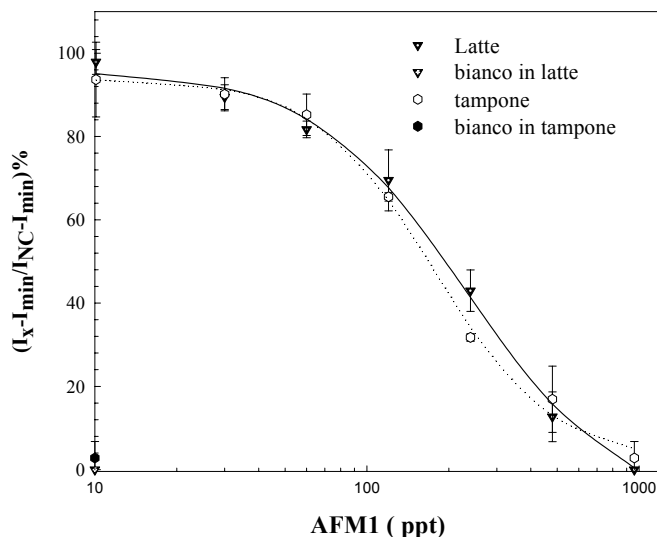


Figura 3. Confronto fra la curva di competizione ottenuta in latte e quella in tampone utilizzando il coniugato commerciale AFM₁-HRP

Inoltre è stato valutato il recupero dell'AFM₁ utilizzando due campioni certificati (CRM 283 fornito dall'IRMM – Fluka, e FAPAS dalla Orsell srl, Milano) e campioni di latte “bianco” fortificati prima della centrifugazione. I risultati sono riportati in Tabella 1. Come si può osservare, il recupero è compreso tra il 90 e il 101%.

Tabella 1. Stima del recupero in campioni di latte fortificati con AFM₁

AFM ₁ aggiunta (ppb)	AFM ₁ trovata (ppb)	RSD % (n. 6)	Recupero %
40	37	4	90
60	55	6	92
240	230	6	97
720	720	8	100
260*	248*	5*	95*
90**	91**	5**	101**

*Materiale certificato FAPAS, diluito 1:10 v/v

**CRM 283

Conclusioni e applicazioni future

Questo lavoro riporta i vari passaggi della realizzazione di un immunosensore, basato sull'applicazione di saggi immunoenzimatici, per la determinazione dell'aflatossina M₁ presente nel latte. Il format scelto per il saggio è di tipo competitivo diretto, dove la reazione di competizione fra l'AFM₁ libera (standard o campione) e la tossina coniugata con un enzima marcatore competono nei confronti dei siti di legame dell'anticorpo immobilizzato sull'elettrodo di lavoro di elettrodi stampati (SPE). Gli enzimi marcatori sono stati la Perossidasi (HRP) e la Fosfatasi Alcalina (AP). Per il primo enzima, è disponibile commercialmente il suo coniugato con l'AFM₁ (AFM₁-HRP) e la misura elettrochimica del prodotto enzimatico è avvenuta mediante cronoamperometria applicando un potenziale pari a -100mV. Nel caso dell'AP, è stato necessario preparare il coniugato, modificando una procedura riportata in letteratura per la coniugazione dell'aflatossina B₁ con l'HRP. I risultati sono stati discreti in termini di resa e di attività enzimatica residua dell'enzima dopo la reazione. L'idea di coniugare la tossina con l'AP deriva necessità di incrementare la sensibilità dell'analisi essendo il limite imposto dalla CE per l'AFM₁ in latte pari a 50 pg/mL. Infatti l'AP è un enzima con un elevato turn-over e i suoi substrati consentono di poter utilizzare tecniche elettrochimiche più sensibili della croamperometria, a cui invece sono limitati i substrati dell'HRP. Tuttavia il coniugato AFM₁-AP ottenuto necessita di ulteriori studi in termini di stabilità sia dell'enzima sia della tossina stessa, fattore che ne ha limitato l'impiego solo alle misure in tampone. La successiva applicazione dell'immunosensore nella "matrice" latte è stata condotta con il solo coniugato AFM₁-HRP. I risultati mostrano che la determinazione della tossina può essere condotta direttamente nel latte, previa sua centrifugazione, senza necessità di pretrattamenti o di diluizioni. Questo consente di avere analisi più rapide di quelle cromatografiche, normalmente utilizzate, riducendone anche i costi. Inoltre, il vantaggio degli immunosensori rispetto al tradizionale ELISA spettrofotometrico consta nella possibilità di avere un sistema di monitoraggio rapido e miniaturizzato, in cui bastano pochi µL di reagenti, da poter utilizzare anche *in situ*.

Bibliografia

1. Miraglia M. Mycotoxins and Phycotoxins – developments in chemistry, toxicology and food safety. In: Miraglia M, van Edgmond HP, Brera C, and Gilbert J (Eds), International IUPAC Symposium on Mycotoxin and Phycotoxin. Alaken, Inc. Fort Collins, Colorado (USA), 1998. pp. 67, 151, 181.
2. Scott PM. Mycotoxin methodology. *Food Addit Contam* 1995; 12(3): 395-403.
3. Rosner H. Mycotoxin: limits in European Union and effect on trade. In: Miraglia M, van Edgmond HP, Brera C, and Gilbert J (Eds), International IUPAC Symposium on Mycotoxin and Phycotoxin. Alaken, Inc. Fort Collins, Colorado (USA), 1998. pp. 203-212.
4. Cole RJ. Modern methods in the analysis and structural elucidation of mycotoxins. Academic Press Inc, Orlando, (USA), 1986.
5. Sydenham EW, Shephard GS, 1996. In: Gilbert J. (Ed.), Progress in Food Contamination Analysis. Blackie Academic and Professional, London (UK).
6. Chu FS. Preparation and characterization of aflatoxin B₁-1-(O-carboxy-methyl)oxime. *Vet Hum Toxicol* 1990; 32: 42-50.

7. Pestka JJ, Li Y, Harder WO, Chu FS. Comparison of a rapid radioimmunoassay and enzyme linked immunosorbent assay for determining aflatoxin M1 in milk. *J Assoc off Anal Chem* 1981; 64(2): 294-301.
8. Warwick MJ. Immunoassay – A practical Guide, Law B (Ed). London: Taylor & Francis; 1996. pp. 150-170.
9. Boehringer Mannheim. Biochemica Information. Keesey J (Ed), Boehringer Mannheim Biochemicals (USA); 1997. p. 10.

Questo lavoro è stato finanziato dalla CE e rientro in un progetto europeo, “ROSEPROMILK QLK1 CT 2001 01617”.

CONFRONTO DI METODOLOGIE ANALITICHE UTILIZZATE NEL DOSAGGIO DELL'AFLATOSSINA M₁ NEL LATTE

Carlo Nachtmann, Monica Gramaglia, Giuseppina Marelo, Marina Rastelli, Gian Luca Ferro

(a) Laboratorio Ricerca Residui Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

(b) Laboratorio Centro Latte, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

Introduzione

La necessità di eseguire un elevato numero di accertamenti analitici in un limitato arco di tempo ha sviluppato la predisposizione dei metodi di screening (Elisa), particolarmente utilizzati nella esecuzione di piani di controllo (Piano Nazionale Residui) e in situazioni di emergenza sanitaria, quale quella intercorsa a far data dal novembre 2003 per quanto attiene la presenza dell'aflatossina M₁ nel latte alimentare e delle aflatossine del gruppo B/G nei prodotti ad uso zootecnico utilizzati nella dieta delle lattifere.

La tecnica Elisa presenta notevoli vantaggi quali la rapidità di analisi, basso costo unitario per accertamento che si riflette in una generale economicità di gestione, una ridotta preparazione del campione unitamente ad estrema praticità. Di contro, si rilevano alcuni svantaggi individuabili nella risposta cumulativa nei confronti di sostanze omologhe contemporaneamente presenti, nella diversa affinità del sistema immunocompetente verso analiti della stessa classe e nella necessità di ricorrere all'impiego di metodi strumentali di conferma analitica qualora il test fornisca risultanze non negative.

Alter ego al test di screening, il metodo strumentale di conferma deve necessariamente fornire una risposta specifica e unitaria verso gli analiti ricercati, presentare una maggiore sensibilità e fornire dati quantitativi accurati e riproducibili considerato l'aspetto legale sotteso all'accertamento. Solitamente, il metodo di conferma comporta un costo di gestione più elevato, la necessità di purificazione del campione e un tempo di esecuzione maggiormente dilatato.

La gestione dell'emergenza aflatossina M₁ ultimamente vissuta, considerata la necessità di rapido riscontro della situazione sul territorio, ha reso inevitabile l'utilizzo di un test di screening Elisa obbligatoriamente supportato da un test analitico di conferma, vista la vigente normativa (Circolare 9 giugno 1999, n. 10 – G.U. n.135 del 11.06.1999) che ne pone il limite di conformità alla concentrazione di 0,05 µg/kg.

Materiali e metodi

Il test di screening Elisa (quantitativo) utilizzato presso i laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Torino per la ricerca dell'aflatossina M₁ (Biopharm – Ridascreen Aflatoxin M₁) presenta un limite di rilevabilità di 0.005 µg/kg, una cross-reattività del 100% verso l'aflatossina M₁ e un recovery rate sul latte pari al 95%. Ogni lotto di analisi viene processato insieme a fortificati in matrice (latte sgrassato contenente 0.050 µg/kg di aflatossina M₁) al fine di definire il cut-off della risposta. Sono ritenuti non negativi i campioni

RSD% (n. 24 a 0,025 µg/kg) = 8,4

RSD% (n. 24 a 0,050 µg/kg) = 6,8

RSD% (n. 24 a 0,075 µg/kg) = 6,1

I criteri di accettabilità dei dati forniti dall'analisi IAC/HPLC-FLD prevedono una retta di taratura (standard esterno) con $R^2 > 0,99$, una identificazione dell'analita nel campione mediante $R_{t(st)}$ (tempo di ritenzione dell'analita nel campione) compreso nella finestra di $R_t(St)$ (tempo di ritenzione dello standard) $\pm 5\%$ e l'utilizzo di una carta di controllo delle percentuali di recupero ottenute sui campioni fortificati al limite di legge utilizzati in ogni lotto di analisi. L'accettabilità del recupero viene posta nell'ambito della media dei recuperi $\pm 2s$.

Raffronto dati

Considerato che il controllo del livello di contaminazione dell'aflatossina M_1 nel latte viene effettuato utilizzando due distinte metodologie di analisi (analisi di screening e analisi di conferma), si pone la necessità di verificare l'aderenza dei dati quantitativi forniti dalle due tecniche di analisi, specialmente quando i termini di legge individuano un determinato livello quantitativo. Il significativo numero di campioni di latte, di varia tipologia, pervenuti presso i laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Torino hanno permesso di avere un campione statisticamente ampio su cui fare un'indagine di raffronto quantitativo dei dati in concentrazione forniti dalle due tecniche di analisi.

I dati di raffronto Elisa vs HPLC di 102 campioni (latte crudo, U.H.T. e pastorizzato) mostrano una buona correlazione tra le due metodologie come mostrato dal valore di R^2 (0,72) dell'equazione della retta di correlazione della Figura 2.

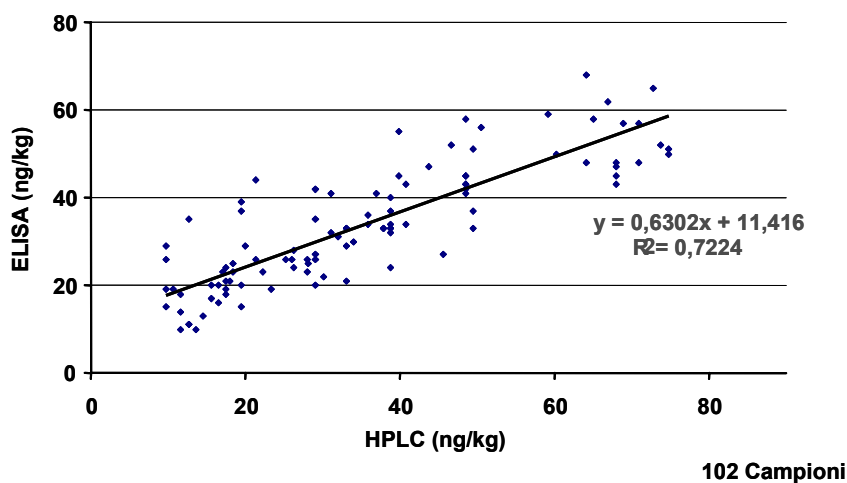


Figura 2. Equazione della retta di correlazione per il confronto Elisa vs HPLC di 102 campioni (latte crudo, U.H.T. e pastorizzato)

Analizzando i dati dei soli latti crudi, che hanno una quantità di grasso notevolmente più elevata dei latti in commercio, la correlazione dei dati risulta comunque essere soddisfacente ($R^2=0,67$).

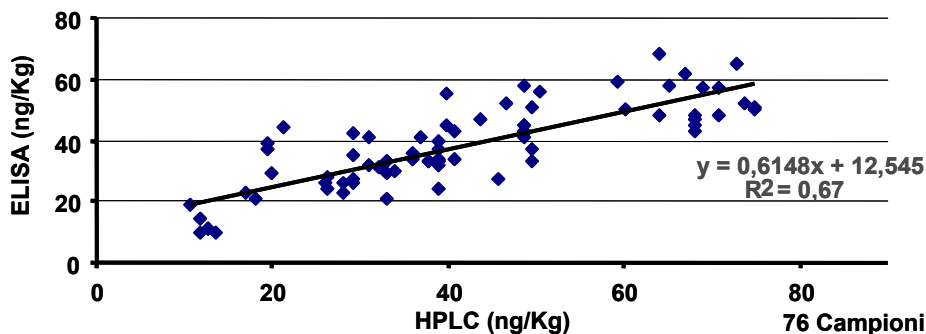


Figura 3. Equazione della retta di correlazione per il confronto Elisa vs HPLC di 76 campioni (latte crudo)

La verifica della eventuale presenza di falsi negativi condotta su un ristretto lotto di campioni ha prodotto, anche in questo caso, esito soddisfacente. Nessuno dei campioni considerati negativi al test di *screening* Elisa ha prodotto esito difforme al susseguente esame di conferma strumentale. Il grafico seguente mostra la correlazione dei dati ottenuti.

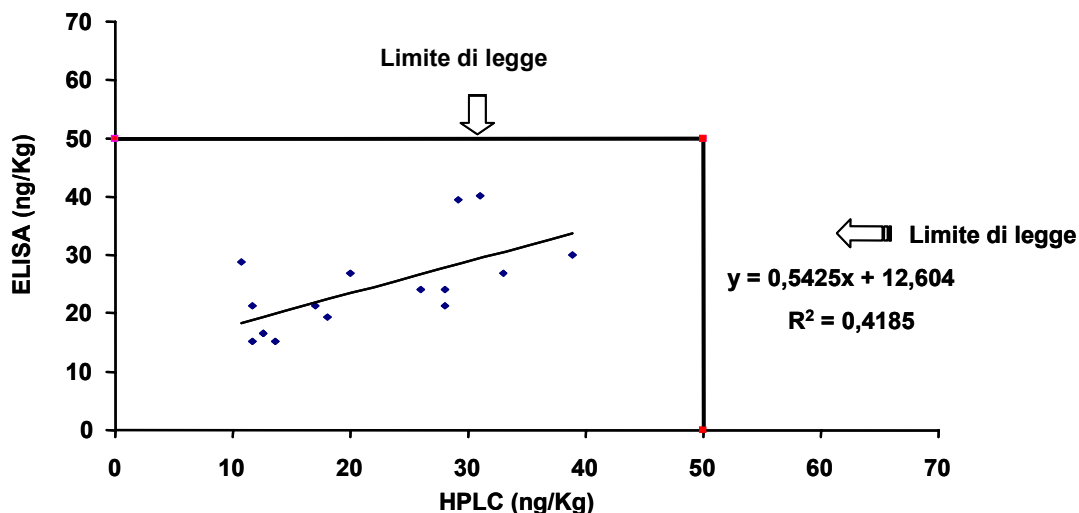


Figura 4. Equazione della retta di correlazione per il confronto Elisa vs HPLC di campioni negativi allo *screening* ELISA

Considerazioni

Le metodologie di analisi illustrate hanno assorbito compiutamente l’impatto dell’emergenza aflatoxina M₁ e hanno riconfermato, in maniera positiva, il necessario connubio tra test di *screening* e test di conferma. L’assenza di falsi negativi, verificata nel corso degli accertamenti, ha dato ulteriore risalto alla sicurezza dei dati prodotti in modo particolare quando correlata all’analisi del rischio sanitario.

Bibliografia

1. Italia. 10 Ministero della sanità. Circolare 9 giugno 1999, n. 10. Direttive in materia di controllo ufficiale sui prodotti alimentari: valori massimi ammissibili di micotossine nelle derrate alimentari di origine nazionale, comunitaria e Paesi terzi. Gazzetta Ufficiale n.135, 11.06.1999.
2. ISO 14501. Milk and milk powder - Determination of aflatoxin M₁ content - Clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by high-performance liquid chromatography; 1988.

OCRATOSSINA A NEL VINO: VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI DI UN KIT ELISA

Carlo Brera, Leonardo Bentivoglio, Valentina Minardi, Francesca Debegnach, Maurizio Paleologo Oriundi

(a) Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Reparto OGM e xenobiotici di origine fungina, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Tecna Srl, Area Science Park, Trieste

Introduzione

Le ocratossine sono metaboliti secondari prodotti da diverse specie di funghi dei generi *Penicillium* e *Aspergillus*. L'ocratossina A è una sostanza nefrotossica, con possibili effetti teratogeni, immunosoppressivi e cancerogeni. La presenza di ocratossina A (OTA) (Figura 1) è stata rilevata in vari alimenti e bevande, tra i quali il caffè, il cacao, la birra e il vino.

I livelli massimi di OTA negli alimenti sono stati fissati dalla legislazione di diversi paesi a concentrazioni variabili da 1 a 50 ppb (il limite comunitario per i cereali destinati all'alimentazione umana è, ad esempio, di 3 ppb). Nel 1999 il Ministero della Salute ha emesso una circolare contenente i limiti di concentrazione di diverse micotossine in vari alimenti; tra gli altre, veniva fissato un limite di 0,2 ppb per l'ocratossina nella birra. Nonostante diversi studi abbiano dimostrato la presenza di questa tossina nel vino, non è ancora stato fissato un limite comunitario per la presenza di questo contaminante. In vista di un futuro lavoro di autocontrollo da parte dei produttori, data la disponibilità di un metodo rapido ed economico per la determinazione dell'ocratossina nel vino (1), si è voluto verificare con il presente lavoro l'affidabilità dello stesso confrontandolo con un metodo di conferma.

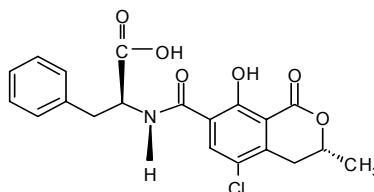


Figura 1. Ocratossina A

Materiali e metodi

HPLC

È stato impiegato un sistema HPLC automatizzato composto da un clean-up in immunoaffinità automatico, un HPLC in fase inversa e un rivelatore in fluorescenza.

Il sistema comprendeva una pompa Gilson 321, un elemento Gilson ASPEC XL per l'estrazione con le colonne di immunoaffinità e un detector di fluorescenza Jasco FP1520. I campioni sono stati processati assieme alle soluzioni di OTA usate come calibratori. La quantificazione dell'OTA nei campioni è stata effettuata per interpolazione con la curva di calibrazione (2).

ELISA

Per l'analisi ELISA è stato impiegato un kit prodotto da Tecna ("Immunoscreen Ochra ELISA", codice OR 360). Sia la preparazione del campione che il saggio sono stati eseguiti secondo quanto descritto nelle istruzioni del kit. Brevemente, i campioni di vino venivano acidificati, estratti con diclorometano e centrifugati. L'OTA veniva quindi estratta dalla fase organica per mezzo di una soluzione di bicarbonato di sodio. Il saggio è un ELISA competitivo, del tipo a "doppio anticorpo". La fase solida è costituita da anticorpi anti IgG di coniglio. Durante l'incubazione l'OTA contenuta nei campioni e negli standard compete con il coniugato OTA-perossidasi per i siti di legame degli anticorpi anti-OTA. Allo stesso tempo gli anticorpi di coniglio anti-OTA si legano a quelli anti IgG adesi ai pozzetti. La quantità di coniugato legato agli anticorpi fissati alla fase solida al termine dell'incubazione è inversamente proporzionale alla concentrazione di OTA presente in ogni pozzetto e viene rivelata mediante l'aggiunta del substrato cromogeno successivamente al lavaggio della micropiastra. La perossidasi converte in un prodotto di reazione colorato il cromogeno incolore. Dopo aver aggiunto una soluzione d'arresto della reazione enzimatica si procede alla lettura del risultato con un fotometro per micropiastre dotato di filtro a 450 nm. I risultati in assorbanza sono convertiti in percentuali dell'assorbanza dello standard zero (B/Bo). Dalla curva di calibrazione (esempio in Figura 2) le concentrazioni dei campioni sono ottenute dopo aver moltiplicato il valore ottenuto per il fattore di diluizione (pari a 2).

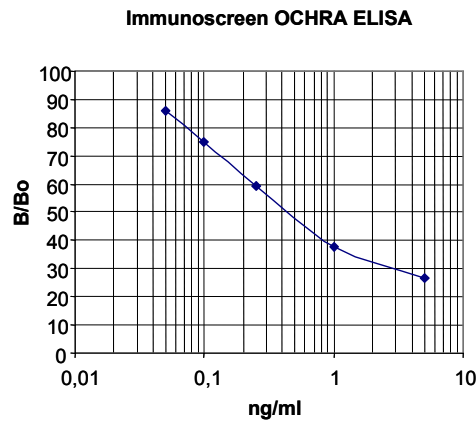


Figura 2. Esempio di curva di calibrazione ottenuto con il kit Immunoscreen Ochra

Le prestazioni dei due metodi, HPLC e ELISA, sono riassunte nella Tabella 1.

Tabella 1. Prestazioni dei due metodi analitici impiegati

Parametro	HPLC		ELISA	
	Repliche		Repliche	
Limite di rivelazione	*	0,01 ppb	12	0,1 ppb
Recupero medio**	12	85%	6	90%
Ripetibilità	10	3,35%	6	5,87 (+/- 3,6) %
Riproducibilità***	10	4,9%	3	6,57 (+/- 4,0) %

* Non applicabile

** 4 livelli di contaminazione per HPLC, 3 per ELISA

*** 2 campioni per HPLC, 4 per ELISA

Risultati

50 campioni di vino (rossi, bianchi, rosati) sono stati analizzati mediante kit ELISA ed HPLC. 2 campioni risultavano negativi in HPLC (valori di OTA inferiori al limite di rivelazione di 0,01 ppb). 7 campioni risultavano negativi al test ELISA (valori di OTA inferiori al limite di rivelazione di 0,1 ppb). Per entrambi i metodi, si operava correzione per il recupero. Il confronto dei valori di concentrazione ottenuti con i due metodi dava un r^2 di 0,952, un'intercetta di -0,065 e un coefficiente angolare di 0,757. La correlazione tra i due metodi, valutata mediante calcolo del t di student associato alla regressione risultava altamente significativa ($P < 0,001$) (3).

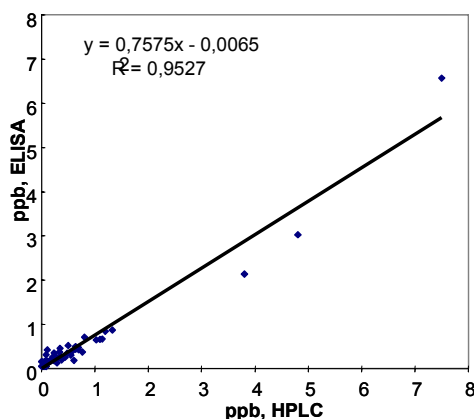


Figura 3. Correlazione HPLC-ELISA

Conclusioni

Nello studio presentato le concentrazioni di ocratossina A sono state determinate in 50 campioni di vino italiano con una metodica HPLC e un kit ELISA. Dai risultati ottenuti il metodo di screening esaminato si dimostra esente da falsi negativi e caratterizzato da una sufficiente correlazione con la metodica cromatografica di conferma.

Bibliografia

1. Persic L, Perrone P, Paleologo Oriundi, M. Rapid and sensitive screening of ochratoxin A in wine samples by competitive ELISA. In: Smith C, Malmhede Yman I and Hellenas K (Ed.) *Proceedings of the VIIth International Conference on Agri-Food Antibodies*. Sept.10-13, 2003. Uppsala, Sweden. Uppsala, Editrice Academic Conferences; 2003. p. 55.
2. Brera C, Grossi, S, De Santis B, Miraglia M. Automated HPLC Method for the Determination of Ochratoxin A in Wine Samples. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2003; 26(1): 119-133.
3. Mecozzi M, Valutazioni statistiche di uso comune in campo ambientale. In: Bruno M, Melchiorre S (Ed). *Alge tossiche, tecniche di campionamento e di identificazione e valutazioni statistiche di uso comune*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2003. (Rapporti ISTISAN 03/32). p 1-19.

SAGGI IMMUNOENZIMATICI: QUALE RUOLO NEL CONTROLLO DELLE MICOTOSSINE?

Maurizio Paleologo
Tecna Srl, Area Science Park, Trieste

La necessità di analisi rapide nelle filiere

Le analisi di autocontrollo svolte dalle industrie alimentari e mangimistiche, per permettere una gestione efficiente del rischio micotossine, devono fornire una risposta in tempi brevi. In alcuni casi sono ammissibili tempi dell'ordine di alcuni giorni, ma spesso è necessario disporre del dato analitico in poche ore e in qualche caso sarebbe utile contenere questo tempo in 10-15 minuti. Per poter analizzare meglio le varie metodologie e i vari sistemi analitici disponibili distingueremo quindi questi sistemi in tre gruppi, a seconda dei tempi di risposta:

1. "immediati" (5 - 20 minuti);
2. "rapidi" (30 - 120 minuti);
3. "lenti" (alcuni giorni)

I sistemi impiegati dall'industria, definiti anche metodi di screening per ricordare che con essi è possibile un monitoraggio di grandi numeri di campioni, saranno quindi del primo e del secondo tipo. Tali metodi di screening sono atti ad identificare subito ogni partita sospetta permettendo il rilascio di quella maggioranza di partite conformi ai requisiti di legge o alle specifiche interne dell'azienda.

