



ISTISAN CONGRESSI 15|C4

ISSN: 0393-5620 (cartaceo) • 2384-857X (online)

V Convegno nazionale

Le micotossine nella filiera agro-alimentare

Istituto Superiore di Sanità
Roma, 28-30 settembre 2015

RIASSUNTI

A cura di C. Brera, B. De Santis, F. Debegnach,
E. Gregori e M.C. Barea Toscan

a cura del Settore Attività Editoriali

Istituto Superiore di Sanità
viale Regina Elena, 299 – 00161 Roma
tel. +39 06 49901

www.iss.it

V Convegno nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare (2015)

ISTISAN Congressi 15/C4

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

V Congresso nazionale

**Le micotossine
nella filiera agro-alimentare**

Istituto Superiore di Sanità
Roma, 28-30 settembre 2015

RIASSUNTI

A cura di
Carlo Brera, Barbara De Santis, Francesca Debegnach,
Emanuela Gregori e Maria Cristina Barea Toscan
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare

ISSN 0393-5620
ISTISAN Congressi
15/C4

Istituto Superiore di Sanità

V Congresso nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 28-30 settembre 2015. Riassunti. A cura di Carlo Brera, Barbara De Santis, Francesca Debegnach, Emanuela Gregori e Maria Cristina Barea Toscan. 2015, xi, 77 p. ISTISAN Congressi 15/C4

Il Congresso, giunto alla sua quinta edizione, proporrà la presentazione di nuovi contributi scientifici che presentino informazioni aggiornate sui tre principali temi che riguardano l'impatto della presenza delle micotossine nella dieta con la salute umana ed animale. Il primo riguarderà la valutazione del rischio con particolare attenzione alla prioritizzazione dei rischi ed alla possibile associazione con specifiche patologie nell'uomo e negli animali, argomento ancora deficitario di informazioni attendibili. Il secondo tema riguarderà, nell'ambito della gestione del rischio, la presentazione delle attività preventive e di controllo che sono state attualmente poste in essere dai vari comparti del sistema agro-alimentare. Infine, come tradizione, l'ultima giornata sarà dedicata alla diagnostica, a cui in ultima analisi sono demandate le verifiche dell'efficacia delle azioni di autocontrollo e controllo ufficiale. Sin dal 2004, il Congresso si è tenuto presso l'Istituto Superiore di Sanità con frequenza media biennale. L'evento scientifico rappresenta un'opportunità per i ricercatori ed in generale tutti gli operatori del Servizio Sanitario Nazionale e della filiera agro-alimentare per discutere l'impatto delle micotossine su questioni economiche, agronomiche, industriali, di sicurezza alimentare e normative.

Parole chiave: Micotossine, Analisi del Rischio, Valutazione della esposizione, Analisi, Campionamento

Istituto Superiore di Sanità

5th National Congress. Mycotoxins in agri-food chain. Istituto Superiore di Sanità. Rome, 28-30 September, 2015. Abstract book. Edited by Carlo Brera, Barbara De Santis, Francesca Debegnach, Emanuela Gregori and Maria Cristina Barea Toscan. 2015, xi, 77 p. ISTISAN Congressi 15/C4 (in Italian and English)

The 5th edition of the National Congress on Mycotoxins in Food Chain will deal with three main issues related to the impact of these toxic compounds for animal and human health. The first issue regards the risk assessment that should lead to prioritization of the risks and possible associations with animal and human pathologies. This matter, mainly for the human side, is still deeply underestimated since no reliable information is available on the correlation between mycotoxin intake with diet and human diseases. The second issue regards the risk management of the mycotoxin threat along the whole agri-food chain. The individuation of the agronomic risks, although in some cases well defined, is still insufficient for implementing proper preventive actions mainly in the primary sector. The third issue, that is undoubtedly the most advanced, relates to the development of new diagnostic platforms aimed at a faster and faster and reliable analytical response to be used both in official control and in own-check activities. Since 2004 the National Congress has been held at the Istituto Superiore di Sanità (ISS, the National Institute of Health) with a two-year frequency, on average. This scientific event is an opportunity for researchers and stakeholders for discussing the effect of mycotoxins on economics, agriculture, industry, safety and legislation.

Keywords: Mycotoxins, Risk analysis, Exposure assessment, Analysis, Sampling.

Responsabili scientifici: Carlo Brera e Fernando Maurizi

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

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

Citare questo documento come segue:

Brera C, De Santis B, Debegnach F, Gregori E, Maria Cristina Barea Toscan MC (Ed.). *V Congresso nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 28-30 settembre 2015. Riassunti.* Roma: Istituto Superiore di Sanità, 2015 (ISTISAN Congressi 15/C4).

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Gualtiero Ricciardi*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 119 del 16/5/2014 (cartaceo) e n. 120 del 16/5/2014 (online)

Direttore Responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Paola De Castro, Egiziana Colletta e Patrizia Mochi*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.

© Istituto Superiore di Sanità 2015

Viale Regina Elena, 299 – 00161 Roma



INDICE

Programma	iii
Relatori e moderatori	ix
Note per la consultazione	xi
Comunicazioni orali	1
Poster	37
Indice degli autori	75

PROGRAMMA

Lunedì 28 settembre 2015

08:30 Registrazione dei partecipanti

09:00 Indirizzo di benvenuto

Umberto Agrimi

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

Armando Zingales

Presidente del Consiglio Nazionale dei Chimici

Carlo Brera

Direttore del Reparto OGM e Xenobiotici di Origine Fungina, Istituto Superiore di
Sanità

Prima sessione

VALUTAZIONE DEL RISCHIO

Moderatori: Carlo Brera, Fernando Maurizi

Comunicazioni Orali

09:30 *Considerazioni generali sulla problematica delle micotossine*

Carlo Brera

09:50 *Problematiche connesse all'esposizione ad aflatossine nei luoghi di lavoro*

Fulvio Ferri, Giorgio Fedrizzi

10:10 *Presenza di micotossine nei foraggi e loro effetti sui ruminanti*

Antonio Gallo

10:30 *Fumonisine, ocratossina e stress ossidativo*

Fiorenza Minervini

10:50 Intervallo

11:10 *Valutazione dell'esposizione del soggetto celiaco alle micotossine: risultati finali*

Barbara De Santis

11:30 *Valutazione della esposizione del consumatore a micotossine emergenti*

Chiara Dall'Asta

- 11:50 *Valutazione dell'esposizione derivante dalla presenza di micotossine negli alimenti per l'infanzia*
Sonia Colicchia
- 12:10 *Risultati del Progetto EFSA: Experimental study of deoxynivalenol biomarkers in urine*
Francesca Debegnach
- 12:30 *Micotossine negli integratori alimentari: valutazione del rapporto rischio-beneficio*
Emanuela Gregori
- 12:50 Discussione dei temi della sessione
- 13:30 Intervallo

Seconda sessione

ATTIVITÀ DI PREVENZIONE E (AUTO)CONTROLLO NELLA FILIERA

Moderatori: **Gianfranco Piva, Amedeo Reyneri**

Comunicazioni Orali

- 14:30 *Gestione integrata delle micotossine in pre- e post-raccolto*
Antonio Logrieco
- 14:50 *Utilizzo di agenti di biocontrollo nella prevenzione dello sviluppo di Aspergillus Flavus in campo*
Paola Battilani
- 15:10 *Linee guida per il controllo delle micotossine in frumento e mais (Progetto MICOPRINCEM)*
Amedeo Reyneri
- 15:30 *Impiego di farine contaminate a fini energetici (biogas): risultati di test in continuo in impianto pilota*
Lorella Rossi
- 15:50 *Prevenzione e degradazione della aflatossina B1 in mangimi a base di mais*
Corrado Fanelli
- 16:10 *Regolamenti e metodi per la valutazione di efficacia degli additivi di mangimi per la riduzione della contaminazione da micotossine*
Giuseppina Avantageggiato

16:30 *La filiera del frumento duro e tenero: focus su criticità e soluzioni*
Maurizio Monti

16:50 Discussione dei temi della sessione

Martedì 29 settembre 2015

Terza sessione

ATTIVITÀ DI MONITORAGGIO E SORVEGLIANZA PER IL CONTROLLO DELLE MICOTOSSINE NELLA FILIERA AGRO-ALIMENTARE

Moderatori: Roberto Causin, Maurizio Monti

08.00 Registrazione dei partecipanti

Comunicazioni Orali

09:00 *Video sulle micotossine*
Gianni Baccharini

09:20 *Criteri di attivazione del Piano Nazionale Controllo delle Micotossine nei prodotti alimentari*
Carlo Brera

09:40 *Micotossine nuove ed emergenti nel mais: diffusione ed influenza dell'agrotecnica*
Valentina Scarpino

10:00 *Micotossine e mercato dei cereali: effetti economici e pratiche contrattuali*
Andrea Villani

10:20 *Determinazione di aflatossina M1 nel formaggio. Valutazione del fattore di concentrazione in pecorino al latte crudo naturalmente contaminato*
Ivan Pecorelli

10:40 *Valutazione e gestione del rischio da micotossine: il punto di vista di una azienda leader*
Marco Silvestri

11.00 Intervallo

11:20 *Risultati del Progetto EFSA: Survey on sterigmatocystin in food*
Amedeo Pietri

- 11:40 *Monitoraggio micotossine in Italia dal 2006 al 2014*
Sabrina Locatelli
- 12:00 *EU policy on mycotoxins in feed and food: recent developments and outlook*
Frans Verstraete
- 12:20 *La percezione del problema delle micotossine da parte dei cittadini*
Agostino Macrì
- 12:40 Discussione dei temi della sessione
- 13:00 Intervallo
- 14.00 Sessione Poster

Mercoledì 30 settembre 2015

Quarta sessione

ASPETTI DIAGNOSTICI

Moderatori: **Barbara De Santis, Amedeo Pietri**

- 08.00 Registrazione dei partecipanti

Comunicazioni Orali

- 09:00 *EU-RL role in monitoring activity on mycotoxins*
Andreas Breidbach
- 09:20 *Il ruolo del Laboratorio Nazionale di Riferimento nelle attività di controllo delle micotossine*
Barbara de Santis
- 09:40 *Sviluppi diagnostici nell'analisi delle micotossine*
Francesca Debegnach
- 10:10 *Il sistema di gestione dati sui contaminanti dell'EFSA: dalla raccolta dati all'analisi*
Stefano Cappè
- 10:30 *Validazione di metodi di screening secondo il Regolamento UE 519/2014. Caso studio: determinazione del Deossinivalenolo in frumento mediante test immunocromatografico a flusso laterale*
Veronica Lattanzio

- 10:50 Intervallo
- 11:10 *Sviluppo di un biosensore elettronico per la determinazione dell'aflatossina B1 nelle derrate alimentari*
Katia Spinella
- 11:30 *Aspetti pratici legati ad una corretta esecuzione delle procedure di campionamento (proiezione DVD)*
Carlo Brera
- 12.15 Discussione dei temi del congresso e conclusioni

RELATORI E MODERATORI

Avantaggiato Giuseppina	Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari
Brera Carlo	Istituto Superiore di Sanità, Roma
Baccarini Gianni	Rotary Club, Ravenna
Battilani Paola	Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza
Breidbach Andreas	Joint Research Centre, Geel
Cappè Stefano	European Food Safety Authority, Bruxelles
Causin Roberto	Università degli Studi, Padova
Colicchia Sonia	University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna
Dall'Asta Chiara	Università degli Studi, Parma
De Santis Barbara	Istituto Superiore di Sanità, Roma
Debegnach Francesca	Istituto Superiore di Sanità, Roma
Fanelli Corrado	Sapienza Università di Roma, Roma
Fedrizzi Giorgio	Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia e Emilia-Romagna, Bologna
Ferri Fulvio	Azienda Sanitaria Locale, Reggio Emilia
Gallo Antonio	Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza
Gregori Emanuela	Istituto Superiore di Sanità, Roma
Lattanzio Veronica	Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari
Locatelli Sabrina	Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bergamo
Logrieco Antonio	Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari
Macrì Agostino	Unione Consumatori, Roma
Maurizi Fernando	Consiglio Nazionale dei Chimici, Roma
Minervini Fiorenza	Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari
Monti Maurizio	Associazione Nazionale Tecnici dell'Industria Molitoria, Roma
Pecorelli Ivan	Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche, Perugia
Pietri Amedeo	Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza
Piva Gianfranco	Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza
Reyneri Amedeo	Università degli Studi, Torino
Rossi Lorella	Centro Ricerche Produzioni Animali, Reggio Emilia
Scarpino Valentina	Università degli Studi, Torino
Silvestri Marco	Barilla, Parma
Spinella Katia	Università degli Studi Tor Vergata, Roma
Villani Andrea	AGER Borsa Merci, Bologna
Verstraete Frans	European Commission, DG SANTE, Bruxelles

NOTE PER LA CONSULTAZIONE

Il presente volume raccoglie tutti i contributi presentati al Congresso. I lavori sono divisi in Comunicazioni orali e Poster.

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

Alla fine del volume è incluso un indice degli autori.

Comunicazioni orali

CONSIDERAZIONI GENERALI SULLA PROBLEMATICHE DELLE MICOTOSSINE

Brera C.

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

Le micotossine rappresentano ancora oggi un serio problema di salute pubblica ed animale per diversi aspetti. Sebbene sia notevolmente aumentata l'attenzione verso questa problematica rimangono ancora in attesa di risoluzione alcuni aspetti fondamentali.

Tossicocinetica. Sebbene gli studi sugli animali abbiano fornito chiare indicazioni, non sono ancora altrettanto state ben definite le interazioni ed i meccanismi di biotrasformazione nell'uomo. Attualmente, la ricerca deve ancora individuare con maggiore certezza i profili metabolici che caratterizzano le varie micotossine assunte con la dieta e che vengono poi trasformate, convertite, eliminate nell'organismo sotto forma di forme metaboliche che in alcuni casi, come quello ad esempio delle fumonisine, non sono ancora perfettamente caratterizzati. Questa mancanza rende la valutazione del rischio per l'uomo un esercizio che in alcuni casi è in grado di dare una risposta quantitativa, ma solo in modo parziale. Altro aspetto fondamentale correlato è la mancanza di correlazione tra patologia e presenza di micotossine nella dieta come agente eziologico. A tale proposito, si registra ancora una totale mancanza di informazioni legate agli effetti tossici additivi e/o sinergici nell'uomo e negli animali, derivanti dalla assunzione di alimenti contaminati da più micotossine.

Valutazione dell'esposizione. Un nuovo approccio che si sta affacciando è quello legato alla definizione dell'esposoma, vale a dire la totalità delle fonti di esposizione derivanti dagli ambienti e stili di vita, quindi non di natura genetica, cui l'uomo è esposto dalla nascita in poi. La sua declinazione, tuttavia, è ancora lontana dall'essere effettuata in modo sistematico in quanto si tratta di un'analisi alquanto complessa e di lunga durata.

Studi di monitoraggio e sorveglianza. Una condizione che è attualmente ancora non pienamente soddisfatta è la quantità e soprattutto la qualità di dati provenienti da studi di monitoraggio e/o sorveglianza che consentano di disporre di una informazione aggiornata e attendibile sullo stato di contaminazione da micotossine nei vari prodotti alimentari nonché negli alimenti zootecnici. Le azioni di controllo, a mio avviso, risentono ancora di una mancanza di strategia nazionale mirata alla individuazione delle possibili fonti di rischio ed alla caratterizzazione del rischio stesso in termini sia quantitativi che qualitativi. Questa lacuna dovrebbe essere colmata dalla predisposizione di un Piano Nazionale di Controllo delle Micotossine che è ancora in embrione ma che dovrebbe essere varato il prossimo anno, i cui criteri sono descritti in una presentazione all'interno di questo Congresso.

Normativa. Ancora oggi sussistono vuoti normativi che inspiegabilmente non trovano una loro declinazione, forse anche a causa della mancanza di dati provenienti dagli studi di monitoraggio come precedentemente osservato. Alimenti come i legumi, gli integratori alimentari ad eccezione del riso rosso fermentato, le erbe infusionali, i prodotti carnei, ed altri prodotti che entrano in modo significativo nella nostra dieta alimentare sono totalmente privi di un limite massimo tollerabile, lasciando una lacuna informativa che non

consente di disporre di un quadro completo della assunzione da parte del consumatore. Stesso discorso per quanto riguarda gli alimenti zootecnici; come noto, solo l'aflatossina B1 è regolamentata mentre per le altre micotossine esistono solo livelli guida secondo la Raccomandazione 576/2006/CE. In base alle patologie che ricorrono nelle diverse specie animali, la fissazione di livelli massimi garantirebbe in modo più completo una riduzione o quantomeno un maggior controllo delle patologie soprattutto di specie altamente sensibili, come ad esempio i suini.

Azioni preventive. Da sempre il ricorso alla considerazione che l'adozione di misure preventive è l'unica strada percorribile per minimizzare il fenomeno, si scontra con la difficile applicabilità nelle condizioni reali. Così la mancata conoscenza da parte dell'agricoltore circa le possibili azioni che potrebbe attivare, oppure la difficoltà di acquisire informazioni predittive sull'andamento climatico prima dell'inizio delle campagne di semina, oppure ancora la difficoltà di aprire a scenari maggiormente in linea con una sistematicità di intervento preventivo rende questa problematica ancora non completamente a regime di controllo. Questi ed altri aspetti saranno ampiamente discussi in questo Congresso con la finalità di dare una risposta concreta ai diversi temi di interesse per la salute pubblica ed animale.

PROBLEMATICHE CONNESSE ALL'ESPOSIZIONE AD AFLATOSSINE NEI LUOGHI DI LAVORO

Ferri F. (a), Fedrizzi G. (b), Magnani M. (a), Giorgi Rossi P. (b), Collini G. (b), Mancuso P. (b)

(a) *SPSAL AUSL Reggio Emilia, Scandiano, Reggio Emilia*

(b) *Servizio di Epidemiologia, AUSL Reggio Emilia, Reggio Emilia*

È sorprendente, per un operatore della prevenzione, trovarsi ad intervenire in aziende della filiera agroalimentare (mangimifici, essiccatoi, allevamenti, ...) e scoprire che il tema della esposizione professionale ad Aflatossine cancerogene (A.) risulta sostanzialmente trascurato. Ciò a causa della carente conoscenza e della scarsa regolamentazione sulla specifica esposizione in ambienti di lavoro e sulle modalità per prevenirne l'assorbimento e i loro effetti nocivi. Sono scarsi, infatti, gli studi epidemiologici o le indagini di approfondimento inerenti i livelli di esposizione professionale ed gli effetti sanitari, nelle pur numerose aziende che trattano, direttamente o indirettamente, materiali o prodotti alimentari o mangimi contaminati. Nonostante la IARC abbia da tempo riconosciuto la cancerogenicità di queste micotossine e, nel contempo, la EU abbia definito regolamenti stringenti e limiti cogenti al loro contenuto nei cibi e nei mangimi, le A., paradossalmente, non sono ancora riconosciute ufficialmente come agenti cancerogeni professionali. La possibilità del loro assorbimento per via respiratoria, attraverso le polveri inalate, da parte di lavoratori professionalmente esposti, è nota da tempo e ben documentata in studi anche recenti. I valori di esposizione possono variare da lavorazione a lavorazione, ma interessano comunque un'ampia serie di comparti produttivi: dalla produzione e trattamento dei cereali e, particolarmente, del mais (raccolta, stoccaggio, essiccamento, trasporto, cernita,...) o di altri prodotti agricoli (frutta secca od essiccata, caffè, cacao, spezie, ..), al loro impiego nell'industria alimentare e mangimistica, fino al loro utilizzo negli allevamenti o nella produzione di biogas, senza trascurare le possibili esposizioni nei laboratori di analisi. Di recente è documentata anche l'esposizione professionale in alcuni comparti dell'industria tessile (cotone). Il numero di aziende e di lavoratori potenzialmente esposti è ingente e ciò accresce la nostra sorpresa sulla scarsa attenzione rivolta al problema, anche a livello internazionale. Pur con tali condizionamenti negativi, non mancano gli strumenti per limitare, se non annullare i rischi professionali. La prima misura da adottare è una adeguata informazione da fornire ai soggetti interessati e, soprattutto, ai lavoratori esposti, per incrementarne la consapevolezza circa la presenza del rischio, le sue fonti, le modalità di esposizione e anche sui provvedimenti di prevenzione più efficaci per limitarla o abbatterla. La Monografia pubblicata di recente dalla Regione Emilia-Romagna va in tal senso. Anche alcuni obblighi generali previsti dal D.L.vo 81/2008, se rispettati, possono contribuire a limitare i rischi professionali da A.: "valutare tutti i rischi presenti" da parte dei datori di lavoro (A. comprese!), adeguarsi alle regole del codice etico ICOH da parte dei medici competenti, adottare ed applicare le buone prassi di prevenzione, per limitare l'inalazione di polveri contaminate durante le lavorazioni a rischio, costituiscono approcci e strumenti in grado di compensare utilmente, seppure in parte, le attuali carenze normative.

PRESENZA DI MICOTOSSINE NEI FORAGGI E LORO EFFETTI SUI RUMINANTI

Gallo A. (a), Masoero F. (a), Frisvad J.C.. (b), Bertuzzi T. (a), Pietri A. (a), Mulazzi A. (a), Rastelli S. (a), Nielsen K.F. (b)

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

(b) *Department of Systems Biology, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark*

Nelle economie sviluppate, la contaminazione da micotossine delle filiere alimentari è strettamente regolata, così da ridurre l'esposizione umana ed animale; in questa situazione, i costi maggiori per il produttore e per il consumatore derivano in primo luogo dalla necessità di rispettare la normativa, immediatamente seguiti da quelli causati dall'impatto delle micotossine sulla salute e produttività degli animali allevati. Il maggior problema derivante dalla presenza di micotossine nella filiera alimentare animale non è costituito dagli episodi di micotossicosi acuta, ma dalle ridotte *performances* produttive degli animali allevati. Bassi livelli di micotossine nella razione possono causare una gamma di disturbi metabolici, che possono essere eventualmente accompagnati da manifestazioni patologiche. Tuttavia, il risultato è invariabilmente una ridotta *performance* degli animali, che è spesso difficile riconoscere e quantificare, dato che gli effetti possono essere diversi e variabili. Una delle prime manifestazioni di una micotossicosi cronica è la diminuzione della crescita, derivante da ridotta assunzione di alimento e diminuita utilizzazione dei nutrienti; quest'ultima può essere parzialmente spiegata dal malassorbimento causato dalla o dalle tossine, dovuto a digestione e assorbimento ridotti e dall'aumento di perdite endogene. Ad esempio, da una elaborazione condotta utilizzando i dati di tutta la letteratura disponibile, è emerso che per ogni mg/kg di deossinivalenolo (DON) e di fumonisina nella razione per suini, si ha una diminuzione della crescita rispettivamente dell'8 e dello 0,4%. L'alterazione del metabolismo a seguito dell'ingestione di micotossine può influenzare l'efficienza riproduttiva di entrambi i sessi; nella femmina gravida, le micotossine possono alterare lo sviluppo embrionico e fetale. Gli effetti delle micotossine sul sistema immunitario sono un elemento importante quando si devono valutare le conseguenze sulla produttività animale. Tali effetti sono difficili da riconoscere sul campo, perché i sintomi della malattia sono associati all'infezione, piuttosto che alla tossina che ha predisposto l'animale all'infezione. Questo perché l'effetto immunosoppressore di molte micotossine si verifica a livelli di ingestione più bassi di quelli che influenzano i parametri produttivi, come la velocità di crescita. L'ingestione di micotossine può anche ridurre l'efficacia dei programmi di vaccinazione. fumonisine e DON sono spesso contemporaneamente presenti nei mangimi ed è stato dimostrato che una co-esposizione sub-clinica dei suini a queste tossine causa una maggiore immuno-soppressione rispetto alle tossine singole.

FUMONISINE, OCRATOSSINA E STRESS OSSIDATIVO

Minervini F.