Le situazioni in cui i metodi richiesti sono del tipo a risposta "immediata" sono molti. Tra questi si possono citare, ad esempio, le centrali del latte, i mangimifici, e, in prospettiva, i centri di essiccazione e stoccaggio del mais. Di certo, comunque, per questi e altri punti delle filiere alimentari i metodi analitici tradizionali, "lenti", non sono adeguati. Cerchiamo ora di capire le dimensioni quantitative di questa domanda analitica.

In Italia, ogni anno, vengono prodotte 9,62 milioni di tonnellate di mais¹ e circa 12,6 milioni di tonnellate di mangimi per animali da reddito². L'industria molitoria produce ogni anno 10,93 milioni di tonnellate di farina³. Basandosi su tali volumi produttivi, ipotizzando che questi vengano movimentati completamente su gomma e che sia necessario effettuare almeno un campione per ogni autocarro, il numero di prove analitiche da eseguirsi per l'aflatossina nei mangimi è stimabile dell'ordine delle 266.000 annue. Considerando la distribuzione disomogenea delle contaminazioni e il poco tempo a disposizione per operare un campionamento corretto, è probabile che tale numero vada anche considerato insufficiente. Con quale sistema analitico andrebbero eseguite queste prove? I metodi "immediati" sono indicati alla ricezione delle materie prime più a rischio, in particolare della granella di mais e dei derivati del mais, nonché di altre materie prime più frequentemente contaminate in modo rilevante da aflatossina. Si può stimare che le materie prime a rischio rappresentino, in volume o peso, circa un terzo delle materie prime totali che pervengono agli stabilimenti. Su questa base, circa la metà delle prove (140.000) dovrebbero essere effettuate con metodi "immediati", prelevando, appunto, almeno un campione per autocarro. Le altre prove, dati per scontati rari

¹ Dati ISTAT 2003

² Dati Assalzo 2003

³ Dati Italmopa 2003

controlli sulle materie prime meno rischiose, possono invece essere effettuate sul prodotto finito. In questo caso il tempo a disposizione è maggiore. Ipotizzando di effettuare mediamente un controllo ogni 100 tonnellate prodotte, si giunge alla necessità di altre 126.000 prove, prove che potrebbero essere eseguite con metodi “rapidi”, ma anche “lenti”, ad esempio con l’HPLC. In totale, considerando che in Italia vi sono circa 700 mangimifici, si arriverebbe ad un numero medio di analisi per aflatoossina pari ad 380 per azienda per anno.

La realtà attuale, sulla base dei dati in nostro possesso, ci fa stimare in circa 90.000 le determinazioni totali di aflatoossina effettuate dei mangimifici in Italia annualmente (circa il 34% del bisogno analitico teorico). Di queste 30.000 sono effettuate con metodi “immediati”, 40.000 con kit “rapidi” e circa 20.000 con l’HPLC (sistema “lento”). Si arriva così ad un “carico” analitico medio di circa 128 prove annue per ogni stabilimento per il controllo dell’aflatoossina. Il grado di copertura di questo autocontrollo appare quindi scarso rispetto al calcolo delle 266.000 determinazioni stimate indispensabili. Dobbiamo concludere che attualmente il rischio di immissione sul mercato di mangimi contaminati oltre i limiti di legge non è trascurabile. Va sottolineato che le analisi riportate non sono in realtà distribuite in modo omogeneo nella popolazione dei mangimifici italiani. Alcune grandi aziende eseguono un numero di controlli superiore a quello da noi stimato per unità di volume e altre, in particolare quelle più piccole, non li eseguono del tutto o effettuano un numero di prove simbolico. Infine, va ricordato che il mangime industriale rappresenta solo una parte dell’alimentazione degli animali da reddito (mediamente circa il 70%, secondo Assalzo, ma una percentuale molto minore nel caso dei bovini da latte) e che il mangime autoprodotta dagli allevatori è sottoposto a controlli meno frequenti di quelli attuati dall’industria mangimistica.

Se focalizziamo l’indagine a monte dell’industria, a livello dell’interfaccia tra la produzione primaria e la prima trasformazione, la situazione è però anche peggiore. Sulla base delle quantità di mais prodotte annualmente in Italia (che, lo ricordiamo, è il secondo produttore europeo) possiamo stimare che per caratterizzare il materiale in ingresso agli stabilimenti di essiccazione e/o stoccaggio sarebbe necessario effettuare almeno 353.000 determinazioni analitiche di aflatoossina annue, preferibilmente del tipo “immediato”¹. Dai dati in nostro possesso questo tipo di controllo è oggi praticamente inesistente. Il numero di prove eseguite su scala nazionale, annualmente, non supera le poche migliaia, e si tratta quasi sempre di analisi effettuate sui silos o sugli ammassi, non sui carichi in arrivo. La situazione attuale, per quanto riguarda i primi passaggi della filiera che dal campo va al latte, per esempio, è tale da far ricadere il rischio aflatoossina sull’allevatore e sull’industria lattiero casearia. Il mais, elemento chiave nell’alimentazione delle vacche da latte, giunge all’industria mangimistica o torna alle aziende agricole come un’incognita, e spesso tale rimane fino a produrre gli effetti che sono noti. Le 353.000 analisi teoricamente necessarie ogni anno (mediamente una per ogni azienda agricola produttrice di mais, una ogni 3 ettari) permetterebbero di diversificare il prodotto fin dal primo anello della catena, distribuendo in modo più equo i costi della qualità. Per poter fare questo servono i metodi immediati o i metodi rapidi, ma tali metodi devono essere allo stesso tempo affidabili, gestibili nel contesto aziendale specifico e, naturalmente, sostenibili economicamente.

Per quanto concerne il settore lattiero caseario, si può stimare che oggi, data la relativa scarsità dei controlli sull’alimentazione animale, si dovrebbero effettuare circa 1 milione di determinazioni annue di aflatoossina M₁. Di queste, circa 250.000 sarebbero da eseguirsi a livello di centrali del latte e circa 750.000 nei caseifici. Tale è la dimensione del controllo necessario sulla base della produzione annua di latte e di formaggio vaccini (circa 10.216.000 tonnellate

¹ Il calcolo presuppone un controllo ogni 30 tonnellate e si basa sul dato ISTAT 2003 di 10,6 milioni di tonnellate di mais prodotte nel 2003 in Italia.

annue¹, provenienti da circa 67.000 allevamenti; di queste circa il 75% va ai caseifici) e ipotizzando che si controlli ogni lotto di latte che perviene giornalmente alle centrali e ai caseifici italiani. I controlli eseguiti alle centrali vanno effettuati con metodi “immediati”, quelli dei caseifici possono anche essere effettuati con metodi “rapidi”.

Basandosi sui dati in nostro possesso possiamo stimare che nel corso del 2004 siano state effettuate in Italia circa 310.000 analisi di autocontrollo per l'aflatossina M₁. Di queste circa 60.000 prove sono state fatte nelle centrali del latte, al ricevimento, circa 250.000 nei caseifici o per conto dei caseifici, le prime con i metodi “immediati”, le seconde prevalentemente con kit “rapidi”, in misura marginale con l'HPLC. Sulla base di questa stima il grado di copertura ottenuto in sede di autocontrollo è dell'ordine del 25% per il latte che va come tale al commercio, mentre è del 33% per il latte destinato alla caseificazione. Se però si andasse a vedere il grado di copertura nel 2002, prima dello storico episodio di contaminazione diffusa dovuto alla scarsa qualità del mais del 2003,

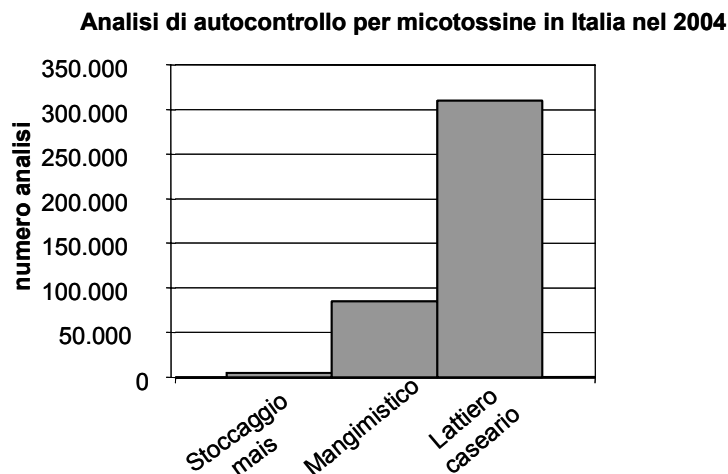


Figura 1. Distribuzione delle analisi di autocontrollo eseguite in Italia per le aflatossine (non sono comprese l'industria delle spezie e dei prodotti da forno). Delle circa 400.000 determinazioni totali, 310.000 (77,5%) sono test per la presenza di aflatossina M₁ eseguite dall'industria lattiero casearia, 85.000 sono ricerche di aflatossina B₁ eseguite dall'industria mangimistica e circa 5.000 (1,25%) sono ricerche di aflatossina B₁ eseguite dai produttori e/o dagli stoccatori di mais e altri cereali

si avrebbe un dato completamente diverso: il numero totale delle analisi di screening eseguite dai privati per la ricerca dell'aflatossina M₁ era probabilmente contenuto in 30 – 40.000 annue, con una copertura irrisoria sia per il latte che per i formaggi. Tali prove erano al 90% concentrate nelle maggiori aziende lattiero casearie.

Va infine segnalato che nei prossimi anni il numero delle determinazioni analitiche che dovranno essere eseguite sul mais è destinato ad aumentare ancora in modo considerevole per l'introduzione del limite comunitario per la fumonisina (somma di B₁ e B₂), per il DON e per lo zearalenone. L'introduzione del limite massimo di ocratossina A nel vino, ormai prossima, comporterà indubbiamente la necessità di implementare routinariamente una certa mole di controlli nel settore enologico, controlli oggi sporadici ed eseguiti sempre con metodi “lenti”. È probabile che l'introduzione di questi nuovi limiti, assieme al crescere del numero di aziende che implementeranno il controllo dei parametri già obbligatori, porterà il numero globale delle analisi di autocontrollo dalle attuali circa 400.000 ad oltre 500.000 annue.

¹ Dati ISTAT 2003

Le tecnologie, i formati, i prodotti

Lo spettro di soluzioni disponibili sul mercato per l'analisi veloce delle micotossine è molto ampio. Prima di iniziare la nostra panoramica sui vari tipi di kit, è necessario chiarire che limiteremo la nostra esposizione ai sistemi immunochimici usa-e-getta, poiché quelli strumentali (biosensori del tipo immunosensori), pur promettenti, sono ancora confinati in ambiti sperimentali o hanno costi troppo elevati per le applicazioni alle quali ambiscono.

I kit a risposta “immediata”

Sulla base della definizione precedentemente data, i test “immediati” devono contenere il tempo di saggio in 20 minuti. Tre sono le tecnologie permettono oggi di rivelare concentrazioni nanomolari di antigeni in questi tempi: EIA o ELISA¹, “lateral-flow” e la fluorimetria.

I saggi immunoenzimatici, o EIA, sono ben noti. La gran parte dei kit basati sul metodo EIA o ELISA richiedono però da 30 a 90 minuti per l'esecuzione e sono relativamente complicati da impiegare. Fanno eccezione alcuni kit, messi a punto in particolare per il controllo del mais e degli altri cereali. Si tratta prevalentemente di saggi qualitativi o semi-quantitativi, concepiti appositamente per controlli in stabilimento. Sono kit nei quali il produttore ha messo la semplicità d'uso al primo posto. Esempi di questo tipo di EIA immediati sono i sistemi *Agriscreen* e *Veratox* della Neogen (USA), i kit *Express* e “FAST” della r-Biopharm (D), i kit *AflaSTOP B₁* e *AflaSTOP M₁* della Tecna (I) e i kit *Agraquant* della Romerlabs. Un esempio di questo tipo di kit e delle prestazioni ottenibili è riportato in Figura 2.

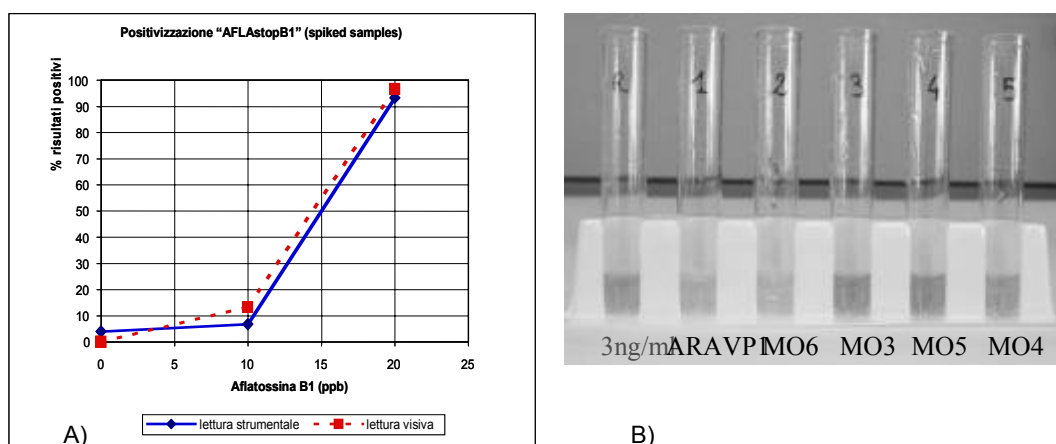


Figura 2. Ricerca dell'aflatossina B₁ nel mais. A) la risposta di un kit ELISA “da campo” per l'aflatossina B₁: il grafico rappresenta la percentuale di risposte positive al crescere della concentrazione di aflatossina nel campione (mais). B) le provette al termine del saggio: il controllo è la prima provetta (marcata “R”), nelle altre provette sono stati saggiati estratti di mais contenenti, rispettivamente, 32.0, 17.5, 5.7, 0.4 e 14.8 ppb (determinati mediante HPLC in un singolo laboratorio). Kit *AflaSTOP B₁* Tecna.

¹ EIA (Enzyme Immuno Assay) è generalmente definito un saggio immunoenzimatico nel quale gli immunoreagenti sono impiegati a concentrazioni estremamente diluite, ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) è invece un saggio nel quale gli anticorpi sono presenti “in eccesso” rispetto agli antigeni da rilevare. I primi sono tipicamente saggi competitivi, i secondi non competitivi. I test per la rilevazione delle micotossine, dato il peso molecolare di queste molecole, non possono che essere saggi competitivi. La distinzione EIA – ELISA è col tempo sfumata e molti, specialmente in campo agro-alimentare, definiscono ELISA ogni saggio di tipo immunoenzimatico.

Per realizzare il saggio in tempi ancora più brevi e con operazioni semplici, la reazione è stata portata su membrane porose, ove questa può avvenire più rapidamente ed essere evidenziata dalla presenza di macchie di colore (cosiddetto *flow-through immunoassay* o *immunofiltration assay*) (1). L'operatore deve dispensare in sequenza, oltre al campione, anche dei reagenti, operazione agevolata dai flaconi contagocce contenuti nel kit. Questo tipo di saggi EIA su membrana possono essere definiti "card", poiché l'aspetto del kit ricorda a volte quello di una carta di credito. Esempi di questo tipo di test sono l'*Afla-cup 20* (International Diagnostic System Corp., USA), kit validato AOAC e GIPSA, e l'*AflaCard* (RhoneBiopharm, UK). L'aspetto di uno di questi kit nei quali la reazione immunochimica avviene su membrana si può osservare nella Figura 3.

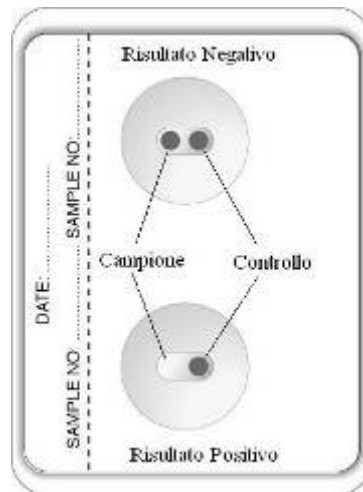


Figura 3. Card test per l'aflatossina (Kit Aflacard RhoneBiopharm): sono rappresentati gli esiti di due campioni, il primo, nella parte superiore della card, è negativo (non si presenta inibizione, il colore dei due siti di legame è identico), il secondo è positivo (c'è inibizione del legame nel sito del campione). (Riprodotta per gentile concessione di R-Biopharm RHÔNE)

I test basati sul principio del *lateral-flow*, detti a volte "immunocromatografici", sono immunosaggi, ma non saggi immunoenzimatici. Questi kit sono basati su particelle colorate (spesso oro colloidale) che migrano in una striscia di nitrocellulosa o altro materiale simile fino ad addensarsi nella zona di reazione; per questo definiti anche "strisce" o *lateral-flow*. La principale caratteristica delle strisce è quella di essere "autosviluppanti" (*walk away devices*). In pratica l'utilizzatore deve solo porre la striscia a contatto del campione e attendere alcuni minuti. Si tratta perciò di un vero test da campo. La tecnologia del *lateral-flow*, impiegata per le strisce autosviluppanti, consente davvero di portare l'analisi dei contaminanti fuori dai laboratori, ovunque e nelle mani di chiunque. Va però ricordato, nel caso dei test su cereali e mangimi, che questa potenzialità è limitata dalla necessità di estrarre comunque le tossine dalla derrata prima di eseguire il test (l'estrazione richiede comunque l'impiego di solventi tossici quali il metanolo). Esempio di questo tipo di kit è il *ROSA* (Charm Sciences Inc., USA) disponibile sia per l'aflatossina M_1 che per la B_1 . Uno di questi kit è rappresentato in Figura 4.

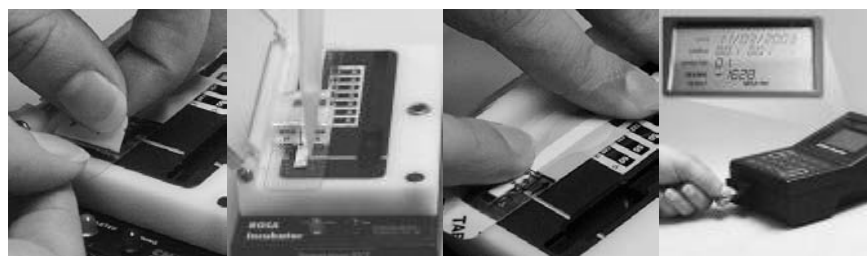


Figura 4. Kit lateral-flow ROSA della Charm Sciences, Inc. per la rivelazione dell'aflatossina M₁ nel latte. Per raggiungere il limite di rivelazione di 0,05 ug/kg il kit necessita, oltre all'incubatore, anche di un lettore (densitometro). (Riprodotta per gentile concessione di Charm Sciences, Inc.)

Strisce autosviluppanti e immuno-card hanno in comune, oltre alla rapidità e alla semplicità d'uso, anche un'altra fondamentale caratteristica: sono tipicamente saggi qualitativi. Inoltre, nella maggior parte dei casi, la lettura avviene visivamente e non strumentalmente. Per questo, anche considerando le condizioni un po' estreme nelle quali i saggi "immediati" vengono impiegati, è utopistico pensare che questi test siano in grado di discriminare nettamente i lotti di cereali o latte in positivi e negativi. Sarà l'utilizzatore a dover verificare se il numero di campioni dubbi (in zona grigia) è accettabile o meno per un certo kit applicato ad una certa matrice in una certa situazione aziendale.

Possiamo anche classificare nella famiglia dei test "immediati" una terza soluzione analitica: la fluorimetria. Per essere più precisi, attualmente il kit che viene maggiormente impiegato (*Afla-test*, Vicam Inc., USA), validato AOAC-RI e GIPSA/USDA, sfrutta la combinazione dell'immunoaffinità con la rivelazione fluorimetrica delle micotossine. La colonnina di immunoaffinità permette di purificare perfettamente la tossina presente nell'estratto acqua/metanolo. Un secondo kit, meno noto in Italia (*Fluoro-quant*, Romerlabs) anch'esso validato GIPSA/USDA, abbina alla fluorimetria una colonna di purificazione chimica one-step, rendendo il test ancora più rapido (5 minuti contro i circa 15 del test Vicam). Con un rapido passaggio di reazione, le tossine sono poi derivatizzate e determinate con piccoli fluorimetri, già calibrati. La fluorimetria è altrettanto rapida degli altri metodi "immediati", ma ha un notevole vantaggio: è un metodo quantitativo. Potendo disporre di sufficienti risorse economiche e di un piccolo laboratorio, questo metodo si presenta quindi come superiore rispetto alle card e alle strisce. Non è comunque disponibile un metodo di questo tipo per la determinazione dell'aflatossina M₁.

I kit a risposta "rapida"

Come abbiamo detto, classifichiamo come "rapidi" quei test che consentono di ottenere un responso in un tempo compreso tra 30 minuti e due ore. È questa la categoria nella quale rientrano la maggior parte dei kit ELISA. La tecnologia del saggio immunoenzimatico prevede di effettuare la reazione immunochimica in fase liquida, generalmente nei micro-pozzetti della piastra da microtitolazione. I ridotti volumi sono un vantaggio perché la miniaturizzazione agevola lo svolgimento di molte analisi in poco spazio, ma rende indispensabili le micropipette, uno strumento delicato, che deve poi essere gestito e mantenuto con cura, delimitando quindi l'ambito applicativo di questi kit ai laboratori veri e propri, in particolare alle mani di operatori addestrati. Passando dai test "immediati" ai test rapidi non si è solo varcata la soglia del laboratorio, si è soprattutto cambiato l'operatore. Se il test "rapido" viene messo nelle mani di operatori non addestrati, perché si ritiene che il kit sia per tutti, si è commesso un grave errore.

Il test di screening è rapido, ma è una prova analitica come tutte le altre, con le stesse esigenze di cultura, addestramento, controllo e verifica che sono proprie delle prove di laboratorio. Le principali caratteristiche dei saggi ELISA rapidi per le micotossine sono:

1. il carattere quantitativo della prova
2. la possibilità di analizzare in parallelo decine di campioni
3. la buona riproducibilità del risultato
4. la disponibilità di un'ampia offerta di kit per le principali tossine

La possibilità di analizzare centinaia di campioni al giorno ha consentito a vari laboratori di gestire con i kit emergenze quali quelle dovute alla diffusa contaminazione del latte con aflatossina M₁ negli ultimi mesi del 2003.



Figura 5. Contenuto di un kit EIA e fase dell'esecuzione di un saggio immunoenzimatic in formato micropiastra

Tra i limiti del metodo va annoverata la necessità di saggiare almeno 5 campioni per seduta, onde evitare che il costo della prova sia troppo elevato per un test di screening, nonché la necessità di acquisire, oltre alle micropipette, un lettore per strip o per micropiastre, poiché l'analisi non può essere quantitativa se la lettura è visiva.

Kit ELISA: affidabilità, limiti

Come abbiamo visto, la gran parte delle circa 400.000 analisi di screening effettuate ogni anno in Italia per la ricerca delle aflatossine nei mangimi e nel latte vengono eseguite con metodo rapido ELISA. A queste si devono poi aggiungere le analisi per la ricerca delle altre tossine nei mangimi (soprattutto DON, zearalenone, fumonisina, tossina T₂) nonché un certo numero di analisi eseguite per le varie micotossine in altri settori dell'industria e un notevole numero di prove di screening effettuate dagli organi di controllo pubblico (soprattutto dagli Istituti Zooprofilattici Sperimentali). A tali prove ELISA, in ambito autocontrollo, anche quando l'esito è positivo, non segue alcuna analisi di conferma di tipo cromatografico. Il motivo è che i costi diventerebbero troppo elevati e i tempi si allungherebbero di nuovo. Si pretende quindi dal kit ELISA un dato quantitativo accurato, poiché si tratta di un dato definitivo. In questo contesto è quindi molto importante non solo che i kit non abbiano falsi negativi, ma anche che il numero dei falsi positivi sia molto contenuto.

Negli scorsi anni, prima in riferimento alla ricerca dell'aflatossina B₁ e poi, più recentemente, in riferimento al dosaggio dell'aflatossina M₁ nel latte, si è da parte di alcuni autori, affermato che "i kit ELISA portano ad una sovrastima" (2). L'affermazione è generica e anacronistica. Va innanzitutto ricordato al lettore che il metodo immunoenzimatico è

correntemente impiegato nei laboratori clinici di tutto il mondo, da decenni, non solo per importanti parametri qualitativi (come la presenza di anticorpi contro le malattie infettive quali HIV o epatite) ma anche per moltissime determinazioni quantitative, come, per esempio, il dosaggio degli ormoni steroidei, presenti nel sangue umano a concentrazioni di ppb o frazioni di ppb. L'affidabilità degli immunosaggi, in genere, non è in discussione nel contesto generale della chimica analitica. In campo alimentare l'accuratezza dei risultati è in realtà variabile da un kit all'altro, da una matrice all'altra e, a volte, anche da un lotto all'altro di uno stesso kit.

Da cosa dipende quindi l'affidabilità dei kit ELISA impiegati in campo alimentare e per le micotossine in particolare? L'applicazione alimentare degli immunosaggi è caratterizzata dalla necessità di analizzare matrici complesse senza alcun passaggio di purificazione. Questo, e solo questo, è il motivo dei fenomeni di inaccuratezza che caratterizzano i dosaggi immunoenzimatici per alimenti e mangimi. Vediamo alcuni esempi. Il dosaggio immunoenzimatico dell'ocratossina A nel vino. In questo caso, secondo le istruzioni dei kit, il campione viene estratto e purificato. In conseguenza di ciò, non c'è traccia di falsi positivi né di sovrastime (3, 4). Altro esempio è quello dell'aflatossina M₁ nel latte, proprio il parametro attorno al quale nel 2003-2004 si sono accese molte discussioni. Alcuni hanno sostenuto l'inadeguatezza del metodo ELISA in assoluto, altri hanno, come dicevamo, affermato che questo metodo porterebbe ad una significativa sovrastima. Negli anni 1995-2002 era in realtà disponibile sul mercato un kit che dava risultati precisi ma una sistematica sovrastima a valori superiori a 0,03 ug/kg, l'"ELISA System Aflatoxin M₁", Riedel-de-Haen (5). Questo kit, che in ogni caso molte aziende avevano usato con efficacia, non è più in commercio da maggio 2002. Con i due kit immunoenzimatici oggi disponibili questo fenomeno non si verifica. Il dosaggio è, mediamente, accurato, come dimostrano, ad esempio, i risultati raccolti nel corso dell'uso routinario di uno di questi kit nell'industria lattiero casearia (6). Questi dati sono rappresentati in Figura 6.