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

I soggetti celiaci presentano una intolleranza permanente al glutine che condiziona le loro abitudini alimentari che sono caratterizzate da maggiori consumi di prodotti a base di mais, riso e altri cereali, in sostituzione dei prodotti contenenti glutine abitualmente consumati dall'intera popolazione; pertanto, a causa di questo sbilanciato consumo di cereali particolarmente suscettibili alla contaminazione da micotossine, lo studio, condotto in collaborazione con l'Associazione Italiana Celiachia (AIC), si prefigge di stimare l'esposizione all'AFB1, OTA, FBs, al deossinivalenolo (DON), allo zearalenone (ZEA), ed alle tossine T-2 e HT-2 nei soggetti celiaci attraverso il consumo dei prodotti dietetici specificatamente destinati alla loro dieta. In particolare, questo studio ha avuto lo scopo di valutare l'esposizione di un gruppo di donne celiache in allattamento, utilizzando i dati di consumo riportati in schede alimentari. Inoltre si è progettato di stimare l'esposizione dell'intera popolazione dei soggetti affetti da morbo celiaco utilizzando i dati di consumo della popolazione italiana, per colmare la mancanza di tale informazione. Per effettuare lo studio di esposizione è stata predisposta una campionatura in siti di campionamento predeterminati e rappresentativi del territorio nazionale (farmacie, negozi specializzati e grande distribuzione). Sono stati raccolti 376 campioni dedicati ai celiaci. Su tali campioni è stato effettuato il dosaggio, con un metodo analitico validato in house, della aflatossina B1, ocratossina A, fumonisine (FBs), deossinivalenolo, zearalenone (ZEA), T-2 e HT-2. Dalla combinazione dei dati di contaminazione dei campioni analizzati e dei dati di consumo per i prodotti alimentari esaminati (medio ed al 95ile) è stata effettuata una valutazione dell'esposizione alle micotossine sia delle donne celiache in allattamento che dell'intera popolazione affetta da morbo celiaco. In particolare, sono state considerate le fasce di età comprese tra i 3 e 9.9 anni, tra 10 e 17.9 anni e tra 18 e 65 anni. Gli scenari di esposizione (*upper and lower bound*) emersi da questo studio hanno delineato per tutte le micotossine analizzate una condizione di estrema tranquillità in tema di sicurezza alimentare, con contaminazioni di interesse solo nel caso delle FBs e dello ZEA. Pertanto, la valutazione della esposizione è stata effettuata solo per queste due micotossine; le donne celiache in allattamento hanno mostrato intervalli di esposizione ampiamente al di sotto dei valori soglia indicati dalla TDI; nella peggiore delle ipotesi (considerando il consumo al considerando i valori di consumo al 95%ile, esclusivamente per lo ZEA nella matrice pane, si sono ottenuti valori di esposizione più alti, che vanno dal 30% al 55% della TDI, per tutte le fasce di età, sia per i maschi che per le femmine.

VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DI AFLATOSSINA M1, OCRATOSSINA A E ZEARALENONE NEL LATTE MATERNO DI MAMME CELIACHE

De Santis B. (a), Valitutti F. (b), Nigri A. (a), Trovato C.M. (b), Iorfida D. (b), Debegnach F. (a), Gregori E. (a), Barbato M. (b), Cucchiara S. (b), Catassi C. (c), Brera C. (a)

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

(b) Reparto di Gastroenterologia ed Epatologia Pediatrica, Dipartimento di Pediatria, Policlinico Umberto I, Roma

(c) Dipartimento di Scienze Cliniche Specialistiche ed Odontostomatologiche-Pediatria Generale e Specialistica, Università Politecnica delle Marche, Ancona

La dieta priva di glutine (Gluten-free diet, GFD) è caratterizzata da un elevato consumo di mais, riso ed altri cereali che possono essere suscettibili alla contaminazione da micotossine, contaminanti chimici prodotti dal metabolismo secondario di alcuni funghi filamentosi del genere *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, che oltre ai cereali, attaccano una ampia varietà di prodotti alimentari di origine vegetale. La presenza di queste sostanze tossiche negli alimenti rappresenta un serio problema di sicurezza alimentare in quanto le micotossine sono responsabili di importanti effetti tossici come la genotossicità e cancerogenicità (aflatossina B1), teratogenicità ed immunosoppressione sia nell'uomo che nell'animale. Fra i cereali, il mais è il prodotto maggiormente colpito dalla contaminazione da micotossine fra cui le più comuni sono le aflatossine, le fumonisine e lo zearalenone, con possibile co-presenza delle stesse. L'elevato consumo di mais nella dieta dei soggetti celiaci, può pertanto rappresentare una fonte di rischio di esposizione per questa popolazione a regime dietetico particolare, e per questo motivo è stato avviato uno studio in collaborazione con l'Associazione Italiana Celiachia (AIC) per la valutazione dell'esposizione ad alcune micotossine in un gruppo di mamme celiache. Attraverso l'analisi della aflatossina M1, ocratossina A e zearalenone in campioni di latte materno prelevato da un gruppo di mamme celiache, è stato valutato sia il livello di esposizione delle mamme celiache sia il rischio di esposizione alle stesse micotossine per i bambini in allattamento per i quali il latte materno costituisce l'alimento esclusivo nei primi mesi di vita. Per lo studio, realizzato nel periodo 2012-2013, sono state reclutate 35 mamme celiache e 30 mamme di controllo in allattamento. Il latte materno è stato raccolto durante le 24h in tre momenti della giornata e per tre giorni successivi, come segue: un campione durante il digiuno, uno 4 ore dopo il pranzo e uno 2 ore dopo la cena. Il contenuto di micotossine è stato analizzato in un totale di 126 campioni latte materno, previa purificazione e colonnina di immunoaffinità, mediante analisi chimica in HPLC a fase inversa con rivelazione fluorimetrica.

VALUTAZIONE DELLA ESPOSIZIONE DEL CONSUMATORE A MICOTOSSINE EMERGENTI

Dall'Asta C.

Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università degli Studi, Parma

Negli ultimi anni si è registrato un interesse sempre più forte della comunità scientifica e del legislatore verso le cosiddette “micotossine emergenti”, composti cioè non ancora normati in Europa ma la cui diffusione negli alimenti e le relative implicazioni tossicologiche richiedono particolare attenzione. Metodi analitici sempre più performanti hanno infatti permesso attività di *screening* di ampio spettro, su cui in alcuni casi è stato possibile effettuare anche valutazioni di esposizione. Contemporaneamente, le nuove conoscenze tossicologiche hanno permesso di meglio delinearne le implicazioni sulla salute umana e animale. Tra le classi di interesse, vi sono gli alcaloidi dell'Ergot, le Fusarium-tossine non normate come enniatine e beauvericina, le micotossine mascherate. In particolare, quest'ultima classe è stata oggetto di una recente opinione EFSA (2014) che ne sottolinea la rilevanza in termini di *risk assessment*. La presente comunicazione si pone quindi l'obiettivo di fare il punto sulle attuali conoscenze, delineare le problematiche ancora aperte e necessarie quindi di intervento, e fornire dati anche recenti che consentano la valutazione dell'esposizione del consumatore a questo gruppo di composti.

VALUTAZIONE DELLA ESPOSIZIONE DERIVANTE DALLA PRESENZA DI MICOTOSSINE NEGLI ALIMENTI PER L'INFANZIA

Brera C. (a), Colicchia S. (b,c), Debegnach F. (a), Gregori E. (a), De Santis B. (a)

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

(b) *Department for Agrobiotechnology, IFA, Christian Doppler Laboratory for Mycotoxin Metabolism and Center for Analytical Chemistry, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, Tulln, Austria*

(c) *Dipartimento di Chimica e Tecnologia del Farmaco, Sapienza Università di Roma, Roma*

La normativa nazionale e comunitaria ha affrontato il problema della contaminazione degli alimenti da micotossine, stabilendo specifici controlli ufficiali. Si possono ricordare, ad esempio, il Regolamento (CE) 401/2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari, ed il Regolamento (CE) 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari, in parte modificato dal Regolamento (UE) 105/2010 (ocratossina A). Inoltre, in applicazione all'art. 15, del Regolamento (CE) 882/2004, il 24 luglio 2009 è stato pubblicato il Regolamento (CE) 669/2009, relativo al livello accresciuto di controlli ufficiali sulle importazioni di alcuni mangimi e alimenti di origine non animale da Paesi Terzi. L'elenco degli alimenti da sottoporre ad un livello accresciuto di controlli viene sottoposto ogni tre mesi ad un riesame periodico da parte di un gruppo di lavoro al quale partecipano esperti di tutti gli Stati Membri, sulla base di un'adeguata analisi del rischio. Infine, il Regolamento (CE) 1152/2009 stabilisce condizioni particolari per l'importazione di determinati prodotti alimentari da alcuni Paesi Terzi a causa del rischio di contaminazione da aflatossine ed è stato parzialmente modificato dal Regolamento (UE) 274/2012. In Italia, gli USMAF (Uffici di sanità marittima, aerea e di frontiera del Ministero della Salute), nell'ambito delle loro attività di sanità transfrontaliera, costituiscono il punto di entrata per gli alimenti di origine non animale provenienti da Paesi Terzi e rappresentano quindi un filtro protettivo nei confronti sia del territorio nazionale che europeo. Questa attività si svolge in ottemperanza alle normative nazionali ed agli specifici Regolamenti comunitari. In media ogni anno vengono eseguiti oltre 120.000 controlli ufficiali su alimenti e materiali a contatto con alimenti, di cui 100% di tipo documentale, circa 9-10% ispettivo e 5-6% con campionamento della merce. I respingimenti in media si attestano al di sotto dell'1%. Tra le matrici alimentari più frequentemente presentate all'importazione sono compresi caffè, nocciole, fichi secchi, fagioli, frutta fresca, erbe aromatiche e spezie, uva sultanina, che possono presentare una contaminazione da micotossine. In conclusione, le Autorità regolatorie nazionali e comunitarie prestano particolare attenzione alle misure di controllo nei confronti delle micotossine e, in Italia, gli USMAF esercitano un'azione di verifica capillare sulla sicurezza degli alimenti, a favore del cittadino.

RISULTATI DEL PROGETTO EFSA: EXPERIMENTAL STUDY OF DON BIOMARKERS IN URINE

Brera C. (a), De Santis B. (a), Debegnach F. (a), Miano B. (a), Moretti G. (a), Lanzone A. (b), Del Sordo G. (b), Buonsenso D. (b), Chiaretti A. (b), Hardie L. (c), White K. (c), Brantsaer A.L. (d), Knutsen H. (d), Eriksen G.S. (e), Sandvik M. (e), Wells L. (f), Allen S. (f), Sathyapalan T. (f)

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

(b) *Policlinico Agostino Gemelli, Roma*

(c) *University of Leeds, United Kingdom*

(d) *Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway*

(e) *Norwegian Veterinary Institute, Oslo, Norway*

(f) *Hull Royal Infirmary, Hull, United Kingdom*

Il Deossinivalenolo (DON) è una micotossina appartenente alla classe B dei tricoteceni prodotta dal metabolismo secondario dei funghi appartenenti alla specie *Fusarium*, principalmente il *F. graminearum* e *F. culmorum*. Lo scopo del progetto, finanziato dall'Autorità Europea di Sicurezza Alimentare (EFSA), GP/EFSA/CONTAM/2013/04, è stato quello di produrre dati di contaminazione di DON totale e di de-epossi deossinivalenolo (DOM-1) in campioni di urina di diversi gruppi di popolazione (bambini, adolescenti, adulti, anziani, vegetariani e donne in gravidanza); i campioni sono stati raccolti in Italia, Norvegia e Regno Unito, per un totale di 635 volontari. Le urine sono state analizzate tramite LC-MS. Le urine del primo mattino sono state raccolte per due giorni consecutivi, inoltre ogni partecipante ha fornito i consumi alimentari relativi ai giorni precedenti la raccolta delle urine. Il DON è stato riscontrato nel 99, 93 e 76% dei campioni norvegesi, inglesi e italiani rispettivamente. I livelli di concentrazione media sono risultati simili in Norvegia e Italia, mentre i campioni inglesi erano circa il triplo. Infine, la contaminazione media del DON nelle urine dei bambini norvegesi e inglesi è risultata circa 2,5 volte maggiore rispetto agli adulti. Per quanto riguarda il DOM-1, è risultato contaminato il 12% dei campioni norvegesi e l'1,5% di quelli italiani, mentre nessuno dei campioni inglesi è risultato positivo al DOM-1. Questo potrebbe però dipendere dai diversi livelli di LOQ nei tre siti di analisi. L'associazione tra consumi alimentari e livelli di micotossina è stata studiata tramite modello logistico ordinale. In Italia, consumi elevati di pasta e alti livelli di DON hanno mostrato associazione positiva. In Norvegia una significativa associazione è stata riscontrata tra consumo di cereali per la prima colazione, snack, pane e derivati, ed elevati livelli di DON urinario. Alti livelli di DON sono invece risultati associati al consumo di biscotti per la popolazione del Regno Unito.

MICOTOSSINE NEGLI INTEGRATORI ALIMENTARI: VALUTAZIONE DEL RAPPORTO RISCHIO-BENEFICIO

Gregori E., Brera C.

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

La Regione Piemonte, attraverso le Aziende Sanitarie Locali, la Dogana di Torino Caselle e i carabinieri del NAS, in autonomia, ha realizzato un vasto programma di controllo degli alimenti a rischio, sia alla produzione che al commercio. La ricerca analitica è affidata al Polo Alimenti dell'ARPA Piemonte. Dal 2010 il laboratorio ha eseguito controlli anche per conto di alcuni Uffici di Sanità Marittima e di Frontiera di altre regioni Italiane che operano secondo i criteri previsti dalla specifica normativa sui controlli all'importazione. Il numero di campioni analizzati è aumentato del 90% rispetto agli anni precedenti e, come conseguenza, è aumentata la percentuale di positività e irregolarità riscontrate. Tali risultati sono da rapportare comunque al prelievo mirato di prodotti "a rischio" per tipologia e provenienza. I campioni analizzati nei dieci anni considerati sono circa 6000. Gli alimenti indagati sono stati soprattutto cereali, frutta secca, vino, caffè, cacao, e i loro derivati; sono state ricercate, nelle varie matrici, una o più delle seguenti micotossine: aflatossine B₁, B₂, G₁, G₂, aflatossina M₁, ocratossina A, patulina, zearalenone, fumonisine B₁ e B₂, Deossinivalenolo, per un totale di oltre 25000 determinazioni. Le positività riscontrate sono state numerose (~30% dei campioni) ma solo in pochi campioni (1-2%) la concentrazione di micotossine ha superato i limiti di legge. La quantità di risultati prodotti ci ha permesso di dare indicazioni utili per la pianificazione e la realizzazione dei controlli sul territorio regionale. Periodicamente viene infatti aggiornata l'elaborazione dei dati, sia a livello globale che, se rilevante, a livello specifico. I risultati possono essere quindi valutati in base a provenienza, tipologia e destinazione d'uso dell'alimento, oppure per tipo e numero di micotossine riscontrate. Negli anni è stato inoltre misurato l'impatto delle modifiche alla normativa sull'entità e gli esiti dei controlli; l'ottimizzazione delle tecniche analitiche adottate ha permesso la rilevazione di concentrazioni di micotossine sempre più basse sulle svariate tipologie di prodotti. Progressivamente è stata incrementata anche la quantità e il dettaglio delle informazioni registrate per ogni singolo campione, ciò ha reso più efficace e puntuale l'elaborazione dei dati. La nuova procedura standardizzata è inoltre anche allineata alle richieste di raccolta dati dell'EFSA.

GESTIONE INTEGRATA DELLE MICOTOSSINE IN PRE- E POST- RACCOLTO

Logrieco A

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

Il Polo di Specializzazione Alimenti di Bari-ARPA Puglia svolge il monitoraggio sulle micotossine in diverse tipologie di alimenti di origine vegetale. Nel periodo 2008-2010 sono state effettuate 1.858 determinazioni su alimenti, così differenziate:

- 51,7%: aflatossine B₁, B₂, G₁, G₂ su cereali e frutta a guscio;
- 23,6%: ocratossina A su cereali, caffè e vino;
- 12,4%: deossinivalenolo (DON) e zearalenone (ZEA) su cereali.

Dalla ricerca è risultato che il 26,5% dei campioni di cereali analizzati era contaminato naturalmente da OTA, il 19,6% da DON, l'1,7% da aflatossine B₁ e lo 0,4% da ZEA. Dei cereali contaminati da OTA il 73,7% presentava un livello di contaminazione inferiore a 2 µg/kg. Fra quelli contaminati da DON sono stati quantificati livelli di contaminazione che raggiungevano i 600 µg/kg. Nessun campione è stato identificato come non conforme. Solo l'1,7% dei campioni analizzati è risultato contaminato da aflatossina B₁. Nel 52,8% dei campioni di vino analizzati è risultato presente un livello di OTA superiore al limite di quantificazione (LOQ=0,1 µg/L) distribuito in maniera differente tra rossi (70,9%), rosati (52,4%) e bianchi (23,1%). Dei campioni di frutta a guscio monitorati, il 40% è risultato naturalmente contaminato da aflatossine, di cui, il 20% con valori superiori ai limiti di legge. Fra i campioni di caffè torrefatto monitorati, il 12,5% è risultato naturalmente contaminato ma con livelli non superiori a 0,5 µg/kg.

UTILIZZO DI AGENTI DI BIOCONTROLLO NELLA PREVENZIONE DELLO SVILUPPO DI *ASPERGILLUS FLAVUS* IN CAMPO

Battilani P.

*Dipartimento di Scienze delle Produzioni Vegetali Sostenibili, Università Cattolica del
Sacro Cuore, Piacenza*

A partire dai primi anni 2000, quando l'emergenza micotossine ha assunto rilevanza per le principali filiere alimentari, è divenuta una priorità la messa a punto di percorsi produttivi in grado di contrastare i funghi tossigeni e la produzione di micotossine. Nel settore dei cereali è stato necessario valutare tutte le possibili soluzioni considerando sia strumenti di controllo preventivo e indiretto sulla coltura o sull'ambiente colturale, sia strumenti di lotta diretta atti a colpire i patogeni. Le difficoltà sono state di diverso ordine: le soluzioni dovevano essere efficaci, condivise, sostenibili economicamente e tecnicamente e quindi tali da essere diffuse su il maggior numero di produttori possibile in un breve lasso di tempo. I migliori risultati sono stati raggiunti combinando i diversi strumenti disponibili in percorsi produttivi razionali dal momento che nessuno tra questi, singolarmente adottato, si è dimostrato capace di rispondere in modo sufficientemente adeguato alle necessità. Allo stato attuale possiamo tracciare sinteticamente per le più diffuse micotossine i percorsi produttivi di campo più efficaci per i cereali vernini e il mais. Cereali vernini e deossinivalenolo: varietà meno sensibili, interrimento o raccolta dei residui, avvicendamento con colture non cerealicole, controllo degli stress, difesa fungicida con triazoli alla spigatura-fioritura. Mais e fumonisine: ibridi meno sensibili, semine precoci, azioni per favorire l'*early vigor*, difesa insetticida contro la piralide, controllo degli stress, raccolta tempestiva. L'applicazione attenta di questi percorsi ha portato a significativi risultati riducendo la forte influenza dell'andamento climatico e assicurando livelli qualitativi prima impensabili e rendendo possibile mantenere la filiera del mais alimentare nei nostri areali. Ciò non di meno è richiesto un continuo aggiornamento per l'arrivo di nuovi strumenti (ad es. fungicidi di nuova generazione), per il sopravvenire di condizioni tecniche e strutturali prima sconosciute e, infine, per la risposta o l'adattamento selettivo della popolazione microbica a definite pressioni operate dai mezzi di difesa. Gli strumenti ora sotto osservazione e che potrebbero avere qualche applicazione futura sono legati all'impiego di micro-organismi competitori con i funghi tossigeni con inoculo distribuito su seme, su parti della pianta più esposte in precisi stadi fenologici o, infine sulle fonti di inoculo dei patogeni quali i residui colturali al suolo. Infine, l'attenzione di tossine "emergenti", quali tossine T2 e HT2 o la moniliformina, l'affermarsi di nuove agrotecniche, quali gli alti investimenti nel mais, richiedono un frequente e attenta riposizionamento delle tecniche di controllo per migliorare la sanità in modo sostenibile.

LINEE GUIDA PER IL CONTROLLO DELLE MICOTOSSINE IN FRUMENTO E MAIS

Reyneri A. (a), Bruno G. (a), D'Egidio M.G. (b), Balconi C. (c)

(a) Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi, Torino

(b) Consiglio per la Ricerca in Agricoltura, Roma

(c) Consiglio per la Ricerca in Agricoltura, Bergamo

Considerando i dati ufficiali disponibili circa la presenza di micotossine nei diversi prodotti alimentari, e in base alle provenienze geografiche, è stata analizzata la distribuzione del pericolo micotossine nei diversi Paesi con impatto sulla filiera alimentare. Partendo dal Regolamento CE 1831/2003 e s.m.i. sono state valutate le principali fonti di possibile contaminazione delle produzioni alimentari. Sono state quindi considerate le materie prime per gruppi (frutta secca, cereali, latte, spezie, caffè, succhi di frutta, vino) in riferimento al gruppo di micotossine coinvolte (aflatossine, ocratossina A, patulina, deossinivalenolo, zearalenone, fumonisine). È stata valutata l'efficacia dei piani HACCP di alcune aziende clienti del Gruppo Maurizi srl suddivise per le seguenti tipologie: produzione pane e prodotti da forno (dolci e salati); confezionamento spezie, imbottigliamento vino, produzione pasta secca, produzione caffè, produzione di prodotti a base latte. La gestione delle materie prime è stata quindi analizzata all'interno di un ipotetico sistema HACCP (studio dell'origine delle materie prime, qualificazione fornitori, documentazione di supporto, valutazione documentazione). Sono descritte le azioni preventive possibili emerse dall'analisi dei pericoli e le azioni di validazione e monitoraggio attraverso un controllo analitico programmato. L'analisi ha permesso di validare un processo di gestione del pericolo micotossine riproducibile in ogni situazione di trasformazione di prodotti alimentari. La metodologia presentata è in linea con quanto richiesto dai più noti standard volontari per la sicurezza dei prodotti alimentari quali *International Food Standard (IFS)* e *British Retail Consortium (BRC)* che proprio nelle ultime revisioni applicabili dal 2012, hanno aumentato la richiesta di un approccio sistemico basato sull'analisi dei pericoli e relativa valutazione dei rischi con conseguenti azioni di gestione preventive e di controllo continuo.

USO DI FARINE CONTAMINATE A FINI ENERGETICI (BIOGAS): RISULTATI DI TEST IN CONTINUO IN IMPIANTO PILOTA

Rossi L. (a), Soldano M. (a), Piccinini S. (a), Pietri A. (b)

(a) CRPA, Centro Ricerche Produzioni Animali, Reggio Emilia

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

Nell'ambito di un progetto di ricerca finanziato dalla Regione Emilia-Romagna ai sensi della L.R. 28/98 e successive modifiche e cofinanziato dal CIB, con l'ausilio dell'impianto sperimentale di digestione anaerobica in continuo di cui è dotato CRPA LAB, sono state poste a confronto 3 miscele di matrici agro-zootecniche di seguito indicate:

1. liquame bovino + silomais + farina mais esente (testimone);
2. liquame bovino + silomais + farina mais AFLA 1 (AFB1: 60-70 µg/kg);
3. liquame bovino + silomais + farina mais AFLA 2 (AFB1: 250-320 µg/kg).

I rapporti di miscelazione sono stati pari a liquame:silomais:farina=45:45:10 in termini di peso tal quale; in termini di apporto di solidi volatili il rapporto è stato il seguente: liquame:silomais:farina=10:59:31. Le tre tesi sono state ripetute tre volte ciascuna. Il processo è stato condotto in condizioni mesofile ($39 \pm 0,4$ °C), con un carico organico volumetrico (COV) pari a 3,8-4,0 kg SV/giorno per m³ di reattore; il tempo di ritenzione idraulica (HRT) è stato pari a circa 45-50 giorni. È stato monitorato l'andamento nel tempo del processo biologico e sono state verificate le rese specifiche in biogas e in metano delle diverse biomasse per oltre 8 settimane. La producibilità in metano è stata regolare ed ha raggiunto valori attesi per quella tipologia di matrici. Oltre ai parametri funzionali alla gestione del processo biologico, il piano di monitoraggio ha previsto la determinazione di aflatossine (AFB1+AFB2) e fumonisine su ripetuti campioni di matrici in ingresso (15 campioni); il contenuto di micotossine è stato poi determinato sul digestato in uscita da ciascuna tesi con frequenza settimanale per almeno 7 settimane (per un totale di oltre 60 campioni). Sulla base dei dati quali-quantitativi disponibili è stato possibile eseguire il bilancio di massa, seguire il potenziale accumulo di aflatossine nel tempo e confrontare la concentrazione attesa di aflatossine e quella effettivamente misurata nei digestati. I risultati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica (procedura "ANOVA - misure ripetute-p=0,5%) e il quadro emerso è il seguente. Le farine contaminate non hanno influito negativamente sulla resa in biogas. All'interno di ciascuna delle 3 tesi la concentrazione di aflatossine nei digestati dalla 6° settimana in poi non presenta differenze significative; nelle settimane 6, 7 e 8, il comportamento delle 3 tesi è analogo. Nelle settimane 6, 7 e 8 le concentrazioni di aflatossine misurate sono inferiori a quelle attese e le differenze non sono significative nella tesi testimone e in quella AFLA 1; nello stesso arco temporale le concentrazioni misurate sono inferiori a quelle attese e le differenze sono significative nella tesi AFLA 2. In quest'ultima tesi dal bilancio di massa complessivo è risultato un abbattimento delle aflatossine dell'ordine del 55-65%.

PREVENZIONE E DEGRADAZIONE DELLA AFLATOSSINA B1 IN MANGIMI A BASE DI MAIS

Scarpari M. (a), Angelucci A. (b), Bello C. (b), Pietricola C. (a), Biancardi A. (b), Dall'Asta C. (c), Bertocchi L. (b), Reverberi M. (a), Fanelli C. (a)

(a) Dipartimento di Biologia Ambientale, Sapienza Università di Roma, Roma

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

(c) Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Parma

MycoRed è un progetto di Ricerca finanziato nell'ambito del 7° Programma Quadro dell'Unione Europea finalizzato allo sviluppo di metodologie innovative per la riduzione del contenuto di micotossine più pericolose lungo le filiere alimentari e mangimistiche di maggiore rilievo economico. Il progetto, avviato nel 2009, ha una durata di 4 anni e vede la partecipazione diretta di numerosi prestigiosi Istituti di Ricerca, particolarmente attivi nel settore, che qui consolidano un percorso di ricerca affermato a livello europeo, garantendo continuità ai programmi di ricerca precedentemente avviati sulle micotossine in ambito comunitario. Uno dei principali punti di forza del progetto è costituito dalla visione e dall'approccio globale che ne caratterizzano sia le attività che i soggetti coinvolti. Vengono studiate le problematiche principali ed emergenti relative a micotossine in quelle filiere alimentari maggiormente esposte: aflatossine in mais e frutta secca, fumonisine in mais e frumento, ocratossina A in frumento e uva, tricoteceni e zearalenone nel frumento. Grazie ad un approccio basato sull'integrazione multidisciplinare di *know-how* e tecnologia, tali problematiche sono affrontate considerando aspetti e fattori spesso analizzati singolarmente. Per quanto riguarda la dimensione del progetto, i 25 partner, collaborano attivamente in diverse aree del mondo, alimentando anche una rete di esperti di altrettanto rilievo, che danno il proprio contributo in termini di co-organizzazione di eventi, supporto scientifico, confronti ed esperienze formative, favorendo un clima di costruzione congiunta e collettiva di nuove aggregazioni locali ma di respiro mondiale. Il progetto punta inoltre alla diffusione dei risultati e alla formazione specialistica a livello globale, rafforzando anche la dimensione della cooperazione con alcuni Paesi in via di sviluppo che maggiormente soffrono gli effetti negativi della contaminazione degli alimenti da micotossine sulla salute umana ed animale e sull'esportazione dei loro prodotti. Infine il diretto coinvolgimento di Paesi non UE, quali Argentina, Egitto, Russia, Sud Africa, Nigeria, di organizzazioni internazionali (CIMMYT, IITA) ed associazioni di settore (ISM, NASMN, MPU, JSM, SLAM), oltre che gli accordi formalizzati tra MycoRed ed esperti/istituzioni, attraverso 18 alleanze scientifiche intercontinentali, sta determinando di fatto il consolidamento di forti legami di cooperazione scientifica a livello mondiale. Da questo impegno congiunto dei diversi partecipanti si stanno ottenendo risultati che verranno presentati al Congresso e che possono avere diretto impatto e benefici nei confronti di diverse tipologie di utenti a vario titolo interessati alle micotossine.

REGOLAMENTI E METODI PER LA VALUTAZIONE DI EFFICACIA DEGLI ADDITIVI DI MANGIMI PER LA RIDUZIONE DELLA CONTAMINAZIONE DA MICOTOSSINE

Avantaggiato G.

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

Le micotossine sono delle sostanze naturali molto diffuse negli alimenti. Le conoscenze sia sulla loro struttura chimico fisica che sulle loro caratteristiche biologiche sono sufficientemente avanzate per quelle ritenute più pericolose, quali ad esempio le Aflatossine e l'ocratossina A. Per altre invece le informazioni sono ancora parziali ed è difficile fare una corretta valutazione dei rischi. Comunque il mondo della ricerca è fortemente impegnato nello specifico anche perché esiste la possibilità di individuare nuove molecole potenzialmente utili. Il consumatore più evoluto ha una discreta conoscenza delle micotossine per le quali la legislazione ha definito dei limiti di tolleranza, ma la maggioranza dei cittadini viene a conoscenza del problema soltanto quando i media portano alla ribalta la scoperta di casi di alimenti fortemente contaminati con qualcuna delle micotossine più pericolose. Bisogna evidenziare che sono scarsamente diffuse le nozioni sulle modalità di contaminazione degli alimenti con micotossine e, per alcuni prodotti, come ad esempio le arachidi ed i pistacchi non si fa molta attenzione al fatto che presentino i segni di ammuffimento o meno. La carenza di informazioni adeguate sui pericoli delle micotossine porta spesso ad avere molta fiducia nelle produzioni "naturali" anche se presentano segni di deterioramento. Ovviamente i consumatori hanno scarse possibilità di verificare lo stato di "contaminazione" dei prodotti alimentari trasformati, come quelli da forno. Infatti il problema nasce dalla contaminazione delle materie prime vegetali il cui controllo in alcune produzioni alimentari, soprattutto artigianali, potrebbe essere poco accurato. È necessario intensificare gli sforzi per trasferire ai consumatori le informazioni scientifiche disponibili in merito ai pericoli correlati alle micotossine e, soprattutto, alle misure da intraprendere per prevenirli.

LA FILIERA DEL FRUMENTO DURO E TENERO: FOCUS SU CRITICITÀ E SOLUZIONI

Monti M.

ANTIM, Associazione Nazionale Tecnici Industria Molitoria, Roma

Dopo due annate cerealicole da semaforo verde per il rischio don, tutte le previsioni di quest'anno facevano pensare a un rischio maggiore, visto le forti piogge che hanno accompagnato la fioritura del frumento soprattutto negli areali del Nord Italia. L'annata granaria 2015 può essere considerata da semaforo arancione con Don pressoché assente nel frumento tenero e duro fino alle Marche mentre il grano del nord ha registrato un numero notevole di campioni positivi alla tossina ma su valori bassi e quindi gestibili senza grosse difficoltà. L'aumento del rischio don andrà affrontato con un numero maggiore di analisi specifiche effettuate in autocontrollo e con una ferrea verifica su tutto il grano in arrivo al molino prima di autorizzare lo scarico. L'alto peso ettolitrico medio del grano del nuovo raccolto facilita molto il riconoscimento delle partite a rischio e l'occhio esperto del mugnaio riconosce le cariossidi attaccate da *fusarium*. Altra misura precauzionale adottata dai molini sarà una attenzione costante agli impianti di pulitura, capaci di abbattere il problema dal 30 al 60%, in particolare agli impianti filtranti per avere il massimo di aria in aspirazione capace di eliminare i chicchi leggeri dalla tarare e una regolazione più intensa delle selezionatrici ottiche per eliminare i chicchi fusariati residui. In annate dove gli arrivi di frumento positivi alla tossina sono elevati il rischio Don non può essere considerato basso anche se i valori medi rilevati sono inferiori ai 500 ppb. Le criticità si hanno soprattutto nei rapporti con i fornitori di frumento perché la normativa vigente prevede un valore massimo di 1.250 ppb sul frumento tenero valutando il parametro sul grano pulito ma un valore così elevato non consente di fornire tutte le farine assolutamente al di sotto dei 750 ppb (impossibile con le farine integrali) e molte importanti industrie di trasformazione finale delle farine richiedono ai mugnai valori massimi nei capitolati non superiori ai 500 ppb difficilmente ottenibili ritirando grano con valori della tossina ai massimi di legge. Per non avere problemi occorre dotarsi di proprie soglie massime di accettazione del frumento per quanto riguarda il contenuto in don respingendo la merce che arriva con valori superiori anche se questa è conforme alle normative. La cosa potrebbe causare discussioni anche aspre con i fornitori di frumento ma è condizione necessaria per consegnare farine ai massimi livelli igienico sanitari anche con il frumento del nuovo raccolto 2015.

VIDEO SULLE MICOTOSSINE

Baccarini G.

Rotary Club Ravenna, Ravenna

La possibilità di contribuire a mantenere una buona salute tramite una dieta adeguata ha recentemente focalizzato l'interesse per le piante alimentari, per quanto riguarda la qualità nutrizionale. Il germoplasma italiano di mais, uno dei più ricchi in Europa per numero di popolazioni ed ecotipi, è un materiale di partenza interessante per l'identificazione di genotipi con buone caratteristiche nutrizionali e con elevata salubrità. Una delle principali minacce per la sanità della cariosside di mais è la presenza di patogeni fungini in grado di produrre micotossine. Gli scopi della ricerca in atto sono: i) individuazione di nuove fonti di variabilità genetica utili in programmi di *breeding* per resistenza a patogeni e caratteristiche chimiche e tecnologiche della granella; ii) identificazione di geni candidati coinvolti in meccanismi di difesa. Nel 2009 e 2010 è stata realizzata un'indagine per individuare resistenza/suscettibilità a *Fusarium verticillioides* (agente causale del marciume della spiga, produttore di fumonisine, ampiamente diffuso nel Sud Europa) su 39 linee *inbred* italiane e su 6 linee pubbliche, mediante: i) inoculo artificiale in campo (tecnica KIA -*Kernel Inoculation Assay*), ii) valutazione visiva estensione del micelio sulla spiga (numero di cariossidi con micelio visibile al punto di inoculo), iii) valutazione contaminazione interna della cariosside (su terreno selettivo DRBC), iv) valutazione contenuto di fumonisine (dosaggio immunoenzimatico test ELISA). Come controlli, sono state considerate spighe inoculate con acqua sterile e non inoculate. In aggiunta alla valutazione fito-patologica, sugli stessi genotipi, sono stati raccolti dati relativi a parametri morfo-fisiologici della pianta (*score pianta*). I campioni di seme sono stati sottoposti ad analisi di riflettanza nel vicino infrarosso (NIR) per determinare la composizione chimica della granella. Durante entrambe le annate, per la maggior parte delle linee è stata osservata bassa suscettibilità all'attacco di *F. verticillioides* dopo inoculo artificiale, in termini di estensione del micelio visibile; mentre circa il 15% dei genotipi testati ha mostrato contenuto di fumonisine superiore a 100 mg/kg, dopo inoculo artificiale. Nel corso di questa ricerca sono state identificate alcune linee in cui si combinavano un buon valore di *score pianta* con ridotta suscettibilità all'infezione fungina. Questi genotipi rappresentano un punto di partenza per lo sviluppo di nuove linee di mais. Un'analisi di espressione genica mediante ibridazione con *microarray* (GeneChip, Affymetrix), è stata condotta paragonando profili di espressione di cariossidi di una linea suscettibile, 7 giorni dopo l'inoculo, rispettivamente con acqua sterile e con *F. verticillioides*. Il confronto ha permesso di identificare numerosi geni che presentano *pattern* di espressione differenziale nei due trattamenti, classificati principalmente nelle categorie funzionali GO associate a processi di sviluppo anatomico, alcuni associati a stress biotico e caratterizzati da una sovraespressione in seguito ad attacco fungino.

La ricerca si è svolta nell'ambito dei progetti di ricerca: RGV-FAO; ALISAL e MICOPRINCEM, finanziati dal Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali (Mipaaf).

CRITERI DI ATTIVAZIONE DEL PIANO NAZIONALE DI CONTROLLO UFFICIALE DELLE MICOTOSSINE NEI PRODOTTI ALIMENTARI

Brera C. (a), Debegnach F. (a), De Santis B. (a), Califano G. (b), Paduano S. (b), Ruocco G. (b)

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

(b) Direzione Generale per l'Igiene e la Sicurezza degli Alimenti e la Nutrizione, Ministero della Salute, Roma

Al fine di organizzare un sistema di controllo ufficiale sul territorio, armonizzato ed efficace, e garantire la sicurezza dei prodotti alimentari, il Ministero della Salute con il supporto e collaborazione dell'LNR (laboratorio Nazionale di Riferimento) per le micotossine presso l'Istituto Superiore di Sanità, degli uffici competenti della Direzione generale per l'igiene e la sicurezza degli alimenti e la nutrizione, ha iniziato l'*iter* per la definizione del Piano Nazionale di Controllo Ufficiale delle Micotossine nei prodotti Alimentari (PNCMA) che vedrà coinvolti le Autorità regionali e delle Province autonome e altri uffici del Ministero. Tale piano prevede, per la raccolta dei dati derivanti dalle attività di controllo, l'utilizzo del sistema informatico NSIS (Nuovo Sistema Informativo Sanitario) già operativo presso il Ministero. L'approvazione del piano da parte del Coordinamento interregionale, come da parte di diversi uffici del Ministero, rispettivamente per le parti di competenza, consentirà la successiva adozione a livello nazionale. Tale piano di controllo costituirà parte integrante del PNI (Piano Nazionale Integrato) di cui all'articolo 41 del regolamento CE n. 882/2004. L'obiettivo del piano è quello di fornire alle Autorità regionali e delle Province autonome indicazioni sul controllo ufficiale delle micotossine nei prodotti alimentari basate sull'analisi dei rischi ed ha, altresì, lo scopo di programmare e coordinare le attività volte sia alla verifica della conformità alla normativa, sia alla valutazione dell'esposizione del consumatore. Il controllo ufficiale sarà focalizzato sull'attività di campionamento destinata a specifiche fasi di produzione/trasformazione/distribuzione nonché di specifici prodotti alimentari. Il presente piano fornirà, inoltre, orientamenti per le attività di campionamento effettuate presso gli USMAF nell'ambito del controllo all'importazione dei prodotti alimentari. I risultati delle attività di controllo sul territorio, validati dalle Autorità regionali e delle Province Autonome, saranno raccolti ed elaborati dal Ministero con il supporto dell'Istituto Superiore di Sanità. Tale elaborazione consentirà di verificare il sistema di gestione dei rischi sull'intero territorio nazionale, e quindi di rivalutare i rischi ai fini di una nuova pianificazione. Nella rivalutazione, annuale, si terrà altresì conto di modifiche legislative, di rischi emergenti, delle risultanze dei controlli sul territorio e all'importazione, degli allerta UE. Il piano, inoltre, permetterà la trasmissione all'EFSA (Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare) dei dati relativi al campionamento e all'analisi, attraverso il sistema NSIS, consentendo all'Italia di assolvere il debito informativo, di cui al Regolamento CE n.1881/2006 e al paragrafo 3 dell'articolo 23 del regolamento CE n. 178/2002, nei confronti di tale Autorità e della Commissione UE.

MICOTOSSINE NUOVE ED EMERGENTI NEL MAIS: DIFFUSIONE ED INFLUENZA DELL'AGROTECNICA

Scarpino V. (a), Blandino M. (a), Reyneri A. (a), Testa G. (a), Sulyok M. (b)

(a) Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi, Torino

(b) Center for Analytical Chemistry, Department for Agrobiotechnology, Tulln, Austria

AIDEPI è il primo polo associativo cerealicolo-dolciario per numero di iscritti, che riunisce grandi marchi internazionali così come piccole e medie imprese del settore alimentare. L'AIDEPI è dotata di una struttura funzionale dedicata, in grado di assicurare alle aziende associate un puntuale servizio di informazione e consulenza in tutte le aree tematiche di interesse dell'industria dolciaria e pastaia. Accrescere la cultura della qualità e della sicurezza dei prodotti è da sempre uno dei principali obiettivi dell'Associazione. In tema di sicurezza alimentare l'AIDEPI sensibilizza le proprie aziende attraverso vari strumenti tra cui il monitoraggio e la tempestiva informazione sull'evoluzione normativa nazionale, comunitaria ed internazionale, le pubblicazioni tematiche, i workshop, la preparazione di Codici di autoregolamentazione, Linee guida e Manuali. Finora circa 20 pubblicazioni, tra cui manuali e linee guida, sono stati sviluppati dall'AIDEPI su vari temi: l'HACCP, la rintracciabilità, i materiali a contatto con gli alimenti e la sicurezza dei giocattoli. L'introduzione negli anni '90 del principio dell'autocontrollo nella legislazione alimentare ha rappresentato un importante aspetto di innovazione: da un lato, perché responsabilizza maggiormente l'operatore; dall'altro, perché presuppone una costante collaborazione tra le imprese e l'Autorità pubblica di controllo. Tra i primi comparti nel panorama alimentare italiano, l'AIDEPI ha ricevuto, in data 15 settembre 1998, la validazione da parte del Ministero della Salute della "Guida di corretta prassi igienica e HACCP dei prodotti dolciari" finalizzata a fornire alle aziende produttrici uno strumento metodologico di autocontrollo, da adattare alle singole realtà aziendali, in grado di soddisfare correttamente le esigenze stabilite dalla normativa comunitaria e dalle leggi nazionali, per la fabbricazione di prodotti "igienicamente sicuri". L'Associazione ha sempre sostenuto nel corso degli anni un rapporto di cooperazione costante con le Amministrazioni Sanitarie attraverso la condivisione dei dati, delle conoscenze e delle criticità. Recentemente AIDEPI ha collaborato con Istituto Superiore di Sanità allo sviluppo di due progetti di ricerca sulle micotossine finalizzati alla valutazione dell'esposizione della popolazione italiana all'ocratossina A da prodotti di cacao e cioccolato e al deossinivalenolo da paste alimentari. I lavori, riscontrando livelli di contaminazione molto bassi sul mercato italiano, sono stati essenziali per la corretta gestione del rischio percepito. Sulla base dell'esperienza acquisita l'AIDEPI auspica che, nell'ambito del lavoro di costante revisione della legislazione alimentare, vi sia la massima coerenza tra i limiti massimi riferiti alla materia prima e ai prodotti finiti.

MICOTOSSINE E MERCATO DEI CEREALI: EFFETTI ECONOMICI E PRATICHE CONTRATTUALI

Villani A. (a), Baccharini G. (b)

(a) *AGER, Borsa Merci Bologna, Bologna*

(b) *Consorzio Quadra, Bologna*

Sia la normativa vigente che i contratti commerciali prevedono il rispetto di limiti per la contaminazione delle principali micotossine. La maggior parte dei controlli sulle produzioni cerealicole italiane riguardano la valutazione della contaminazione da deossinivalenolo sul grano duro, per uso alimentare, e di aflatossina B₁ su granturco, per uso mangimistico. Lo stoccatore/essiccatore, cerniera fra la produzione primaria e l'industria di trasformazione, deve garantire all'anello successivo della filiera la conformità dei prodotti consegnati, anche ai requisiti igienico-sanitari. Nell'applicazione dell'Autocontrollo diventa pertanto necessario predisporre piani di campionamento e di analisi per la verifica del livello di contaminazione nel prodotto consegnato dall'azienda agricola e nel prodotto durante le fasi di stoccaggio temporaneo, essiccazione e conservazione. Il lavoro presenta i dati derivanti dai piani dell'autocontrollo attuati da due fra le principali realtà della regione Emilia-Romagna, operanti nelle province di Bologna, Modena, Ferrara e Ravenna nelle campagne agrarie 2010 e 2011. Le produzioni controllate dalle aziende sono messe in relazione con le produzioni provinciali, regionali e nazionali, per poter valutare, a livello locale, l'impatto dell'autocontrollo effettuato. Vengono infine documentate le attrezzature e le metodiche utilizzate per l'effettuazione delle analisi.

DETERMINAZIONE DI AFLATOSSINA M₁ NEL FORMAGGIO. VALUTAZIONE DEL FATTORE DI CONCENTRAZIONE IN PECORINO AL LATTE CRUDO NATURALMENTE CONTAMINATO

Pecorelli I., Bibi R., Ciriaci M., Diamanti I., Spaccini G., Valiani A.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

È noto che le micotossine sono metaboliti stabili e tendono ad accumularsi nel tempo, sia *in planta* che nell'organismo di soggetti esposti. Negli studi relativi alla dinamica di accumulo di fumonisine in mais sono stati rilevati quantitativi differenti in diversi ibridi, anni e località. Questo fenomeno potrebbe essere dovuto ad un effetto di mascheramento influenzato da diverse variabili, incluse quelle sopra citate. Per questo studio sono state individuate coltivazioni di mais con presenza di diversi ibridi (10) in diverse aree geografiche (4 province dell'Emilia-Romagna e 1 della Lombardia). In questi campi di mais sono state raccolte spighe durante tutta la stagione colturale, a partire da inizio maturazione cerosa, fase in cui le fumonisine iniziano ad essere rilevate nelle cariossidi. Le spighe sono state sgranate e la granella così ottenuta è stata utilizzata per la quantificazione dei funghi presenti (con particolare attenzione per il Genere *Fusarium*), per le analisi relative al contenuto di fumonisine in forma palese o nascosta e per le analisi di lipidomica. I risultati ottenuti hanno mostrato che una maggiore presenza di funghi del Genere *Fusarium* corrisponde ad una maggiore presenza di fumonisine sia in forma libera che in forma nascosta ma vi sono differenze per quanto riguarda l'andamento sia dei funghi in termini di incidenza di infezione e di unità formanti colonia sia della quantità delle fumonisine rilevate durante la stagione colturale, con un ruolo svolto dagli ibridi e dalle zone di coltivazione. In relazione a questo andamento, l'approccio lipidomico ha consentito di mettere in evidenza le diverse specie lipidiche che si formano durante le diverse fasi fenologiche nei diversi ibridi di mais e suggerisce l'esistenza di una correlazione tra il profilo ossilipinico (acidi grassi insaturi ossidati) espresso dall'ibrido, il grado di contaminazione fungina e la quantità di fumonisine.

VALUTAZIONE E GESTIONE DEL RISCHIO DA MICOTOSSINE: IL PUNTO DI VISTA DI UNA AZIENDA LEADER

Silvestri M.

*Ricerca Agronomica, Group Research, Development and Quality, Barilla G. e R. Fratelli
Società per Azioni, Parma*

Barilla è l'azienda leader mondiale nel mercato della pasta e utilizza per le sue produzioni ogni anno oltre 1,4 milioni di tonnellate di grano duro equivalenti, di cui circa l'80% è macinato direttamente nei mulini di proprietà. Il grano duro, con una produzione media mondiale di circa 30 milioni di tonnellate all'anno, rispetto ai 600 milioni del grano tenero, costituisce, nel panorama cerealicolo mondiale, una coltura minore. La coltivazione è inoltre concentrata in un numero limitato di areali nel mondo, spesso caratterizzati da un clima secco e scarsa disponibilità di acqua e pertanto potenzialmente soggetta a fluttuazioni sia di quantità che di qualità disponibile. Produzione e qualità della granella sono inoltre influenzate dallo sviluppo di patologie tra cui la fusariosi della spiga, causata da funghi del genere *Fusarium*, che sono responsabili non solo di perdite di produzione ma anche della potenziale contaminazione della granella da micotossine. Tra queste, la più rilevante, pur se tra le meno tossiche, nel caso del grano duro è sicuramente il Deossinivalenolo (DON). Si tratta di una patologia dei cereali piuttosto complessa e di difficile controllo in campo sul cui sviluppo intervengono diversi fattori agronomici ma soprattutto climatici. Per questo motivo Barilla, ha sviluppato un approccio integrato alla sicurezza alimentare che si basa su: "Prevenzione", "Monitoraggio" e "Gestione" dei rischi. In particolare per quanto riguarda la potenziale presenza di DON, questo approccio si concretizza in una strategia di valutazione del rischio, controllo e gestione preventiva dei lotti di grano. Un modello matematico, basato su dati meteorologici e agronomici, permette di stimare il rischio di sviluppo della fusariosi e del DON prima del raccolto a partire dalla fase di spigatura del grano. Le aree di coltivazione del grano duro vengono quindi classificate e sottoposte, se necessario, a uno *screening* analitico di verifica. Vengono quindi sviluppati in funzione del rischio di presenza di DON, piani di campionamento specifici per ciascuna area di approvvigionamento. In particolare per le aree ad alto rischio ogni lotto di grano viene campionato e analizzato seguendo i criteri ufficiali prima dell'acquisto. Un sistema informatico online, consente infine di garantire un costante aggiornamento a tutti gli operatori coinvolti per poter gestire in modo ottimale gli acquisti e il ricevimento dei soli lotti conformi. Il *breeding* di varietà più tolleranti, lo studio dell'effetto dei processi di trasformazione e della diffusione del DON e delle micotossine emergenti nelle diverse aree produttive, così come il continuo lavoro sui metodi analitici completano l'approccio integrato di Barilla non solo alle micotossine ma alla sicurezza alimentare nel suo complesso.