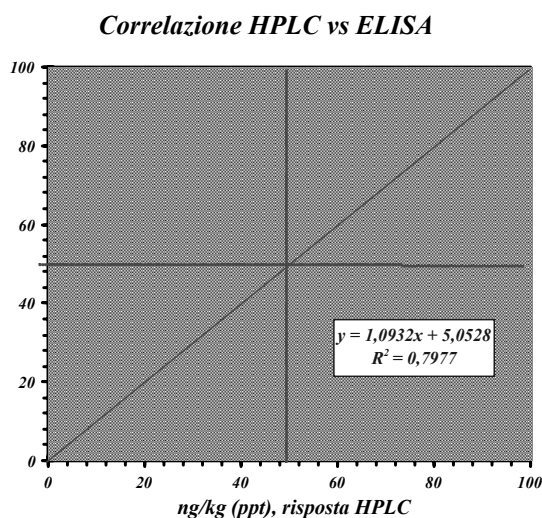


Figura 6. Ricerca dell'aflatossina M₁ nel latte: confronto tra il dato di un kit immunoenzimatico e il dato dell'analisi HPLC; prove su 604 campioni (6)

A conclusioni simili si giunge anche analizzando gli esiti di tre ring test organizzati tra il 2003 e il 2004 dal Laboratorio Standard Latte dell'Associazione Italiana Allevatori (7). Le medie dei dati ELISA e HPLC sono molto vicine (Tabella 1), con valori a volte leggermente più elevati in ELISA. All'analisi statistica tali differenze si dimostrano spesso non significative. Va

precisato che la maggior parte dei laboratori che hanno preso parte a questi ring test per l'aflatossina M₁ con metodica HPLC ha dichiarato di eseguire prove di recupero solo saltuariamente e di non correggere il dato sulla base degli stessi recuperi (dato emerso a seguito di indagine effettuata dall'ente organizzatore). A questo punto è legittimo ipotizzare che il dato medio HPLC sia in alcuni casi una sottostima, piuttosto che quello ELISA una sovrastima.

Tabella 1. Risultati dei ring test AIA per l'aflatossina M₁ nel latte

Codice Materiale	Round effettuato in	Media ELISA +/- dev. Standard, mg/kg (ppb)	RSDR* ELISA %	Media HPLC +/- dev. Standard mg/kg (ppb)	RSDR* HPLC %	Differenza delle medie statisticamente significativa?*
A	Ottobre 2003	0,048 +/- 0,013	26,8	0,054 +/- 0,016	29,6	NO
B		0,038 +/- 0,005	14,3	0,041 +/- 0,009	23,5	NO
C		0,039 +/- 0,006	15,3	0,043 +/- 0,009	21,3	NO
E		0,025 +/- 0,004	17,2	0,025 +/- 0,005	18,4	NO
1-3	Aprile 2004	0,025 +/- 0,004	17,2	0,022 +/- 0,005	19,6	NO
2-4		0,065 +/- 0,009	14,2	0,052 +/- 0,010	19,3	SI
1-3	Ottobre 2004	0,027 +/- 0,004	14,6	0,018 +/- 0,004	22,4	SI
2-4		0,065 +/- 0,009	14,2	0,056 +/- 0,012	21,4	SI
5-6		0,024 +/- 0,003	12,0	0,020 +/- 0,005	25,0	SI
media			16,2		22,2	SI

*deviazione standard relativa tra laboratori ("among laboratories Relative Standard Deviation");

**verificata mediante test t, con correzione di Welch, impiegando il software InStat 3 (GraphPad Software Inc.)

Il risultato accurato è possibile, in questo caso, perché dal campione si rimuove il grasso e si effettua una calibrazione in matrice. A parità di tecnologia impiegata, tra un kit e l'altro ci sarà poi la differenza dovuta alla diversa specificità dei vari anticorpi e anche la capacità dei singoli produttori di calibrare più o meno correttamente il saggio. Per questo motivo i vari kit per l'aflatossina M₁ non hanno comunque la stessa accuratezza.

Rimozione della matrice e, quando possibile, calibrazione in matrice, portano dunque a dosaggi accurati anche con metodica ELISA. Così è comprensibile che i dosaggi rapidi delle micotossine nei mangimi, laddove non si opera alcuna purificazione né si calibra in matrice, abbiano, in genere, un'accuratezza minore.

Per alcune micotossine, come DON e fumonisina, diversi laboratori lamentano la tendenza di alcuni kit alla sovrastima sistematica. Tale sovrastima si manifesta al confronto con l'HPLC ma in misura molto più contenuta negli esperimenti di spiking. Ragione di questo fenomeno, in buona misura, la presenza nel campione di altri metaboliti secondari che cross-reagiscono con l'anticorpo impiegato. Nella maggior parte dei casi, per esempio, il dosaggio del DON per via ELISA è in realtà un dosaggio di un gruppo di tricoteceni (3 acetil DON, 15 acetil DON e altri) ma viene confrontato con una prova HPLC nella quale viene dosato il solo DON. Similmente, per la fumonisina molti laboratori oggi quantificano in HPLC la sola forma B₁, mentre i kit in commercio hanno tutti notevoli cross-reattività per la B₂ e la B₃. In questi casi siamo quindi di fronte ad una insufficiente specificità dei saggi, ma anche ad indagini cromatografiche migliorabili.

L'affidabilità dei kit ELISA per l'aflatossina e per la stessa fumonisina nei cereali è comunque giudicata sufficiente da enti autorevoli, quali il GIPSA (organo tecnico del Ministero dell'Agricoltura degli Stati Uniti d'America). Tale ente ha infatti approvato, e mantiene sotto controllo, come validi per il dosaggio delle aflatossine (tra 5 e 100 ppb) 3 kit quantitativi in

micropiastra, e altri 3 kit ELISA sono approvati per il dosaggio della fumonisina ELISA (intervallo di dosaggio 0,5 – 5 ppm).

Per quanto concerne la riproducibilità del dato ELISA, questa si manifesta attualmente come un punto di forza del metodo. Significativi in questo senso sono, ancora una volta, i dati dei ring test AIA, già presentati in Tabella 1 (7), dai quali si osserva come la precisione del metodo rapido sia significativamente migliore di quella del metodo cromatografico. La riproducibilità, espressa come deviazione standard relativa (RSD_R), è infatti di poco superiore al 16%, quella dell'HPLC oltre il 22%. Secondo l'equazione ideata da Horwitz negli anni '80 la RSD_R , in questo intervallo di concentrazioni, potrebbe salire, con qualsiasi metodo analitico, ad oltre il 65% (8). In letteratura si trovano diversi lavori nei quali la RSD_R degli ELISA per micotossine era stimata significativamente peggiore di quella ottenibile con le metodiche cromatografiche (9). Possiamo quindi concludere, alla luce dei dati presentati, che lo stato dell'arte si è modificato. I kit attuali sono probabilmente più robusti di quelli disponibili 10 - 15 anni fa, così come gli operatori sono certamente in più addestrati e più consapevoli dei punti critici del metodo.

Va comunque ricordato che risultati affidabili si possono ottenere solo se l'attrezzatura e la strumentazione impiegata sono adeguati e soprattutto se l'operatore ha avuto un addestramento specifico. L'esecuzione del saggio non comporta infatti particolari capacità, ma l'operatore sbaglia a volte nell'elaborazione dei risultati fuorviato, ad esempio, dai software dei lettori per micropiastre. Non di rado, inoltre, si manca di effettuare un minimo controllo di qualità interno e quasi sempre manca quello esterno (partecipazione a proficiency test). In conseguenza di ciò anche un kit plurivaldato può dare origine a responsi falsi negativi o falsi positivi. Per ovviare a questo fenomeno ogni tecnico dovrebbe partecipare a specifici corsi di addestramento.

I costi delle analisi rapide

La dimensione economica dell'autocontrollo effettuato dai produttori alimentari non risulta essere mai stata analizzata in letteratura. È però indubbio che si tratti di un aspetto rilevante perché si arrivi a garantire il rispetto dei limiti comunitari in materia di micotossine negli alimenti e nei mangimi. Cercheremo qui brevemente di esaminare le opzioni che hanno di fronte gli operatori del settore dal punto di vista della spesa corrente e dell'eventuale investimento necessario.

Per quelle aziende che ritengono possibile o addirittura indispensabile allestire una forma di controllo "immediato", sono possibili, come abbiamo detto in precedenza, diverse opzioni. Per il controllo dell'aflatossina B_1 nei cereali, per esempio, si potrà impiegare un test su membrana (tipo *Afla-cup* o *AflaCard*) o in provetta (tipo *AflaSTOP*), tutti sistemi semplici di tipo qualitativo. Il costo industriale di queste prove (materiali, e mano d'opera compresa), è stimabile in circa 14 euro a determinazione. Alcune aziende utilizzano ELISA in micropiastra, ma il poco tempo a disposizione e le costrizioni economiche (lettura non strumentale) rendono spesso poco affidabile un saggio quantitativo in questo contesto. È anche possibile eseguire una prova "immediata" quantitativa, acquisendo un fluorimetro e il kit *Aflatest* o *Fluoro-quant*. Il costo, in questo caso è maggiore (18 euro) ed è necessario un investimento di circa 5.000 euro per lo strumento, che è poi dedicato solo a quel tipo di analisi.

Nel settore lattiero caseario, per il controllo dell'aflatossina M_1 , l'unico controllo "immediato" oggi è quello eseguibile mediante un kit in "lateral-flow" prodotto dall'americana Charm Sciences Inc., il "ROSA aflatoxin M_1 ". Si tratta di un test qualitativo, il cui costo industriale è attualmente di circa 9 euro a determinazione. Anche in questo caso è necessario

l'acquisto di uno strumento di lettura (densitometro), del costo di circa diverse migliaia di euro. Anche questo strumento è utile solo con i test del produttore.

Per quelle situazioni nelle quali è possibile gestire controllare gli approvvigionamenti di materie prime anche con analisi "rapide", la scelta è decisamente maggiore. Tanti sono i kit ELISA quantitativi presenti sul mercato per le varie micotossine che risulta qui impossibile elencarli. Vale solo la pena di dire che presso i produttori europei (r-Biopharm, Diffchamb, Tecna, per esempio) sono disponibili, oltre a kit progettati per i controlli immediati, anche kit pensati per privilegiare l'accuratezza e la precisione.

Per i controlli "rapidi" anche l'HPLC, per un numero limitato di campioni, potrebbe dare l'esito in tempi sufficienti. Alcune realtà industriali, infatti, hanno scelto di eseguire i controlli o parte dei controlli direttamente in cromatografia. Il motivo per cui la gran parte degli operatori, sia nel settore cerealicolo che nel settore lattiero caseario, ha preferito optare per i metodi di screening è prevalentemente economico. Il costo industriale di una prova HPLC è stimato mediamente in non meno di 25 euro, mentre quello di una prova con kit ELISA è stimato in circa 10 euro, operando in singolo (per la variabilità di questo costo, legata al numero di campioni per seduta, si veda la Figura 7). Inoltre, per disporre di una stazione di lavoro HPLC, l'investimento è stimabile in almeno 25.000 euro.

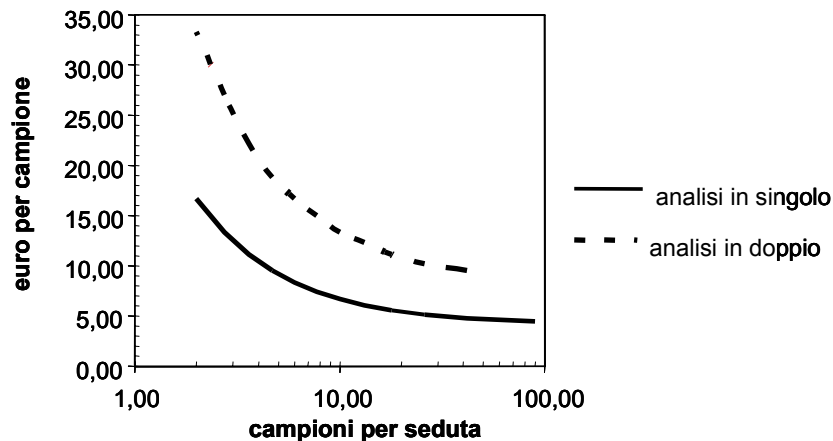


Figura 7. Costi delle determinazioni dell'aflatossina B₁, eseguite mediante kit immunoenzimatici (ELISA): i costi per analisi decrescono rapidamente al crescere del numero di campioni analizzati per seduta. Si ipotizza che il costo del kit sia di 400 euro (96 determinazioni). Analizzando 10 campioni per volta il costo per campione è di circa 13 euro, quando l'analisi è effettuata in duplicato (due pozzetti per ogni standard e ogni campione), circa 6,5 euro se l'analisi è effettuata in singolo. Il costo industriale, partendo da 6,5 euro di materiali, raggiunge circa 10 euro.

Considerando che un'azienda di medie dimensioni, ad esempio un mangimificio o un caseificio, deve effettuare diverse centinaia di prove all'anno, la maggiore spesa cui questa andrebbe incontro allestendo un laboratorio HPLC interno è molto rilevante. Nel caso le analisi siano 500 all'anno, ad esempio, la spesa passa da 5.000 a 12.500 euro. Inoltre l'azienda dovrebbe effettuare un investimento di 25.000 euro e disporre di un operatore che sia in grado di governare l'HPLC ma anche disposto a fare molte altre prove e lavori, come è tipico delle piccole imprese.

Dunque i metodi di screening, oltre ad essere metodi "rapidi" o "immediati", sono metodi economici, gli unici metodi che le piccole e medie aziende si possono permettere. La combinazione di test ELISA in azienda e un certo numero di prove di conferma eseguite in

laboratori esterni accreditati è, e sarà per molti anni, la combinazione più diffusa nelle principali filiere alimentari.

Ricordando infine, come abbiamo detto precedentemente, che le analisi di screening che verranno effettuate in Italia nei prossimi anni saranno dell'ordine di 500.000 all'anno, è possibile stimare il "peso" minimo di questo autocontrollo, eseguito prevalentemente con i kit ELISA, in circa 5 milioni di euro. Ipotizzando poi che si attivi una politica di "mais di qualità", la spesa per eseguire questa operazione sarebbe di 7,5 milioni di euro mediante analisi HPLC, mentre sarebbe contenuta in 3 milioni di euro impiegando metodi rapidi (con opportuni rilievi in campo, segregando fin dall'inizio, a livello dei centri di raccolta, il prodotto significativamente contaminato da micotossine, si può ipotizzare che siano necessarie 300.000 determinazioni di aflatossina e 300.000 determinazioni di fumonisina).

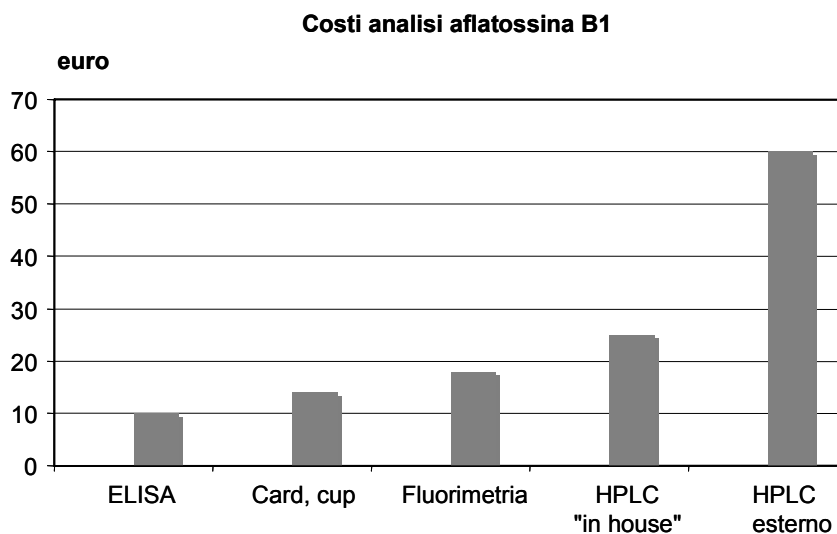


Figura 8. Costi industriali (materiali, mano d'opera e ammortamenti inclusi, costi generali esclusi) delle determinazioni dell'aflatoossina con i vari metodi disponibili. Il dato presuppone che siano eseguite circa 500 analisi all'anno e che le sedute analitiche, nel caso dell'ELISA, siano di circa 10 campioni per volta.

Conclusioni

La mole di determinazioni analitiche che deve essere eseguita in Italia per il controllo delle micotossine nelle filiere alimentari è dell'ordine delle 500.000 analisi annue. In molti casi le analisi, per avere un senso, devono dare una risposta immediata o comunque entro poche ore. Si verificano, a volte, emergenze che portano il numero dei controlli ad diverse centinaia alla settimana, a volte anche al giorno. Per rapidità, decentrabilità ed economicità, i metodi rapidi sono gli unici in grado di far fronte a simili esigenze. I metodi immediati (meno di 30 minuti) sono anche utili, ma sono prevalentemente qualitativi e hanno spesso un costo superiore al kit quantitativo. La fluorimetria risulta conveniente quando le analisi da fare sono poche e si vuole la risposta in 15 minuti. I kit ELISA commercialmente disponibili, in particolare per l'aflatoossina e l'ocratossina, hanno raggiunto un buon livello di accuratezza e precisione. Questi kit quantitativi sono consigliabili quando le partite e i fornitori da valutare sono numerosi e quando campionamento e analisi possono essere fatti con tempi di ore anziché di minuti.

Bibliografia

1. Haasnoot W, Schilt R. Immunochemical and receptor technologies. In: O'Keeffe M., (Ed.). *Residue analysis in Food, principles and applications*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 2000. p. 107-144.
2. Pietri A. Micotossine nel latte e negli alimenti: un problema di attualità. In: *Atti del Convegno "Le Tre Giornate del Controllo Alimentare"*. Milano, 16-17 Giugno 2004. Milano: Morgan Ed. Tecniche; 2004. p. 25-28.
3. Persic L, Perrone P, Paleologo Oriundi M. Rapid and sensitive screening of ochratoxin A in wine samples by competitive ELISA. In: Smith C, Malmhede Yman I and Hellenas K (Ed.) *Proceedings of the VIIth International Conference on Agri-Food Antibodies*. Sept.10-13, 2003. Uppsala, Sweden. Uppsala, Editrice Academic Conferences; 2003. p. 55.
4. Bentivoglio L, Debegnach F, Minardi V, Paleologo Oriundi M, Brera C. Ocratossina A nel vino: valutazione delle prestazioni di un kit ELISA. In: *Le micotossine nella filiera agro-alimentare. I° Congresso Nazionale. Riassunti*. Roma, 29-30 novembre 2004. Roma: Istituto Superiore di Sanità, 2004.
5. Biancardi A. Determinazione di Aflatossina M₁ nel latte, metodologie immunochiniche e cromatografiche a confronto. *Industrie Alimentari* 1997; 36 (361); 870-876.
6. Borsari A, Rosi P, Fava A, Galanti A, Lodi S. Determinazione del contenuto di aflatossina M₁ nel latte bovino: correlazione tra il metodo immunoenzimatico (ELISA) ed il metodo cromatografico (HPLC-FLD). *Le micotossine nella filiera agro-alimentare. I° Congresso Nazionale. Riassunti*. Roma, 29-30 novembre 2004. Roma: Istituto Superiore di Sanità, 2004.
7. Associazione Italiana Allevatori, Laboratorio Standard Latte, *Ring Test Aflatossine*, Maccaresse, Roma, 2003-2004.
8. Horwitz W, Kamps LR, Boyer KW. Quality assurance in the analysis of foods and trace constituents, *Journal of AOAC International* 1980; 63(6):1344-54.
9. Whitaker T, Horwitz W, Albert R, Nesheim S. Variability associated with analytical methods used to measure aflatoxin in agricultural commodities, *J. of AOAC International* 1996; 79(2):476-485.

DETERMINAZIONE SIMULTANEA DELLE TOSSINE T-2 E HT-2 NEL FRUMENTO MEDIANTE HPLC CON RIVELATORE A FLUORESCENZA E DERIVATIZZAZIONE PRE-COLONNA CON 1-ANTROILNITRILE

Veronica Maria Teresa Lattanzio, Miriam Haidukowski, Michelangelo Pascale, Angelo Visconti
Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA), CNR, Bari

Introduzione

Le tossine T-2 e HT-2 sono tricoteceni di tipo A prodotti da alcune specie di *Fusarium* (principalmente *F. sporotrichioides* e *F. poae*) che, in condizioni ambientali favorevoli, possono colonizzare in campo vari cereali, in particolare frumento e mais. Tra tutti i tricoteceni conosciuti, le tossine T-2 e HT-2 sono quelle con effetti tossici più acuti. È stato dimostrato che la tossina T-2 è un potente inibitore della sintesi delle proteine, della sintesi di DNA e RNA, sia *in vivo* che *in vitro*, ha effetti ematotossici, immunosoppressivi e dermatossici. L'ingestione da parte dell'uomo di cereali contaminati con funghi del genere *Fusarium* (in particolare *F. sporotrichioides*, noto produttore di tossine T-2 e HT-2) è stata associata a casi di Leucopenia Tossico-Alimentare (ATA) nell'ex-Unione Sovietica, con gravi episodi di mortalità negli anni 1942-47. Poiché la tossina T-2 *in vivo* è rapidamente metabolizzata a tossina HT-2, la sua tossicità può essere attribuita, almeno parzialmente, a quella della tossina HT-2.

Recentemente il Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) ha valutato i rischi connessi con la presenza di alcune micotossine negli alimenti concludendo che sono disponibili poche informazioni sui livelli di contaminazione da T-2 e HT-2 negli alimenti e che sarebbe necessario avere maggiori informazioni per valutare i rischi associati all'ingestione di queste tossine da parte dell'uomo (1). Presso la Commissione Europea sono attualmente in discussione i valori massimi ammissibili di alcune tossine prodotte da *Fusarium* e, in particolare, per le tossine T-2 e HT-2 in cereali e prodotti derivati i limiti saranno fissati entro il 1° luglio 2007.

È necessario, pertanto, avere a disposizione metodi analitici sensibili e accurati per la determinazione delle tossine T-2 e HT-2 in diverse matrici agroalimentari, allo scopo di proteggere il consumatore dai rischi connessi alla loro esposizione. I metodi di analisi attualmente disponibili si basano su tecniche cromatografiche (TLC, GC-ECD/FID/MS, HPLC-MS) (2,3,6-9) e tecniche immunometriche (ELISA, *dipstick*, membrane) (2,4,5). La tecnica HPLC con rivelazione UV o in fluorescenza non può essere applicata ai tricoteceni di tipo A poiché queste molecole non hanno appropriati gruppi cromofori o fluorescenti.

Tra i metodi sopraelencati, quelli gas-cromatografici (GC) sono i più diffusi. Tuttavia recentemente uno studio interlaboratorio, svolto nell'ambito di un progetto europeo, ha messo in evidenza che i metodi GC presentano recuperi troppo alti (>110%), scarsa precisione, tempi lunghi di analisi, non linearità delle curve di calibrazione, effetto memoria e soprattutto interferenze dovute alla matrice, che possono determinare una sovrastima della tossina nel campione analizzato (10). L'HPLC con rivelazione a fluorescenza generalmente permette di determinare l'analita con elevata selettività, sensibilità e ripetibilità. Un metodo per la determinazione di tricoteceni di tipo A mediante HPLC e rivelatore a fluorescenza previa derivatizzazione con cumarin-3-carbonil cloruro, un reagente sintetizzato in laboratorio, è stato

recentemente sviluppato. Tuttavia il metodo quando applicato a campioni di cereali mostrava bassi recuperi (11, 12).

Recentemente, presso l'Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA) - CNR di Bari, è stato messo a punto un nuovo metodo di analisi per la determinazione della tossina T-2 in frumento e altri cereali che prevede la purificazione dell'estratto con colonne ad immunoaffinità e la determinazione della tossina mediante HPLC con rivelatore a fluorescenza previa derivatizzazione con 1-antrilnitrile (1-AN), un reagente fluorescente commercialmente disponibile (13). Di seguito viene descritta l'estensione di tale metodo alla determinazione simultanea delle tossine T-2 e HT-2 nel frumento.

Risultati e discussione

La reazione di derivatizzazione delle tossine T-2 e HT-2 con 1-antrilnitrile è stata condotta in toluene, in presenza di 4-dimetilamminopiridina (DMAP), utilizzando le condizioni sperimentali già ottimizzate per la reazione di derivatizzazione della tossina T-2 (13). La caratterizzazione dei corrispondenti esteri fluorescenti è stata effettuata mediante analisi HPLC-MS della miscela di reazione (ionizzazione positiva, QSTAR[®] hybrid Qq-TOF mass spectrometer, Applied Biosystem/MSD Sciex).

Per l'analisi cromatografica dei prodotti della reazione di derivatizzazione è stata utilizzata una colonna fenil-esile (150 × 4.6 mm, 5µm, Luna[®], Phenomenex). Il confronto tra i cromatogrammi ottenuti analizzando la miscela dei prodotti di reazione con una colonna C18 o C₈ (150 × 4.6 mm, 5µm, Zorbax[®], Agilent) e la colonna Luna[®] ha, infatti, rivelato che i vantaggi derivanti dall'uso di quest'ultima sono: tempi di ritenzione minori, migliore risoluzione, maggiore sensibilità, in particolare per la tossina HT-2.

È stata osservata una buona risposta lineare (area del picco-quantità iniettata) per la reazione di derivatizzazione delle tossine T-2 e HT-2 in miscela (1:1) nell'intervallo 0,05 – 8,00 µg. Il limite di rivelabilità, basato su un rapporto segnale/rumore di 3:1, è risultato di 4 ng per la tossina T-2 derivatizzata e di 3 ng per la tossina HT-2.

È stata inoltre valutata la stabilità dei derivati fluorescenti conservando la miscela di reazione per 7 giorni a temperatura ambiente e alla luce e per 30 giorni a 4°C e al buio. In entrambi i casi non è stato osservato alcun decremento significativo dell'intensità di fluorescenza relativa ai derivati.