RISULTATI DEL PROGETTO EFSA: SURVEY ON STERIGMATOCYSTIN IN FOOD

Pietri A., Rastelli S., Mulazzi A., Bertuzzi T.

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

Il progetto europeo triennale (2007-2009) *Agronomical and technological methods to improve organic wheat quality* (AGTEC-Org), finanziato dal CORE - *Organic Funding Body* nell'ambito dell'ERA *Network*, si proponeva di identificare metodi agronomici e tecnologici per migliorare la quantità e la qualità della produzione di frumento tenero biologico coltivato in Europa. Il progetto ha visto la partecipazione di 9 tra centri di ricerca e università europei, e la ragguardevole mole di risultati è in corso di disseminazione attraverso i canali più appropriati. In particolare, in questo lavoro viene presentato l'effetto di due trattamenti preliminari alla macinazione (la decorticazione e l'ozonizzazione con Oxygreen®) e di due tecniche di macinazione (a pietra o a cilindri) sulla contaminazione da deossinivalenolo della granella di frumento tenero biologico. Gli oltre 400 campioni di granella erano costituiti da 11 cvs. coltivate secondo oltre 150 schemi di coltivazione in Austria, Francia, Danimarca e Svizzera. I campioni presentavano generalmente bassi livelli di deossinivalenolo (da 2 a 697 µg/kg, con più del 75% dei campioni sotto i 200 µg/kg), ampiamente variabili in base al clima e alle condizioni agronomiche, ma comunque inferiori ai limiti fissati dalle leggi europee (750 µg/kg). I trattamenti della granella successivi al raccolto e la tecnica di macinazione, sperimentati su 3 diversi campioni, hanno prodotto notevoli cambiamenti sui livelli di deossinivalenolo nella farina. I pretrattamenti di decorticazione e di ozonizzazione (Oxygreen) si sono infatti dimostrati molto efficienti nel ridurre i livelli di deossinivalenolo nella farina, indipendentemente dal tipo di macinazione e dal tasso di estrazione della farina stessa. L'efficienza di tali trattamenti dovrebbe essere comunque verificata su campioni con livelli di DON più elevati, nei quali il *Fusarium* potrebbe essere penetrato nell'endosperma. Farine ottenute con macinazione a cilindri avevano sempre livelli di DON più bassi rispetto a farine ottenute con macinazione a pietra, specialmente quando il tasso di estrazione era inferiore al 75%. Nella farina macinata a pietra, il tasso di estrazione era invece praticamente ininfluenza sui livelli di DON.

MAIS: MONITORAGGIO MICOTOSSINE IN ITALIA DAL 2006 AL 2014

Locatelli S., Lanza C., Facchinetti F., Mascheroni S., Balconi C.

Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria, Bergamo

La rilevanza della problematica connessa alla contaminazione da micotossine in alimenti e mangimi, essenzialmente determinata dalla loro tossicità e frequenza di ritrovamento, ha indotto negli ultimi anni un crescente impiego di tecnologie innovative finalizzate al miglioramento della fase di determinazione analitica. L'evoluzione tecnologica si applica a più livelli e con diverse modalità su un elevato numero di metodi analitici per la determinazione di micotossine, a partire dai metodi basati sulla cromatografia liquida ad elevate prestazioni (HPLC), ai più recenti metodi in cui la cromatografia liquida è combinata alla spettrometria di massa (LC-MS), fino ai metodi rapidi basati principalmente su tecniche immunochimiche. Negli ultimi anni sono stati sviluppati nuovi metodi cromatografici grazie alla disponibilità di sistemi meno costosi e ad ultra-elevate prestazioni (UHPLC) che consentono una notevole riduzione dei tempi di analisi. Lo sviluppo di diversi metodi LC-MS, a singolo stadio o multistadio, ha consentito la determinazione simultanea di micotossine, anche con caratteristiche chimico-fisiche molto diverse, in svariate tipologie di matrici. Recentemente spettrometri di massa sempre più sensibili e ad alta risoluzione (HRMS), con elevata accuratezza di massa, consentono l'analisi diretta degli estratti di matrici alimentari o di fluidi biologici senza necessità di una fase preliminare di purificazione. I metodi LC-HRMS offrono inoltre prestazioni uniche per l'identificazione e la determinazione delle forme coniugate delle micotossine, siano esse mascherate o nascoste, che possono contribuire alla tossicità globale dell'alimento e per le quali è ad oggi disponibile uno scarso numero di dati di incidenza. Sono stati sviluppati numerosi metodi rapidi per la determinazione di micotossine in un'ampia varietà di formati basati su nuove tecnologie, quali l'immunocromatografia (*dipsticks e lateral flow device*), la Polarizzazione di Fluorescenza (FP), i biosensori ottici o elettrochimici, la spettroscopia infrarossa, ed i metodi che usano recettori alternativi come i polimeri sintetici (*Molecularly Imprinted Polymers*, MIPs) o gli aptameri. Sarà presentata una panoramica dei principali metodi innovativi sviluppati negli ultimi anni per l'analisi di micotossine, con particolare attenzione alle metodologie sviluppate presso l'ISPA-CNR di Bari, tra cui: un metodo UHPLC per la determinazione delle tossine T-2 e HT-2 in cereali; metodi LC-MS/MS o LC-HRMS per la determinazione di micotossine libere e coniugate in cereali e prodotti derivati; un immunosaggio basato sulla Polarizzazione di Fluorescenza per la determinazione delle tossine T-2 e HT-2 in frumento e avena; un metodo basato sulla spettroscopia infrarossa in Trasformata di Fourier per la determinazione di deossinivalenolo in frumento; un *dipstick* per la determinazione simultanea di tossine di *Fusarium* in cereali e prodotti derivati. Saranno inoltre riportati i vantaggi, limitazioni e prospettive future delle metodologie presentate.

EU POLICY ON MYCOTOXINS IN FEED AND FOOD: RECENT DEVELOPMENTS AND OUTLOOK

Verstraete F.

European Commission, DG for Health and Food Safety Brussels, Belgio

Directive 2002/32/EC of 7 May 2002 of the European Parliament and of the Council on undesirable substances in animal feed is the framework for the European Union action on undesirable substances in feed. Council Regulation (EEC) No 315/93 of 8 February 1993 laying down community procedures for contaminants in food (OJ L37, 13.2.1993, p. 1) is the framework for the Union action on mycotoxins in food. Following requests of the European Commission, the Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) from the European Food Safety Authority (EFSA) has completed in recent years several scientific opinions on mycotoxins in feed and food, reviewing the possible risks for animal and human health due to the presence of these substances in feed and food. The outcome of these risk assessments has resulted in several changes to the EU legislation on mycotoxins in feed and food. An overview of the recent changes with information on the considerations resulting in these legal provisions will be provided in the presentation. In recent years, an increased prevalence and a significant year-to-year variation of the presence of mycotoxins in feed and food in the European region can be observed. Climate change and extreme weather conditions are considered to be the main cause. The high levels of aflatoxin in the maize harvest 2012 and the high level of *Fusarium* toxins in the maize harvest 2013 and 2014 have resulted in problems for feed and food supply and safety. This situation entails specific challenges for farmers, feed and food manufacturers, traders and regulators to ensure the safety for animal and human health of feed and food while ensuring the supply of major staple feed and food such as cereals. This issue was intensively discussed in recent years and the presentation shall provide more details on these discussions and explore some possible options on the way forward.

LA PERCEZIONE DEL PROBLEMA DELLE MICOTOSSINE DA PARTE DEI CITTADINI

Macri A., Bernardi M.

Unione Nazionale Consumatori, Roma

Le micotossine negli alimenti rappresentano un serio problema di carattere sanitario ed economico. Grazie alla ricerca scientifica che prosegue silenziosamente da molti decenni, è stato possibile identificare un gran numero di queste sostanze naturali prodotte dal metabolismo dei miceti. Alcune sono molto pericolose e la loro presenza come contaminanti degli alimenti deve essere esclusa o comunque contenuta entro limiti di sicurezza. In molti casi è stato possibile conoscere i meccanismi di azione tossica; sono stati anche sviluppati metodi di analisi molto sofisticati che consentono di controllare in modo adeguato gli alimenti in modo da evitare che quelli contaminati con livelli pericolosi siano destinati alla alimentazione. Molti aspetti legati alla sicurezza delle micotossine non sono stati ancora interamente chiariti e per questo motivo si usa un approccio molto prudentiale che porta spesso al divieto di utilizzazione alimentare dei prodotti contaminati. Esiste comunque una legislazione comunitaria e nazionale il cui rispetto garantisce l'assenza di rischi per i cittadini. Si tratta di una legislazione che copre l'intera filiera produttiva, dal campo alla tavola, e riguarda anche la sicurezza dei mangimi utilizzati per gli animali produttori di alimenti per l'uomo. La legislazione però non copre la sicurezza degli alimenti nella fase della loro gestione "domestica". Infatti, l'acquisto degli alimenti dai mercati "legali" deve garantire che essi siano esenti da pericoli. Non sempre però i cittadini sono correttamente informati dei pericoli che possono correre consumando degli alimenti da loro mal conservati e magari ammuffiti. Su questo punto occorre intensificare gli sforzi di una corretta informazione che dovrebbe essere semplice ma efficace. L'UNC in collaborazione con gli esperti del settore ha elaborato un sintetico decalogo sui comportamenti da seguire nella gestione degli alimenti a livello domestico.

EU-RL ROLE IN MONITORING ACTIVITY ON MYCOTOXINS

Breidbach A.

European Commission, Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgium

Regulation (EC) 882/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 defines reference laboratories on community and member state level. In this presentation I will show which activities the European Reference Laboratory for Mycotoxins, hosted by IRMM, performs to satisfy the requirements of 882/2004.

IL RUOLO DEL LABORATORIO NAZIONALE DI RIFERIMENTO NELLE ATTIVITÀ DI CONTROLLO DELLE MICOTOSSINE

De Santis B., Debegnach F., Gregori E., Moracci G., Brera C.

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

Il Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare (DSPVSA) (ex Centro Nazionale per la Qualità e per i Rischi Alimentari) è stato designato, nel 2007, Laboratorio Nazionale di Riferimento per le Micotossine (LNR-Micotossine) dal Ministero della Salute in ottemperanza all'art. 33 del Regolamento CE/882/2004. L'LNR-Micotossine opera principalmente con la finalità di formare ed informare le strutture laboratoristiche che operano sul territorio nazionale relativamente alle attività di controllo ufficiale effettuate sugli alimenti e sui mangimi per il controllo delle micotossine. È inoltre compito dell'LNR-Micotossine lo sviluppo e la validazione di metodi di analisi e l'espletamento di attività legate alla valutazione del rischio da micotossine derivante dal consumo di alimenti e mangimi. L'LNR-Micotossine collabora con l'EU-RL Mycotoxin (European Union Reference Laboratory, JRC-Geel) e con gli LNR degli altri Stati Membri Europei partecipando alle riunioni plenarie che il Laboratorio Comunitario di Riferimento organizza periodicamente. L'LNR-Micotossine svolge la propria attività nei settori di seguito elencati.

Accreditamento. Al fine di fornire prestazioni e risultati di laboratorio qualificati e riconosciuti in ambito nazionale e internazionale, l'LNR-Micotossine opera in base allo sviluppo di una politica della qualità conforme alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025, ed è accreditato con il n. 0779 da parte dell'Ente Italiano di Accreditamento (ACCREDIA). A tal fine, tra l'altro, il Laboratorio partecipa regolarmente a programmi nazionali ed europei di *Proficiency Testing*.

Standardizzazione metodiche e studi interlaboratorio. Nell'ambito dello sviluppo di attività finalizzate alla diffusione di strumenti diagnostici utili ai fini del controllo ufficiale, l'LNR Micotossine ha organizzato nel 2013 uno studio di validazione interlaboratorio per la determinazione delle tossine T2 e HT2 in campioni di cereali utilizzando metodi di *screening* mediante ELISA. Nel 2014 è stato invece lanciato uno studio interlaboratorio finalizzato alla determinazione delle Tossine T2 ed HT2 in campioni cerealicoli e della aflatossina M1 nel latte in polvere. Attualmente, è in corso un *Proficiency Testing* per la determinazione delle fumonisine in un campione di mais. La partecipazione è stata estesa, quando possibile, anche a laboratori europei ed internazionali.

Network. Attraverso la distribuzione di questionari *ad hoc*, è in continua elaborazione la raccolta delle informazioni tecniche dei laboratori ufficiali, relative alla tipologia delle metodologie analitiche in uso presso i laboratori, l'elenco delle prove accreditate, unitamente alle altre informazioni utili per avere uno scenario aggiornato della distribuzione delle prove sul territorio. Il Laboratorio ha partecipato inoltre a *Proficiency Testing* organizzati dal Laboratorio comunitario, nel 2013 sulla determinazione della aflatossina B1, deossinivalenolo, e fumonisine in due campioni di mais naturalmente contaminati e sulla determinazione della patulina in due campioni di succo di mela e nel

2014 sulla determinazione della aflatossina B1 in due campioni di farina di cocco e dello zearalenone nell'olio di mais.

Sorveglianza. Nel triennio 2013-2015, l'LNR-Micotossine ha portato a termine vari studi tra cui quelli per valutare la contaminazione da micotossine in prodotti commerciali destinati ai soggetti celiaci ed all'infanzia, ed ha svolto, inoltre, una valutazione dell'esposizione del consumatore derivante dalla presenza del deossinivalenolo nella pasta e del soggetto celiaco relativamente alla presenza di varie micotossine nei prodotti destinati a questa gruppo di categoria.

SVILUPPI DIAGNOSTICI NELL'ANALISI DELLE MICOTOSSINE

Debegnach F., Brera C., Gregori E., De Santis B.

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

La rilevanza della problematica delle micotossine in alimenti e mangimi è legata all'elevata incidenza di contaminazione nelle derrate alimentari e alla loro tossicità. Questi elementi hanno determinato negli ultimi anni lo sviluppo di metodi analitici basati su tecnologie innovative, che comprendono sia metodiche che sfruttano sistemi di separazione cromatografica accoppiati a rivelatori a spettrometria di massa, sia metodi rapidi prevalentemente basati su saggi immunoenzimatici. Recentemente sono stati sviluppati nuovi metodi cromatografici grazie anche alla disponibilità di strumentazioni meno costose e allo sviluppo di cromatografi con prestazioni ultra elevate (UHPLC) che permettono, tra le altre cose, di ridurre drasticamente i tempi di analisi. La maggior parte dei metodi in LC-MS o MS//MS permette determinazioni multi-micotossina, includendo anche tossine con caratteristiche chimico-fisiche diverse tra loro, e l'analisi di matrici diverse che comprendono alimenti e mangimi, ma anche fluidi biologici. Lo sviluppo negli ultimi anni di strumenti ad alta risoluzione (HRMS), consentono l'analisi diretta degli estratti non purificati con valori del limite di quantificazione (LOQ) molto bassi. Tali strumenti si rivelano poi di grandissimo ausilio quando applicati allo studio delle così dette micotossine mascherate, inclusa la determinazione dei metaboliti delle micotossine. Questi ultimi infatti, possono contribuire alla tossicità globale dell'alimento consumato; inoltre, anche lo studio dei metaboliti nei fluidi biologici (biomarcatori) può essere impiegato per le stime di valutazione del rischio. Accanto a queste metodiche di determinazione sono stati sviluppati anche metodi rapidi pensati per avere risposte in tempi brevi (analisi in campo) e per essere usati da operatori non qualificati (metodi *user friendly*) riducendo non solo il numero di passaggi analitici ma anche l'impiego di standard di tossina e/o di solventi organici.

IL SISTEMA DI GESTIONE DATI SUI CONTAMIANTI DELL'EFSA: DALLA RACCOLTA DATI ALL'ANALISI

Cappè S.

Unità Evidence Management, European Food Safety Authority, Parma

Negli articoli 23 e 33 del Regolamento (CE) 178/2002, EFSA ha ricevuto dalla commissione europea mandato per raccogliere dati sull'occorrenza di contaminanti chimici negli alimenti e nei mangimi. In quest'ambito sono incluse anche le micotossine. Il sistema di raccolta dati europeo si basa sulla trasmissione armonizzata dei dati utilizzando il modello *Standard Sample Description*. I dati vengono in genere forniti da parte delle autorità competenti degli Stati Membri che si occupano di centralizzare la raccolta dati nazionale. Il processo di raccolta prevede una trasmissione dati annuale, effettuata entro il 1 Ottobre di ogni anno. La *Standard Sample Description* fornisce un modello dati molto generico applicabile a diversi contaminanti. È quindi necessario che chi genera e invia il dato conosca e rispetti i requisiti di dettaglio necessari affinché il dato sia accettato dal sistema di raccolta dati automatico di EFSA (Data Collection Framework - DCF). Questi requisiti, forniti da EFSA e definiti in collaborazione con gli esperti europei di analisi del rischio alimentare, sono finalizzati a far sì che il dato raccolto sia utilizzabile ai fini dell'analisi del rischio. In molti casi il rispetto di questi requisiti da parte del fornitore ultimo dei dati, l'autorità nazionale competente, risulta difficile se il dato non è stato generato in origine in compatibilità con i requisiti richiesti. La presentazione discuterà alcuni metodi di analisi dati, prendendo spunto da esempi concreti inclusi in alcuni pareri scientifici di EFSA su micotossine. Le analisi proposte e il calcolo delle necessarie statistiche descrittive metteranno in luce la necessità di alcune informazioni (metadati) e aiuterà a comprendere i vincoli imposti sui dati in ingresso. A tale scopo saranno mostrati alcuni "rapporti di analisi" disponibili nel nuovo sistema di EFSA per lo stoccaggio e la condivisione dei dati: la *Scientific data warehouse* (DWH).

VALIDAZIONE DI METODI DI SCREENING SECONDO IL REGOLAMENTO UE 519/2014. CASO STUDIO: DETERMINAZIONE DEL DEOSSINIVALENOLO IN FRUMENTO MEDIANTE TEST IMMUNOCROMATOGRAFICO A FLUSSO LATERALE

Lattanzio V.M.T. (a), La Penna M.P. (a), Ciasca B. (a), Powers S. (b), von Holst C. (c)
(a) *Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Bari*
(b) *Vicam, A Waters Business, Milford, USA*
(c) *European Commission, DG Joint Research Centre, 2400 Geel, Belgium*

In prospettiva dell'entrata in vigore dei limiti regolamentari per alcune micotossine negli alimenti zootecnici (e.g., ocratossina A, deossinivalenolo, tossina T-2), lo sviluppo di metodi speditivi per lo *screening* è un tema di ricerca di notevole interesse pratico-applicativo. L'obiettivo di tale contributo, pertanto, è stato lo sviluppo di modelli predittivi basati su acquisizioni spettrali di tipo *Near Infrared Reflectance* (NIR) per lo *screening* della contaminazione da fusariotossine nei sottoprodotti della molitura del frumento. In totale, 89 campioni di crusame di grano tenero e duro (crusca, tritello e farinaccio), di varia provenienza, sono stati sottoposti ad acquisizione spettrale (per interattanza) mediante un sistema portatile NIR-AOTF (*Acousto Optical Tunable Filter*). Previo trattamento statistico e trasformazione, i dati spettrali NIR sono stati utilizzati per lo sviluppo di modelli calibrativi di regressione *Partial Least Square* (PLS). Per la calibrazione è stato impiegato un set di dati analitici ottenuti con metodo cromatografico (SPE/GC-MS) e relativi alla presenza nei campioni in studio di deossinivalenolo (DON) (media $\pm$ d.s.: 1141 $\pm$ 1254 μ g/kg) e di tricoteceni totali (DON e altri tricoteceni del gruppo B: 1258 $\pm$ 1326 μ g/kg). La validazione dei modelli NIR è stata condotta con il metodo *Internal Full Cross Validation*. In termini generali, l'ordinamento preliminare dei dati spettrali mediante *Principal Component Analysis* (PCA), ha suggerito di sviluppare calibrazioni senza distinzione tra i due tipi di grano o tra le categorie merceologiche. Il modello così sviluppato per il DON, ha restituito in calibrazione valori di R^2 ed errore standard (SEC) pari a 0,85 e 481 μ gDON/kg, rispettivamente. In predizione l' R^2 è risultato pari a 0,75 con un errore standard (SECV) di 623 μ gDON/kg. Risultati simili, sono stati ottenuti per il modello predittivo dedicato ai tricoteceni totali (R^2 pari a 0,85 in calibrazione e SEC pari a 518 μ g/kg; R^2 pari a 0,75 in predizione e SECV pari a 669 μ g/kg). Per confermare l'utilità applicativa della modellistica NIR sviluppata, l'incertezza di predizione è stata valutata alla luce delle performance di metodo prescritte dalla vigente normativa di settore. I risultati preliminari ottenuti, consentono di ravvisare nella tecnica NIR un potenziale predittivo utile per lo screening sistematico delle contaminazioni da tricoteceni in cruscami di frumento destinati all'alimentazione animale.

SVILUPPO DI UN APTASENSORE ELETTROCHIMICO PER LA DETERMINAZIONE DELL'AFLATOSSINA B1

Castillo G. (a), Spinella K. (b,c), Poturnayova A. (a,d), Šnejdárková M. (b), Mosiello L. (c), Tibor H. (a)

(a) *Facoltà di Matematica, Fisica ed Informatica, Università Comenius, Mlynska, Bratislava Slovacchia*

(b) *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma Tor Vergata, Roma*

(c) *ENEA, Agenzia Nazionale Italiana per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente, Roma*

(d) *Istituto di Biochimica e Genetica, Accademia Slovacca delle Scienze, Ivanka pri Dunaji, Slovacchia*

Recentemente un nuovo prototipo di biosensore elettrochimico a DNA per la determinazione dell'Aflatossina B1 (AFLA-B1) nelle derrate alimentari è stato assemblato utilizzando come biorecettori gli aptameri, molecole di acido nucleico a filamento singolo lunghe 50-100 basi che possono essere selezionate per la loro capacità di legarsi direttamente a proteine specifiche. La novità nell'approccio analitico consiste nell'utilizzare come piattaforma di immobilizzazione nanomateriali quali i **dendrimeri Poli(AMido Amine)** in acronimo (PAMAM) di quarta generazione, che vengono depositati su elettrodi d'oro funzionalizzati con cistamina e glutaraldeide che svolge il ruolo di legante tra la piattaforma dendrimerica e gli aptameri a DNA specifici per l'AFLA-B1. La caratterizzazione analitica è stata effettuata mediante spettroscopia di impedenza elettrochimica (EIS) e voltammetria ciclica (CV) in presenza della coppia redox $K[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$. Il biosensore è stato utilizzato per la determinazione quantitativa di AFLA-B1 in un più esteso intervallo lineare di risposta pari a $0,01 \div 32$ nM. Questo importante risultato rende tale biosensore estremamente interessante in campo agro-industriale. Soddisfacenti sono risultate le prestazioni del biosensore anche in termini di sensibilità e di limite minimo di rivelabilità ($LOD=0,4 \pm 0,03$ nM). Il biosensore proposto mostra inoltre tempi di risposta brevi, dell'ordine di 10 s, una stabilità operativa superiore alle 24 ore, ed una stabilità nel tempo di 72 ore, se conservato opportunamente a 4 °C in buffer. L'aptasensore è stato testato in campioni certificati di arachidi e in *spiked* di arachidi dando una risposta ottimale. La specificità del biosensore è stata testata misurando due micotossine, l'Ocratossina A (OTA) e l'Aflatossina B2 (AFLA-B2) strutturalmente analoga all'AFLA-B1. La superficie del biosensore è stata caratterizzata da un punto di vista morfologico, mediante microscopia a forza atomica (AFM).

Poster

P1 APPROCCIO GEOSTATISTICO AL PROBLEMA DEL DEOSSINIVALENOLO NEL FRUMENTO DURO: RISULTATI PRELIMINARI

Amoriello T. (a), Aureli G. (b), Belocchi A. (b), Fornara M. (b), Mazziere G. (c), Ripa C. (b), Quaranta F. (b)

(a) *Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria, Centro di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione, Roma*

(b) *Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria, Unità di Ricerca per la Valorizzazione Qualitativa dei Cereali, Roma*

(c) *Agenzia per i Servizi nel Settore Agroalimentare nelle Marche (ASSAM), Osimo, Ancona*

La contaminazione da micotossine nei cereali è un problema che coinvolge vaste aree del territorio agricolo italiano con ricadute negative sia sulla qualità igienico-sanitaria della materia prima sia sugli aspetti economico-commerciali ad essa collegati. Una buona strategia per il contenimento delle micotossine deve partire dalla prevenzione in campo, con particolare riguardo alla conoscenza delle caratteristiche ambientali del territorio, alla vocazionalità, alla coltivazione dei cereali e all'impiego di idonee pratiche agronomiche. L'acquisizione e l'elaborazione dei dati relativi a diffusione ed entità di contaminazione nelle aree cerealicole costituiscono la base per efficaci azioni di monitoraggio e prevenzione del rischio. Lo scopo di questo studio è stato quello di svolgere un'indagine conoscitiva sulla distribuzione spaziale di Deossinivalenolo (DON), attraverso l'applicazione di un metodo geostatistico nell'elaborazione dei dati di contaminazione del frumento duro. Lo studio ha riguardato un totale di 821 campioni, raccolti in diversi ambiti territoriali della regione Marche nel poliennio 2006-2014. Il dosaggio del DON è stato effettuato con metodo immunoenzimatico ELISA, utilizzando Ridascreen® DON, R-Biopharm. I dati ottenuti sono stati elaborati con la statistica descrittiva classica assumendo l'indipendenza spaziale dei campioni; successivamente le tecniche geostatistiche sono state utilizzate per identificare la dipendenza spaziale e stimare i livelli di contaminazione nei siti non campionati, permettendo la realizzazione di una carta tematica. Il monitoraggio del DON ha evidenziato un livello medio di contaminazione pari a 243 µg/kg ed un livello mediano di 55 µg/kg. Il 95% dei campioni è risultato all'interno del valore di 1009 µg/kg e quindi lontano dal limite di 1750 µg/kg, stabilito dal Reg. CE 1881/2006. L'analisi geostatistica è stata condotta utilizzando solo i dati dei campioni positivi, risultati pari al 73% del totale. I valori di contaminazione sono stati convertiti in valori gaussiani attraverso una trasformazione logaritmica. La mappatura risultante dell'area investigata sembra indicare una distribuzione piuttosto eterogenea della contaminazione, con un gradiente che aumenta dalle zone interne verso quelle costiere. Potendo disporre di un numero consistente di campioni, la mappatura con metodo geostatistico potrebbe interessare aree più vaste del territorio nazionale proponendosi come valido strumento per la caratterizzazione degli areali di coltivazione, concretamente utilizzabile nella programmazione delle azioni di prevenzione e nella gestione del rischio di contaminazione da DON.

P2 AFLATOSSINE M1 E B1 IN LATTE E MATERIE PRIME: NON CONFORMITÀ IN ANALISI DI CONTROLLO UFFICIALE NEGLI ANNI 2012-2013

Armentano A., Lo Magro S., D'Antini P., Summa S., Conticelli A., Muscarella M.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia

Nell'anno 2012 le alte temperature e l'elevato tasso di umidità riscontrate durante l'estate, hanno favorito la proliferazione di muffe e la conseguente formazione di aflatossina B1 (AFB1) nel mais. Conseguentemente, anche il latte è risultato una matrice particolarmente a rischio per contaminazione da Aflatossina M1 (AFM1). A causa degli scarsi raccolti della campagna maidicola, inoltre, è aumentato l'utilizzo di mais importato. A seguito di questa particolare situazione, le autorità competenti hanno intensificato, a livello nazionale, sia i campionamenti che i controlli ufficiali sulla presenza delle aflatossine nel mais e nel latte. Anche le regioni Puglia e Basilicata sono state interessate da questa allerta con il conseguente incremento delle analisi effettuate presso i laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale. Lo studio riportato è stato condotto adoperando due metodi di conferma in cromatografia liquida ad elevate prestazioni con rivelazione fluorimetrica sviluppati presso il nostro laboratorio e riportati in letteratura. Le analisi sono state effettuate in doppio per ciascun campione e la conformità dei campioni è stata stabilita per l'AFB1 nelle materie prime, in base al limite di 20 µg/kg riportato nel Reg. 574/2011/CE. Per il latte, invece, si è adoperato come limite massimo per l'AFM1 il valore fissato nel Reg. 165/2010/CE pari 0,050 µg/kg. Relativamente ai risultati ottenuti per le materie prime, su un totale di 344 campioni pervenuti in laboratorio negli anni 2012-2013, 16 campioni di mais ad uso zootecnico sono stati sottoposti ad analisi di conferma. Fra questi, 7 hanno presentato un contenuto di AFB1 superiore al limite di legge. I campioni di latte sono stati prelevati da aziende zootecniche e centri di distribuzione nelle regioni di Puglia e Basilicata. Su un totale di 471 campioni, 137 campioni, prevalentemente di specie bovina, sono stati analizzati mediante analisi di conferma e 44 campioni sono risultati non conformi (9,3% dei campioni totali). La provincia di Potenza è stata quella per la quale è stato rilevato il maggior numero di positività in entrambi gli anni di monitoraggio. In alcuni casi, alle non conformità riscontrate nei campioni di latte sono seguiti campionamenti ed analisi sul mais con il quale erano stati alimentati gli animali, che hanno confermato positività per AFB1.

P3 PRESENZA DI AFLATOSSINE B₁, B₂, G₁, G₂ IN FRUTTA A GUSCIO DI ORIGINE EXTRA EUROPEA

Armentano A., Summa S., Lo Magro S., Muscarella M.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia

La frutta a guscio è fra i prodotti maggiormente soggetti a possibile contaminazione da aflatossine, micotossine dalle ben note proprietà teratogene, cancerogene e mutagene. Negli ultimi anni in Italia è aumentata l'importazione di frutta a guscio da paesi extra-europei, dove spesso fattori climatici sfavorevoli e condizioni igienico-sanitarie non idonee favoriscono lo sviluppo di muffe. Per tale ragione, come sottolineato da recenti allerte RASFF, la contaminazione da aflatossine dei prodotti importati è un problema di interesse attuale ed è quindi necessario intensificare il monitoraggio su tali matrici mediante metodi analitici affidabili e veloci. I limiti di legge per l'Aflatossina B₁ (AFB₁) e per le aflatossine totali (AF_{tot}: AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂) nella frutta a guscio destinata al consumo umano diretto o utilizzata come ingrediente sono riportati nel Reg. 165/2010/CE. Il Reg. 178/2010/CE, invece, fissa i criteri per il campionamento, principale fonte di errore nella determinazione del tenore di aflatossine, data l'eterogenea distribuzione delle stesse nelle partite alimentari. In questo studio sono riportati i risultati di un monitoraggio sulla presenza di AFB₁ ed AF_{tot} in frutta a guscio di provenienza extra-europea negli anni 2012-2014. Lo studio è stato condotto adoperando un metodo HPLC/FLD con derivatizzazione fotochimica post-colonna già sviluppato e validato presso il nostro laboratorio. 73 campioni di frutta a guscio (42 di pistacchi, 24 di mandorle, 4 di semi di albicocche, 2 di arachidi, 1 di nocciole), provenienti soprattutto dalla Turchia e dagli Stati Uniti, sono stati prelevati dai porti di Bari e di Gioia Tauro (RC). Poiché le partite di frutta a guscio erano superiori a 15 tonnellate, il campionamento è stato effettuato in accordo al Reg. 178/2010/CE prelevando un campione globale di 20 kg, che è stato suddiviso ulteriormente in due campioni da 10 kg da cui sono state costituite le due aliquote da sottoporre ad analisi in doppio. Dei 73 campioni analizzati (146 aliquote), 46 hanno presentato concentrazioni di AFB₁ e di AF_{tot} non quantificabili (AFB₁<0.6 µg/kg; AF_{tot}<0.9 µg/kg). Un numero pari a 16 campioni, dei quali 7 provenienti dalla Turchia e 3 dagli Stati Uniti, sono risultati non conformi. Solo 2 di questi hanno presentato concentrazioni superiori ai limiti in entrambe le aliquote e questo sottolinea l'importanza della fase di campionamento. Tutti i campioni non conformi presentavano positività sia per l'AFB₁ che per le AF_{tot}. In 12 aliquote sono stati riscontrati tenori di aflatossine totali superiori a 20 µg/kg. Tra i campioni analizzati, i pistacchi risultano la matrice maggiormente contaminata (33% su un totale di 42 campioni).

P4 RILEVAZIONE DI TOSSINE T2+HT2 NEL FRUMENTO DURO BIOLOGICO COLTIVATO IN ITALIA

Aureli G., Belocchi A., Fornara M., Melloni S., Quaranta F.
CRA, Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria, Unità di Ricerca per la Valorizzazione Qualitativa dei Cereali, Roma

La coltivazione in biologico del frumento duro (*Triticum durum* Desf.) continua a rappresentare un aspetto di grande interesse nel sistema agricolo del nostro Paese, soprattutto per la potenziale capacità di coniugare una produzione di qualità con le esigenze crescenti di sostenibilità ambientale. Fra gli elevati standard qualitativi richiesti dal mercato per il frumento duro biologico uno dei più importanti riguarda il controllo della contaminazione da micotossine nella materia prima. Questo imprescindibile pre-requisito igienico-sanitario può essere raggiunto soprattutto attraverso l'impiego di azioni di prevenzione, buone pratiche agronomiche e scelte varietali idonee per ambienti pedoclimatici vocati. Fra i contaminanti per i quali non sono stati ancora fissati livelli massimi accettabili negli alimenti, ma che sono tuttavia oggetto di attenzione e studio da parte della Comunità Europea, le tossine T2 e HT2, micotossine tricotecniche di tipo A prodotte da alcuni funghi tossigeni del genere *Fusarium* spp., assumono una particolare importanza in quanto rilevabili nei cereali, fra i quali il frumento, e nei prodotti derivati. Il lavoro svolto ha riguardato una prima indagine sulla presenza di tossine T2 e HT2 (somma delle due micotossine) in campioni di frumento duro di 11 varietà coltivate in campi appartenenti a 5 diversi areali di coltivazione, afferenti alla Rete nazionale di confronto varietale in biologico, in due annate agrarie consecutive (2012-2013 e 2013-2014). Per la rilevazione di T2+HT2 è stato impiegato il metodo immunoenzimatico (ELISA). I risultati dello screening, svolto su un totale di 110 campioni, hanno evidenziato un'eterogenea diffusione delle micotossine in funzione dell'areale di appartenenza dei campioni. In particolare, l'incidenza percentuale dei campioni con concentrazione di T2+HT2 uguale o superiore al limite di rilevabilità del metodo (LOD=25 µg/kg), sul totale dei campioni analizzati, è stata compresa fra il 5% (areale nord) e il 68% (areale Centro-Adriatico). La concentrazione delle micotossine è risultata al di sotto del limite di rilevabilità in tutti i campioni provenienti dalla Sicilia e dalla Sardegna. Tutte le varietà testate si sono dimostrate sensibili all'accumulo di T2+HT2 nella granella ad eccezione dei campioni della varietà Anco Marzio per la quale non sono stati riscontrati campioni positivi all'analisi effettuata. I risultati dell'indagine preliminare svolta suggeriscono la necessità di ulteriori studi per approfondire le modalità di diffusione e l'entità di contaminazione da T2+HT2 al fine di poter applicare efficaci azioni di prevenzione del rischio e, nel contempo, valorizzare le pregevoli potenzialità del frumento duro biologico nazionale.

P5 PROGETTO RETE QUALITÀ CEREALI PLUS: RQC-MAIS

Balconi C. (a), Locatelli S. (a), Reyneri A. (b), Battilani P. (c)

(a) Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria, Unità di Ricerca per la Maiscoltura, Bergamo

(b) Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi, Torino

(c) Dipartimento di Scienze delle Produzioni Vegetali Sostenibili, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza

Il Progetto triennale (2014-2017) “Rete Qualità Cereali plus RQC-Mais” nasce dall’azione congiunta di tre gruppi di ricerca, in risposta alla richiesta da parte del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali (MiPAAF) di proporre misure ed azioni nell’ambito della linea strategica di intervento volto a regolamentare il mercato dei prodotti agroalimentari. Prerequisito indispensabile per la qualificazione e valorizzazione della filiera maidicola è la sicurezza delle produzioni sotto il profilo igienico-sanitario con particolare attenzione alla contaminazione da micotossine. Obiettivo generale del progetto consiste nella valutazione della qualità del mais a livello nazionale al fine di sviluppare un piano per il miglioramento della qualità igienico sanitaria della filiera mais, con conseguente recupero e accrescimento della competitività della zootecnia nazionale e dell’industria alimentare. Al fine di affrontare le tematiche richieste dal MiPAAF, valorizzando le competenze delle tre Unità Operative (UO) partecipanti alla proposta progettuale in oggetto, le attività previste sono state articolate in tre diversi *Work Packages* (WP), come segue:

- WP 1. Rete Qualità Mais: monitoraggio delle caratteristiche igienico-sanitarie e qualitative del mais (UO 1: CRA-MAC);
- WP 2. Micotossine emergenti nel mais: monitoraggio e prevenzione (UO 2: DISAFA-UNITO);
- WP 3. Modelli predittivi a supporto della prevenzione delle micotossine in mais (UO 3: UO 3: DIPROVES-UNICATT).

Inoltre, l’attività di coordinamento (WP 0), a cura di CRA-MAC, prevede, tra le altre attività, l’aggiornamento delle Banche dati relative alle caratteristiche agronomiche, qualitative e igienico sanitarie del mais, in collaborazione con le altre UO.

L’attività di ricerca prevista nell’ambito del Progetto RQC MAIS è finanziata dal MiPAAF (D.D. N. 88666 del 03/12/2014).

P6 PRESENZA DI OCRATOSSINA A (OTA) IN CAMPIONI COMMERCIALI DI FORMAGGIO GRATTUGGIATO

Biancardi A. (a), Dall'Asta C. (b)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia-Romagna, Brescia

(b) Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Università degli Studi, Parma

L'ocratossina A è una micotossina, principalmente prodotta come metabolita secondario da *Penicillium* e *Aspergillus*. Il Regolamento (CE) 1881/2006 ha stabilito diversi limiti di tolleranza per svariate tipologie di matrici; non esiste attualmente un limite per salumi e formaggi. Per quanto riguarda espressamente la matrice formaggio, dalle evidenze della letteratura scientifica è noto che la contaminazione da OTA non riguarda la materia prima, ovvero il latte. Nondimeno la contaminazione della superficie della forma in fase di stagionatura è un evento possibile. Considerando che il disciplinare di produzione dei grattuggiati prevede l'uso della crosta fino ad un massimo del 18%, lo scopo di questo studio è di valutare la presenza di OTA in grattuggiati commerciali. Sono stati effettuati due set di campionamenti di buste commerciali "formaggio fresco grattugiato": un primo set di 40 campioni e un secondo set di 71 campioni, fatti in periodi diversi. Sono stati analizzati con metodo LC-MS/MS messo a punto e validato *in house* nell'ambito del presente studio. In sintesi il recupero medio è 94% (N=24, 4 livelli di drogaggio, 6 repliche/livello), il LOQ è pari a 1 ppb (S/N=10). L'incertezza estesa relativa è pari a 25% (gradi di libertà $\nu=52$, fattore di copertura $k=2,01$). Nel I set i valori trovati variano da un minimo di $<1 \mu\text{g/Kg}$ ad un massimo di $54,07 \mu\text{g/Kg}$. Nel I set la % di presenza media di OTA è 15%. Nel II set i valori trovati variano da un minimo di $<1 \mu\text{g/Kg}$ ad un massimo di $51,10 \mu\text{g/Kg}$. Nel II set la % di presenza media di OTA è 20%. Complessivamente tra I e II set di dati, la presenza media di OTA è pari al 18%. In conclusione, la percentuale media di negatività (OTA-free) è del tutto rassicurante (82%). La presenza di OTA nel restante 18% è sicuramente da attribuire all'uso di croste contaminate. La soluzione del problema può semplicemente svilupparsi attraverso due approcci complementari:

1. approccio *tecnologico*: si realizza sia con un'adeguata cura dell'igiene degli ambienti di stagionatura sia con opportuna spazzolatura delle forme;
2. approccio *regolatorio* attraverso:
 - l'emanazione di limiti di tolleranza di OTA non solo sulle croste ma anche sul prodotto finito (in linea con quelli già esistenti su altre matrici come da Reg. 1881/2006);
 - l'introduzione di piani di monitoraggio.

P7 DETERMINAZIONE DI STERIGMATOCISTINA (STC) IN CEREALI E MANGIMI MEDIANTE LC-MS/MS

Biancardi A. (a), Dall'Asta C. (b)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia-Romagna, Brescia

(b) Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Università degli Studi, Parma

Prodotta principalmente da *Aspergillus Versicolor*, la sterigmatocistina (STC) è una micotossina strutturalmente correlata all'Aflatossina B1 (AFB1), di cui è il precursore biogenico. La sua tossicità sia acuta che cronica è in relazione sia a proprietà tossicologiche intrinseche che alla capacità di generare *in vivo* la AFB1. STC è stata riconosciuta dalla IARC come cancerogeno di classe 2B (possibile cancerogeno per l'uomo). Comunemente diffusa in substrati quali cereali e derivati, mangimi, spezie, semi di caffè e frutta secca, non è attualmente normata quanto a limite di tolleranza. Una recente raccomandazione EFSA suggerisce di avviare studi di monitoraggio sulla presenza di STC in alimenti e mangimi con metodi sensibili e accurati (LOQ consigliato 1,5 µg/kg. Nel presente lavoro è stato messo a punto un metodo veloce e affidabile per la determinazione di STC in cereali e mangimi mediante LC-MS/MS. Il campione è estratto con miscela idroacetonitrilica; una volta filtrato e opportunamente diluito è pronto per l'analisi LC-MS/MS (HPLC Agilent 1290 Infinity abbinato a triplo quadrupolo Agilent 6430). La colonna cromatografica è una Zorbax SB-C18 (5 cm; ID 2,1 mm; diametro medio delle particelle 1,8 µm). La fase mobile è costituita da un sistema binario (fase A acido formico 0,1%; fase B acetonitrile contenente acido formico 0,1%) combinati in una corsa cromatografica con gradiente di eluizione della durata di 6 minuti (flusso 0,4 mL/min). La quantificazione avviene mediante metodo dello standard esterno con acquisizione in MRM (ESI ioni negativi) delle due transizioni caratteristiche 325.1 → 310 (transizione di quantificazione *Quantifier*) e 325.1 → 281 (transizione di qualificazione *Qualifier*) tra 0 e 4.2 minuti (tempo di ritenzione dell'analita 3,61 minuti). Parametri strumentali: *dwell time* 200 msec, *fragmentor* 174 V, *collision energy* 25 V (transizione *Quantifier*), *collision energy* 40 V (transizione *Qualifier*), *cell acceleration* 7 V. Il metodo è stato validato. I parametri valutati sperimentalmente sono: linearità - specificità - LOQ 1 µg/kg (sei repliche indipendenti) - esattezza e precisione su tre diversi livelli di drogaggio in sei repliche indipendenti. Il recupero medio complessivo è 97,96% (N=24), con un CV% pari a 3,75%. L'incertezza estesa relativa è pari a 19% (gradi di libertà v=56, fattore di copertura k=2,00). È stata sperimentalmente verificata l'assenza di effetto matrice. Il metodo è stato applicato a 14 campioni naturalmente contaminati da AFB1 a diversi livelli (da un minimo di 28,75 µg/kg ad un massimo di 240,08 µg/kg). Effettivamente in tutti i campioni è stata constatata la presenza di STC da un valore minimo di 0,7 µg/Kg ad un massimo di 2,25 µg/kg.

P8 EFFETTO DEL PROCESSO MOLITORIO NELLA RIPARTIZIONE DELLA MONILIFORMINA IN MAIS

Blandino M., Scarpino V., Reyneri A., Vanara F.

Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi, Torino

I prodotti e sottoprodotti della lavorazione industriale della granella di mais sono il risultato di processi di trasformazione in grado di ripartire le micotossine contenute nella cariosside intera. Nel Nord Italia il mais è particolarmente soggetto alla contaminazione in pre-raccolta da micotossine prodotte da *Fusarium spp.*, tra cui le Fumonisine (FB) sono le più presenti. Recentemente a livello europeo si è posta l'attenzione sulla Moniliformina (MON) per la quale i primi dati di diffusione presenti in letteratura ne confermano la presenza su mais italiano in associazione alle FB, ma di cui nessun dato è ora noto in relazione alla sua ripartizione nei prodotti e sottoprodotti molitori. Questo lavoro valuta l'effetto del processo molitorio nella ripartizione della MON e delle FB nella granella di mais nei semilavorati e nei prodotti finiti da lavorazioni di farine o *hominy grits*. A tal proposito sono stati esaminati 5 diversi lotti delle campagne 2011, '12 e '13, ciascuno costituito da un unico ibrido analizzando distintamente: la granella prima della pulitura; la granella pulita; il processo di lavorazione per degerminazione a umido per la produzione di *hominy grits* [grosso ($>4000\ \mu\text{m}$), medio ($2.500\text{-}4.000\ \mu\text{m}$), fine ($1.200\text{-}2.500\ \mu\text{m}$)]; il processo di molitura a secco per la produzione di farina bramata ($500\text{-}800\ \mu\text{m}$); fioretto ($350\text{-}500\ \mu\text{m}$) e fumetto ($<350\ \mu\text{m}$); e i sottoprodotti germe e farinetta. La metodica di campionamento ha seguito il Reg. CE 401/2006. Tutti i campioni sono stati caratterizzati per la resa di lavorazione e per il contenuto in MON e in FB mediante analisi LC-MS/MS. La contaminazione della granella intera a inizio lavorazione dei lotti esaminati è risultata molto variabile nelle diverse campagne maidicole e mediamente inferiore per MON (tra $203\ \mu\text{g kg}^{-1}$ e $844\ \mu\text{g kg}^{-1}$) rispetto a FB (tra $344\ \mu\text{g kg}^{-1}$ e $2.980\ \mu\text{g kg}^{-1}$). Le operazioni di pulitura con l'ausilio di un sistema di aspirazione meccanica e con una selezionatrice ottica ha ridotto la contaminazione da FB e MON rispettivamente di 2,3 (56%) e 1,5 volte (35%). La farinetta, frazione contenente anche le parti cruscali, è sempre stato il prodotto più contaminato, con un contenuto in FB e MON mediamente di 6,9 e 3,1 volte superiore rispetto alla granella di partenza. Il germe campionato durante questa lavorazione è risultato in media meno contaminato rispetto alla granella intera per entrambe le micotossine. La farina bramata e fioretto derivanti dalla raffinazione dell'endosperma vitreo, sono risultati sempre meno contaminati, con abbattimenti rispetto alla granella intera in media di 5,5 volte per FB e 3,2 volte per MON. La frazione derivante dall'endosperma farinoso, il fumetto, ha sempre mostrato un minor contenuto di micotossine rispetto al mais di partenza, ma con un abbattimento medio inferiore. Per quanto riguarda invece il processo di produzione di *hominy grits*, la contaminazione da MON si è ridotta in particolare nei prodotti con maggiore granulometria, confermando complessivamente una ripartizione analoga a quella delle FB.