La reazione di derivatizzazione con l'1-antrilnitrile è stata utilizzata per la messa a punto di un metodo di analisi per la determinazione delle tossine T-2 e HT-2 in campioni di frumento. Il metodo prevede l'estrazione delle tossine con una miscela metanolo/acqua, in presenza di NaCl, seguita dalla purificazione dell'estratto con colonna ad immunoaffinità T-2testTM HPLC (Vicom, USA). L'analisi degli estratti è stata quindi effettuata mediante HPLC con rivelatore a fluorescenza previa derivatizzazione con 1-antrilnitrile. L'aggiunta di NaCl alla matrice nella fase di estrazione consente di ottenere dei cromatogrammi privi di picchi interferenti in prossimità dei tempi di ritenzione delle tossine.

In Figura 1 sono riportati i cromatogrammi di un estratto di frumento non contaminato e artificialmente contaminato con 250 ng/g di T-2 e 250 ng/g di HT-2. I recuperi medi determinati nell'intervallo di contaminazione 25-500 ng/g per ogni singola tossina sono risultati maggiori dell'85% con coefficienti di variazione (CV) minori dell'8%. Il limite di rivelabilità del metodo è di 5 ng/g per la tossina T-2 e di 10 ng/g per la tossina HT-2 (segnale/rumore 3:1).

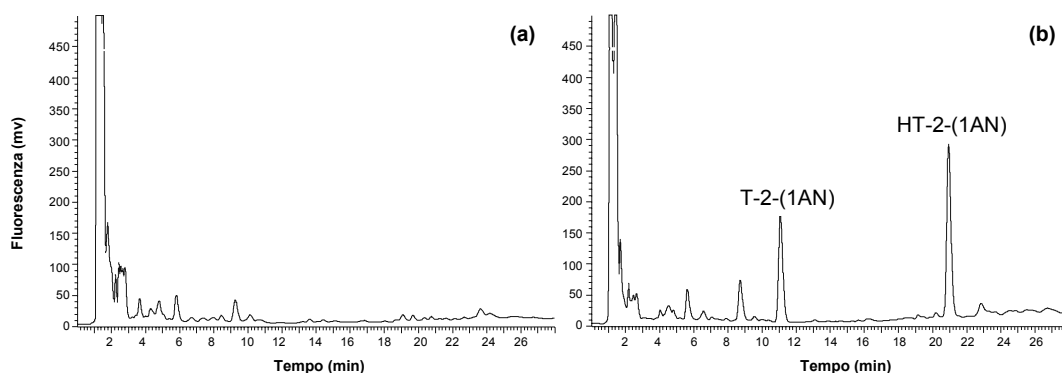


Figura 1. Cromatogrammi di estratti di frumento duro non contaminato e artificialmente contaminato con 250 ng/g di T-2 e 250 ng/g di HT-2 dopo purificazione con colonne ad immunoaffinità e reazione di derivatizzazione con 1-AN.

Conclusioni

Il metodo analitico messo a punto consente la determinazione simultanea delle tossine T-2 e HT-2 nel frumento a livelli di ng/g (ppb) combinando la selettività della purificazione effettuata con colonne ad immunoaffinità con l'elevata sensibilità della tecnica HPLC con rivelatore a fluorescenza. L'utilizzo dell'1-antrolnitrile, per la formazione di esteri fluorescenti delle tossine T-2 e HT-2, si è rivelato particolarmente vantaggioso poiché il reagente è commercialmente disponibile e in grado di reagire in condizioni blande. Il metodo analitico consente la determinazione delle tossine T-2 e HT-2 con buona sensibilità, accuratezza e precisione.

Bibliografia

1. WHO Food Additives Series 47, FAO Food and Nutrition Paper 74, Presented at the 56th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JEFCA), WHO, Geneva, 2001. pp.557-638.
2. Krska R, Baumgartner R, Josephs R. The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals. *Fresenius J Anal Chem* 2001;371:285-299.
3. Trucksess MW. Mycotoxin protocols. In: Pohland AE (Ed.), *Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press; 2001. Vol. 157, p.115.
4. Park J, Chu F. Assessment of immunochemical methods for the analysis of trichothecene mycotoxins in naturally occurring moldy corn. *JAOAC Int* 1996;79:465-471.
5. Sibanda L, De Saeger S, Van Peteghem C, Grabarkiewicz-Szczesna J, Tomczak M. Detection of T-2 toxin in different cereals by flow-through enzyme immunoassay with a simultaneous internal reference. *J Agric Food Chem* 2000;48:5864-5867.
6. Langseth W, Rundberget T. Instrumental methods for determination of nonmacrocylic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. *J Chromatogr A* 1998;815:103-121.
7. Schothorst RC, Jekel AA. Determination of trichothecenes in wheat by capillary gas chromatography with flame ionisation detection. *Food Chem* 2001;73:111-117.

8. Schollenberger M, Lauber U, Jara HT, Suchy S, Drochner W, Muller HM. Determination of eight trichothecenes by gaschromatography-mass spectrometry after sample clean-up by a two-stage solid-phase extraction. *J Chromatogr A* 1998;815:123-132.
9. Berger U, Oehme M, Kuhn F. Quantitative determination and structure elucidation of type A- and B-trichothecenes by HPLC/ion trap multiple mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, 1999;47:4240-4145.
10. Petterson H, Langseth W. BCR Information Project Reports EUR 20285/1 EN (Part I) and EUR 20285/2 (Part II), European Commission, Brussels, 2002.
11. Mateo JJ, Mateo R, Hinojo MJ, Llorens A, Jimenez M. Liquid chromatographic determination of toxigenic secondary metabolites produced by *Fusarium* strains. *J Chromatogr A* 2002;955:245-256.
12. Dall'Asta C, Galaverna G, Biancardi A, Gasparini M, Sforza S, Dossena A, Marchelli R. Simultaneous liquid chromatography-fluorescence analysis of type A and type B trichothecenes as fluorescent derivatives via reaction with coumarin-3-carbonyl chloride. *J Chromatogr A* 2004;1047:241-247.
13. Pascale M, Haidukowski M, Visconti A. Determination of T-2 toxin in cereal grains by liquid chromatography with fluorescence detection after immunoaffinity column clean-up and derivatization with 1-antroynitrile. *J Chromatogr A* 2003;989:257-264.
14. Hunter KW, Brimfield AA, Miller M, Finkelman FD, SF Chu. Preparation and characterization of monoclonal antibodies to the trichothecenes mycotoxin T-2. *Appl Environ Microbiol* 1985;49:168-172.

DETERMINAZIONE DELL'AFLATOSSINA M₁ NEI FORMAGGI: NUOVO METODO ENZIMATICO DI ESTRAZIONE

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

Introduzione

Nella produzione di formaggi con latte contaminato, l'aflatossina M₁ (AFM₁) si ripartisce tra cagliata e siero, ma l'associazione con la caseina (interazione dell'AFM₁ con alcune regioni idrofobiche presenti sulla superficie della caseina) causa una più elevata concentrazione nel formaggio rispetto al latte utilizzato; i fattori di arricchimento calcolati vanno da 2,5-3,3 per i formaggi teneri a 3,9-5,8 per i duri. La metodica usualmente utilizzata per determinare la concentrazione di AFM₁ nei formaggi (es. AOAC) (1), prevede l'uso di cloroformio per l'estrazione della tossina dal campione grattugiato. Con l'avvento delle colonne di immunoaffinità (IA) per la purificazione, in sostituzione di altre colonne basate su fasi stazionarie convenzionali, il metodo è stato adattato; si evapora il cloroformio sotto vuoto e si riprende l'estratto con metanolo, acqua ed esano, in modo da recuperare con imbuto separatore l'AFM₁ nella fase idroalcolica ed eliminare il grasso con l'esano. Quindi si effettua la purificazione su colonna di IA e la quantificazione mediante HPLC con rivelazione fluorimetrica (2,3). Questo metodo, anche se laborioso, ha evidenziato una buona precisione, un buon recupero e un basso limite di rivelazione. Tuttavia, ci siamo chiesti se nel caso dei formaggi naturalmente contaminati (in particolare in quelli a pasta dura), il cloroformio è in grado di estrarre completamente l'AFM₁ legata alla caseina. Scopo del lavoro è stato quello di mettere a punto una tecnica di estrazione alternativa, utilizzando un'idrolisi enzimatica con pepsina per degradare le proteine del formaggio e liberare nella fase acquosa l'AFM₁ legata alla caseina.

Materiali e metodi

Metodo convenzionale

Il metodo prevede un'estrazione della tossina con cloroformio seguita da purificazione del campione su colonnina di IA. In un pallone si pesano 20 g di formaggio precedentemente grattugiato, si aggiungono 75 mL di CHCl₃, 1 mL di soluzione satura di NaCl e si agita per 45 minuti su agitatore rotativo. Si filtra su filtro di carta in un cilindro da 100 mL e si misura il volume dell'estratto. Il filtrato viene quindi evaporato con evaporatore rotativo a 40°C e ripreso con 1,5 mL di CH₃OH, 50 mL di H₂O bidistillata e 50 mL di n-esano. Successivamente, la miscela viene trasferita in un imbuto separatore e dopo la separazione, la fase acquosa inferiore viene fatta passare su colonnina di IA.

Metodo enzimatico di estrazione

Il metodo prevede un attacco enzimatico con pepsina allo 0,2% in HCl 0,1N, per 16 ore a 42°C. Successivamente, la soluzione viene centrifugata, filtrata, neutralizzata e purificata su colonna di IA. In un provettone da centrifuga (250 mL) si pesano 5 g di formaggio grattugiato e si aggiungono 50 mL di una soluzione di pepsina (Sigma, P-7000) allo 0,2 % in HCl 0,1 N. Il campione viene posto in stufa termostata a 42°C per 16 ore, sotto continua agitazione (magnetica). Quindi, la soluzione viene centrifugata a 4500 x g a 4°C per 15 minuti, allo scopo di separare il grasso. Dopo filtrazione su filtro di carta con eliminazione del grasso, si misura il volume del filtrato, che viene neutralizzato con NaOH 1N. Tutto il filtrato viene quindi fatto passare su colonna di IA; dopo lavaggio con 5 mL di acqua bidistillata, l'AFM₁ è eluita con 2 mL di CH₃OH e raccolta in una provetta di vetro. Dopo evaporazione del solvente con flusso di N₂, il residuo viene sciolto con 1 mL di miscela CH₃CN:H₂O=25:75 utilizzando un bagno ad ultrasuoni; la soluzione viene miscelata con vortex, filtrata (0,45 µm) e sottoposta ad analisi in HPLC.

Condizioni H.P.L.C.

È stata utilizzata una colonna RP-18 (Merck), con fase mobile CH₃CN:H₂O=25:75 a flusso 1 mL/min e rivelazione fluorimetrica (λ_{ecc} 365, λ_{em} 440 nm).

Risultati e discussione

Prove di recupero

Sono state valutate le percentuali di recupero dei due metodi, aggiungendo ad aliquote di un campione di formaggio grattugiato, risultato esente da AFM₁, un volume misurato di standard della micotossina, in modo da avere tre livelli di contaminazione (50-100-250 ng/kg). I risultati, non indicativi della capacità estrattiva dei due metodi utilizzati, ne hanno però dimostrato l'accuratezza e la precisione (Tabella 1).

Tabella 1. Percentuali di recupero di AFM₁

Metodo estrazione	50 ng/kg	100 ng/kg	250 ng/kg
	Recov.±SD* (%)	Recov.±SD (%)	Recov.±SD (%)
CHCl ₃	93,6±2,1	94,4±1,8	93,2±2,3
Enzimatico	96,6±1,6	95,9±2,3	95,8±2,1

* SD = deviazione standard (n. 4)

Estrazione con e senza pepsina

Su un campione di grana (ovviamente prodotto con latte parzialmente scremato) e due campioni di fontina (prodotta da latte intero) tutti naturalmente contaminati, è stata effettuata una prova di estrazione con pepsina e senza pepsina (in pratica estraendo con solo HCl 0,1N). I risultati (Tabella 2) dimostrano l'efficacia dell'enzima nel degradare la frazione proteica del campione, permettendo di liberare l'AFM₁ presente.

Tabella 2. Confronto tra estrazione con e senza pepsina

	Con pepsina (ng/kg)	Senza pepsina (ng/kg)
Grana (3 mesi)	228±3	52±2
Fontina (1 mese)	191±4	36±1
Fontina (1 mese)	534±8	72±2

Confronto tra i due metodi

Sono state effettuate analisi su numerosi campioni di formaggio, sia utilizzando il metodo convenzionale che il nuovo metodo. Nei formaggi a lunga stagionatura il metodo enzimatico fornisce valori di AFM₁ superiori anche del 50% rispetto all'estrazione con cloroformio (Tabella 3). Valori più elevati, tra il 7 e il 30%, sono stati ottenuti anche nei formaggi a breve e media stagionatura (da 1 a 8 mesi). Invece, prove effettuate con i due metodi su cagliate, mozzarelle e latte, hanno dato risultati equivalenti.

Tabella 3. Confronto tra valori di AFM₁ trovati con il metodo convenzionale (CHCl₃) e quello enzimatico

Formaggio	Metodo estrazione		Differenza %*
	CHCl ₃ (ng/kg)	Enzimatico (ng/kg)	
Grana (18)**	1042±23	1520±31	45,9
Grana (18)	555±14	881±20	58,7
Grana (18)	981±19	1439±18	46,7
Grana (18)	496±12	776±11	56,4
Grana (8)	1207±28	1572±25	30,2
Grana (8)	1069±23	1380±21	29,1
Grana (3)	240±12	260±11	8,3
Grana (3)	519±15	564±13	8,7
Grana (3)	197±7	228±6	15,7
Caciotta (3)	428±11	513±14	19,8
Caciotta (1)	794±17	986±26	24,2
Fontina (1)	161±5	191±5	18,6
Caciotta (1)	131±5	129±3	-
Caciotta (1)	150±5	160±4	-
Mozzarella	438±12	452±12	-
Mozzarella	977±25	944±25	-

* Diff % = [(conc.AFM₁ enzim - conc.AFM₁ clorof) / conc.AFM₁ clorof] * 100

** (18) = mesi stagionatura

I valori inferiori di AFM₁ ottenuti con il metodo convenzionale nei formaggi a media-lunga stagionatura, sono probabilmente da ricondurre all'interazione tra la tossina e la caseina, che non permette una totale estrazione da parte del cloroformio da una struttura compatta. In conclusione, il metodo proposto è senza dubbio preferibile, perché ha dimostrato una buona precisione e una migliore accuratezza, è meno laborioso, non presenta punti critici durante l'analisi ed evita l'uso di solventi tossici.

Bibliografia

1. AOAC. Aflatoxin M₁ and M₂ in fluid milk. *AOAC Official Method of Analysis* 1995; 986.16; 49.3.06.
2. Sharman MW, Potey AL, Gilbert J. Application of an immunoaffinity column sample clean-up to the determination of aflatoxin M₁ in cheese. *J Chromatogr* 1989; 474:457-61.
3. Pietri A, Bertuzzi T, Bertuzzi P, Piva G. Aflatoxin M₁ occurrence in samples of Grana Padano cheese. *Food Addit Contam* 1997; 14:341-44.

DETERMINAZIONE DELL'OCRATOSSINA A IN PRODOTTI CARNEI: NUOVO METODO ENZIMATICO DI ESTRAZIONE

Amedeo Pietri, Terenzio Bertuzzi, Alessia Gualla, Gianfranco Piva
*Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Facoltà di Agraria, Università Cattolica del S. Cuore,
Piacenza*

Introduzione

La presenza di ocratossina A (OTA) nelle carni e prodotti derivati può essere dovuta all'ingestione di alimenti contaminati da parte degli animali e successiva deposizione nei tessuti, o alla contaminazione diretta da muffe produttrici di OTA durante la stagionatura dei salumi. I dati a disposizione sulla presenza di OTA nelle carni suine commercializzate in Italia sono limitati; tuttavia, alcuni tipi di prodotti stagionati presentano una contaminazione diffusa, con un livello medio non molto inferiore al valore guida previsto dalla normativa italiana (1 µg/kg) (1). La metodica comunemente utilizzata per determinare la quantità di OTA in prodotti carnei, prevede: un'estrazione con cloroformio; una partizione con una soluzione di NaHCO₃ in imbuto separatore, con passaggio della tossina nella fase acquosa; dopo separazione delle fasi, una purificazione dell'estratto acquoso con colonna di immunoaffinità (IA) e una quantificazione mediante HPLC con rivelazione fluorimetrica (2). Questo metodo richiede tempi di analisi abbastanza lunghi e presenta difficoltà operative di estrazione per la complessità della matrice, anche se ha evidenziato una buona precisione, un buon recupero e un basso limite di rivelazione. Scopo del presente lavoro è stato quello di mettere a punto una procedura di estrazione alternativa, che prevede un'idrolisi enzimatica con enzimi proteolitici in grado di degradare la matrice carnea; il nuovo metodo elimina le fasi di estrazione con cloroformio e di ripartizione con la soluzione acquosa alcalina.

Materiali e metodi

Metodo convenzionale

Il metodo prevede un'estrazione della tossina con cloroformio, seguita da purificazione dell'estratto su colonnina di IA. In un pallone si pesano 5 g di campione precedentemente macinato, si aggiungono 100 mL di CHCl₃, 0,7 mL di acido orto-fosforico all'85% e si omogeneizza per 2 minuti. Si filtra su filtro di carta in un cilindro da 100 mL, si prelevano 50 mL e si trasferiscono in imbuto separatore, dove si estrae l'OTA con due aliquote da 25 mL di NaHCO₃ 0,5M. Si trasferiscono le fasi acquose in bicchiere da 50 mL e si controlla che il pH sia maggiore di 8,5. Un volume di 10 mL viene purificato su colonnina di IA dopo diluizione con 10 mL di tampone PBS (NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L, Na₂HPO₄ 1,15 g/L, KH₂PO₄ 0,2 g/L, pH 7,4).

Metodo enzimatico di estrazione

Il metodo prevede un'idrolisi enzimatica con pancreatina all'1% in tampone fosfato a pH 7,5, per 3 ore a 37°C. Successivamente, la soluzione viene centrifugata, filtrata e purificata su colonna di IA. In un provettone da centrifuga (250 mL) si pesano 5 g di campione precedentemente macinato e si aggiungono 100 mL di una soluzione di pancreatina (Sigma, P-1750) all'1% in tampone fosfato (NaH_2PO_4 0,2M: Na_2HPO_4 0,2M=16:84) a pH 7,5. Il campione viene posto in stufa termostata a 37°C per 3 ore, sotto continua agitazione (magnetica). In seguito, la soluzione viene centrifugata a 4500 x g a 4°C per 15 minuti. Dopo filtrazione su filtro di carta, 5 mL del filtrato vengono diluiti con un uguale volume di tampone PBS; la soluzione viene fatta passare su colonna di IA. Dopo lavaggio con 5 mL di tampone PBS, l'OTA è eluita con 2 mL di CH_3OH acido al 2% per acido acetico. Dopo evaporazione del solvente con flusso di N_2 , il residuo viene sciolto con 1 mL di miscela $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}=41:59$, utilizzando un bagno ad ultrasuoni; la soluzione viene miscelata con vortex, filtrata (0,45 μm) e sottoposta ad analisi in HPLC.

Condizioni H.P.L.C.

È stata utilizzata una colonna RP-18 Superspher (Merck) con fase mobile $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}=41:59$ a flusso 1 mL/min e rivelazione fluorimetrica ($\lambda_{\text{ecc}}=333$ nm, $\lambda_{\text{em}}=470$ nm).

Risultati e discussione

Prove di recupero

Sono state valutate le percentuali di recupero dei due metodi, aggiungendo ad aliquote di un campione di carne macinata, risultato esente da OTA, un volume misurato di standard della micotossina in modo da avere tre livelli di contaminazione (500-1000-2000 ng/kg). I risultati, non indicativi della capacità estrattiva dei due metodi utilizzati, ne hanno però dimostrato l'accuratezza e la precisione (Tabella 1).

Tabella 1. Percentuali di recupero di OTA

Metodo estrazione	500 ng/kg	1000 ng/kg	2000 ng/kg
	Recov.±SD* (%)	Recov.±SD (%)	Recov.±SD (%)
CHCl_3	87,7±2,8	89,7±2,5	88,4±2,8
Enzimatico	90,6±2,0	90,9±2,3	90,8±2,4

* SD = deviazione standard (n. 4)

Stabilità dell'OTA in presenza di pancreatina

Dopo aver verificato l'instabilità dell'OTA a pH acido e avere quindi scartato la possibilità di usare enzimi proteolitici attivi in quelle condizioni, è stata studiata la stabilità dell'OTA a pH 7,5, valore ottimale per l'attività della pancreatina, in presenza e in assenza dell'enzima. I

risultati ottenuti dimostrano una buona stabilità dell'OTA, fino a 6 ore, in presenza della pancreaticina (Figura 1).

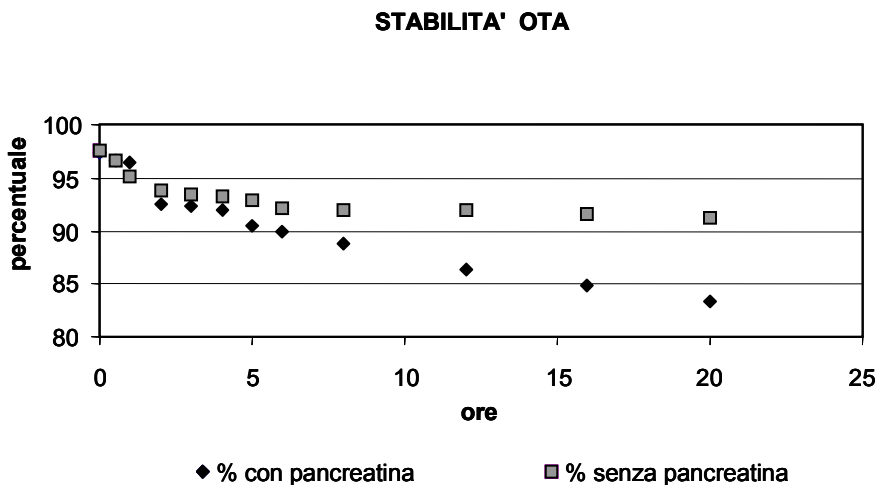


Figura 1. Cinetica di degradazione dell'OTA a pH 7.5 in presenza e assenza di pancreaticina

Confronto tra i due metodi

Sono state effettuate analisi su campioni di salami e prosciutti a diversa stagionatura, tutti naturalmente contaminati, sia utilizzando l'estrazione con cloroformio che il metodo enzimatico. Data l'eterogeneità della contaminazione (specialmente nel caso dei prodotti stagionati), al campione, dopo la macinazione, è stata aggiunta lentamente acqua sotto continua miscelazione (fino al 65% di umidità), al fine di ottenere un "omogeneizzato" o *slurry*; un'aliquota (riferita a 5 g del campione di partenza) è stata quindi sottoposta ad analisi con i due metodi (Tabella 2).

Tabella 2. Confronto tra valori di OTA trovati con il metodo convenzionale (CHCl₃) e quello enzimatico in campioni di prosciutto e salame

Matrice	Metodo estrazione		Differenza %*
	CHCl ₃ (µg/kg)	Enzimatico (µg/kg)	
Prosciutto	1,25±0,21	1,72±0,28	37,6
Prosciutto	1,02±0,19	1,33±0,24	30,4
Prosciutto	4,09±0,41	4,41±0,32	7,8
Salame	1,50±0,25	1,40±0,20	-6,6
Salame	2,74±0,28	3,73±0,35	36,1
Salame	2,08±0,25	2,14±0,21	2,9

* Δ % = [(conc.OTA_{enzim} - conc.OTA_{clorof}) / conc.OTA_{clorof}] * 100

I risultati ottenuti hanno dimostrato che i due metodi forniscono valori analoghi, solo leggermente superiori per l'estrazione che utilizza l'idrolisi enzimatica. I valori più elevati di OTA ottenuti con il nuovo metodo sono probabilmente dovuti ad un processo di estrazione che, per la sua semplicità, consente un miglior recupero della tossina. In conclusione, il metodo

proposto è senza dubbio preferibile, perché è meno laborioso, non presenta punti critici durante l'analisi ed evita l'uso di solventi tossici.

Bibliografia

1. Italia. Circolare 9 giugno 1999, n. 10. Direttive in materia di controllo ufficiale sui prodotti alimentari: valori massimi ammissibili di micotossine nelle derrate alimentari di origine nazionale, comunitaria e Paesi terzi. *Gazzetta Ufficiale* – Serie Generale n. 135, 11 giugno 1999.
2. Dragacci S, Grosso F, Bire R, Fremy JM, Coulon S. A french monitoring programme for determining ochratoxin A occurrence in pig kidneys. *Nat Toxins* 1999; 7:167-173.

OLIO VERGINE D'OLIVA: UNA MATRICE A RISCHIO

Rosalia Ferracane, Alessio Tafuri, Antonio Logrieco, Dolores Balzano, Alberto Ritieni
(a) Dipartimento di Scienza degli Alimenti Università di Napoli Federico II, Portici, Napoli
(b) Istituto Scienze delle Produzioni Alimentari CNR, Bari

Introduzione

Le origini dell'olivo e dell'olio sono considerate antichissime; infatti, ambedue compaiono per la prima volta nell'Asia occidentale per poi diffondersi in tutta l'area mediterranea.

Nell'ultimo decennio la coltura dell'olio sta ritrovando un nuovo rinascimento, grazie ai suoi effetti benefici ormai riconosciuti che lo rendono attore primario della dieta mediterranea.

Le potenzialità offerte dall'olio d'oliva sono molto ampie, considerando che il consumo dell'olio d'oliva è pari al 3% del totale degli oli vegetali.

Il consumo d'olio d'oliva, in Italia si aggira intorno a 750 mila tonnellate, per un valore complessivo di 3mila milioni d'euro circa e un consumo pro-capite di 12-13 chilogrammi. Il consumo di prodotto cosiddetto "sfuso" copre circa un terzo degli acquisti complessivi d'olio d'oliva. In Italia il mercato dell'auto-consumo costituisce il 29,7% della produzione d'olio d'oliva delle aziende del Centro-Nord e raggiunge il 65,9% al Sud e nelle isole; questo è da attribuire al fatto che il settore del confezionamento è concentrato per oltre il 40% in sole tre regioni (Toscana, Umbria e Lombardia).

La produzione d'olio d'oliva è invece concentrata al Centro-Sud con 550mila tonnellate e la Puglia primeggia con un ammontare di 217 mila tonnellate.

Il concetto di qualità si è andato arricchendo nel tempo all'approccio molecolare si è aggiunto quello fisiologico che tiene conto di fattori tossici, igienici e biologici fino a quello salutistico che considera l'alimento attore nel mantenimento e nella promozione del benessere fisico, mentale e sociale.

La qualità di un alimento è oggi definita in accordo alla norma UN-ISO 8402 (1), come l'insieme delle proprietà e delle caratteristiche che forniscono al prodotto la capacità di soddisfare esigenze espresse (requisiti organolettici e requisiti tecnologici-commerciali) o implicite (requisiti nutrizionali o pre-requisito di sicurezza).

Gli indici di qualità dell'olio vergine d'oliva sono individuati nel regolamento CE 656/95 che ha fissato gli standard qualitativi minimi che l'olio d'oliva deve presentare per poter essere commercializzato con la dicitura "verGINE" o "verGINE extra".

Il citato Regolamento Comunitario stabilisce ben 28 parametri analitici da verificare per valutare l'olio d'oliva; la maggior parte dei quali sono indici di genuinità che tutelano il consumatore da eventuali frodi.

Le analisi previste come indici di qualità sono invece:

- acidità libera
- numero di perossidi
- indici spettrofotometrici
- panel test.

Occorre rimarcare che la non conformità di uno solo dei parametri indicati, provoca il declassamento dell'olio ad una categoria merceologica inferiore.

Le micotossine sono metaboliti secondari bioattivi prodotti da alcuni funghi microscopici aerobici e parassiti delle piante e/o agenti d'ammuffimento delle derrate in fase di stoccaggio.

I generi fungini più tossici e diffusi, che comprendono specie micotossinogene sono *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Le aflatossine sono prodotte da muffe quali ad esempio l'*A. flavus* e l'*A. parasiticus* ad una temperatura ideale compresa tra 25°C e 30°C e un'umidità compresa tra 88 e 95%.

Le aflatossine sono solubili nei solventi organici polari, in quelli clorurati e negli idrocarburi aromatici sono invece poco solubili in acqua e insolubili negli idrocarburi saturi.

Le aflatossine si ritrovano essenzialmente nelle colture e nelle derrate a base di arachidi, semi piante oleaginose, mais e derivati, mandorle, noci, nocciole e fichi secchi.

L'attività tossica delle aflatossine scaturisce dalla loro peculiare capacità di legarsi con gli acidi nucleici, determinando effetti deleteri sulla sintesi proteica e sull'integrità degli acidi nucleici con conseguenti danni agli organismi; sono molecole considerate a ragione fra i più potenti agenti epatocarcinogenici per la loro capacità di danneggiare il prodotto di espressione del gene p53.

Le aflatossine sono in ogni modo considerate dei potenti agenti carcinogeni, teratogeni e mutageni molto pericolosi per la salute umana e degli animali (2, 3) tanto che sono fra le molecole più regolamentate in termini di residui indesiderati in numerose derrate alimentari.

Studi condotti da vari autori (4-9) mostrano che le olive possono essere un buon terreno d'accrescimento per la produzione d'aflatossine.

Spesso le olive prima di essere processate sono stoccate per settimane in condizioni che promuovono la crescita di muffe perché lasciate sul terreno, in sacchi di iuta, in depositi poco areati o in ogni caso favorevoli alla colonizzazione delle muffe tossigene.

Yassa *et al.* (1994) (10) hanno evidenziato da olive prodotte in Egitto un totale di 40 ceppi di muffe potenzialmente micotossinogene.

Nove di questi ceppi d'*A. flavus* e cinque ceppi d'*A. parasiticus* sono poi risultati *in vitro* produttori di aflatossina B₁, quando sono stati accresciuti su pasta di olive.

La raffinazione dell'olio d'oliva potrebbe rimuovere parzialmente le aflatossine all'olio crudo contaminato (11) o addirittura totalmente (12). Si è comunque osservato che l'olio d'oliva pressato veicola tra il 18 e il 47% delle aflatossine originariamente presenti su olive contaminate (7).

Le ocratossine sono una famiglia di micotossine isolate dapprima da colture d'*A. ochraceus wilhelm* e poi osservato essere prodotte da svariate specie d'aspergilli e penicilli. La famiglia delle ocratossine comprende nove molecole diverse fra cui la più nota e pericolosa è l'ocratossina A.

L'ocratossina A è solubile in solventi polari organici e in soluzioni acquose debolmente basiche. L'*A. ochraceus* è un fungo colonizzatore di cereali nonché di colture tropicali e subtropicali come caffè e cacao mentre tipica dell'uva è la colonizzazione da *A. carbonarius* (13).

Il *P. verrocosum* colonizza cereali (orzo, frumento, segale) (14), mentre l'*A. alliaceus* predilige mandorle e fichi delle aree temperate più calde. Oltre ai succitati substrati alimentari possono risultare contaminati anche birra, legumi, mangimi, nonché alimenti di origine animale specie carni suine.

Sono pochi i riferimenti in letteratura sulla contaminazione d'olio d'oliva da ocratossina A (11).

Il D.L. n.° 155 del 26.5.97 (15) prevede la messa in atto di sistemi d'autocontrollo per una gestione continua e organica delle disposizioni igieniche, garantendo la sicurezza e la salubrità degli alimenti. L'autocontrollo è il mezzo attraverso il quale ogni azienda può verificare l'efficacia del sistema produttivo, utilizzando le procedure di sorveglianza e di monitoraggio dettate dal sistema HACCP (*Hazard Analysis Critical Control Point*).

Il sistema HACCP fornisce le modalità tecniche per l'identificazione e la valutazione dei rischi e pericoli associati alle diverse fasi di produzione, determinandone le misure correttive

atte a prevenire, eliminare o ridurre la probabilità d'insorgenza di un pericolo entro limiti di accettabilità. Il prerequisito per lo sviluppo di un programma HACCP è il rispetto di corrette pratiche agricole e il rispetto delle norme di buona fabbricazione (16). L'applicazione di tale sistema al frantoio per la produzione dell'olio d'oliva è piuttosto difficoltosa per la loro elevata disseminazione sul territorio e per il ritardo accumulato fino ad oggi dagli operatori del settore.

Se è in parte vero che la composizione dell'olio lo rende inadatto allo sviluppo dei microrganismi per la mancanza d'ossigeno, per la ridotta presenza d'acqua e per la presenza di soli lipidi come risorse alimentari non si può escludere in esso la presenza di spore ed eventualmente di tossine preesistenti sulle drupe. Il principale fattore di rischio biologico, nel caso d'oli vergini, è lo sviluppo di muffe sulle olive o sui residui di paste d'olive, che possono ritrovarsi nell'impianto di frangitura se non sufficientemente bonificato (17).

I punti critici di controllo dell'intero processo sono il trasporto, lo stoccaggio delle olive e il loro lavaggio prima di iniziare la vera e propria frangitura. In campo, la contaminazione da micotossine è il risultato di diverse condizioni ambientali, come temperatura, precipitazioni, umidità relativa, presenza e diffusione delle muffe (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*), ma è assodato che la biosintesi delle micotossine può verificarsi nei vari stadi di trasformazione delle olive.

Le olive dovrebbero essere trasformate entro 12 ore dalla raccolta, soprattutto se le condizioni dell'olivaio non garantiscono basse temperature e una sufficiente aerazione. Il prolungamento del tempo di sosta si riflette negativamente sulla qualità dell'olio, aumentandone l'acidità e conferendo evidenti difetti organolettici, tra i quali sapore di muffa, riscaldamento e rancido. Uno stoccaggio prolungato può consentire la proliferazione di specie di muffe tossinogene così come un lavaggio superficiale del feltro miceliare formatosi sulle olive.

La prevenzione e, quindi, una corretta gestione delle fasi di raccolta, post-raccolta e stoccaggio, è sicuramente il modo migliore per prevenire e controllare la contaminazione da micotossine nell'olio d'oliva (18).

Materiali e Metodi

Tutti i solventi utilizzati per le fasi estrattive, per la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) e per la spettrometria di massa sono della Merck (Germania).

L'ocratossina A e l'aflatossina B₁ per le soluzioni standard sono della Sigma (USA).

La cromatografia in fase liquida ad alta prestazione (HPLC) per la determinazione delle micotossine è realizzata con un sistema HPLC della Shimadzu (Giappone), con rivelatore di fluorescenza modello RF-10Ax e una colonna cromatografica Bio-Sil C18 HL 90-5 S, 5µm, 150 x 4,6 mm, della Biorad (Belgio).

La purificazione degli estratti richiede colonne di gel di silice Spe-ed SPE da 500 mg/3 mL della Applied Separation (U.S.A.) e tutti i campioni sono stati filtrati su filtri RC 25 da 0.20 µm della Chemtek Analytica (Italia).

Per le analisi spettrofotometriche è stato impiegato uno spettrofotometro UV 2100 Shimadzu.

L'analisi di spettrometria di massa è stata realizzata mediante uno spettrometro di massa dell'Applied Biosystem (Toronto, Canada) Sciex API 3000, con interfaccia Turbo Ion Spray (TIS) e un triplo quadrupolo come analizzatore. La raccolta dei campioni analizzati è riassunta nella Tabella 1.

Tabella 1. Campioni d'olio sfuso e confezionato

Codice	Origine	Vendita	Pratiche agronomiche
P1	Bari	Sfuso	convenzionale
P2	Bari	Sfuso	convenzionale
P3	Taranto	Sfuso	convenzionale
S1	Salerno	Confezionato	convenzionale
P4	SASSO	Confezionato	convenzionale
P5	Pisciotta (SA)	Sfuso	convenzionale
C1	Castellana	Sfuso	convenzionale
M1	Marocco	Sfuso	convenzionale
M2	Marocco	Sfuso	convenzionale
M3	Marocco	Sfuso	convenzionale
P6	Bitonto (BA)	Confezionato	convenzionale
P7	COOP	Confezionato	convenzionale
P8	Gragnano(NA)	Sfuso	convenzionale
P9	Salerno	Sfuso	convenzionale
P10	Sicilia	Sfuso	convenzionale
P11	Oglirola Giovinazzo (FG)	Confezionato	convenzionale
P12	Salerno	Confezionato	biologico
L1	Riva degli Angeli (LE)	Sfuso	convenzionale
L2	P.to Cesareo-Veglie (LE)	Sfuso	convenzionale
L3	P.to Cesareo (LE)	Sfuso	convenzionale
L4	P.to Cesareo (LE)	Sfuso	convenzionale
L5	P.to Cesareo (LE)	Sfuso	convenzionale
L6	Veglie (LE)	Sfuso	convenzionale
L7	Veglie (LE)	Sfuso	convenzionale
L8	Cellina (LE)	Sfuso	convenzionale
L9	Carluccio (LE)	Sfuso	convenzionale
L10	Carluccio (LE)	Sfuso	convenzionale
L11	Nociara (LE)	Sfuso	convenzionale
L12	Chirella (LE)	Sfuso	convenzionale
P13	BIOFAM	Confezionato	biologico

L'acidità dei singoli campioni prevede la titolazione degli acidi grassi liberi mediante una soluzione d'idrossido di potassio (KOH) 0,10 N, fino al punto d'equilibrio della reazione di neutralizzazione evidenziato da fenolftaleina all'1% (Reg. CEE 2568/91).

Il metodo prevede che in una beuta da 200 mL si pesino esattamente 5 g. d'olio a cui si aggiungono 100 mL di una miscela alcool-etero (1:2 v/v), si agiti fino a dissoluzione completa. Dopodichè si aggiungono 50 µL di fenolftaleina all'1% e si titola con soluzione alcalina fino al viraggio della fenolftaleina. L'acidità, espressa in percentuale d'acido oleico è data da:

$$(V \cdot N \cdot 282) / (P \cdot 10)$$

V = volume (mL) di soluzione d'idrossido di potassio consumato

N = normalità della soluzione d'idrossido di potassio

P = peso (g) del campione prelevato.

Sulla base del contenuto percentuale in acidi grassi liberi gli oli d'oliva vergini sono classificati in quattro categorie (Reg. CEE 2568/91 e succ. mod.):

- Olio d'oliva vergine extra, acidità inferiore all'1%;
- Olio d'oliva vergine, acidità compresa tra 1% e 2%;
- Olio d'oliva vergine corrente, acidità compresa tra 2% e 3.3%;
- Olio d'oliva lampante, acidità superiore al 3.3%.

La determinazione del numero di perossidi valuta lo stato d'ossidazione degli acidi grassi e sfrutta le proprietà ossidanti degli idroperossidi stessi. Il valore del numero di perossidi dipende sia dalle tecniche agronomiche di coltivazione, raccolta, stoccaggio, e lavorazione delle olive, sia dall'ossidazione dei grassi durante la conservazione dell'olio.

La determinazione prevede una titolazione con soluzione di tiosolfato di sodio, 0.01 N, fino a scomparsa del colore blu viola dell'indicatore (Reg. CEE 2568/91). In una beuta da 300 mL si pesa una quantità variabile d'olio da 1 a 10 g. in funzione del numero di perossidi presunto, si aggiungono 25 mL di miscela acido acetico glaciale-cloroformio (3:2 v/v) e si agita a dissoluzione completa.

Si aggiungono 1 mL di soluzione satura di ioduro di potassio e dopo agitazione si lascia a riposo al buio per 5 min esatti, tempo necessario per l'ossidazione dello ioduro a iodio da parte degli idroperossidi. Si aggiungono 75 mL d'acqua distillata e 10 µL di salda d'amido, indicatore che si colore di blu-viola in presenza di iodio, si titola con il tiosolfato fino a scomparsa del colore. Il valore del numero di perossidi è dato da:

$$NP = V \cdot N \cdot 100/M$$

V = volume (mL) di soluzione di tiosolfato consumato

N = normalità della soluzione di tiosolfato

m = massa del campione prelevato (g).

Gli acidi grassi mono- o poli-insaturi dell'olio d'oliva come l'acido o l'acido linoleico e l'acido linolenico sono responsabili dell'ossidazione dell'olio da parte dell'ossigeno e conducono alla formazione di idroperossidi e alla coniugazione di doppi legami con variazione dell'assorbimento nella regione UV specie alla lunghezza d'onda di 232 nm, mentre la coniugazione di tre doppi legami (acido linolenico) comporta un aumento dell'assorbimento alla lunghezza d'onda di 270 nm. I valori di tali assorbimenti sono espressi come estinzione specifica E1% 1cm, cioè estinzione di una soluzione della sostanza grassa all'1% in spessore di 1 cm, e sono indicati con K grande (coefficiente di estinzione).

In un matraccio da 25 mL si pesano accuratamente 250 mg d'olio portando a volume con un solvente in modo da ottenere una soluzione all'1% (peso/volume). Sulla soluzione s'effettua la lettura allo spettrofotometro, contro un bianco costituito dal solvente, alle lunghezze d'onda di 232 e 270 nm.

L'esame spettrofotometrico dell'olio d'oliva prevede anche la determinazione del K inteso come:

$$K = K_{268} - (K_{264} + K_{272})/2$$

L'analisi HPLC dell'aflatossina B₁ e dell'ocratossina A negli oli d'oliva vergini si è basata sulla procedura di Daradimost *et al.* (2000) (19).

A 20 g. d'olio si aggiungono 40 mL di esano, la soluzione è poi estratta con 40 mL di una miscela acqua metanolo (40:60 v/v) per tre volte. Dall'estratto idroalcolico, raccolto in un pallone si allontana il metanolo a pressione ridotta e ad una temperatura costante di 35°C. L'estrazione richiede un totale di 120 mL di cloroformio poi evaporato a 35°C e il residuo ripreso in 5 mL di diclorometano.

La purificazione utilizza colonne di gel di silice (Spe-ed SPE) eluite per gravità con 3 mL di esano; 3 mL di diclorometano; con il campione risospeso in 2 mL di diclorometano; 3 mL di esano; 3 mL di etere dietilico; 3 mL di diclorometano; 4 mL di una soluzione

cloroformio/acetone (9:1 v/v) (dove è eluita l'aflatossina B₁) e infine con 4 mL di metanolo (dove è eluita l'ocratossina A).

L'analisi HPLC è stata condotta in condizioni isocratiche ad un flusso di 1 mL/min con un loop da 20 µL. Per l'aflatossina B₁ la fase mobile utilizzata è stata una miscela H₂O/CH₃OH/CH₃CN (50:25:25 v/v/v) e il rilevatore a fluorescenza settato a 360 nm per l'assorbimento e a 440 nm per l'emissione. La durata della corsa cromatografica è stata di 20 minuti con un tempo d'eluizione di circa 7.4 minuti per uno standard d'aflatossina B₁ (in Figura 1 è riportata la corsa cromatografica di una soluzione standard d'aflatossina B₁ alla concentrazione di 200 ppb).

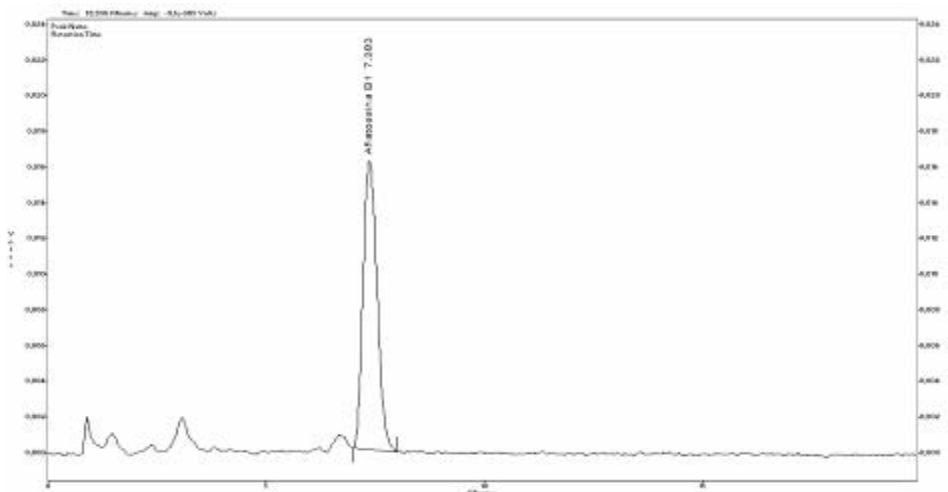


Figura 1. Standard di 200 ppb d'aflatossina B₁.

La Figura 2 riporta la retta di taratura dell'aflatossina B₁ che è stata ottenuta iniettando in triplicato soluzioni standard a differenti concentrazioni e correlandole con le aree ottenute dalle integrazioni dei picchi; la linearità della retta è compresa tra 1 e 0.01 ppm.

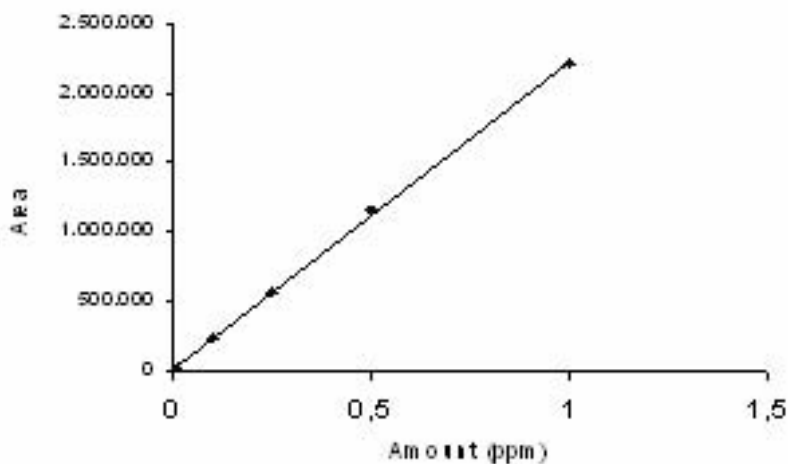


Figura 2. Retta di taratura dell'aflatossina B₁.

Per l'ocratossina A la fase mobile si usa una miscela acqua (1% di acido acetico) e acetonitrile (1% di acido acetico) (1:1 v/v) e il rilevatore a fluorescenza settato a 333 nm per l'assorbimento e 460 nm per l'emissione. La durata della corsa cromatografica è di 15 minuti con un tempo d'eluizione di circa 6.3 minuti per uno standard d'ocratossina A (in Figura 3 è riportata la corsa cromatografica di una soluzione standard d'ocratossina A alla concentrazione di 200 ppb).

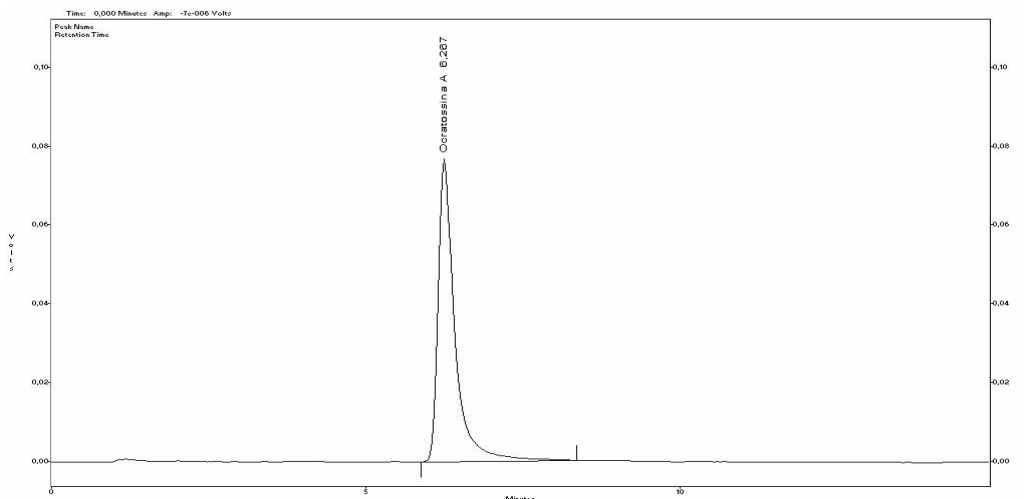


Figura 3. Standard di 200 ppb d'ocratossina A.

La Figura 4 riporta la retta di taratura dell'ocratossina A che è stata ottenuta iniettando in triplicato soluzioni standard a differenti concentrazioni e correlandole con le aree ottenute dalle integrazioni dei picchi; la linearità della retta è compresa tra 0.2 e 200 ppb.

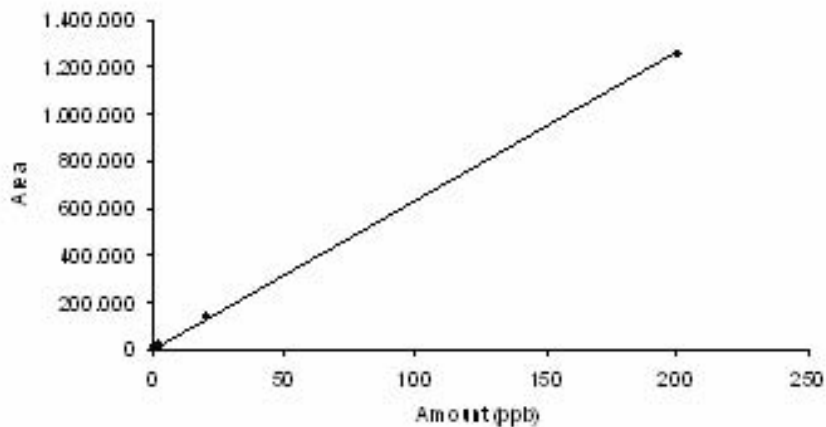


Figura 4. Retta di taratura dell'ocratossina A.

La cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa consente la conferma strutturale delle micotossine in esame nei campioni analizzati.

L'analisi cromatografica dell'aflatossina B₁ è stata eseguita utilizzando una colonna Synergy 4 µm Max-Rp 80 Å, 50 x 2.00 mm della Phenomenex (U.S.A.) eluita con H₂O-MeOH secondo il gradiente lineare riportato in Tabella 2.

Tabella 2. Gradiente lineare d'eluizione dell'aflatossina B₁

Tempo	% A	% B
0	80	20
10	20	80
12	0	100
15	80	20

Il flusso è stato selezionato a 0.2 mL/min e il tempo di ritenzione dell'aflatossina B₁ è stato registrato a circa 6.7 min. (Figura 5).

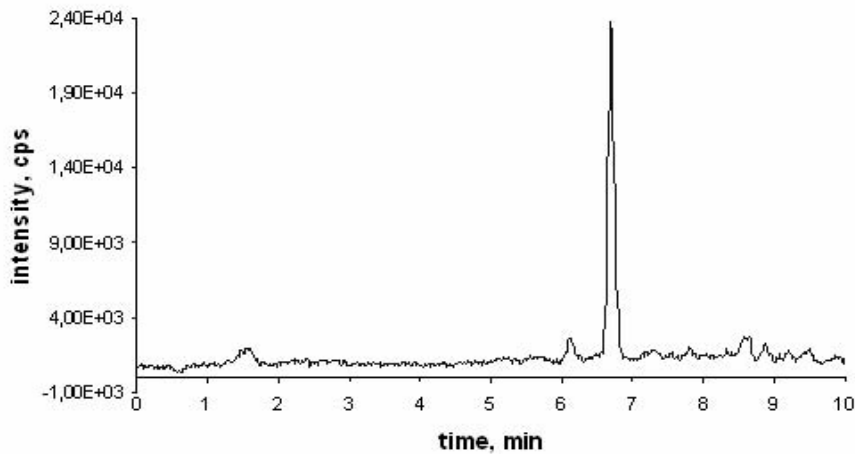


Figura 5. Cromatogramma TIC della molecola d'aflatossina B₁

L'analisi è stata effettuata impiegando un loop da 5 µL utilizzando la tecnica del loop pieno.

L'acquisizione è stata effettuata in MRM (multiple reaction monitoring) nella modalità degli ioni positivi per l'aflatossina B₁. Gli ioni prodotti in MS/MS sono stati ottenuti frammentando con una determinata energia di collisione (CE) uno ione precursore selezionato.

Per l'analisi dell'aflatossina B₁ è stato selezionato lo ione corrispondente alla molecola protonata [MH]⁺. Nella Tabella 3 è stato riportato lo ione precursore selezionato e le specifiche transizioni monitorate.

Tabella 3. Frammentazione caratteristica dell'aflatossina B₁ in LC-MS-MS

Analita	Ione precursore (m/z)	Transizioni (m/z)
Aflatossina B ₁	313.1	313.1→285 331.1→269

L'analisi LC/MS/MS dell'ocratossina A è invece eseguita ad un flusso di 0.2 mL/min per Flow Injection e la corrispondente frammentazione è riportata in Figura 6.