P9 "ANTICORPI VERDI": EFFICACI STRUMENTI PER LA DIAGNOSTICA AGRO-ALIMENTARE

Catellani M., Mancini C., Cerasi M., Benvenuto E., Capodicasa C.
ENEA, UT-BIORAD-FARM, Laboratorio di Biotecnologie, C.R. Casaccia, Roma

Le aflatossine comprendono diverse molecole molto simili tra loro (B1, B2, G1, G2) prodotte da due specie del fungo *Aspergillus* e l'aflatossina M1, metabolita idrossilato di origine animale della B1, e sono fra le tossine più diffuse nei prodotti alimentari. Basti pensare che ogni anno circa un quarto delle notifiche emesse a livello comunitario dal RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*) riguardano contaminazioni da micotossine e che in più del 90% dei casi queste appartengono al gruppo delle aflatossine. Per sviluppare sistemi diagnostici efficaci e a basso costo per la rivelazione di queste tossine, sono stati generati degli anticorpi specifici per l'aflatossina B1 e la M1 da produrre in maniera ricombinante ed innovativa, sfruttando le piante come bioreattori. Gli anticorpi sono stati isolati con la tecnologia dell'ibridoma, immunizzando topi BALB/c con dei coniugati proteici di aflatossina B1 e di aflatossina M1 separatamente. In seguito alla fusione, sono stati selezionati 4 cloni (due per ciascuna tossina) che producevano gli anticorpi con le caratteristiche migliori. Gli anticorpi monoclonali (mAb) ottenuti sono stati caratterizzati ed hanno mostrato una elevata affinità per le tossine (K_D nell'ordine del pM), necessaria per il loro utilizzo in diagnostica. Per l'espressione in pianta, le sequenze codificanti per le catene pesanti e leggere dei diversi mAb sono state clonate, dal cDNA delle diverse linee cellulari selezionate, in un vettore di espressione in pianta. I mAb sono stati quindi prodotti in piante di *Nicotiana benthamiana* tramite trasformazione transiente mediata da *Agrobacterium tumefaciens*. L'analisi *Western blot* degli estratti di pianta ha confermato elevati livelli di espressione delle catene proteiche anticorpali mentre il corretto assemblaggio e la funzionalità degli anticorpi espressi è stata verificata mediante ELISA funzionale. Gli anticorpi espressi in pianta hanno mostrato la stessa capacità di legame in ELISA verso le aflatossine dei corrispettivi anticorpi prodotti dagli ibridomi murini. Con questi anticorpi si stanno sviluppando dei dispositivi per la rilevazione delle aflatossine (ELISA e *lateral flow*) in matrici alimentari. Si spera così di ottenere dei kit "verdi" per la diagnostica che avranno il vantaggio di utilizzare degli anticorpi monoclonali, in grado di garantire performance costanti e riproducibili, prodotti in pianta con costi ridotti e uno scale-up produttivo rapido e flessibile in alternativa ai metodi classici di produzione degli anticorpi mediante colture cellulari.

P10 MICOTOSSINE NELLA FEED SUPPLY CHAIN: STATO DELL'ARTE E PROSPETTIVE FUTURE

Cheli F., Dell'Orto V.

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare, Università degli Studi, Milano

Le micotossine rappresentano un problema significativo per l'industria mangimistica con un elevato impatto sull'economia ed il commercio internazionale. Il problema principale associato a mangimi contaminati da micotossine non è tanto legato ad episodi acuti, ma ad esposizione cronica a bassi livelli di contaminazione con effetti negativi sulla salute, la produzione animale ed i prodotti di origine animale. Recenti indagini, condotte per valutare l'incidenza delle micotossine nei mangimi, confermano che aflatoossine, deossinivalenolo, fumonisine, ocratossina A, tossina T-2 e zearalenone sono le principali micotossine rilevate nei mangimi e che vi sono notevoli differenze per quanto riguarda il tipo e la prevalenza di contaminazione in diverse regioni del mondo, con una variabilità di contaminazione fortemente dipendente dalle condizioni climatiche regionali. I risultati indicano che nella maggior parte dei casi le concentrazioni sono abbastanza basse per garantire la conformità con i valori indicati dalle normative dell'UE. Tuttavia, un'alta percentuale di campioni di mangimi risultano contaminati da più micotossine, che possono influire sulla salute degli animali a causa di effetti additivi/sinergici delle micotossine già a basse dosi. Generalmente le micotossine entrano nella filiera mangimistica attraverso colture contaminate destinate alla produzione di alimenti e mangimi, principalmente di cereali. Studi sul destino delle micotossine durante la trasformazione dei cereali hanno dimostrato che queste si concentrano nelle frazioni che comunemente sono utilizzate per l'alimentazione animale. Pertanto, la comprensione della distribuzione delle micotossine durante i processi tecnologici (macinazione, processi di fermentazione per la produzione di bio-etanolo e birra) rappresenta una tematica di interesse a livello mondiale. La disponibilità di tali dati può fornire una solida base di conoscenze per l'industria alimentare e mangimistica e gli enti istituzionali al fine di ridurre il rischio per l'animale e l'uomo, le ripercussioni commerciali negative, migliorare la sostenibilità dei processi produttivi agro-zootecnici ed agro-industriali, nonché permettere una revisione dei limiti normativi. Per il controllo della contaminazione con micotossine nei mangimi, il campionamento e l'analisi rappresentano i punti critici. In tale ambito, l'uso di metodi rapidi rappresenta una delle sfide più importanti al fine di ottenere una diagnosi rapida e accurata della qualità dei mangimi che ne permetta una gestione efficace e sicura.

P11 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DELLA COTTURA ALCALINA DEL MAIS SUL CONTENUTO DELLE FUMONISINE E RELATIVE FORME IDROLIZZATE

De Girolamo A., Lattanzio V.M.T., Schena R., Visconti A., Pascale M.
Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari

Le Fumonisine B₁ (FB₁) e B₂ (FB₂) sono micotossine prodotte principalmente dai funghi del genere *Fusarium*, frequenti contaminanti del mais. Per il suo valore nutritivo e per le svariate utilizzazioni dei suoi prodotti e sottoprodotti, il mais rappresenta una componente importante dell'alimentazione umana. In alcuni paesi del Sud America e nel Messico il mais viene consumato previa cottura in presenza di una soluzione di idrossido di calcio. Questo processo, noto come nixtamalizzazione, produce un impasto chiamato "masa" che possiede proprietà nutrizionali superiori a quelle del mais di partenza. La "masa" viene poi impiegata per la produzione di svariati prodotti derivati come *tortillas*, *tamales* e *arepas*. Durante il processo di nixtamalizzazione si verifica la rimozione di uno o di entrambi i residui di acido tricarballilico delle fumonisine dando origine rispettivamente alle fumonisine parzialmente idrolizzate (PHFBs) o alle fumonisine idrolizzate (HFBs). Recentemente presso i laboratori ISPA-CNR sono stati prodotti, isolati e caratterizzati per la prima volta standard puri (purezza >98%) di PHFB₁, PHFB₂, HFB₁ e HFB₂. La disponibilità di tali standard ha permesso di valutare l'effetto del processo di nixtamalizzazione (condotta su scala da laboratorio) sul contenuto delle fumonisine e delle relative forme idrolizzate. Il mais di partenza, le frazioni intermedie (acque di *steeping* e di lavaggio) e la "masa" finale sono state analizzate mediante LC-HRMS per determinarne il contenuto di FBs, PHFBs e HFBs. Sono stati condotti anche esperimenti di controllo che prevedevano la cottura del mais in assenza di idrossido di calcio. I risultati hanno evidenziato che la nixtamalizzazione riduceva il contenuto di FBs e PHFBs nella "masa" finale, mentre favoriva la produzione di HFBs. Tuttavia, il contenuto complessivo delle tre forme di fumonisine nelle frazioni raccolte risultava ben superiore al 100% (fino al 180%) indicando che la nixtamalizzazione rendeva disponibili forme di fumonisine complessate con i componenti della matrice che venivano a loro volta convertite nelle relative forme idrolizzate. Al contrario, la cottura del mais in assenza di idrossido di calcio non rilasciava HFBs e quasi il 100% di fumonisine iniziali veniva raccolto nelle frazioni intermedie e nella mais cotto. Considerata la minore tossicità delle forme idrolizzate delle fumonisine rispetto alle forme native si può affermare che la nixtamalizzazione produce alimenti più salubri rispetto al mais di partenza.

L'attività di ricerca è stata finanziata dal progetto EU MYCORED (FP7-KBBE-2007-222690)

P12 CONTROLLI UFFICIALI DI AFLATOSSINE NELLA FRUTTA A GUSCIO DI PROVENIENZA COMUNITARIA ED EXTRACOMUNITARIA IN ENTRATA NEL PORTO DI GIOIA TAURO

De Pace R., Vita V., Franchino C.,
*Struttura Semplice Micotossine e Tecniche Immunoenzimatiche, Dipartimento di Chimica,
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia*

In questi ultimi anni, è stata posta sempre maggiore attenzione ai temi riguardanti la sicurezza alimentare e la salubrità delle derrate alimentari. Vino, caffè, cereali e frutta secca, rappresentano le matrici a più alto rischio di contaminazione da micotossine. Esempi di matrici contaminate da Aflatossine, prodotti secondari di alcune specie fungine, sono principalmente arachidi e pistacchi coltivati nelle zone dove il clima caldo - umido è una delle cause che favorisce il loro sviluppo. L'Istituto Zooprofilattico di Puglia e Basilicata, negli anni 2013 - 2015, poiché organo preposto a tali controlli ed accreditato ai sensi del Reg. 882/2004, ha iniziato a monitorare le Aflatossina B1 e totali su campioni di frutta secca con guscio importati da paesi comunitari ed extracomunitari al fine di verificarne la contaminazione. I prelievi sono stati eseguiti dagli Usmaf di Reggio Calabria. Le analisi delle aflatossine nei campioni di frutta secca con guscio, sono state eseguite utilizzando kit immunoenzimatici, validati in accordo alla Decisione 2002/657/CE del 12 agosto 2002, che attua la Direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati. I metodi immunoenzimatici utilizzati sono controllati periodicamente per verificarne il corretto funzionamento, attraverso carte di controllo e circuiti interlaboratorio. Il monitoraggio eseguito su 502 campioni di frutta secca con guscio nell'arco del triennio 2013-2015, ha evidenziato che il 94% dei campioni analizzati è inferiore ai limiti di legge definiti dal Regolamento (UE) n.165/2010, mentre il restante 6% è positivo. I dati analitici riscontrati, sono abbastanza confortanti considerando che i campioni esaminati sono materie prime, che, sottoposte a cernita ed a ulteriori trattamenti fisici consentono un notevole abbattimento di eventuali residui di micotossine. Tuttavia è importante continuare l'attività di sorveglianza in maniera continua e costante per garantire la salvaguardia della salute dei consumatori da eventuali rischi di contaminazione.

P13 VALUTAZIONE DELLA CONTAMINAZIONE DI AFLATOSSINA B1 IN MANGIMI DELLA PUGLIA E BASILICATA DAL 2010 AL 2014

De Pace R., Clausi M.T., Franchino C., Vita V.

*Struttura Semplice Micotossine e Tecniche Immunoenzimatiche, Dipartimento di Chimica,
Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata, Foggia*

La contaminazione da micotossine di derrate alimentari destinate all'uomo è un tema complesso e delicato, e l'attuale normativa prevede nella maggior parte dei paesi l'attuazione di debiti piani di controllo per prevenire il rischio per la salute pubblica. In questa classe di biocontaminanti ritroviamo le aflatossine, prodotti secondari di varie specie fungine che infestano soprattutto cereali, leguminose, semi oleosi, frutta secca e spezie. Esse vengono ricercate anche in mangimi destinati ad animali di interesse zootecnico e l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata è una delle strutture deputate a effettuare i controlli ufficiali previsti in Italia. Presso la suddetta struttura, durante il periodo 2010-2014, sono stati analizzati con metodiche immunoenzimatiche accreditate circa 919 campioni di mangimi prelevati sul territorio delle regioni di competenza dell'ente. I risultati hanno mostrato un quadro abbastanza rassicurante, con la presenza solo di pochi campioni non conformi (0,76%) per l'aflatossina B1 rispetto ai livelli massimi previsti dal Reg. CE 574/2011. Queste non conformità sono state rilevate nella provincia di Bari con livelli maggiori nelle province di Foggia e Brindisi. Tali riscontri contribuiscono a confermare l'importanza di controlli costanti e del monitoraggio non solo nella tutela del consumatore ma anche come utile mezzo per migliorare la qualità delle attività zootecniche e dell'industria mangimistica.

P14 MICOTOSSINE NEL MAIS: PROVE VARIETALI 2014 IN FRIULI VENEZIA GIULIA

De Paoli M., Barbiani G., De Pauli P., Vicentini L.
*ERSA, Servizio Fitosanitario e Chimico, Ricerca, Sperimentazione e Assistenza Tecnica,
Pozzuolo del Friuli, Udine*

Nell'ambito di un progetto micotossine iniziato già 10 anni fa, il Servizio fitosanitario e chimico, ricerca, sperimentazione e assistenza tecnica dell'ERSA - Agenzia regionale per lo sviluppo rurale del Friuli Venezia Giulia ha condotto nel corso del 2014 il primo anno di una prova varietale sperimentale su 75 ibridi commerciali di mais volta a valutare eventuali correlazioni tra "genetica" e presenza di micotossine. Si sono testati 54 ibridi classe 5-6-700 e 21 ibridi di classe 2-3-400 in 3 località della pianura friulana per gli ibridi tardivi e in 2 località per gli ibridi precoci. Tutte le prove sono state effettuate in località coperte da irrigazione e in diverse epoche di semina e di raccolta. La prova, inizialmente pensata per le aflatossine, considerata l'annualità climaticamente sfavorevole a queste tossine, si è rivelata invece particolarmente importante nello studio del Deossinivalenolo (DON) che nel 2014 ha registrato, viste le condizioni di bassa temperatura e alta piovosità nella stagione estiva, una forte contaminazione. Dall'analisi dei risultati circa i residui di tricoteceni e DON in particolare, si è potuto stabilire, in questa prima annualità sperimentale, che una riduzione della contaminazione di queste micotossine è strettamente correlata alla classe di maturazione degli ibridi partendo dai più precoci, alla scelta del tipo di granella (vitrea, semivitrea, farinosa) unitamente a semine e raccolte anticipate. Interessanti anche i dati dei singoli ibridi che dovrebbero essere riconfermati nei prossimi anni anche su altre micotossine.

P15 ESIGENZE ECOLOGICHE DI FUNGHI MICOTOSSIGENI ASSOCIATI AI FORMAGGI

Decontardi S. (a), Camardo Leggieri M. (a), Bertuzzi T. (b), Pietri A. (b), Battilani P. (a)
(a) Dipartimento di Scienze delle Produzioni Vegetali Sostenibili, Università Cattolica del
Sacro Cuore, Piacenza
(b) Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione, Università Cattolica del Sacro
Cuore, Piacenza

Diversi funghi del genere *Aspergillus* e *Penicillium* possono crescere su formaggi e contribuiscono alle caratteristiche proprie del prodotto, ma talvolta causano effetti negativi quali la presenza di micotossine. Recentemente, Ocratossina A (OTA), Sterigmatocistina (STC), Roquefortina C (ROQ-C), Acido Micofenolico (MPA), Citrinina (CIT) e Acido Ciclopiazonico (CPA), sono state rilevate in diversi studi condotti su formaggi. Benché OTA e STC siano incluse nel gruppo 2B (possibili cancerogeni per l'uomo) secondo IARC (1993, 1987), non esiste una regolamentazione europea in merito. Le conoscenze relative ai fattori ecologici che influenzano l'attività dei funghi citati sono piuttosto limitate. Lo scopo principale di questo lavoro, quindi, è stato quello di: i) definire le esigenze ecologiche (temperatura, T ; acqua libera, a_w) di otto specie fungine, tra cui *A. versicolor*, *P. camemberti*, *P. citrinum*, *P. crustosum*, *P. nalgiovense*, *P. nordicum*, *P. verrucosum* e *P. roqueforti* e verificarne la capacità di produrre micotossine (STC, CPA, CIT, OTA, ROQ – C, MPA); ii) sviluppare equazioni matematiche per descrivere l'attività dei funghi in relazione a T e a_w . Lo sviluppo dei funghi è stato studiato *in vitro* su substrato artificiale (Czapek Yeast Agar, CYA) a diverse T tra 5 °C e 40 °C (step 5 °C; $a_w=0,99$) e a diverse a_w , comprese tra 0,87 e 0,99, (step 0,03; $T=20$ °C). Dopo 3, 7, 10 e 14 giorni di incubazione è stato misurato il diametro delle colonie e a 14 giorni la produzione di micotossine. I risultati ottenuti hanno mostrato crescita tra 5 e 35 °C, tranne per *A. versicolor* e *P. camemberti*, con 10-30 °C e 5-25 °C, rispettivamente. L'optimum di crescita è stato invece 25 °C, eccetto per *P. citrinum* (30 °C), *P. nordicum* e *P. verrucosum* (20 °C). Riguardo all' a_w , l'intervallo di crescita è stato tra 0,87 e 0,99 per *A. versicolor*, *P. citrinum*, *P. nalgiovense*, *P. roqueforti* e *P. verrucosum*, mentre le altre specie sono risultate più sensibili alle basse a_w . L'optimum di crescita è stato 0,99 per tutte le specie tranne *A. versicolor*, con $a_w=0,96$. La crescita delle colonie è stata descritta i) dalla funzione Bete di Analitys, per T e ii) dalla logistica per a_w . Per la produzione di micotossine, nonostante il range di condizioni utili sia stato variabile, la condizione ottimale è 15-25 °C; fanno eccezione *P. camemberti* (optimum per CIT: 5 °C) e *P. citrinum* (optimum per CIT: 30 °C). Riguardo ad a_w , l'optimum di produzione è 0,99 per tutte le specie e le tossine (tranne MPA: $a_w=0,96$). Queste informazioni costituiscono una buona base per prevedere le condizioni di rischio di contaminazione da micotossine nei formaggi in relazione alle condizioni degli ambienti di stagionatura. Questi dati dovranno essere confermati da ulteriori studi con inoculi su formaggi per avvicinare maggiormente le stime ai dati reali.

P16 MONITORAGGIO DELLO SVILUPPO DI FUNGHI TOSSIGENI SU AGRUMI IN POST-RACCOLTA

Del Fiore A., De Rossi P., Nobili C.

Laboratorio Sostenibilità, Qualità e Sicurezza delle Produzioni Agroalimentari, ENEA Casaccia, Roma

La filiera dei prodotti ortofrutticoli, in particolare del mezzogiorno d'Italia, è una delle più importanti del Settore Agroalimentare italiano. Una delle principali problematiche dei prodotti ortofrutticoli è rappresentata dalla contaminazione da funghi tossigeni, che oltre a determinare gravi degradazioni sensoriali, possono costituire una fonte di rischio per la salute umana ed animale. Diverse specie fungine sintetizzano infatti, in particolari situazioni ambientali, alcuni metaboliti secondari a basso peso molecolare ed elevata stabilità chimica, le micotossine, che possono determinare situazioni di micotossicosi. Lo sviluppo fungino e la formazione di micotossine possono avvenire sia in campo, che nelle fasi successive di trasformazione e conservazione. Negli agrumi le contaminazioni da *Penicillium digitatum* (*green mould*), possono determinare perdite significative di prodotto durante le fasi di post-raccolta. Obiettivo del presente lavoro è stata la messa a punto di tecniche biomolecolari (PCR *Real time*) per la precoce determinazione di questi fitopatogeni negli agrumi durante le fasi di stoccaggio. Le attività sperimentali sono state condotte sul "Mandarino Tardivo di Ciaculli", appartenente alla famiglia delle Rutacee specie *Citrus reticulata*. I mandarini sono stati inoculati artificialmente con *Penicillium digitatum* (proveniente dalla collezione del centro ENEA Trisaia) in condizioni controllate ed è stato monitorato il progredire dell'infezione nelle condizioni di trasporto. Il metodo PCR *Real time* messo a punto si è dimostrato sensibile e specifico per una valutazione quali-quantitativa dell'entità della patogenesi. Le attività del presente lavoro sono state svolte nell'ambito del PROGETTO ORTOFRULOG, "Piattaforma logistica innovativa per le produzioni ortofrutticole nazionali destinate ai mercati interni ed esterni", finanziato dal Ministero dello Sviluppo Economico attraverso il bando "Industria 2015".

P17 LIVELLI DI AFLATOSSINE SIERICHE ED URINARIE IN SOGGETTI CHE ASSUMONO CIBI POTENZIALMENTE CONTAMINATI

Ferri F. (a), Brera C. (b), De Santis B. (b), Collini G. (c), Crespi E. (a), Giorgi Rossi P. (c), Luberto F. (c), Gargano A. (a), Gattei D. (a), Magnani I. (a), Mancuso P. (c), Mozzanica S. (a)

(a) *SPSAL AUSL Reggio Emilia, Scandiano, Reggio Emilia*

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

(c) *Servizio Interaziendale di Epidemiologia, Azienda Unità Sanitaria Locale e Azienda Ospedaliera, IRCCS, Reggio Emilia*

Le aflatossine, micotossine prodotte da due specie di *Aspergillus*, un fungo che si trova in particolare nelle aree caratterizzate da un clima caldo e umido, sono note per le loro proprietà genotossiche e cancerogene. L'esposizione sia professionale, sia attraverso gli alimenti, a seguito di contaminazioni di derrate alimentari avvenute prima e dopo la raccolta, deve essere il più possibile limitata. L'Unione Europea ha introdotto misure, volte a ridurre al minimo la presenza di aflatossine in diversi prodotti alimentari quali arachidi, frutta a guscio, granoturco, riso, fichi e altra frutta secca, spezie, oli vegetali. La ricerca nei fluidi biologici (siero/urina) delle aflatossine stesse o dei loro biomarcatori è un valido sistema per la valutazione del rischio di assorbimento avvenuto sia per via respiratoria in ambito professionale, sia per via alimentare, come avviene nella popolazione generale. Nell'ambito di un'indagine per valutare l'esposizione ad aflatossine di lavoratori esposti a mais contaminato, sono stati testati campioni di individui non esposti, come controlli, per valutare il livello di aflatossine nella popolazione generale. In questo lavoro si valuta l'associazione fra livello di aflatossine urinarie e l'assunzione di alimenti notoriamente a rischio di contaminazione. Lo studio è stato condotto nell'aprile 2014. Il campione, estratto casualmente, consisteva di 29 lavoratori professionalmente esposti in un mangimificio e in un'azienda di essiccamento/cernita di granaglie e di 30 controlli non esposti, 21 operatori del Dipartimento di Sanità Pubblica dell'Azienda USL di Reggio Emilia e 9 impiegati amministrativi del mangimificio. Previo consenso informato, ad entrambi i gruppi, il lunedì e il venerdì successivo, è stato somministrato un questionario ed effettuato un prelievo di sangue e delle urine. Le ricerche di aflatossina B1 (AfB1), B2 (AfB2), G1 (AfG1), G2 (AfG2), Aflatoxina M1 (AfM1) e Aflatoxina (AfOH), nel siero e nelle urine sono state eseguite dal Laboratorio di Riferimento Nazionale per le Micotossine dell'ISS di Roma. Si riportano qui i risultati per l'AfM1, il biomarcatore riscontrato più frequentemente. Il questionario ha rilevato l'assunzione, nei quattro giorni precedenti il prelievo, di alimenti considerati particolarmente a rischio di contaminazione (frumento e altri cereali, mais, riso, spezie, frutta secca, frutta disidratata), di alimenti non a rischio (pesce, molluschi o crostacei, carni fresche, frutta fresca), di altri alimenti in cui la contaminazione è improbabile, ma non da escludere completamente (fegato bovino/suino, latte fresco, formaggi freschi e stagionati). Il rischio "alimentare" è stato opportunamente pesato, integrando il fattore "quantità" di cibo a rischio di contaminazione e il fattore "latenza" (tra momento di assunzione e quello del prelievo). I valori di aflatossine nei soggetti non

professionalmente esposti sono stati utilizzati per stimare il livello di assorbimento nella popolazione generale associata all'esposizione alimentare. Nessun campione di siero è risultato positivo alla ricerca delle Aflatossine testate. La presenza di AfM1 nei controlli, rilevato attraverso i campioni urinari, ha portato a verificare la presenza di eventuali associazioni rilevanti fra assunzione di cibi a rischio di contaminazione e i valori di AfM1. Si è evidenziata una relazione significativa tra presenza di AfM1 nelle urine e consumo di spezie nel gruppo dei non esposti, in particolare per il consumo di peperoncino e "altre spezie". Nel contempo non si è rilevata alcuna relazione significativa con il consumo di pepe, zenzero e noce moscata. Si è evidenziato un aumento di circa 0,2 ng/mL di AfM1 nelle urine tra coloro che consumano un quantitativo minimo di peperoncino e i forti consumatori (Coef. 0,06; IC95% 0,02-0,09) e di circa 1 ng/mL per le "altre spezie" (Coeff. 0,39; IC95% 0,18-0,62). In entrambi i gruppi, nessuno degli alimenti non a rischio e di quelli in cui la contaminazione è improbabile, è risultato associato alla presenza di AfM1 nelle urine. Lo studio dell'associazione fra cibi a rischio di contaminazione ed effettivo assorbimento di aflatossine nella popolazione generale deve tener conto del fatto che la contaminazione dei cibi, almeno nella nostra realtà, è un evento casuale e di cui il consumatore non può aver alcuna consapevolezza; ciò rende questa associazione difficile da studiare tramite indagini campionarie con questionario alimentare. Ciononostante abbiamo riscontrato una forte associazione fra aflatossine urinarie e consumo di spezie. Infine, i dati suggeriscono che eventuali interventi di monitoraggio biologico in popolazioni professionalmente esposte ad aflatossine devono tenere conto di un eventuale apporto alimentare che può agire come fattore di confondimento.