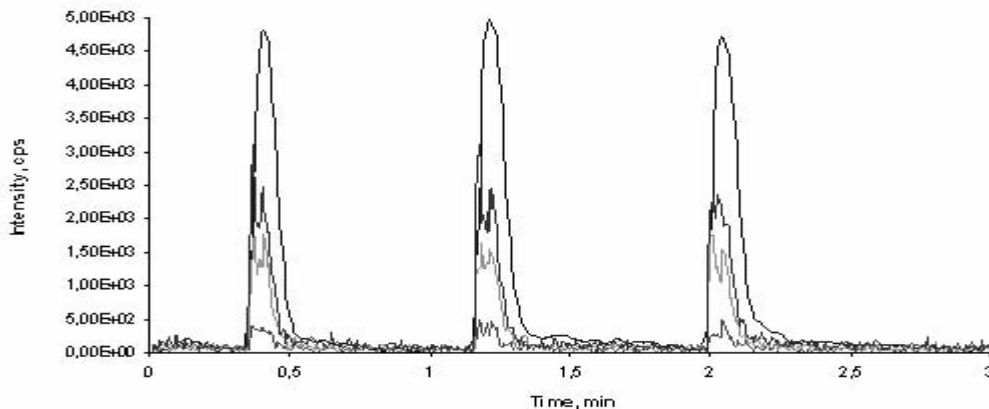


Figura 6. Spettro di frammentazione dell'ocratossina A

Anche per l'analisi dell'ocratossina A s'impiega un loop da 5 μ L utilizzando la tecnica del loop pieno.

L'acquisizione dei dati di massa è effettuata in MRM (multiple reaction monitoring) in modalità degli ioni negativi per l'ocratossina A.

Gli ioni prodotti in MS/MS sono ottenuti frammentando con una determinata energia di collisione (CE) uno ione precursore selezionato.

Per l'analisi dell'ocratossina A è stato selezionato lo ione corrispondente alla molecola deprotonata $[MH]^-$. Nella Tabella 4 sono riportati, gli ioni precursori selezionati e le specifiche transizioni monitorate durante questi esperimenti.

Tabella 4. Frammentazione caratteristica dell'ocratossina A in LC-MS-MS

Analita	Ione precursore (m/z)	Transizioni (m/z)
Ocratoossina A	402	402 \rightarrow 358.2 402 \rightarrow 254.2 402 \rightarrow 211.2 402 \rightarrow 167.0

L'analisi delle due micotossine per LC-MS richiede dei settaggi differenti della sorgente Tubo Ion Spray; nel caso dell'aflatossina B₁ la sorgente ionica è posta a + 5000 V con un potenziale di frammentazione di + 42 V e una temperatura del turboprobe di 450°C mentre per l'ocratossina A s'utilizza un voltaggio di - 4500 V per la sorgente ionica, un potenziale di frammentazione di - 55 V e una temperatura del turboprobe di 400°C.

Le rette di taratura lineari sono costruite, per l'aflatossina B₁ nell'intervallo 0.5-100 ppb, per l'ocratossina A da 0.2 a 20 ppb; con un limite di rilevabilità di 250 ppt per l'aflatossina B₁ e 100 ppt per l'ocratossina A.

Risultati

Raggiunto l'obiettivo prefissato all'inizio di questo lavoro sperimentale, vale a dire, la messa a punto di un metodo semplice, rapido, economico ed efficace d'estrazione dell'aflatossina B₁ e dell'ocratossina A dall'olio d'oliva, il successivo passo è quello di applicarlo su campioni di olio commerciali, con il fine sia di verificarne la procedura sia di effettuare una sorveglianza della qualità di tale prodotto, non ancora monitorato sotto questo aspetto.

In alcuni dei campioni più significativi la presenza d'aflatossina B₁ e ocratossina A, rilevata e quantificata mediante tecnica fluorimetrica, è confermata per spettrometria di massa mediante tecnica della Flow Injection per l'ocratossina A (campioni L6, L7, L9, L10, P7) e HPLC/MS/MS per l'aflatossina B₁ (C1, M3, M1). In Figura 7 e Figura 8 sono riportati due cromatogrammi di oli naturalmente contaminati da aflatossina B₁ e ocratossina A.

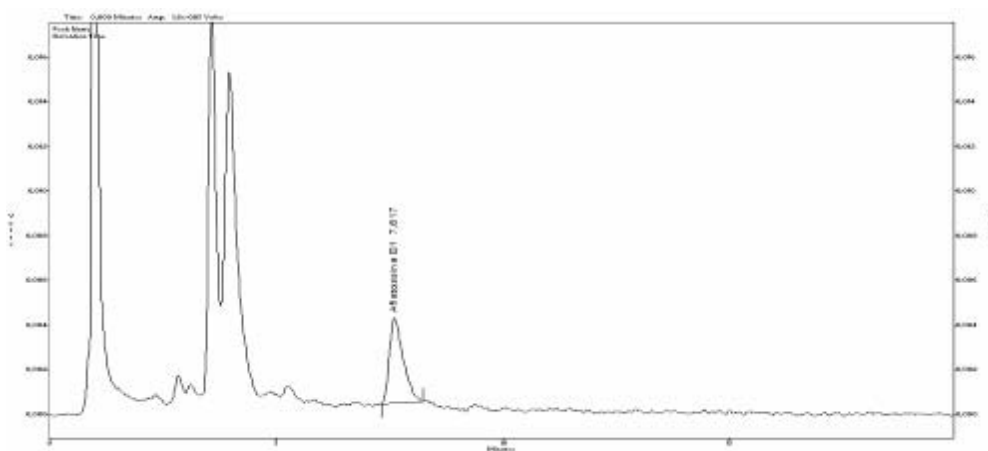


Figura 7. Aflatossina B₁ in campione d'olio C1

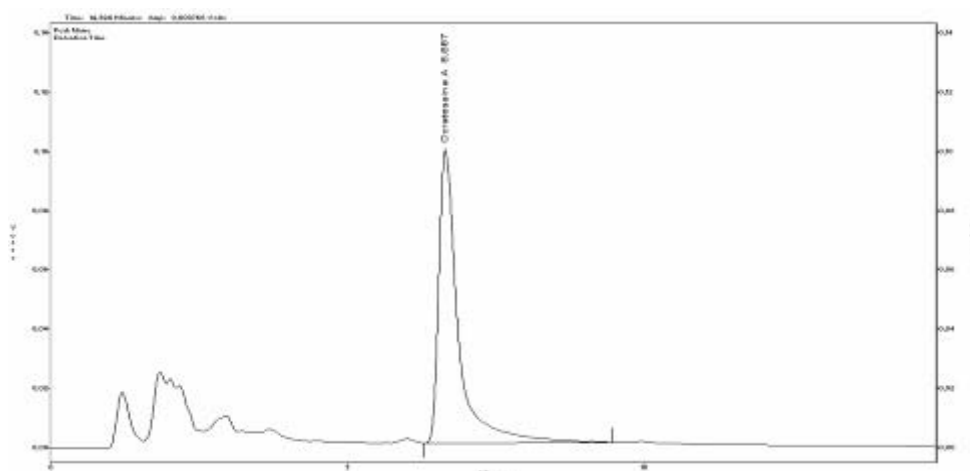


Figura 8. Ocratossina A in campione d'olio L9

Come controprova si sono analizzati per spettrometria di massa alcuni campioni negativi all'analisi fluorimetrica confermandone i risultati. La metodologia di conferma, certamente economicamente più svantaggiosa, ha però il pregio di fornire una sensibilità analitica paragonabile a quella ottenuta mediante HPLC-FLD, di fornire una conferma strutturale del metabolita investigato e permette di progettare delle analisi multiresiduali rapide ed esaustive.

In questo lavoro di sorveglianza la maggior parte dei campioni sono stati acquistati direttamente dai frantoi, sprovvisti di etichetta e di provenienza soprattutto del Sud Italia, dove la realtà dello "sfuso" è di gran lunga più marcata rispetto alle regioni del Centro e del Nord Italia, ove si concentrano le aziende di confezionamento (20). La rimanente parte dei campioni provengono dalla grande distribuzione e da piccoli punti vendita, per valutare la garanzia di qualità offerta in funzione delle forme di approvvigionamento. Una rappresentazione più omogenea degli oli vergini offerti dal mercato ha richiesto campioni commerciali etichettati sia di marchi prestigiosi che no, campioni d'olio di oliva provenienti da coltivazione biologica e convenzionale.

La ricerca d'ocratossina A e di aflatossina B₁ è stata integrata dalla valutazione di altri parametri considerati come principali indici di qualità dell'olio d'oliva ovvero l'acidità, il numero di perossidi (NP) e gli indici spettrofotometrici (K232, K270, ΔK).

Nella Tabella 5 sono riassunti i risultati delle analisi condotte sui vari campioni d'olio vergine d'oliva esaminati.

Tabella 5. Risultati delle analisi condotte sui vari campioni d'olio vergine d'oliva

Codice	Pratiche agronomiche	OtA (ppb)*	AfB1 (ppb)*
P1	convenzionale	0.62	ND
P2	convenzionale	1.45	ND
P3	convenzionale	9.2	ND
P5	convenzionale	ND	ND
C1	convenzionale	0.53	2.45
M1	convenzionale	0.78	0.548
M2	convenzionale	0.64	ND
M3	convenzionale	1.46	1.015
P8	convenzionale	0.60	ND
P9	convenzionale	0.70	ND
P10	convenzionale	ND	ND
L1	convenzionale	0.39	ND
L2	convenzionale	0.23	ND
L3	convenzionale	0.56	ND
L4	convenzionale	0.14	ND
L5	convenzionale	ND	ND
L6	convenzionale	0.75	ND
L7	convenzionale	6.02	ND
L8	convenzionale	0.45	ND
L9	convenzionale	17	ND
L10	convenzionale	5.50	ND
L11	convenzionale	0.18	ND
L12	convenzionale	ND	ND
S1	convenzionale	0.42	ND
P4	convenzionale	0.39	ND
P6	convenzionale	0.60	ND
P7	convenzionale	0.13	ND
P11	convenzionale		ND
P12	biologico	1.80	ND
P13	biologico		ND

*I risultati sui livelli di contaminazione e ocratossina A ottenuti, non sono stati corretti tenendo conto del fattore di recupero.

Si è quindi giunti ad una metodica che prevede un'estrazione più veloce che garantisce un recupero medio dell'aflatossina B₁ del 70%.

Si è testato il grado di recupero contaminando a tre differenti livelli e ogni prova è stata ripetuta per tre volte e il tutto ripetuto in due giorni diversi (Tabella 6).

Tabella 6. Risultati degli esperimenti di recovery per l'aflatossina B₁

Livello di contaminazione	Recovery d'aflatossina B ₁	Media
1) 30 ppb	87.5%	86%
2) 30 ppb	85.5%	
1) 10 ppb	74%	70%
2) 10 ppb	72%	
1) 2.5 ppb	65.5%	67%
2) 2.5 ppb	69%	

Lo stesso processo estrattivo è stato utilizzato anche per un campione d'olio contaminato con uno standard d'ocratossina A, preparato e prepurificato come descritto per l'aflatossina B₁.

Durante la fase di purificazione sono state raccolte tutte le fasi di eluizione e analizzate all'HPLC che non ha rilevato la presenza l'ocratossina A, evidentemente ancora legata al gel di silice.

È stato perciò aggiunto un ulteriore step di lavaggio con un eluente, il metanolo, favorente il rilascio della micotossina; infatti, l'analisi all'HPLC ha confermato la presenza dell'ocratossina A in questa frazione.

L'efficienza di recupero per tale micotossina è in media dell'80%. Si è testato il grado di recupero contaminando a tre differenti livelli e ogni prova è stata ripetuta per tre volte e il tutto ripetuto in due giorni diversi (Tabella 7).

Tabella 7. Risultati degli esperimenti di recovery per l'ocratossina A

Livello di contaminazione	Recovery ocratossina A	Media
1) 30 ppb	91.6%	90%
2) 30 ppb	90.6%	
1) 10 ppb	78.8%	84.7%
2) 10 ppb	90.6%	
1) 2.5 ppb	38.8%	39%
2) 2.5 ppb	39.6%	

Essendo diverse le fasi di lavaggio in cui le due micotossine sono eluite dalla colonnina è stato possibile recuperare entrambe con un unico processo estrattivo e di purificazione.

Sono state effettuate quindi prove di recupero per l'estrazione delle due micotossine copresenti nella matrice, è riportata di seguito l'efficienza ottenuta con una contaminazione di 10 ppb, pari al 76.6% per l'ocratossina A e al 70% per l'aflatossina B₁.

Tabella 8. Risultati degli esperimenti di recovery per l'ocratossina A e l'aflatossina B₁

Livello di contaminazione	Recovery ocratossina A + aflatossina B ₁	Media
1) 10 ppb	69%+74.6%	69.5%+75.5%
2) 10 ppb	70%+76.6%	

I risultati prima discussi sono stati ottenuti ripetendo le prove a tre differenti livelli di contaminazione, per tre volte nello stesso giorno e in giorni successivi al fine di evidenziare la variabilità intergiornaliera e intragiornaliera.

Il primo dato indica che complessivamente circa il 73% dei campioni venduti al frantoio risultano contaminati da ocratossina A. L'esame dettagliato dei risultati dimostra che nella categoria degli oli considerati "non etichettati", la percentuale dei campioni risultati contaminati con ocratossina A è circa dell'80% con livelli compresi tra 0.14 e 17 ng./g. mentre per i campioni commerciali etichettati la frequenza è paragonabile, ma i livelli sono compresi tra 0.13 e 0.60 ng/g. Infine, nei campioni dichiarati da coltivazione biologica sono contaminati circa il 50% con un valore massimo di 1.80 ng/g per l'ocratossina A.

Occorre mettere in risalto che non vige ancora una normativa sul limite d'ocratossina A negli oli di oliva mentre nei cereali destinati al consumo umano, invece, il limite risulta essere di 3 ng/g e tenuto conto che il consumo procapite annuo di olio di oliva è di 12-13 kg (20) il livello di assunzione di tale micotossina sarà in media, per il prodotto sfuso posto in analisi, di circa 65 ng/giorno ovvero 1.09 ng/ kg di peso corporeo/giorno mentre per i prodotti etichettati in media di 18.3 ng/giorno ovvero di 0.3 ng/kg di peso corporeo/giorno (considerando un peso corporeo di 60 kg).

Il MTDI (*maximum tolerable daily intake*) è stato recentemente riformato a 0.2-14 ng/kg peso corporeo/giorno (21) pertanto i campioni analizzati sono in tale intervallo, ma rappresentano una fonte d'ocratossina A comunque valutabile. Si sottolinea che il consumatore di olio è esposto costantemente a tale rischio dal momento che l'approvvigionamento di questo prodotto è con cadenza spesso annuale.

Il *Codex Committee of Food Additives and Contaminants* (22) riporta che i cereali rappresentando il 15% dell'apporto dietetico totale sono la prima fonte d'ocratossina A e il vino rosso rappresenta la seconda fonte d'esposizione dell'uomo, ma gli effetti cumulativi considerando che l'olio d'oliva, principale grasso consumato nella dieta delle popolazioni del bacino del mediterraneo, non sono da trascurare.

Un rischio maggiore, per di più, può essere associato al consumo d'olio venduto "sfuso" in cui i livelli di ocratossina A sono più consistenti.

Per quanto riguarda l'aflatossina B₁ come si osserva dalla Tabella 8 solo 3 su 30 dei campioni analizzati risulta contaminato ad un livello compreso tra 0.54-2.45 ng/g, e in più, di questi, il 66% non sono campioni di provenienza italiana e sono tutti campioni cosiddetti "sfusi". Questi dati d'incidenza confermano che le olive non sono il miglior substrato per la biosintesi di tale micotossina (23).

Anche per questo metabolita non vige ancora una normativa che ne stabilisce il limite negli oli d'oliva, mentre nei cereali destinati al consumo umano diretto tale limite è stato fissato a 2 ng/g.

Occorre anche aggiungere che essendo inferiore l'incidenza dell'aflatossina B₁, rispetto all'ocratossina A sarà inferiore anche il rischio di esposizione.

Va però ricordato che il 10% dei campioni è co-contaminato da aflatossina B₁ e da ocratossina A (il 66% è di origine Nord Africana) a dimostrazione di potenziali rischi di additività e/o sinergismo.

Dalla valutazione degli indici di qualità analizzati per i vari campioni, è emerso che alcuni di essi, come M3 e P12, pur rispettando i limiti richiesti per essere classificati come extravergini risultano contaminati da ocratossina A mentre per i campioni P10, L12 e L5, non contaminati accade il contrario perché i loro parametri di qualità non rientrano in quelli stabiliti dalla legge.

In conclusione si può affermare che, in materia di micotossine, il prodotto confezionato offre maggiori garanzie; ciò può essere esteso anche per gli indici di qualità dell'olio d'oliva che sono stati esaminati e che confermano quanto dichiarato sull'etichetta.

Lo stesso non si può affermare per gli oli sfusi, in quanto oli venduti come extravergini, non sono risultati tali dalle analisi condotte e inoltre l'utilizzo dei soli parametri di qualità dell'olio non assicura il consumatore di non essere esposto a prodotti quali ocratossina A e aflatoxina B₁.

Nel 2002 il Regolamento Europeo n1019/2002 in vigore da Novembre 2003 (24), vieta la vendita d'olio d'oliva in assenza d'etichetta e ciò garantisce al consumatore una scelta cosciente del prodotto commercializzato.

Bibliografia

1. Mirandola R, Tuccoli M, Vaglini S, De Risi P. *Sistemi qualità*. Pisa: ETS Editrice; 1989.
2. Chu FS. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. *Mutations Research* 1991;259:291-396.
3. Eaton DL, Groopman JD. *The Toxicology of aflatoxins, Human Health, Veterinary and Agricultural Significance*. New York: Academic Press, Inc.; 1994.
4. Gracian J, Arevalo Presencia de aflatoxinas an los productos del olivar. *Gracias y acetos* 1980;31: 167-171.
5. Tanoui-Elaraki A, Le Tutour B, Aboussalim A. Conséquences de la contamination des olives par des *Aspergillus* toxinogènes sur la quantité et la qualité de l'huile de pression. *Revue Francaise de Corps Gras* 1983;11/12 : 473-476.
6. Paster N, Juven BJ, Harsemesh H. Antimicrobial activity and inhibition of aflatoxins B₁ formation by olive plant tissue constituents. *Journal of Applied Bacteriology* 1988;64: 293-297.
7. Mahjoub A, Bullerman L B. A method for aflatoxin B₁ determination in olives. *Revue Francaise de Corps Gras* 1990;37: 245-246.
8. Yassa IA. Some factors affecting mould growth and aflatoxins production in olives. *Annals of Agricultural Science (Cairo)* 1995;40: 59-65.
9. Eltem R. Growth and aflatoxins B₁ production on olives and olive paste by moulds isolated from Turkish-style natural black olives in brine. *International Journal of Food Microbiology* 1996;32: 217-223.
10. Yassa IA, Abdalla EAM, Aziz SY. Aflatoxin B₁ production by moulds isolated from black table olives. *Annals of Agricultural Science* 1994;39: 525-537.
11. Le Tutour B, Tantaoui-Elaraki A, Ihlal L. Simultaneous detection of aflatoxin B₁ and Ochratoxin A in olive oil. *Journal of the American Oil Camists' Society* 1983;60:835-837.
12. Parker WA, Melnick D. Absence of aflatoxins from refined vegetable oils. *Journal of the American Oil Camists' Society* 1996;43: 635-638.
13. Zimmerli B, Dick R. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food additives and Contaminants* 1996;13: 653-668.
14. International Agency for Reseach on Cancer (IARC). Iarc Monograph on the Evolution of Carcinogenic Risks to humans. IARC working group, World Health Organization. Lion, France 1993;vol. 56.
15. Italia. Decreto Legislativo n.° 155 del 26 Maggio 1997 "Attuazione delle direttive 93/43/CEE e 96/3/CE concernenti l'igiene dei prodotti alimentari ". *Gazzetta Ufficiale Suppl. Ord. n. 136 del 13/6/97*.
16. Douglas LP. Minimising Risks Posed by Mycotoxins Utilising the HACCP Concept. In: *Conferences on mycotoxins*. Tunisia 3-6 Marzo 1999.

17. Sacchi R, Ambrosino ML, Della Medaglia D, Paduano A. L'HACCP in frantoio: guida all'auto controllo dell'igiene in oleificio. Portici: Edizione finanziata dall'unione Europea (Reg. Cee 528/99) programma di interventi per il settore oleicolo, pp 1-72; 2000.
18. Park DL. Surveillance programmes for managing risks from naturally occurring toxicants. *Food Addit. Contam.* 1995;72-361.
19. Daradimos E, Markaki P, Koupparis M. Evaluation and validation of two fluorimetric HPLC methods for the determination of aflatoxin B₁ in olive oil. *Food additives and Contaminants* 2000;17, 65-73.
20. ISMEA. La filiera dell'olio d'oliva 2000.
21. Commission of the European Community (CEC). Scientific on food opinion on Ochratoxin A. Cs/Cntm/Myc/14 Final, Annex II to document XXIV/2210/98 (Brussels: CEC) 1998.
22. Codex Alimentarius Commission (CAC). Position paper on Ochratoxin A. CX/FAC 94/14 1998.
23. Leontopoulos D, Siafaka A, Markaki P. Black olives as substrate for *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin B₁ production. *Food Microbiolog* 2003;20: 119-126.
24. Commissione Europea. Regolamento (CE) N. 1989/2003 della Commissione del 6 Novembre 2003. *Gazzetta Ufficiale U.E.* n. L295 del 13 Novembre 2003.

DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI AFLATOSSINA M₁ NEL LATTE: CORRELAZIONE FRA METODO IMMUNOENZIMATICO (ELISA) E CROMATOGRAFICO (HPLC-FLD)

Paolo Rosi, Andrea Borsari, Sandro Lodi, Alessia Galanti, Alessia Fava

(a) *Ricerca&Sviluppo, Granarolo SpA, Bologna*

(b) *RSAQ., Granarolo SpA, Bologna*

(c) *Lab. Centrale Controllo Qualità, Granarolo SpA, Bologna*

Introduzione

L'aflatossina M₁, chimicamente il 4-idrossi- derivato della aflatossina B₁, è prodotto dal metabolismo epatico degli animali che si nutrono di alimenti contaminati. La AfM₁ è una delle micotossine di particolare interesse per la sua pericolosità e per la sua potenziale presenza nel latte, alimento di larghissimo consumo. Il Regolamento Comunitario ha fissato un valore massimo di 50 ng/kg (Reg. CE n. CE 1525 del 1998). Granarolo s.p.a nel 1998 ha introdotto un monitoraggio della presenza di M₁ nel latte bovino, individuando nella tecnica immunoenzimatica lo strumento più adatto per un controllo periodico dei livelli di contaminazione nelle aziende agricole conferenti e delle partite in entrata negli stabilimenti del gruppo, creando i presupposti per un'attività di controllo che nel corso degli ultimi anni è diventata più estesa e frequente. L'adozione della tecnica ELISA è dovuta essenzialmente alla sua semplicità e rapidità di esecuzione che la rende perciò adatta per un monitoraggio costante, senza la necessità di disporre di apparecchiature di costo elevato. Nel corso del tempo tale metodica è stata più volte sottoposte a verifiche delle performance, attraverso controlli "paralleli" con la tecnica HPLC-FLD e attraverso analisi di ripetibilità all'interno dello stesso lotto e tra lotti diversi di produzione del kit. La contaminazione da aflatossina B₁ del mais raccolto nel 2003 ha provocato di conseguenza un innalzamento del contenuto di M₁ nel latte con la possibilità di avere superamenti del limite di legge. A fronte di valori irregolari e dell'esigenza di escludere il ritiro di partite di latte non idonee, è sorta la necessità di convalidare il metodo ELISA in confronto con il metodo di riferimento HPLC, in modo da utilizzare i risultati del controllo di routine per i conseguenti provvedimenti di urgenza. Scopo del presente lavoro è la valutazione nel contesto del controllo di routine dell'affidabilità di un kit ELISA immunoenzimatico commerciale "Immuno screen AFLA M₁ Tecna srl, Trieste, Italy" in correlazione con la metodica ufficiale HPLC-FLD.

Materiali e metodi

Nell'ambito del piano di autocontrollo di Granarolo SpA sul latte conferito e sui propri prodotti nel periodo settembre 2003-settembre 2004 il laboratorio centrale di Bologna ha analizzato 15000 campioni con il metodo immunoenzimatico ELISA; da questi sono stati selezionati e analizzati con metodo HPLC oltre 600 campioni di latte crudo naturalmente contaminato da AFM₁, e campioni di latte trattato termicamente, omogeneizzato e confezionato.

Nell'ambito di questo studio di validazione delle performance del metodo immunoenzimatico sono inoltre stati allestiti campioni di latte artificialmente contaminati a titolo noto ottenuti aggiungendo AFM₁ standard (R-biopharm Rhone ltd, Glasgow) a latte pastorizzato non omogeneizzato con valori di AFM₁ inferiori al limite di rilevabilità. Tutti i campioni selezionati conservati in frigorifero sono stati analizzati entro 3 giorni successivi alla raccolta senza ricorrere al congelamento. Tutti i campioni sono stati scremati per centrifugazione prima di essere analizzati : il latte crudo per 10 minuti a 4500 giri/min mentre il latte omogeneizzato per almeno 10 minuti a 10.000 giri/min.

Kit ELISA

Dopo la scrematura del campione per centrifugazione, l'esecuzione del test avviene secondo le istruzioni indicate dal fornitore del kit Immunoscreen AFLA M₁ Tecna srl.

HPLC-FLD

I campioni di latte scremato sono stati prima purificati tramite percolazione su colonne di immunoaffinità (Easy extract aflatoxin, R-biopharm Rhone ltd) per la determinazione cromatografica si è fatto riferimento alla norma ufficiale UNI EN ISO 14501:99; tuttavia per ridurre e ottimizzare i tempi di preparazione dei campioni, sono state apportate alcune modifiche: estrazione dell'aflatossina a partite da aliquote di 25 mL di latte anziché di 50 mL e iniezione diretta di 50 microlitri dell'eluato ricavato dalla colonnina (2,5 mL) senza pre-concentrazione in corrente di azoto. Da notare come tali modifiche non hanno portato a perdite significative in termini di sensibilità del metodo che rimane comunque in grado di rilevare fino a 3 ng/kg (ppt). Per valutare le performance del metodo in termini di recupero dell'aflatossina , oltre al normale controllo basato sull'aggiunta di standard esterno (AFM₁) al campione si è optato per la scelta dell'aggiunta di uno standard interno. È stata scelta a questo scopo l'aflatossina B₂, in quanto normalmente assente nel cromatogramma dei campioni analizzati (range conc. AfM₁ 0-150 ppt), non necessita di derivatizzazione e mostra un buon segnale già a concentrazioni di 30 ppt nelle condizioni analitiche prescelte (Ex 358 nm – Em 428 nm) (Figura 1-2).

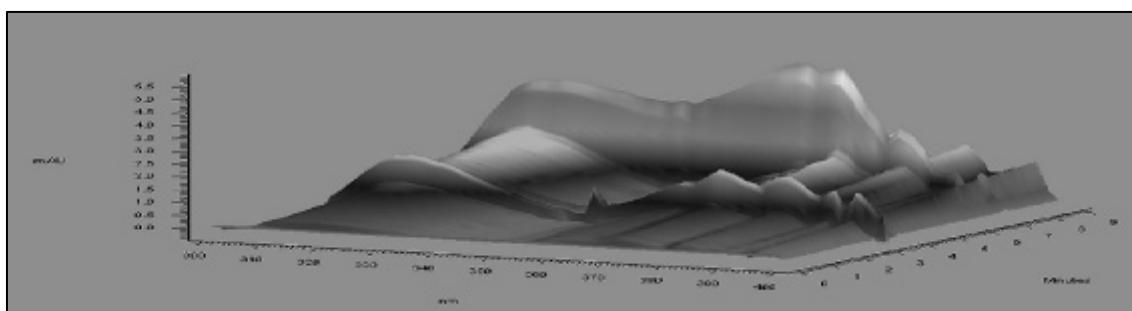


Figura 1. Spettro di assorbimento UV-DAD di AfM₁ (conc. 10 ng/kg)

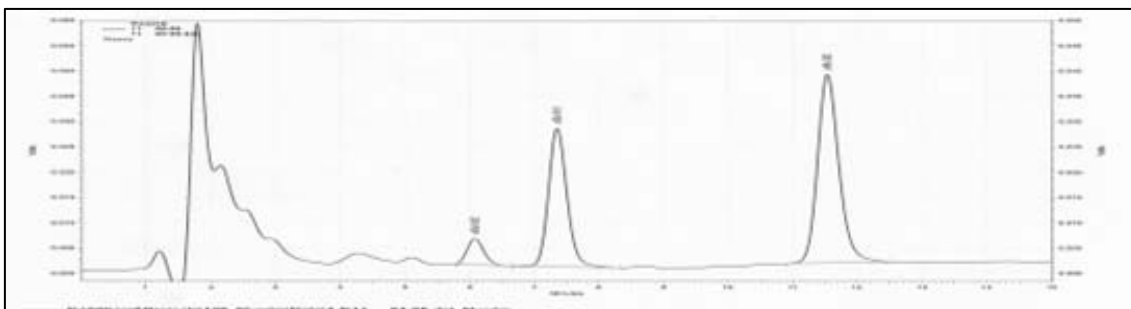


Figura 2. Cromatogramma

Risultati e discussioni

Figura 3: Il grafico mostra il risultato dell'applicazione di un modello di regressione lineare fra i dati prodotti dal metodo HPLC e il metodo ELISA. Tale elaborazione statistica cumulativa degli oltre 600 dati fornisce la retta di correlazione $Y = 4,88 + 1,09 X$ dove Y ppt M₁ ELISA e X ppt M₁ HPLC; il valore $p < 0,01$ nell'ANOVA mostra che esiste una relazione statisticamente significativa al 99% di confidenza. L'indice di determinazione (R^2) indica che il modello utilizzato spiega la variabilità dei dati osservati per oltre l'80% (coefficiente di correlazione 0,89). L'intercetta media pari a 4.88 indica una leggera sovrastima della metodica immunoenzimatica.

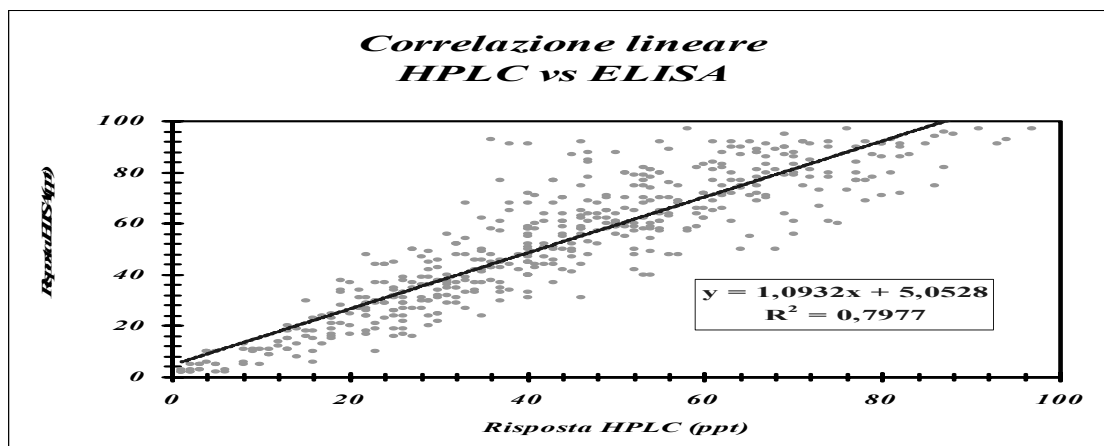


Figura 3. Correlazione lineare HPLC-ELISA

Figura 4: Lo stesso modello statistico ha fornito una deviazione standard delle stime pari a 11,24. Sono state esaminate inoltre correlazioni per fasce di concentrazione della AfM1: esaminando l'intervallo di concentrazione fino a 40 ppt (riferito ai valori ELISA) si è riscontrato un fattore di correlazione di 0,85, mentre nell'intervallo 41-100 ppt tale fattore scende a 0,69.

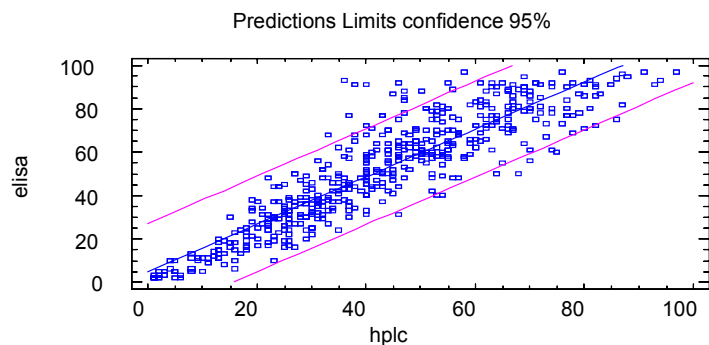


Figura 4. Deviazione standard delle stime

Figura 5: Per verificare la linearità della relazione così ottenuta si è ricorso anche a metodi di regressione non lineari (polinomiali). L'applicazione di tale modello non ha apportato un effettivo incremento del coefficiente di determinazione (r^2), giustificando la scelta del modello lineare, tuttavia tale approccio permette di evidenziare fluttuazioni della curva modello (6° grado) rispetto al modello lineare e a un ipotetico modello $Y=X$ ($R^2=1$).

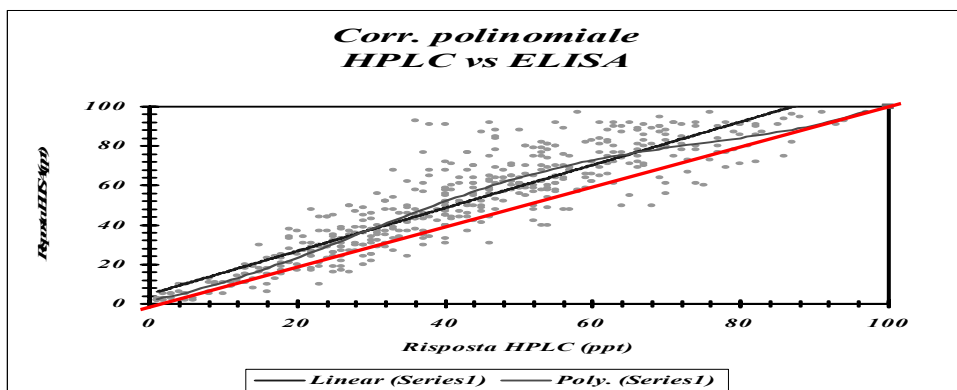


Figura 5. Regressione polinomiale HPLC-ELISA

Tale andamento viene evidenziato anche dall'analisi dei residui graficata in Figura 6.

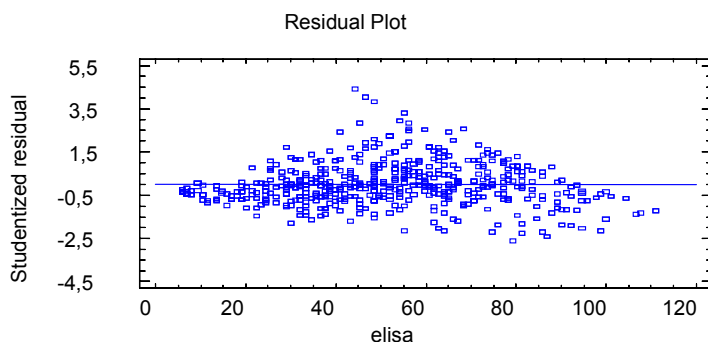


Figura 6. Analisi dei residui

In particolare osservando il comportamento della curva polinomiale in Figura 5 si evidenzia rispetto al modello lineare una parziale sovrapposizione della curva alla retta $Y=X$ nel primo intervallo di concentrazione (0-20 ppt), una tendenza alla sovrastima del dato ELISA nell'intervallo 20-75 ppt, e una tendenza ad un riallineamento della curva alla retta $Y=X$ per alte conc. di AfM₁ (>80 ppt). Tale diverso comportamento riscontrato nella risposta del kit immunoenzimatico è probabilmente dovuto alla prassi di ripetere l'analisi dei campioni risultati fortemente contaminati (>80 ppt) al primo screening, eseguendo una diluizione del latte scremato con matrice non contaminata in modo da fare rientrare il risultato analitico del campione diluito nel range di maggiore linearità di risposta del kit. Allo scopo di valutare le performance dei metodi attualmente utilizzati in Granarolo per il controllo del contenuto di aflatoxina M₁, sono state sottoposte ad analisi 8 aliquote di latte artificialmente contaminato nel range analitico 10-100 ppt. Prima di procedere alla contaminazione si è valutata l'assenza nello stesso di aflatoxina M₁ (< 3ppt: Limite di Rivelazione metodo HPLC) Il latte è stato contaminato con quantità note di della soluzione standard di aflatoxina M₁. Ogni campione dell'analisi HPLC è stato estratto in doppio, e ciascun campione iniettato due volte. L'analisi in ELISA è stata invece eseguita in quadruplo per ciascun campione.

Figura 7: Per quanto riguarda i dati ottenuti con il metodo cromatografico va notato innanzitutto l'ottimo accordo fra i dati ottenuti e quelli attesi per tutti i livelli analizzati, e come tale relazione sia anche accompagnata da una deviazione standard dei replicati contenuta (1,90). Dal momento che la valutazione dei recuperi dei campioni viene solitamente effettuata tramite l'utilizzo di una soluzione di aflatoxina B₂, anche nel corso di questa sperimentazione si è scelto di aggiungere i campioni, in modo da confrontare i recuperi dell'aflatoxina di interesse con lo standard interno. I valori di recupero medi dei due analiti appaiono molto vicini (100,1% per la M₁ e 97,8% per la B₂) e comunque sempre prossimi al 100%: ciò conferma la nostra scelta di adottare l'aflatoxina B₂ come standard interno, mentre gli alti livelli di recupero e conseguentemente la loro ridotta deviazione standard (8,38 e 3,25), dimostrano una standardizzazione del metodo di estrazione utilizzato.

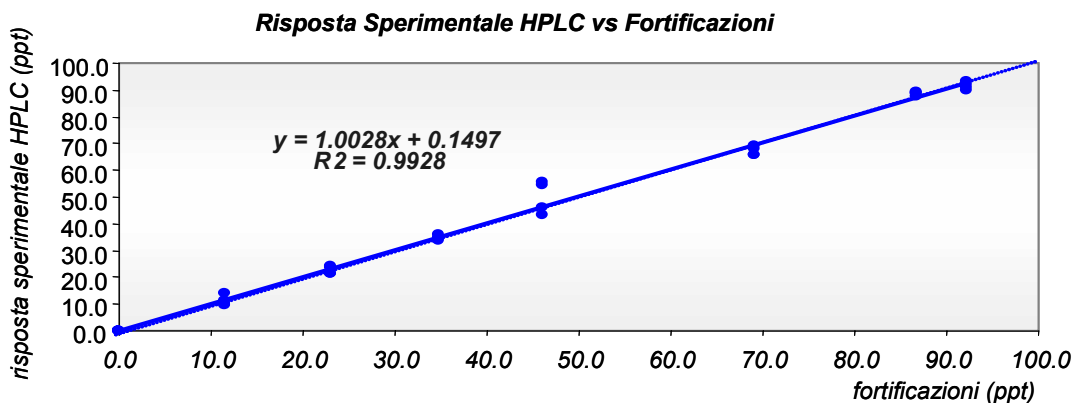


Figura 7. Risposta sperimentale HPLC in latte artificialmente contaminato

Figura 8: Vengono riportati i valori ottenuti con il metodo ELISA. Va rilevato anche in questo caso, a conferma dell'affidabilità di questo metodo di screening l'accordo ottenuto fra i dati medi e quelli attesi: risulta però evidente come la deviazione standard tenda ad aumentare sensibilmente al di sopra di un valore che si potrebbe fissare intorno ai 60 -70 ppt. Il recupero medio mostrato dal kit risulta di 105 % con una deviazione standard pari a 19,33. L'applicazione di un modello di regressione lineare fra i dati prodotti dal metodo HPLC e il metodo ELISA

fornisce in questo caso l'equazione $Y = 1,90 + 1,01 X$ con un coefficiente di determinazione (R^2) di 0,97.

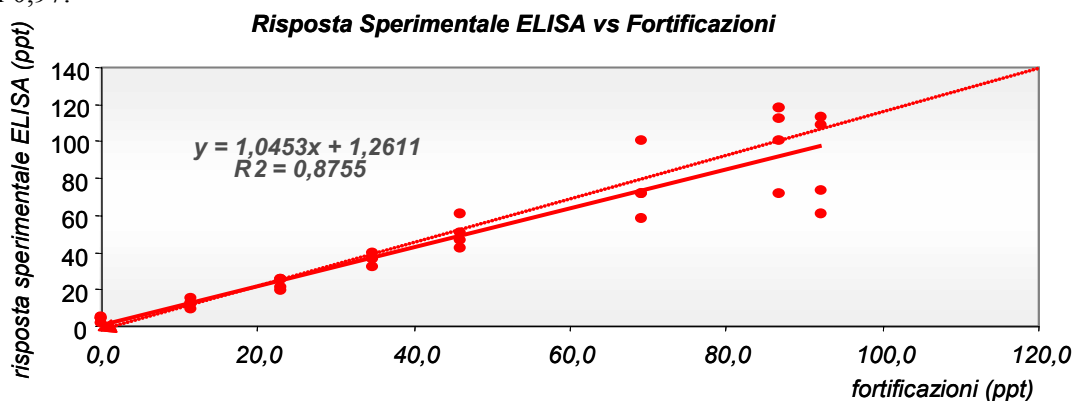


Figura 8. Risposta sperimentale ELISA in latte artificialmente contaminato

Conclusioni

I risultati del nostro lavoro mettono in evidenza un buon accordo ($r^2=0,80$) fra i dati prodotti dai due metodi, considerando il numero rilevante di campioni analizzati e la eterogeneità dei campioni stessi (crudi, pastorizzati, omogeneizzati e non). In particolare il metodo ELISA mostra di mantenere una correlazione accettabile anche oltre il valore fissato dalla legge (50 ng/kg).

In conclusione il kit immunoenzimatico adottato costituisce un metodo di screening rapido e affidabile per il controllo del latte da singoli allevamenti e di autocisterne in entrata negli stabilimenti, e fornisce valori immediatamente utilizzabili per la prevenzione del rischio. Nel caso di campioni con valori di poco superiore ai limite di legge può essere utile effettuare anche un'analisi di conferma mediante HPLC-FLD.

Bibliografia

1. ISO/FDIS 14675:2002. Milk and milk products-guidelines for a standardized description of competitive enzyme immunoassays-determination of aflatoxin M_1 content. Geneva: International Organization for Standardization; 2002.
2. UNI EN ISO 14501:99. *Determinazione del contenuto di aflatoxina M_1 : purificazione per mezzo di cromatografia di immunoaffinità e determinazione per cromatografia liquida ad alta risoluzione*. Milano:Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 1999.

SVILUPPO DI NUOVI APPROCCI PER LA DETERMINAZIONE DI MICOTOSSINE

Cinzia Tozzi Laura Anfossi, Claudio Baggiani, Cristina Giovannoli, Gianfranco Giraudi
Laboratorio di Bioanalitica, Dip. di Chimica Analitica, Università degli Studi di Torino, Torino

Introduzione

Il termine micotossina identifica una serie di prodotti tossici per l'uomo e per gli animali che si formano da alcune specie fungine che possono contaminare un elevato numero di alimenti, quali per esempio i cereali, principalmente frumento, mais, segale e orzo, le oleaginose, il caffè, il cacao, le spezie, il latte e i suoi derivati. L'infezione, lo sviluppo e la produzione di micotossine possono avvenire durante ogni stadio del ciclo produttivo, dalla coltivazione in campo, alla raccolta, all'immagazzinamento, alla trasformazione e al trasporto dei prodotti finiti. Questi composti risultano, inoltre, essere chimicamente molto stabili e resistenti alle lavorazioni a cui vengono sottoposti. La loro frequente incidenza ha un potenziale impatto negativo sull'economia delle regioni produttrici, in particolare di quelle zone in via di sviluppo dove, spesso, le tecniche agricole sono scarsamente sviluppate. Non mancano per altro episodi di contaminazione, anche grave, nei Paesi con sistemi agricoli più moderni e avanzati.

Con queste premesse assumono grande importanza i controlli per l'identificazione e la quantificazione (1) delle micotossine durante tutta la filiera agro-alimentare. I metodi di analisi sono numerosi e sfruttano diverse tecniche analitiche, ma in genere un protocollo per la determinazione delle micotossine si divide in quattro stadi: il campionamento, l'estrazione, la ripulitura da matrice ed eventuale pre-concentrazione della tossina e infine l'analisi quantitativa vera e propria.

Una buona parte dei metodi di analisi in commercio fa uso di anticorpi sia nella fase di ripulitura e pre-concentrazione attraverso l'uso di resine per immunoaffinità sia nella fase analitica con l'impiego di saggi immunochimici. Gli anticorpi offrono, in effetti, buona sensibilità analitica e affinità elevate, per questo solitamente sono molto efficaci nella cattura e nell'identificazione degli analiti. A fronte di questi pregi l'utilizzo degli anticorpi presenta anche alcuni svantaggi: per esempio nel caso delle fasi stazionarie per immunoaffinità, i costi sono piuttosto elevati per la scarsa possibilità di riutilizzo, la difficoltà di rigenerazione e le grosse quantità di anticorpo necessarie per la loro preparazione. Questi problemi sono essenzialmente dovuti al deterioramento della capacità di legame degli anticorpi che mal sopportano ambienti di lavoro estremi, quali possono essere gli estratti delle matrici contenenti le micotossine.

Nel caso dei kits immunoenzimatici, i saggi immunochimici per la determinazione di analiti a basso peso molecolare, quali le micotossine, sono normalmente nel formato ELISA (saggi di tipo competitivo), con limiti di rilevabilità, in condizioni ottimizzate, dell'ordine dei ppb-ppt. Pertanto quando applicati a matrici reali, si osservano limiti di rilevabilità dell'ordine dei ppb. Inoltre molto spesso è necessario ricorrere a pre-trattamenti del campione. Un miglioramento significativo del limite di rilevabilità dei saggi immunochimici può essere ottenuto utilizzando un formato di tipo non competitivo. Questo formato è potenzialmente molto più sensibile del formato competitivo (limite di rilevabilità, LOD, inferiore di uno-due ordini di grandezza), poiché nel saggio non competitivo si ha la misura di un segnale che è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'analita, mentre nel saggio di tipo competitivo si osserva

un segnale inversamente proporzionale alla concentrazione dell'analita. Tuttavia, il modello classico di saggio non-competitivo non può essere applicato ad analiti a basso peso molecolare, dato che il legame simultaneo di due anticorpi risulta impossibile su molecole di piccole dimensioni.

Negli ultimi anni nel nostro laboratorio sono stati sviluppati due approcci per intervenire sui punti critici sopra indicati: ovvero è stato sviluppato un saggio per piccole molecole con un formato non competitivo che prevede un approccio di tipo immuno-cromatografico al fine di aumentare la sensibilità dell'analisi di 1-2 ordini di grandezza (2) e contemporaneamente la preparazione di leganti sintetici che mimano il comportamento degli anticorpi e possiedono proprietà di riconoscimento molecolare tali da poter essere impiegati nelle fasi di clean-up con costi molto ridotti rispetto ai leganti biologici classici e con notevoli possibilità di riutilizzo delle colonne (3).

In questo lavoro sono presentati entrambi gli approcci applicati alla determinazione e pre-concentrazione di aflatossine (B₁, B₂, G₁, G₂) e dell'ocratossina A.

Peptidi come leganti sintetici

Aflatossine

La sintesi di leganti sintetici di piccole dimensioni sta aprendo nuove prospettive nel campo dei sistemi che mimano le proprietà di riconoscimento molecolare dei leganti naturali (4).

L'approccio combinatoriale alla sintesi di questi leganti permette la creazione di librerie contenenti un alto numero di composti diversi con differenti capacità di legame. Gli amminoacidi per le loro caratteristiche chimico-fisiche si sono dimostrati dei buoni monomeri di partenza per la creazione di queste librerie (3).

In questo lavoro è stata sfruttata una sintesi combinatoriale in fase solida allo scopo di preparare librerie di peptidi dalle quali selezionare leganti specifici indirizzati verso le aflatossine.

Una resina polistirenica (Amberlite IRC-50) funzionalizzata con gruppi carbossilici è stata utilizzata come fase solida mentre nove amminoacidi sono stati impiegati nella creazione della libreria (arginina, serina, prolina, valina, leucina, glutammina, glicina, alanina, fenilalanina). L'acido aminobutirrico è stato usato come braccio spaziatore per allontanare le sequenze peptidiche dal supporto solido e rendere il peptide maggiormente libero e disponibile all'interazione con la piccola molecola. L'immobilizzazione del braccio spaziatore e degli amminoacidi è avvenuta attraverso l'attivazione dei gruppi carbossilici presenti sulla fase solida con il metodo dell'estere N-idrossisuccinimidico. (5) Una prima fase ha visto la creazione di una libreria di 81 dipeptidi le cui proprietà di legame sono poi state testate verso l'aflatossina B₁. Il dipeptide che ha mostrato le migliori capacità di legame è stato leucina-leucina. Le proprietà di legame di leucina-leucina sono state verificate anche verso le altre tre aflatossine B₂, G₁ e G₂. Le costanti di affinità (6) sono risultate promettenti ($K > \text{di } 0.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$), inoltre le selettività mostrate verso le quattro aflatossine sono paragonabili a quelle riportate per un anticorpo commerciale (si veda a titolo di esempio (7)). Quindi usando la sequenza leucina-leucina come base di partenza, è stata preparata una seconda libreria di tetrapeptidi. In questo caso il primo e il secondo amminoacido restavano costanti, mentre variavano il terzo e il quarto creando 81 tetrapeptidi diversi. Nuovamente sono state testate le proprietà di legame verso le diverse aflatossine ed è stata selezionata la sequenza leucina-leucina-glicina-fenilalanina che ha mostrato costanti di affinità $> \text{di } 10^4 \text{ M}^{-1}$ verso tutte le aflatossine.

È stata quindi verificata la capacità di legame del tetrapeptide selezionato preparando una colonnina per estrazione in fase solida. La procedura sperimentale è simile alle normali estrazioni in fase solida presenti in letteratura (6) ed è stata ottimizzata in tampone ottenendo dei recuperi in metanolo compresi tra il 62 e l'88% per le quattro aflatoxine.

Inoltre è stata messa a punto una fase di rigenerazione completa della colonna (3) senza alcuna perdita di capacità legante. Questo risultato ha permesso l'utilizzo di una sola colonnina per tutte le prove di estrazione in fase solida.

È stata preparata anche una colonnina "bianca" con la resina completamente bloccata con etanolamina: nessuna capacità di riconoscimento molecolare è stata riscontrata con il recupero quantitativo delle aflatoxine durante la fase di caricamento della colonna.

Nella fase finale di questo lavoro, tuttora in svolgimento, si è iniziato ad affrontare le matrici alimentari, prendendo come primo esempio tre campioni di arachidi. I risultati preliminari sono promettenti (recupero aflatoxina > del 70%) e concordano con quelli riportati in letteratura (8) per i dispositivi di immunoaffinità classici.

Ocratossina A

Lo stesso lavoro di sintesi combinatoriale è stato eseguito per l'ocratossina A. In questo caso però è stata preparata una libreria di 144 composti utilizzando 12 amminoacidi (arginina, serina, prolina, valina, leucina, glutammina, glicina, alanina, fenilalanina, lisina, istidina, triptofano). Anche in questo caso è stata creata una prima libreria di dipeptidi da cui è stata selezionata una sequenza legante l'ocratossina A, che è poi stata usata come base per una successiva libreria di tetrapeptidi fino all'ottenimento di una libreria di esapeptidi. In questo caso l'affinità delle prime due librerie era inferiore a quella mostrata verso le aflatoxine e per questo motivo solo la libreria di esapeptidi ci ha permesso di selezionare una sequenza amminoacidica che mostrasse una costante di affinità superiore a 10^4 M^{-1} .