P18 LIVELLI SIERICI ED URINARI DI AFLATOSSINE IN LAVORATORI PROFESSIONALMENTE ESPOSTI E IN UN GRUPPO DI CONTROLLO

Ferri F. (a), Brera C. (b), De Santis B. (b), Collini G. (c), Crespi E. (a), Giorgi Rossi P. (c), Luberto F. (c), Gargano A. (a), Gattei D. (a), Magnani I. (a), Mancuso P. (c), Mozzanica S. (a)

(a) SPSAL, AUSL Reggio Emilia, Scandiano, Reggio Emilia

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

(c) Servizio Interaziendale di Epidemiologia, Azienda Unità Sanitaria Locale e Azienda Ospedaliera, IRCCS, Reggio Emilia

La disastrosa siccità che ha caratterizzato la campagna agricola del 2012 ha prodotto un esteso ed elevato inquinamento da aflatossine del mais, ponendo all'attenzione dei Servizi di Prevenzione delle AUSL la possibilità, per i lavoratori delle aziende della filiera agroalimentare, di una sensibile esposizione professionale, per via inalatoria, a polveri di cereali e di farine contaminate da tale cancerogeno. Si può prefigurare un sistema di controllo dell'avvenuto assorbimento di tali sostanze tossiche da parte dei lavoratori fondato sulla ricerca nei fluidi biologici (siero/urina) delle stesse Aflatossine o di loro metaboliti (ad es. Aflatossicolo), tenuto conto anche della effettiva esposizione a polveri potenzialmente contaminate. Lo studio è stato condotto nell'arco di due settimane, all'inizio di aprile 2014. È stato estratto un campione casuale di 29 lavoratori di due aziende, fra quelli professionalmente esposti (E.) a polveri di cereali: 26 lavoratori di un mangimificio 3 di un'azienda di essiccamento e cernita granaglie. Nel contempo sono stati estratti casualmente, come controlli non professionalmente esposti (N.E.), 30 soggetti maschi (21 gli operatori del Dipartimento di Sanità Pubblica dell'AUSL di RE e 9 impiegati amministrativi del mangimificio). L'indagine si è articolata in due fasi:

- somministrazione di un questionario sull'assunzione di alimenti nei quattro giorni precedenti e stima delle quantità consumate;
- prelievo di sangue e consegna di un campione delle prime urine del mattino, nello stesso giorno della somministrazione del questionario, il lunedì mattina (dopo due giorni di riposo e di assenza di esposizione professionale per i dipendenti delle aziende a rischio) e il venerdì mattina (dopo l'esposizione lavorativa della settimana).

Le analisi sui campioni raccolti sono state condotte "in cieco". I campioni ematici sono stati raccolti utilizzando due provette criogeniche da 10 cc con tappo a vite. L'analisi è stata eseguita dal Laboratorio di Riferimento Nazionale per le Micotossine dell'ISS di Roma. L'indagine si è focalizzata sull'analisi dei seguenti biomarcatori: Aflatossina B1 (AfB1), B2 (AfB2), G1 (AfG1), G2 (AfB1), Aflatossina M1 (**AfM1**) e Aflatossicolo (AfOH), nel siero e nelle urine. Si riportano qui i risultati per l'**AfM1**, il biomarcatore riscontrato più frequentemente. Per i campioni negativi, cioè al di sotto della soglia di rilevazione per l'**AfM1** (0,002 ng/mL) è stata posta una concentrazione pari a 0 ng/mL.

Analisi del siero: nessun campione di siero, sia tra gli E. che tra i N.E., è risultato positivo alla ricerca delle Aflatossine testate.

Analisi delle urine: dei 118 campioni urinari analizzati, il 73,7% (n=87) è risultato positivo all'**AfM1**, 41 negli esposti e 46 nei non esposti. Inoltre, 13 sono risultati positivi alla AfG2, un campione è risultato positivo alla AfG1, uno alla AfB2 e uno alla AfB1; nessun campione è risultato positivo alla presenza di AfOH. La quantità media di AfM1 nei campioni, inclusi i negativi, era di **0,031 ng/mL** (*range*: 0-0,399 ng/mL; DS=0,056); di **0,035 ng/mL** negli esposti (*range*: 0-0,399 ng/mL; DS=0,064) e di **0,027 ng/mL** (*range*: 0-0,259ng/mL; DS=0,046) nei non esposti (p=0,21); i 9 campioni con AfM1>0,1 provenivano da 5 soggetti esposti e 4 non esposti. La concentrazione media di **AfM1** nei campioni positivi prelevati il lunedì è **0,031 ng/mL** e nei campioni positivi prelevati il venerdì **0,040 ng/mL** fra gli esposti (p=0,27); anche fra i non esposti la concentrazione è leggermente più bassa il lunedì rispetto al venerdì (p=0,32). Dall'analisi dei campioni ematici è emerso che in nessuno di essi, all'interno dei gruppi confrontati (E. vs N.E.) è stato possibile rilevare, con le metodiche utilizzate, la presenza di aflatossine. Per quanto riguarda i campioni di urine, i valori medi di aflatossine urinarie negli E. (**AfM1**) sono lievemente più elevati rispetto ai N.E., ma in modo non significativo, inoltre i campioni con concentrazione maggiore si trovano indifferentemente fra i due gruppi. La concentrazione di **AfM1** aumenta leggermente tra il lunedì e il venerdì successivo, sia fra gli E. che tra i N.E., sebbene, in questi ultimi, in modo minore. Nel complesso, tutte le differenze fra i due gruppi sono compatibili con oscillazioni casuali, sebbene tutte le differenze osservate vadano nella direzione di una maggiore concentrazione media nei campioni dei lavoratori esposti. I livelli di assorbimento dei soggetti esposti per ragioni professionali, quindi, appaiono piuttosto limitati e, comunque, dello stesso ordine di grandezza riscontrabile in un gruppo di controllo esposto ad aflatossine unicamente per via alimentare.

P19 MONITORAGGIO MICOTOSSINE: ATTIVITÀ 2011-2014 DEL POLO ALIMENTI ARPA PUGLIA DI BARI

Ferrieri F., Amenduni M.C., Barisonzo M., Corte G., Intini N., Leonetti E., Lo Greco F., Palma M., Pinto A., Rizzi F., Sabino N., Santoro T., Ventrella A., Fiume F., Blonda M., Assennato G.

ARPA Puglia, Bari

Il Polo di Specializzazione Alimenti di Bari - ARPA Puglia conduce da diversi anni, su scala regionale, il monitoraggio delle micotossine in diverse tipologie di alimenti di origine vegetale, analizzando con metodi accreditati campioni prelevati dalle ASL nell'ambito di piani regionali di controllo ufficiale, dagli USMAF nell'ambito del controllo sulle merci di importazione e dai Carabinieri del NAS. Nel periodo 2011-2014 sono stati analizzati 656 campioni costituiti da vini (49%), frutta secca e a guscio (20%), cereali e prodotti derivati (18.5%), altre bevande alcoliche (8%), spezie e caffè (4%), *baby food* (<1%). Risultano quindi effettuate complessivamente 2.119 determinazioni analitiche riguardanti Aflatossine B1, B2, G1, G2, Ocratossina A (OTA), Deossinivalenolo (DON) e Zearalenone (ZEA). Circa il 33% dei campioni ed il 50% delle determinazioni del quadriennio sono da attribuire al solo anno 2014, il che evidenzia il progressivo potenziamento della linea analitica "micotossine", in ottemperanza alle sempre più specifiche richieste derivanti dai Programmi di controllo ufficiale. La consistente percentuale dei campioni di vino evidenzia l'attenzione rivolta a questa matrice alimentare di importanza rilevante per il territorio regionale. Il 31% dei campioni esaminati è risultato naturalmente contaminato, ossia con livelli quantificabili delle micotossine ricercate. La distribuzione di tali positività è risultata la seguente: vini (63%), cereali e derivati (24%), frutta secca e a guscio (6,5%), spezie (4%), *baby food* (1,5%), altre bevande alcoliche (1%). Soltanto il 2.5% delle positività ha portato a casi di "non conformità", tutti riguardanti la categoria "frutta secca e a guscio". Si tratta di 4 campioni in transito provenienti da Paesi terzi (Uzbekistan, Tajikistan, Afghanistan) costituiti da noccioli di albicocca e mandorle, con livelli di Aflatossine fino a 8 volte il tenore massimo consentito, e di un campione di pistacchi prelevato alla distribuzione ma di origine extracomunitaria (Iran) con un livello di contaminazione doppio rispetto al limite di legge. Quest'ultimo caso ha portato all'attivazione del "Sistema di Allerta Rapido per gli Alimenti e i Mangimi" (RASFF). Relativamente alla matrice "vino" largamente campionata, le positività sull'OTA sono risultate circa il 40%, di cui: vini rossi (76%), rosati (17%), bianchi (6%). Circa l'8% dei campioni naturalmente contaminati ha presentato livelli superiori a 1 ug/L ed in nessun caso si è verificato superamento del limite di legge (2 ug/L). Relativamente al monitoraggio del DON, è stata riscontrata una larga percentuale di positività (51%), soprattutto su grani di importazione (circa il 71% delle positività). In particolare, i livelli più alti di contaminazione, sono stati riscontrati su campioni di grano del 2014 importati dal Nord America.

P20 EFFICACIA E SICUREZZA D'USO DI PRODOTTI COMMERCIALI PER LA RIDUZIONE DELLA CONTAMINAZIONE DA MICOTOSSINE

Greco D., Minervini F., Garbetta A., Avantaggiato G.

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

Tra i metodi fisici di detossificazione delle micotossine presenti nei mangimi, l'aggiunta di adsorbenti rappresenta il metodo più innovativo ed efficace per ridurre i rischi di micotossicosi ed evitare il trasferimento di tossine in prodotti di origine animale. Da decenni centinaia di questi materiali sono disponibili sul mercato. La maggior parte di essi rivendica capacità multi-sequestranti. Tuttavia, solo di recente il loro uso è stato regolamentato (Regolamento CE 386/2009), mentre molti di essi sono stati esaminati solo *in vitro* e limitatamente all' AFB_1 . Poche informazioni sono disponibili per altre micotossine come OTA, FB_1 , ZEA e tricoteceni. Il presente studio ha, quindi, esaminato l'efficacia dei principali prodotti commerciali disponibili sul mercato europeo, provenienti da 26 partner industriali, a sequestrare micotossine strutturalmente diverse. In base a quanto riportato nelle specifiche tecniche dei prodotti e il loro contenuto in ceneri, i materiali sono stati classificati come minerali (ceneri >90%, fillosilicati e tettosilicati), materiali organici (ceneri <15%, lieviti e estratti vegetali) o loro miscele (ceneri 40-90%). Tutti i prodotti sono stati preliminarmente saggiati allo 0.1% (w/v) di dosaggio, nei confronti di una soluzione contenente 1 $\mu\text{g/mL}$ di AFB_1 , ZEA, OTA, FB_1 , DON, T-2 e HT-2, preparata in tampone a pH3 o pH7 al fine di simulare il pH di stomaco e piccolo intestino. Per i 52 materiali esaminati, l'adsorbimento diminuiva nell'ordine $AFB_1 > FB_1 > ZEA > OTA$. Ad eccezione del carbone attivo, tutti hanno mostrato una scarsa efficacia nei confronti dei tricoteceni (in particolare di HT-2 e DON). I prodotti a base di minerali, puri o in miscela, adsorbivano preferibilmente AFB_1 ad entrambi i valori di pH; OTA e FB_1 al solo pH gastrico. I tettosilicati (zeoliti, clinoptiloliti) sono risultati meno efficaci dei fillosilicati (bentoniti). I prodotti a base di parete cellulare di lievito (contenuto in ceneri <15%) adsorbivano unicamente lo ZEA. Per molti dei prodotti commercializzati come lieviti (o derivati), l'adsorbimento di AFB_1 era correlato al contenuto in ceneri. Infine, dei 52 prodotti presi in esame, solo 4 sono risultati capaci a sequestrare simultaneamente AFB_1 , ZEA, OTA, FB_1 e T-2. Analisi chimico-fisiche e spettroscopiche (XRF, XRD) hanno rilevato che 3 dei 4 prodotti selezionati come migliori adsorbenti erano, a differenza di quanto dichiarato dai fornitori, bentoniti organofile funzionalizzate con sali di ammonio quaternari (non ammessi in mangimistica poiché tossici). Lo studio del meccanismo di adsorbimento e la determinazione dei parametri di adsorbimento (capacità massima, affinità e indice di chemio-adsorbimento) ha evidenziato che le 3 bentoniti organofile erano adsorbenti deboli e di scarsa efficacia. In aggiunta, saggi biologici hanno confermato la spiccata tossicità di due delle bentoniti organofile selezionate e di un materiale a base di lievito. In conclusione, il presente lavoro ha evidenziato come non siano ancora disponibili in commercio materiali adsorbenti capaci di sequestrare, simultaneamente, le principali micotossine di interesse zootecnico. La totalità di essi ha mostrato scarsa efficacia nell'adsorbire i tricoteceni.

L'identità/composizione dei prodotti commerciali potrebbe essere, in alcuni casi, contraffatta e fuorviante. Alcuni prodotti commerciali potrebbero, addirittura, risultare tossici se analizzati mediante biosaggi di tossicità.

P21 SOTTOPRODOTTI AGROINDUSTRIALI QUALI ADDITIVI DI MANGIMI PER LA RIDUZIONE DELLA CONTAMINAZIONE DA MICOTOSSINE

Greco D., Damascelli A., Grieco F., Avantaggiato G.

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

L'aggiunta di materiali adsorbenti a mangimi contaminati da micotossine rappresenta un approccio nutrizionale innovativo per contenere l'insorgenza di micotossicosi in animali in allevamento ed evitare, a causa del fenomeno del *carry-over*, il trasferimento di tossine in prodotti di origine animale (latte, carne, uova). In accordo al Regolamento CE 386/2009, questi additivi tecnologici sono da intendere come sostanze in grado di inibire o ridurre l'assorbimento delle micotossine, di promuoverne l'escrezione o di modificarne il meccanismo di azione e la tossicità. L'arricchimento dei mangimi contaminati da micotossine con sottoprodotti dell'agricoltura può essere considerato una strategia per ridurre i potenziali rischi di micotossicosi. Sebbene ci siano alcuni studi che evidenziano la capacità di materiali di origine vegetale, ad alto contenuto di fibra, di contrastare gli effetti tossici di ZEA e tossina T-2 in suini, ad oggi non sono disponibili informazioni a riguardo dell'efficacia delle fibre alimentari ad adsorbire, simultaneamente, le principali micotossine. Il presente lavoro di ricerca ha, quindi, esaminato la capacità di 52 materiali (sottoprodotti dell'agricoltura o delle lavorazioni industriali) ad adsorbire AFB₁, ZEA, OTA, FB₁ e DON, da soluzioni multi-tossine preparate a valori di pH tipici del tratto gastroenterico dei monogastrici (pH3 e pH7). I sottoprodotti presi in esame sono stati scelti per l'alto contenuto di fibre insolubili e sono stati sottoposti ad essiccamento mediante calore, macinazione e setacciatura, al fine di ottenere polveri con granulometria molto fine (<100 µm) da usare per saggi di adsorbimento. Vinacce esauste ottenute da diverse varietà di uva rossa e bianca, sottoprodotti della lavorazione del carciofo (gambi e foglie) e delle mandorle (mallo) sono stati selezionati come migliori adsorbenti. Ad un dosaggio relativamente basso (2% in peso corrispondente a 20 kg/ton), questi materiali adsorbivano fino al 95% di AFB₁, 83% di ZEA, 83% di OTA e 47% di FB₁ da una soluzione contenente 1 µg/mL di ciascuna tossina. Nessun materiale è risultato in grado di sequestrare il DON. I valori più alti della capacità massima di adsorbimento (calcolata mediante isoterme all'equilibrio) sono stati registrati per la vinaccia e corrispondevano a 3.0 µg di AFB₁, 2.7 µg di ZEA, 2.8 µg di OTA e 1.2 µg di FB₁ adsorbita per mg di materiale. Questi valori sono risultati paragonabili, o addirittura più alti, di quelli ottenuti con prodotti commercializzati come adsorbenti di micotossine. In conclusione, il presente lavoro suggerisce che alcuni degli scarti dell'agricoltura potrebbero trovare un'importante applicazione come additivi di mangimi, a basso costo, potenzialmente in grado di prevenire gli effetti tossici delle micotossine negli animali in allevamento sia mediante riduzione dell'assorbimento gastrointestinale che arricchimento dei prodotti alimentari con importanti fattori nutrizionali dalle note proprietà anti-ossidanti e immunostimolanti.

P22 INTEGRATORI ALIMENTARI E MICOTOSSINE. DETERMINAZIONE MEDIANTE HPLC-FL E VALIDAZIONE IN-HOUSE

Gregori E., Passaretti I., Debegnach F., Rizzo M., De Santis B., Moracci G., Brera C.
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La gamma degli integratori alimentari è in continuo cambiamento e diversificazione e sta registrando un sempre più crescente consumo in base alle dichiarate proprietà salutistiche che li contraddistinguono. Per la legislazione italiana ed europea l'integratore è considerato un "alimento destinato ad una alimentazione particolare" (Direttiva 2002/46/CE), il che comporta l'assoggettamento di tali prodotti alla rigorosa e strutturata normativa del diritto alimentare. La qualità di un integratore passa per il controllo delle caratteristiche organolettiche e della garanzia della materia prima impiegata, intesa come sicurezza di utilizzo di una determinata pianta e/o suo sottoprodotto. Inoltre, come per tutti gli alimenti, la qualità di un integratore, che deve essere garantita lungo tutta la filiera di produzione, passa per il controllo della sicurezza dei componenti, intesa come controllo delle possibili contaminazione chimiche, biologiche e fisiche. I prodotti a base di piante o estratti di piante, inclusi nella classe degli integratori alimentari, possono essere soggetti durante il raccolto e lo stoccaggio alla contaminazione da funghi di vario genere e di conseguenza alla contaminazione da parte delle micotossine. Per questo motivo sia per i laboratori per autocontrollo sia per quelli pubblici è indispensabile disporre di metodi veloci e pratici per la determinazione delle diverse micotossine in questa classe di alimenti. Storicamente i metodi più utilizzati per la determinazione delle micotossine in matrici di origine vegetale sfruttano le colonnine di immunoaffinità nella fase di purificazione, e per la rivelazione la tecnica HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) con diversi rivelatori, principalmente UV e spettrofluorimetrico. Il primo metodo proposto permette la determinazione simultanea delle aflatossine e della ocratossina A in integratori alimentari a base di ginseng, utilizzando un sistema HPLC con rivelazione spettrofluorimetrica. Il secondo metodo, sempre con sistema HPLC e rivelazione spettrofluorimetrica, è stato messo punto per la determinazione della citrinina in campioni di riso rosso fermentato commerciali e non. Entrambi i metodi sono stati validati con l'approccio *in house* ottenendo risultati più che soddisfacenti e in linea con il Reg. (CE) 401/2006 e s.m.

P23 IMMUNOSAGGI BASATI SULLA POLARIZZAZIONE DI FLUORESCENZA PER LA DETERMINAZIONE DELLE TOSSINE T-2 E HT-2 IN AVENA, ORZO, SEGALE E PRODOTTI A BASE DI CEREALI

Lippolis V., Porricelli A.C.R., Cortese M., Valenzano S., Pascale M.

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

Fra i cereali maggiormente soggetti a contaminazione da tossine T-2 e HT-2 ritroviamo avena, frumento, orzo e segale. A causa della limitate informazioni disponibili in merito alla presenza delle due tossine in cereali e prodotti derivati in Europa, recentemente la Commissione Europea ha evidenziato la necessità di raccogliere dati supplementari sull'incidenza della contaminazione per una completa valutazione del rischio, ai fini della salvaguardia della salute umana ed animale. Per tale ragione, assume notevole rilevanza la necessità di sviluppare nuovi metodi rapidi, sensibili ed accurati per la loro determinazione sia in cereali non processati che nei relativi prodotti finiti. Nell'ambito di tali metodi risulta crescente l'attenzione verso gli immunosaggi in fase omogenea basati sulla Polarizzazione di Fluorescenza (FP), vista la loro semplicità di utilizzo, rapidità, affidabilità ed economicità. A tal proposito, sono stati sviluppati e validati immunosaggi FP per la determinazione rapida e quantitativa di tossine T-2 e HT-2 (espressa come somma delle due tossine) in avena, segale, orzo, pasta, fiocchi di avena e prodotti da forno a base di avena (*oats crispbread*). I campioni sono estratti con una miscela metanolo/acqua (90:10, v/v), successivamente filtrati, diluiti con una soluzione acquosa di cloruro di sodio ed infine analizzati mediante l'immunosaggio FP. I valori dei recuperi medi ottenuti per tutte le matrici analizzate rientrano nell'intervallo tra 101% e 107% e presentano deviazioni standard relative inferiori al 6%. I limiti di determinazione (LODs) degli immunosaggi FP sviluppati risultano pari a 70 µg/kg per avena, 40 µg/kg per fiocchi di avena e orzo, 25 µg/kg per pasta e 20 µg/kg per segale e prodotti da forno a base di avena. Infine, è stata osservata una buona correlazione ($r > 0,953$) tra il contenuto delle tossine T-2 e HT-2 in campioni di avena, orzo, fiocchi di avena e pasta naturalmente ed artificialmente contaminati ottenuto mediante gli immunosaggi FP sviluppati ed il metodo UHPLC con purificazione con colonnine ad immunoaffinità (metodo di riferimento). In conclusione, tali risultati combinati con la rapidità (10-15 minuti) e semplicità del protocollo messo a punto, dimostrano che i saggi sviluppati possono essere applicati sia per uno screening rapido, sia per una determinazione quantitativa delle tossine T-2 e HT-2 in campioni di avena, orzo, segale e prodotti a base di cereali.

P24 METODO E-NOSE CON TECNOLOGIA MOS PER LO SCREENING DI CRUSCA DI FRUMENTO CONTAMINATA DA DEOSSINIVALENOLO

Lippolis V., Cervellieri S., Damascelli A., Bernardi N., De Girolamo A., Pascale M.
Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari

Negli ultimi anni il consumo di alimenti a base di crusca ha avuto un notevole incremento grazie al loro apporto di fibre, acidi grassi essenziali, amido, proteine, vitamine e minerali. Tuttavia diversi studi hanno anche dimostrato che la crusca di frumento duro e i prodotti derivati risultano essere frequentemente contaminati da Deossinivalenolo (DON), una micotossina prodotta da funghi del genere *Fusarium*. Al fine di proteggere la salute del consumatore dall'esposizione al DON, la Commissione Europea ha fissato i limiti massimi ammissibili di DON in diversi prodotti, tra cui la crusca destinata al consumo umano diretto. I metaboliti fungini volatili sono stati utilizzati come indicatori della contaminazione da micotossine in cereali. A tal proposito, è stato sviluppato un metodo rapido, di facile realizzazione e non-distruttivo basato sull'impiego di un naso elettronico (*e-nose*) con sensori a tecnologia MOS (*Metal Oxide Semiconductors*) per distinguere campioni di crusca di frumento duro sulla base del contenuto di DON. In particolare i campioni, analizzati con metodo HPLC di riferimento, sono stati distinti in due classi: classe A ([DON] ≤ 400 $\mu\text{g/kg}$) e classe B ([DON] > 400 $\mu\text{g/kg}$). Lo sviluppo del metodo analitico è stato condotto su 410 campioni di crusca di frumento duro naturalmente contaminato da DON con livelli fino a 1.600 $\mu\text{g/kg}$. L'analisi statistica multivariata, condotta mediante *Discriminant Function Analysis* (DFA), ha fornito un modello di calibrazione che permette di classificare i campioni di crusca con una percentuale di riconoscimento totale dell'89%. I campioni in classe A e classe B sono stati riconosciuti con percentuali rispettivamente dell'88% e 91%. La validazione del modello è stata condotta mediante procedura di cross-validazione (*leave-more-out*) escludendo in maniera *random* il 30% dei campioni dai dati in calibrazione e ponendo gli stessi in validazione. La percentuale di riconoscimento totale ottenuta in validazione è risultata pari all'87%, con valori percentuali simili per le classi A e B. È stato inoltre ottimizzato un metodo SPME-GC-MS per caratterizzare la componente volatile di campioni di crusca di frumento duro in presenza ed in assenza di contaminazione da DON. La componente volatile ottenuta è risultata composta da idrocarburi alifatici e aromatici, acidi, esteri, alcoli, aldeidi, chetoni, terpeni e composti furanici. È stato inoltre identificato un *pattern* di 8 molecole aventi correlazione positiva con il contenuto di DON, quali il 2-metil-1-propanolo, γ -caprolattone, 1-pentanol, 1-otten-3-olo, esanale, 1-esanolo e tridecano o negativa come il 2-pentil-furano. Tali risultati confermano che il metodo *e-nose* sviluppato potrebbe essere un utile strumento per lo *screening* di DON in campioni di crusca di frumento duro.