Anche in questo caso è stata testata la capacità legante del peptide verso l'ocratossina A preparando una colonnina per estrazione in fase solida. La procedura sperimentale è simile alle normali estrazioni in fase solida presenti in letteratura (6) ed è stata ottimizzata in tampone ottenendo dei recuperi in metanolo compresi tra l'80 e il 95%. Anche in questo caso la colonnina "bianca" non ha mostrato capacità leganti.

Sviluppo di un saggio immuno-cromatografico rapido

I saggi immunochimici non competitivi risultano più sensibili dei rispettivi competitivi permettendo l'abbassamento del LOD di uno o due ordini di grandezza. Normalmente, come detto precedentemente, il classico schema di saggio non competitivo non si applica alle piccole molecole, per questo motivo nel nostro laboratorio è stato sviluppato un saggio immuno-cromatografico non competitivo (2, 9) che si è dimostrato particolarmente sensibile (abbassamento del LOD fino a 60 volte rispetto al corrispondente ELISA) e adatto all'uso in matrici alimentari. Questo modello si basa sulla possibilità di separare il complesso analita-anticorpo dall'eccesso di anticorpo libero attraverso un passaggio di cromatografia di affinità.

Il primo schema di saggio proposto (10) prevedeva che un eccesso di anticorpo specifico fosse mescolato e incubato con il campione in esame in modo da permettere la formazione del complesso antigene-anticorpo. L'anticorpo libero era poi allontanato e separato dal complesso attraverso una cromatografia di affinità che impiegava una fase solida su cui era immobilizzato

l'antigene. La misura della concentrazione del complesso permetteva quindi la determinazione della concentrazione dell'analita.

In lavori precedenti effettuati dal nostro gruppo, il complesso analita-anticorpo veniva recuperato dalla cromatografia di affinità e lasciato incubare in micropiastre per 24 h. Sui pozzetti delle micropiastre era stato immobilizzato un coniugato dell'analita ad alta concentrazione, in questo modo il complesso si separava e l'anticorpo si legava alla fase solida. La misura della concentrazione dell'anticorpo, direttamente proporzionale alla concentrazione del complesso, avveniva per successiva incubazione con un secondo anticorpo marcato (1 h) e sviluppo colorimetrico (30 min) finale (2).

Per limitare i tempi di analisi, si è ricorsi alla marcatura in fluorescenza dell'anticorpo specifico in modo da poter misurare direttamente la concentrazione del complesso in uscita dalla colonna cromatografica. Nel nostro caso, infatti, il campione contenente l'aflatossina viene incubato con un anticorpo specifico marcato, quindi la miscela viene fatta passare su di una fase solida su cui è stato immobilizzato un coniugato dell'analita stesso. La fase stazionaria permette la separazione tra anticorpo libero e complesso antigene-anticorpo, infatti, l'eccesso di anticorpo libero rimane legato alla fase stazionaria, mentre il complesso aflatossina-anticorpo non interagisce con questa e viene eluito in corrispondenza del volume morto. La fluorescenza misurata per il volume morto risulta direttamente proporzionale alla concentrazione del complesso e, di conseguenza, alla concentrazione di analita presente in soluzione.

Il metodo descritto è stato sviluppato per la determinazione di aflatossina B₁.

Durante la prima fase di lavoro è stato necessario preparare la fase stazionaria per la cromatografia di affinità, immobilizzando covalentemente un coniugato proteina-aflatossina B₁ su di un opportuno supporto, la resina EAH-Sepharose. La reazione di immobilizzazione utilizzata è la stessa impiegata nella sintesi dei peptidi della libreria (5). L'anticorpo utilizzato è stato un anticorpo commerciale anti-aflatossina B₁ che è stato purificato e successivamente marcato a pH basico con fluoresceina isotiocianato seguendo il protocollo fornito dal rivenditore (11).

In prima battuta sono stati ottimizzati i parametri che influenzano la separazione tra l'anticorpo libero e l'anticorpo complessato (in particolare, dimensioni della colonna e velocità di flusso). Dopo una prima verifica del funzionamento dell'intero saggio immunocromatografico in bassa pressione, la separazione cromatografica è stata condotta su un cromatografo ad alta pressione con rivelatore in fluorescenza in linea. Questa modificazione del saggio ha permesso di abbreviare ulteriormente i tempi di analisi. Infine si è effettuata una prima curva di taratura in tampone con l'utilizzo di soluzioni standard di aflatossina B₁ in un intervallo di concentrazioni inferiori a 10 ppb.

Le indicazioni preliminari di applicazione del saggio alla determinazione dell'aflatossina B₁ (la più diffusa e tossica) mostrano la possibilità di raggiungere buoni limiti di rilevabilità dell'ordine dei ng/L (ppt), molto inferiori a quanto riportato per saggi immunochimici competitivi sia commerciali, sia descritti in letteratura (si veda, a titolo di esempio (12)) e assolutamente compatibili con i limiti legislativi europei che sono compresi tra 2 e 8 ppb (13). La possibilità di aumentare la sensibilità dell'analisi permette inoltre di diluire notevolmente il campione minimizzando o addirittura eliminando gli effetti interferenti della matrice. I tempi di analisi, con l'introduzione delle marcatura in fluorescenza, risultano drasticamente ridotti rispetto al metodo precedentemente sviluppato (2) e sono dell'ordine di un paio di minuti per ogni campione.

Inoltre, dato che i saggi di tipo non-competitivo sono per loro natura meno selettivi dei saggi competitivi, si può pensare di applicare il metodo descritto anche per ridurre la selettività nei casi, come quello delle aflatossine, dove risulta importante non solo la determinazione del composto singolo, ma anche quella dell'intera classe di sostanze.

Conclusioni

In questo studio sono stati approfonditi due dei passaggi che sono spesso impiegati nell'analisi delle micotossine: la fase di ripulitura e pre-concentrazione del campione attraverso fasi solide per immunoaffinità e la fase analitica di determinazione quantitativa con l'impiego di saggi immunochimici. Nel nostro laboratorio sono stati sviluppati due approcci alternativi alle metodiche classiche con la preparazione di peptidi leganti da applicarsi nell'estrazione e pre-concentrazione delle micotossine e con la messa a punto di un saggio immuno-cromatografico rapido ad alta sensibilità per la quantificazione delle stesse.

Per quanto riguarda i leganti sintetici, questo lavoro ha permesso di dimostrare la possibilità di ottenere peptidi leganti con buone proprietà di riconoscimento molecolare utilizzando una tecnica combinatoriale mirata. Le procedure di sintesi e di screening sono semplici, rapide ed economiche; inoltre utilizzano una quantità molto ridotta di analita. L'impiego di peptidi leganti in sistemi di estrazione in fase solida è stato in questi primi studi soddisfacente e questi sistemi si sono dimostrati un'alternativa economica, versatile, riutilizzabile e di sviluppo più rapido ai sistemi di riconoscimento molecolare classici.

Nel caso dell'analisi quantitativa l'impiego di un saggio immuno-cromatografico come sistema di determinazione della concentrazione dell'aflatossina B₁ è risultato fattibile. I reattivi utilizzati sono facilmente reperibili in commercio e sono gli stessi impiegati nei saggi ELISA, ma grazie allo schema del nostro saggio le loro prestazioni sono state fortemente incrementate. Questo ci ha permesso di ottenere un LOD inferiore ai saggi immunochimici in uso (qualche ppt) e tempi di analisi ridotti.

Bibliografia

1. Krska R, Kos G. Analytical methodology. European Mycotoxin Awareness Network. Disponibile all'indirizzo: <http://www.lfra.co.uk/eman2/wp2analy.asp>; ultima consultazione 21/12/04.
2. Anfossi L, Giraudi G, Tozzi C, Giovannoli C, Baggiani C, Vanni A. Development of a non competitive immunoassay for monitoring DDT, its metabolites and analogues in water samples. *Anal.Chim.Acta* 2004; 506: 87-95.
3. Tozzi C, Anfossi L, Giraudi G, Giovannoli C, Baggiani C, Vanni A. Chromatographic characterisation of an estrogen-binding affinity column containing tetrapeptides selected by a combinatorial-binding approach. *J. Chromatogr. A* 2002; 966: 71-79.
4. Tozzi C, Anfossi L, Giraudi G. Affinity chromatography techniques based on the immobilisation of peptides exhibiting specific binding activity. *J. Chromatogr. B* 2003; 797: 289-304.
5. Yatsimirskaya EA, Gavrilova EM, Egorov AM, Levashov A. Preparation of conjugates of progesterone with bovine serum albumin in the reversed micellar medium. *Steroids* 1993; 58: 547-550.
6. Tozzi C, Anfossi L, Baggiani C, Giovannoli C, Giraudi G. A combinatorial approach to obtain affinity media with binding properties towards the aflatoxins. *Anal. Bioanal. Chem.* 2003; 375: 994-999.
7. Aflatoxin Total, RIDASCREEN®, Rhône-diagnostics technologies, Glasgow, U.K.
8. Gilbert J, Anklam E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. *Trac - Trend Anal.Chem.* 2002; 21: 468-486.
9. Rosso I. Sviluppo di saggi immunoenzimatici per la determinazione di apteni di interesse ambientale. Tesi di dottorato di ricerca in Scienze Chimiche, XI ciclo, Università degli Studi di Torino. 1998.

10. Eremenko AV, Bauer CG, Makover A, Kanne B, Baumgarten H, Scheller FW. The development of a non-competitive immunoenzymometric assay of cocaine. *Anal.Chim.Acta* 1998; 358: 5-13.
11. Goding JW. Conjugation of antibodies with fluorochromes: modifications to the standard methods. *J.Immunol.Methods* 1976; 13: 215-226.
12. Lipigongoson S, Limtrakul P, Suttajit M, Yoshizawa T. In-house direct cELISA for determining aflatoxin B1 in Thai corn and peanuts. *Food Addit Contam* 2003; 20: 838-845.
13. European Mycotoxin Awareness Network. Fact Sheets on Sampling and Legislation. Disponibile all'indirizzo: http://www.lfra.co.uk/eman2/fsheet6_1.asp; ultima consultazione 20/12/04.

METODOLOGIA D'INDAGINE SU CAMPIONI DI FARINA DI MAIS PER LA RICERCA DI FUMONISINE

Alberto Carniel, Sandro Ceccone, Bruno Bresin, Clara Zuch

(a) ARPA FVG Dipartimento di Pordenone

(b) Direzione Centrale della Salute Regione Friuli Venezia Giulia, Trieste

Premessa

Nella valutazione della sicurezza alimentare un ruolo particolarmente importante deve essere riservato all'invasione di alcune derrate alimentari ad opera di ceppi fungini produttori di micotossine in determinate condizioni ambientali e di composizione dell'alimento (1). In termini generali le micotossine più importanti sono state raccolte in Tabella 1 indicando la specie fungina e gli alimenti maggiormente a rischio.

Tabella 1. Elenco di micotossine con le relative speci fungine e alimenti maggiormente a rischio

Micotossina	Produttore	Ospite
CITRINA	<i>Penicillium citrinum</i>	Riso, nocciole, mais
PATULINA	<i>Penicillium patulum</i>	Mele, succo di mele
ZERALENONE	<i>Fusarium graminearum</i>	Cereali, mais
ALTERNARIA	<i>Alternaria alternata</i>	Grano, cereali, pomodoro
AFLATOSSINE (B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂)	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticum</i>	Arachidi, pistacchi, frutta secca, cereali (mais, frumento, orzo, avena) Mangimi, spezie
AFLATOSSINE (M ₁ , M ₂)		Latte, formaggi
OCRATOSSINA A	<i>Aspergillus ocraceus</i> <i>Penicillium verucosum</i>	Cereali (mais, frumento, orzo, avena), riso, caffè, birra, vino, cacao, legumi, carni, (suine, avicole)
FUMONISINE	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium proliferatum</i>	Mais, sorgo

A seguito di alcuni episodi di allerta alimentare da parte della UE in farine di mais, è emersa la necessità di dare spazio adeguato, nell'ambito del "programma ufficiale alimenti – anno 2004" della Regione Friuli Venezia Giulia, alle analisi delle micotossine con particolare attenzione alle fumonisine, in modo da verificare la situazione attuale e fornire informazioni per eventuali iniziative normative sui prodotti alimentari a base di mais.

Infatti la coltivazione di mais in Friuli Venezia Giulia risulta molto estesa, circa il 50% della SAU (Superficie Agraria Utile). Indagini pregresse svolte dal Dipartimento dell'ARPA di Pordenone avevano evidenziato una diffusa contaminazione della granella da parte di funghi *Fusarium*, precursori della formazione di fumonisine. Alla luce di quanto sopra nel piano regionale 2004 è stato inserito un programma di analisi sulle farine di mais per la preparazione di polenta ad uso alimentare umano, sia nella grande distribuzione che in quella locale.

Sono stati esaminati 48 campioni, di cui 39 di farina e 9 di farina precotta; il 38% del totale dei campioni proviene da mulini del Friuli Venezia Giulia.

Per meglio coordinare l'attività si è concentrato il periodo di campionamento nei mesi di maggio e giugno 2004.

Come detto nei prodotti a base di mais il rischio maggiore deriva dalla presenza di fumonisine: composti chimicamente definibili come esteri tricarballilici di ammino-alcoli, con struttura molecolare riportata in Figura 1.

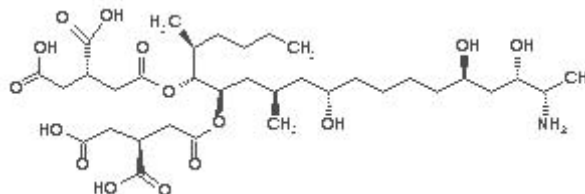


Figura 1. Fumonisin B₁ CAS n. 116355-83-0

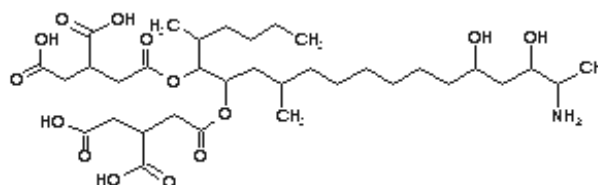


Figura 2. Fumonisin B₂ CAS n. 116355-84-1

I componenti principali delle fumonisine sono indicati come FB₁; FB₂; FB₃ presenti, mediamente, con i seguenti valori percentuali, ricavati dalla letteratura, sul totale delle 3 fumonisine: FB₁ 68,3%; FB₂ 22,9%; FB₃ 9,8% (2) Come sopra indicato le analisi del presente studio hanno riguardato la ricerca di fumonisine B₁ e B₂ risultandone un rapporto medio B₂/B₁ di concentrazione pari a 2,54. Le fumonisine sono classificate dallo IARC (vol. 1-88) appartenenti al gruppo 2B definite come possibile cancerogeno per l'uomo. In Italia ad oggi non esistono limiti di accettabilità per le farine ad uso alimentare. In Europa risulta che Svizzera e Germania abbiano stabilito rispettivamente i limiti di 1 e 0,5 mg/kg come somma di fumonisine.

L'UE ha deliberato per le farine ad uso alimentare umano il limite di 1 mg/kg a decorrere dal luglio del 2007.

Esiste altresì un'indicazione del Ministero della Salute Italiano, in risposta ad un quesito della Regione Abruzzo (lettera del 27/10/2004) che fa riferimento ai valori di 1 mg/kg. Nella formulazione dei mangimi per animali da allevamento l'ente americano FDA (Food and Drug Administration) ha espresso i seguenti limiti per la presenza di fumonisine totali:

Mangimi per animali (FDA-1999)

Equini	5 mg/kg
Maiali	10 mg/kg
Pollame	50 mg/kg
Bovini	50 mg/kg

avendo a mente le fumonisine quali agenti eziologici in grado di causare encefalomalacia negli equini ed edema polmonare nei suini.

Discussione

I campioni di farina sono stati analizzati non solo per la ricerca di fumonisine B₁ e B₂, ma anche per i seguenti ulteriori parametri analitici: carica mimetica (3) (identificazione dei generi e di alcune specie di *Fusarium*), DNA eterologo (OGM), residui di insetticidi fosforati, attività dell'acqua, umidità e acidità. La ricerca di OGM e di residui di insetticidi fosforati ha dato esito negativo in tutti i campioni considerati. In Tabella 2 sono riportati i valori minimo, massimo e mediano dei parametri di umidità, attività dell'acqua e acidità. In particolare si sottolinea che i valori di umidità e di A_w sono incompatibili con un ulteriore sviluppo delle muffe con relativa produzione di micotossine nella fase di commercializzazione.

Tabella 2. Il valore minimo, massimo e mediano dei parametri di umidità, attività dell'acqua e acidità

	Valore max	Valore min	Valore mediano
Umidità% (p/p)	14,49	10,72	12,61
A _w	0,704	0,485	0,59
acidità	3,45	1,21	1,74

L'analisi microbiologica per la presenza di miceti ha evidenziato una grande variabilità di concentrazioni, così come illustrato nell'istogramma di Figura 3, con l'intervallo di frequenza più rappresentato corrispondente a concentrazioni comprese tra 10000 e 50000 UFC/g. A riguardo si deve tenere conto che 9 campioni erano costituiti da farine precotte e quindi soggette a bonifica termica con esposizione del prodotto a vapore alla temperatura di 160-180 °C.

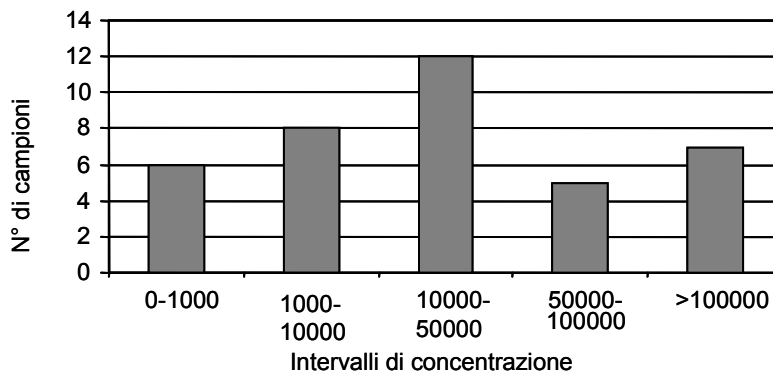


Figura 3. Carica di *Fusarium Verticillioides*. UFC/g

L'approfondimento degli esiti analitici attraverso il riconoscimento delle specie fungine indica che la carica totale fungina riscontrata è costituita quasi esclusivamente da *Fusarium verticillioides* relativamente ai campioni di farina di mais.

Le analisi per la ricerca di fumonisina B₁ e B₂ sono state eseguite con tecniche strumentali di HPLC/MS (4)(5) secondo lo schema riportato in Figura 4.

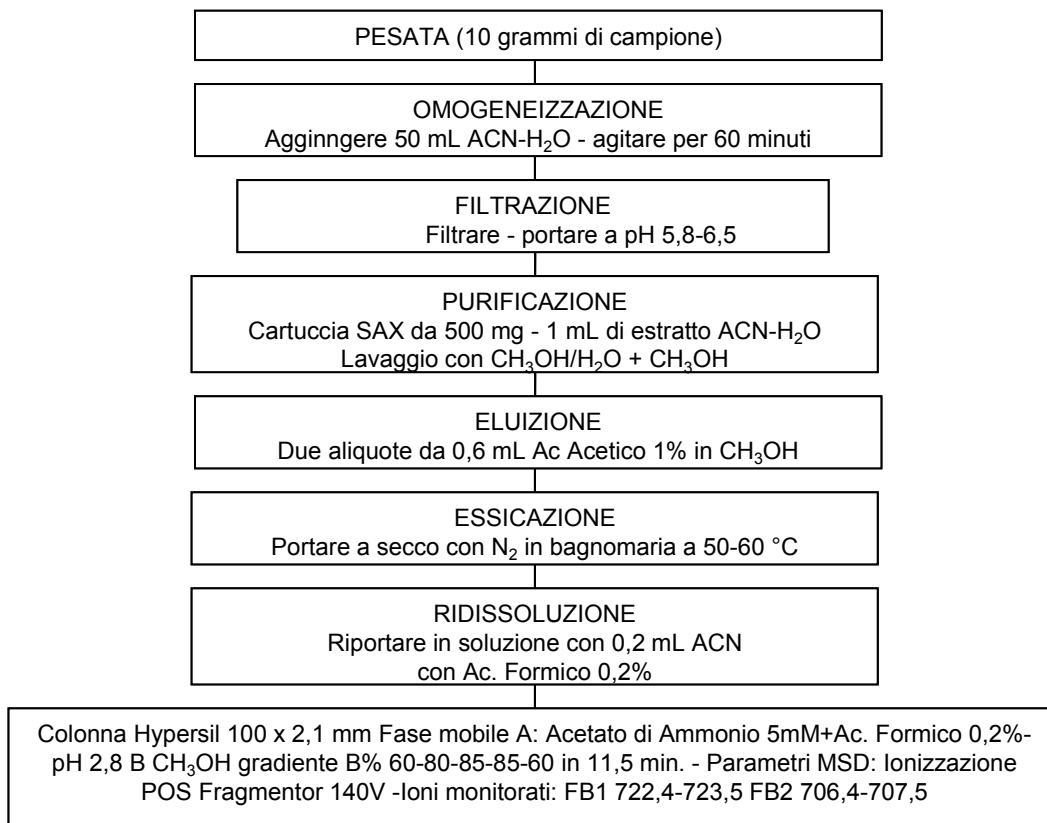


Figura 4. Metodo analisi fumonisine LC - MS

Risultati

Il Dipartimento di Pordenone ha partecipato negli anni 2003 e 2004 a circuiti internazionali di intercalibrazione promossi dal FAPAS (Food Analysis Performance Assesment Scheme UK) con risultati positivi.

Dalla elaborazione dei risultati per la determinazione di fumonisine B₁ e B₂ si determina la frequenza di distribuzione dei valori di concentrazione illustrati in Figura 5. Nel dettaglio risulta che 23 campioni hanno concentrazioni superiori a 0,5 mg/kg di cui 11 superiori a 1 mg/kg.

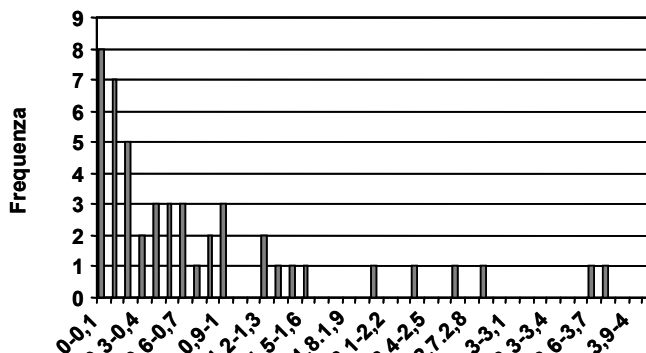


Figura 5. Istogramma di frequenza mg/kg somma FB₁+FB₂

In Figura 6 è rappresentata la situazione indicata relativamente agli intervalli considerati evidenziando altresì cromaticamente i risultati relativi alle farine precotte 7 su 9 campioni hanno risultati inferiori a 0,5 mg/kg e quelli definiti di produzione biologica (2 campioni rispettivamente con 1,5 e 3,8 mg/kg).

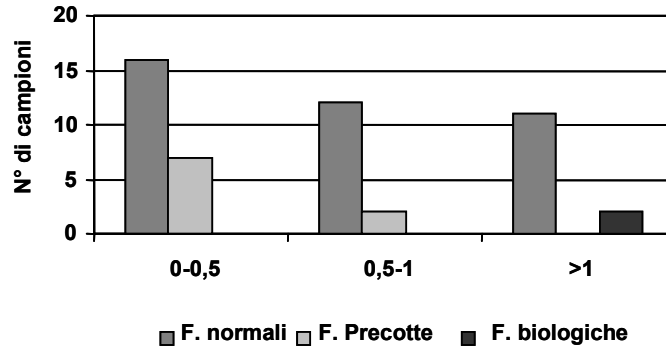


Figura 6. Concentrazione di (FB₁+FB₂) mg/kg in farine precotte e in farine di produzione biologica

Stante la derivazione della fumonisina dalla presenza di *Fusarium verticillioides* si è tentato di stabilire una correlazione tra carica fungina e concentrazione di FB₁ + FB₂ nei singoli campioni, così come illustrato in Figura 7 risultando un coefficiente di correlazione pari a 0,33 che rende impraticabile la possibilità di predire la presenza di fumonisina sulla base della carica fungina ritrovata.

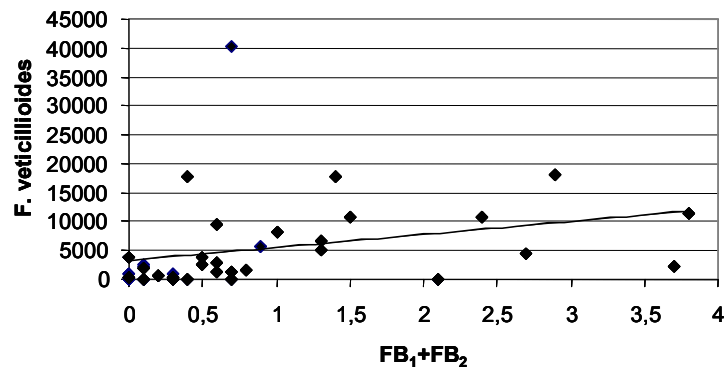


Figura 7. Correlazione tra carica di *F. verticillioides* e concentrazione FB₁+FB₂

Bibliografia

1. Brera C, Debergnach F, Grossi S, Miraglia M. Effect of Industrial Processing on the Distribution of Fumonisin B₁ in Dry Milling Corn Fractions. *Journal of Food Protection* 2004; 67(6):1261.
2. Carniel A, Casetta B, Ceccone S. Caratterizzazione e dosaggio delle tossine della famiglia delle fumonisine per LC-MSMS. *Boll. Chim. Igiene* 1996;47:289.
3. ISO 7698. Cereals, pulses and derived products-Enumeration of bacteria, yeasts and moulds. Geneva: International organization for Standardization; 1990.
4. Sydenham EW, Shephard GS, Thiel PG, Stockenstrom S, Snijman PW, Van Schalkwyk DJ. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in corn: IUPAC/AOAC international collaborative study. *J. AOAC Int* 1996;79:688.
5. Churchwell MI, Cooper WM, Howard PC, Doerge DR. Determination of fumonisins in rodent feed using HPLC with electrospray mass spectrometric detection. *J. Agric. Food Chem* 1997;45:2573.

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

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

Roma, dicembre 2005 (n. 4) 18° Suppl.