P25 FUSARIUM SPP. NEL GRANO: SPME-GC-MS DELLA COMPONENTE VOLATILE PER L'INDIVIDUAZIONE DI INDICATORI D'INFEZIONE

Lupi F. (a), Palermo C. (a,b), Quinto M. (a,b), Nardiello D. (a,b), Mentana A. (a), Frisullo S. (a,b), Centonze D. (a,b)

(a) *Dipartimento di Scienze Agrarie degli Alimenti e dell'Ambiente, Università degli Studi, Foggia*

(b) *CSRA, Centro Servizi di Ricerca Applicata, Università degli Studi, Foggia*

Il frumento è una delle colture più suscettibili all'attacco da parte di funghi patogeni. Se si considera che i suoi prodotti di trasformazione sono alla base dell'alimentazione della gran parte della popolazione mondiale, risulta essere importante approfondire, in un'ottica di qualità e sicurezza alimentare, lo studio delle interazioni fungo-pianta, al fine di capirne i meccanismi e di prevenire la formazione di sostanze nocive, quali le micotossine. Individuare sostanze, naturalmente prodotte dalla pianta o dal fungo, che possano essere indice precoce della contaminazione fungina, prima ancora della produzione delle micotossine, può risultare la strategia vincente per ridurre le perdite di raccolto, garantendo l'assenza di micotossine nella granella e nei prodotti di trasformazione. Il *Fusarium* è tra i più importanti generi di funghi micotossinogeni che possono contaminare i prodotti alimentari. *Fusarium culmorum* e *Fusarium graminearum* colpiscono coltivazioni agricole e materie prime, contaminandole con produzione di tricoteceni, in particolare deossinivalenolo (DON) e i suoi acetil-derivati. La maggior parte delle metodiche analitiche attualmente impiegate sono state sviluppate per determinare le micotossine presenti nella granella e nei prodotti di trasformazione. Una volta verificata la presenza di micotossine a concentrazioni superiori al limite di legge, la partita di origine del prodotto deve essere distrutta, con danni enormi ai diversi attori della filiera. Lo scopo di questo studio è stato quello di caratterizzare le sostanze prodotte dalle interazioni fungo-pianta, al fine di individuare potenziali indicatori di infezione, che segnalino la presenza dei funghi micotossigeni, prima che essi inizino a produrre micotossine. In considerazione del fatto che molti funghi, come anche le piante, hanno la capacità di produrre composti organici volatili, è stata impiegata la microestrazione in fase solida nello spazio di testa (SPME) accoppiata alla gascromatografia con rivelazione in spettrometria di massa (SPE-GC-MS). Piante di grano sane e piante inoculate con *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum* nelle diverse fasi di crescita sono state monitorate dall'inoculo sino alla maturazione della granella. Oltre all'analisi della componente volatile, eseguita su campioni di foglie e spighe, sono stati effettuati degli isolamenti su piastra per valutare il livello di contaminazione fungina. I risultati ottenuti sono stati opportunamente trattati con approcci chemiometrici, quali quello delle componenti principali, al fine di individuare le sostanze prodotte come conseguenza dell'interazione fungo-pianta. L'approccio sviluppato ha fornito dei risultati che sembrano essere promettenti per la lotta contro gli attacchi fungini del grano e per il contenimento della contaminazione da micotossine. Sono in corso ulteriori studi sui metaboliti non volatili, al fine di verificare l'eventuale presenza di indicatori per una diagnosi precoce di attacco fungino.

P26 EFFETTO DEL TRATTAMENTO CON OZONO SULLA CONTAMINAZIONE DA FUNGHI E MICOTOSSINE IN CARIOSSIDI DI FRUMENTO

Pascale M. (a), Panzarini G. (a), Cervellieri S. (a), Prisciantelli C. (a), Lippolis V. (a), Ventura V. (b), Epifani F. (a), Perrone G. (a)

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

(b) CDP, Industrie Molitorie, Altamura, Bari

L'interesse per l'ozono quale agente sanitizzante nell'industria alimentare è aumentato negli ultimi anni in risposta ad una sempre crescente richiesta di una "chimica verde". L'ozono è infatti un composto rispettoso dell'ambiente in quanto si decompone rapidamente in ossigeno e non lascia residui negli alimenti. Tale gas è considerato un additivo alimentare GRAS (*Generally Recognised As Safe*) ed il suo utilizzo come additivo antimicrobico per il contatto diretto con gli alimenti è stato recentemente approvato dalla *Food and Drug Administration* (FDA). Recenti studi hanno mostrato come l'ozono sia efficace nel controllo di insetti, batteri e funghi e nel degradare pesticidi e micotossine che possono contaminare i cereali. Scopo del presente studio è stato quello di valutare l'effetto dei trattamenti con ozono gassoso a diverse concentrazioni (9,0-15,4-26,1 g/m³) e tempi di contatto (2-8-12-24 ore) sulla contaminazione da funghi filamentosi, lieviti e micotossine (in particolare deossinivalenolo e tossine T-2 e HT-2) in campioni di frumento duro utilizzando un prototipo di generatore di ozono progettato *ad hoc* per il trattamento delle cariossidi. È stato inoltre valutato l'effetto dei trattamenti su alcuni parametri di qualità del frumento, in particolare sul contenuto in ceneri, proteine, amido, fibra, glutine e indice di giallo. I trattamenti con ozono alle concentrazioni di 9,0 e 15,4 g/m³ non hanno evidenziato effetti significativi sulla contaminazione da funghi filamentosi e lieviti per tutti i tempi di contatto, rispetto al controllo non trattato. In tali condizioni operative è stata osservata una riduzione del contenuto di DON (fino al 19%), rispetto al controllo non trattato, già a partire dalle 8 ore di contatto. I trattamenti con ozono a concentrazioni maggiori (26,1 g/m³) hanno determinato sia una riduzione significativa della carica microbica già a partire dalle 2 ore, sia una maggiore riduzione del contenuto di DON, fino al 32%, a partire dalle 12 ore di trattamento. Non è stata invece osservata alcuna variazione significativa del contenuto di tossine T-2 e HT-2 per tutti i trattamenti. Nelle diverse condizioni sperimentali non sono state osservate variazioni significative dei parametri qualitativi del frumento.

Lavoro svolto nell'ambito del Progetto S.I.Mi.S.A. "Strumenti Innovativi per il Miglioramento della Sicurezza Alimentare: Prevenzione, Controllo, Correzione (PON02_00186_3417512).

P27 DETERMINAZIONE DI DEOSSINIVALENOLO E FORME MODIFICATE MEDIANTE KIT ELISA

Righetti L. (a), Rosar G. (b), Paleologo O.M. (b), Dall'Asta C. (a)

(a) *Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università degli Studi, Parma*

(b) *Tecna Srl, Area Science Park, Trieste*

Tra le micotossine che tipicamente possono essere ritrovate in cereali e derivati, il deossinivalenolo (DON) rappresenta il composto più diffuso, sia in forma parentale che nelle sue forme modificate. Solitamente questi composti vengono determinati mediante analisi LC-MS/MS multiresiduale. In previsione dell'introduzione di una possibile regolamentazione, vi è una richiesta di metodi di *screening* rapido in grado di determinare tutte le forme analoghe come somma delle stesse. Il possibile utilizzo di kit ELISA a tal scopo è stata oggetto di diversi studi, che hanno mostrato la cross reattività di molti anticorpi verso le forme 3-derivate (3-acetilDON e DON3Glc). Tali studi sono però solitamente condotti in tampone di analisi e in assenza di matrice. Pertanto, il bias di risposta che può essere introdotto nella misura di un campione reale è molto elevato. L'obiettivo del presente studio è stato quindi quello di verificare la possibile risposta di un kit commerciale ELISA per l'analisi del DON alle sue forme modificate, tenendo in considerazione l'effetto matrice. Lo studio è stato condotto su campioni di grano tenero naturalmente contaminato da DON e sue forme modificate precedentemente profilati tramite LC-MS. I risultati ottenuti mostrano che il kit è in grado di offrire elevata accuratezza di risposta in matrice in presenza del solo analita *target*, il DON. Quando però, oltre al DON, sono presenti le sue forme modificate, si registra un'apparente sovrastima della risposta, fortemente correlata alla presenza delle forme modificate. I risultati ottenuti indicano quindi come il kit ELISA possa essere visto non solo come un sistema accurato di determinazione rapida della forma parentale, ma anche come uno strumento di *screening* per l'intero gruppo di composti analoghi.

P28 BIODEGRADAZIONE DI OCRATOSSINA A PER *TRICHODERMA REESEI*

Scaglioni P.T., Kupski L., Badiale-Furlong E.
Universidade Federal do Rio Grand, FURG, Escola de Química e Alimentos, Rio Grande, Brasil

Le ocratossine sono un gruppo di composti tossici prodotti da funghi appartenenti ai generi *Penicillium* e *Aspergillus*; tra queste l'Ocratossina A (OTA) è il composto più tossico e comunemente ritrovato nei prodotti alimentari. L'OTA si caratterizza da un'elevata capacità ad accumularsi nei tessuti in quanto ha a un rapido assorbimento e una lenta eliminazione, pertanto è necessario individuare dei processi atti al controllo e alla riduzione della sua contaminazione nei prodotti alimentari frequentemente consumati. Esiste un crescente interesse per processi biologici basati su lieviti, batteri e funghi non tossigeni che agiscono idrolizzando il legame ammidico tra fenilalanina e isocoumarina formando l'Ocratossina alpha (OT α), un composto meno tossico. Questi microrganismi potrebbero essere impiegati nella produzione alimentare. In questo lavoro il fungo *Trichoderma reesei* QM 9414 è stato valutato come agente biodegradante di ocratossina. Questo microrganismo è stato incubato per 7 giorni a 30 °C su Potato Dextrose Agar (PDA) e le spore sono state prelevate con una soluzione allo 0,2% di Tween 80. La soluzione di spore contenente 4.106 spore/mL_{medium} è stata coltivata in piastre di Petri contenenti 15 mL di PDA e OTA a 1,5 mg/mL_{medium} (gruppo contaminata). Nel gruppo di controllo il solvente di micotossine è stato aggiunto al mezzo. Le piastre sono state incubate a 30 °C per 120 ore e ogni 24 ore piastre dei gruppi contaminati e di controllo sono state rimosse per determinare la concentrazione di OTA e OT α . La micotossina e i suoi metaboliti sono stati estratti mediante partizione con HCl e cloroformio e quantificati mediante HPLC-FL. La massima riduzione della concentrazione di OTA è stata del 58% dopo 72 ore. La presenza di OT α è stata osservata dopo 48 ore di cultura, con la concentrazione massima di 179,6 ng/g_{medium} in 72 ore, che è il 10% della concentrazione iniziale di OTA. Questa produzione ha un'elevata correlazione ($R=-0,958$; $p<0,05$) con la concentrazione di OTA. Pertanto il microrganismo considerato si evidenzia come un agente biologico promettente per la biodegradazione dell'OTA negli alimenti, mediante la sua trasformazione in un metabolita (OT α) che presenta effetti tossici inferiore. Sarà necessario valutare le condizioni operative migliori per ottimizzare la trasformazione di OTA in OT α nei diversi alimenti.

P29 INIBIZIONE DELLA PRODUZIONE DI TRICOTECENI USANDO COMPOSTI FENOLICI DI *SPIRULINA* SP.

Scaglioni P.T. (a), Pagnussatt F.A. (b), Badiale-Furlong E. (a)

(a) Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Escola de Química e Alimentos, Rio Grande, Brasil

(b) Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Câmpus Santo Antônio da Patrulha, Santo Antônio da Patrulha, Brasil

I composti fenolici estratti da piante e fonti microbiche hanno dimostrato la capacità di inibire la crescita di funghi e la produzione di micotossine. In questo lavoro l'obiettivo è stato quello di verificare l'azione degli estratti dall'alga *Spirulina* sp. LEB-18 sulla inibizione dei tricoteceni prodotti da *Fusarium graminearum* isolati da frumento. Sono state considerate due specie filogenetiche presenti con maggior frequenza nel sud del Brasile, *Fusarium graminearum* sensu stricto (*Fgra*) e *Fusarium meridionale* (*Fmer*), genotipi che producono 15-acetil-deossinivalenolo (15-AcDON) e nivalenolo (NIV), rispettivamente. In piastra di Petri (diametro 10 cm) l'estratto fenolico è stato aggiunto in concentrazione 3% (v/v) e 8% (v/v) su un terreno di coltura a base di Potato Dextrose Agar a 35 °C. I dischi miceliari di ciascuna specie fungina (1.1 cm di diametro) sono stati inoculati sul mezzo solido, al centro di ciascuna piastra. Le colture sono state incubate a 25 °C per 7 giorni. Le tesi sono state confrontate con un testimone in cui è stata aggiunta acqua sterile in sostituzione dell'estratto fenolico. L'estrazione di tricoteceni è stata eseguita secondo il metodo QuEChERS e la quantificazione eseguita mediante HPLC con rivelatore UV-visibile per NIV, DON, 3Ac-DON e 15-Ac-DON. Gli acidi fenolici presenti in *Spirulina* hanno alterato la via di sintesi di tricoteceni, probabilmente a causa della complessazione della proteina carrier con il composto fenolico. Nel testimone, l'isolato *Fmer*07Tr210 ha prodotto 30,2 ug g⁻¹ di NIV, mentre con la più alta concentrazione di estratto fenolico, la produzione è stata ridotta a 0,6 ug g⁻¹, evidenziando una riduzione del 98%. L'isolato *Fgra*08Tr022 ha prodotto 28,6 ug g⁻¹ da 15-Ac-DON nel testimone, mentre ad una concentrazione di estratto fenolico dell'8%, la produzione è stata ridotta a 6,1 ug g⁻¹, con attività inibitoria del 78%. Per entrambi gli isolati fungini l'efficacia è risultata essere simile anche quando è stata utilizzata una minore concentrazione di estratto fenolico. Questi risultati supportano l'idea che la miscela di acidi fenolici presenti nell'estratto da *Spirulina* eserciti un effetto sinergico sul metabolismo microbico, soprattutto in relazione alla sintesi del NIV, e che tale effetto antifungino sia indipendente dalla quantità di estratto applicato. Pertanto, i composti fenolici estratti da *Spirulina* sp. LEB-18 possono essere utilizzati per controllare la produzione di tricoteceni da specie di *Fusarium* che comunemente attaccano i cereali.

P30 EFFETTO DELL'AGROTECNICA SULLE MICOTOSSINE NUOVE ED EMERGENTI NEL FRUMENTO

Scarpino V. (a), Blandino M. (a), Marinaccio F. (a), Reyneri A. (a), Sulyok M. (b)
(a) *Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi, Torino*
(b) *Center for Analytical Chemistry, Department for Agrobiotechnology, IFA, Tulln, Austria*

La Fusariosi della spiga (FHB) è una delle principali malattie che colpiscono il frumento causando la contaminazione delle *Fusarium*-tossine, come il deossinivalenolo (DON). Oggigiorno, sono carenti informazioni sul ruolo della FHB nei riguardi delle così dette micotossine nuove ed emergenti. Queste sono metaboliti secondari verso i quali è crescente l'attenzione per il loro impatto sulla salute umana e animale. L'obiettivo di questo studio è quello di valutare l'effetto dell'agrotecnica e in particolare dell'applicazione fungicida all'antesi, delle lavorazioni del terreno e della suscettibilità varietale sulla contaminazione da micotossine emergenti nel frumento. A questo scopo quattro esperimenti sono stati effettuati in 3 siti del Piemonte nel biennio 2010-2012. In tutti gli esperimenti, l'applicazione di diversi fungicidi azolici, è stata confrontata con un controllo non trattato. I campioni di grano sono stati analizzati con un metodo LC-MS/MS multi-micotossina in grado di rilevare e quantificare simultaneamente almeno 139 diverse micotossine. Applicando questo metodo sono state rilevate circa 15 micotossine, tra cui: enniatine, aurofusarina, moniliformina, tentossina, equisetina, deossinivalenolo, deossinivalenolo-3-glucoside e culmorina. L'incidenza e la gravità della malattia, nonché la contaminazione da tali micotossine sono state significativamente ridotte in seguito all'applicazione fungicida in ogni esperimento. L'effetto della suscettibilità varietale è stato condotto ponendo a confronto 2 varietà a diversa suscettibilità (frumento tenero cv. Generale e frumento duro cv. Saragolla). In tutti gli anni di sperimentazione, prendendo in considerazione tutte le micotossine rilevate, la varietà di frumento duro è risultato significativamente più contaminata. Infine, è stata esaminata l'influenza della lavorazione del terreno, confrontando la semina su sodo con pratiche di minima lavorazione e di semina su terreno arato. Per tutte le micotossine rilevate la pratica dell'aratura è risultata essere la miglior soluzione per la sicurezza sanitaria. Si sottolinea, inoltre, che nella campagna cerealicola del 2013 si è rilevata la presenza di alcaloidi dell'ergot a concentrazioni medie comprese tra 6 e 943 $\mu\text{g kg}^{-1}$, tra cui i più abbondanti sono risultati ergocristina e ergometrina. Inoltre, l'applicazione fungicida è risultata essere efficace anche nel contenere gli alcaloidi dell'ergot. In conclusione, i risultati confermano che la scelta varietale, l'applicazione del fungicida alla fioritura e la pratica dell'aratura, comunemente impiegati per controllare la FHB e ridurre la contaminazione da DON, rappresentano la miglior soluzione per la sicurezza sanitaria del frumento anche la contaminazione dalle principali micotossine emergenti.

P31 DETERMINAZIONE MULTIMICOTOSSINA IN CEREALI E MANGIMI. MESSA A PUNTO E VALIDAZIONE DI UNA METODICA IN LC-MS/MS: ATTIVITÀ SVOLTE NELL'AMBITO DELLA RICERCA CORRENTE FINANZIATA DAL MINISTERO DELLA SALUTE

Solfrizzo M. (a), Bibi R. (b), Ciriaci M. (b), Gambacorta L. (a), Paoloni A. (b), Pecorelli I. (b)
(a) *Istituto di scienze delle produzioni alimentari, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari*
(b) *Laboratorio Contaminanti Ambientale, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia*

Le micotossine sono metaboliti secondari prodotti da funghi microscopici che infestano un gran numero di alimenti destinati al consumo umano e zootecnico. A causa dei loro molteplici ed importanti effetti tossici la loro presenza costituisce un serio pericolo per la salute degli uomini e degli animali. Al fine di tutelare la salute, l'Unione Europea, ha stabilito una serie di tenori massimi di tali sostanze ammessi negli alimenti e nei mangimi.

La letteratura scientifica riporta non solo casi di contaminazione multipla da micotossine negli alimenti e mangimi, ma anche, effetti sinergici dovuti alla assunzione di più molecole contemporaneamente. Al fine di tutelare la salute pubblica è necessario mettere a punto metodiche analitiche che consentano la rilevazione simultanea di tutte le molecole per le quali il Legislatore Comunitario ha fissato dei limiti massimi in alimenti e mangimi e forniscano dati sulla loro copresenza per la valutazione del rischio complessivo. A tale scopo è stata messa a punto e validata una metodica analitica multiresiduo e multiclasse che consente, per mezzo della spettrometria di massa tandem accoppiata all'HPLC, la contemporanea rilevazione di aflatossine B₁, G₁, G₂, B₂, Ocratossina A, Zearalenone, Deossinivalenolo, Tossina T-2, HT-2, Fumonisine B₁, B₂ e B₃ in cereali e alimenti ad uso zootecnico con purificazione mediante colonne ad immunoaffinità multianticorpo in tandem di tipo AOF (Afla/Ocra/Fum) e DZT (Don/Zon/T2HT2). Durante le fasi di messa a punto del metodo sono state valutate metodiche di estrazione e purificazione differenti quali il metodo *dilute and shoot*, la metodica QuEChERS (nella sua modalità originale e modificata), la SPE multiresiduo. È stato inoltre studiato il cosiddetto "effetto matrice" mediante la comparazione di curve di calibrazione in solvente ed in matrice con e senza l'ausilio di standard marcati con ¹³C in calibrazione interna. La separazione e rivelazione è stata ottenuta mediante un'unica corsa cromatografica con interfaccia di tipo ESI+ per tutte le molecole. Il metodo è stato validato su alimenti a base di cereali ed alimenti ad uso zootecnico verificando le *performance* in termini di linearità strumentale, effetto matrice, limite di quantificazione (LOQ), recupero, precisione in condizioni di ripetibilità e confrontando i risultati ottenuti con quanto prescritto dal Regolamento (CE) 401/2006 e s.m.i. e dalla norma UNI CEN/TR 16059.

La metodica consente di rilevare tutte le molecole oggetto dello studio a livelli compatibili con i limiti di legge ed ha delle *performance* uguali o migliorative rispetto a quanto previsto dalla normativa vigente.

INDICE DEGLI AUTORI

Allen S.; 11
Amenduni M.C.; 59
Amoriello T.; 39
Angelucci A.; 17
Armentano A.; 40; 41
Assennato G.; 59
Aureli G.; 39; 42
Avantaggiato G.; 18; 60; 62
Baccarini G.; 20; 23
Badiale-Furlong E.; 69; 70
Balconi C.; 15; 27; 43
Barbato M.; 8
Barbiani G.; 52
Barisonzo M.; 59
Battilani P.; 14; 43; 53
Bello C.; 17
Belocchi A.; 39; 42
Benvenuto E.; 47
Bernardi M.; 29
Bernardi N.; 65
Bertocchi L.; 17
Bertuzzi T.; 6; 26; 53
Biancardi A.; 17; 44; 45
Bibi R.; 24; 72
Blandino M.; 22; 46; 71
Blonda M.; 59
Brantsaer A.L.; 11
Breidbach A.; 30
Brera C.; 3; 8; 10; 11; 12; 21; 31; 33; 55;
57; 63
Bruno G.; 15
Buonsenso D.; 11
Califano G.; 21
Camardo Leggieri M.; 53
Capodicasa C.; 47
Cappè S.; 34
Castillo G.; 36
Catassi C.; 8
Catellani M.; 47
Centonze D.; 66
Cerasi M.; 47
Cervellieri S.; 65; 67
Cheli F.; 48
Chiaretti A.; 11
Ciasca B.; 35
Ciriaci M.; 24; 72
Clausì M.T.; 51
Colicchia S.; 10
Collini G.; 5; 55; 57
Conticelli A.; 40
Corte G.; 59
Cortese M.; 64
Crespi E.; 55; 57
Cucchiara S.; 8
D'Antini P.; 40
D'Egidio M.G.; 15
Dall'Asta C.; 9; 17; 44; 45; 68
Damascelli A.; 62; 65
De Girolamo A.; 49; 65
De Pace R.; 50; 51
De Paoli M.; 52
De Pauli P.; 52
De Rossi P.; 54
De Santis B.; 8; 10; 11; 21; 31; 33; 55;
57; 63
Debegnach F.; 8; 10; 11; 21; 31; 33; 63
Decontardi S.; 53
Del Fiore A.; 54
Del Sordo G.; 11
Dell'Orto V.; 48
Diamanti I.; 24
Epifani F.; 67
Eriksen G.S.; 11
Facchinetti F.; 27
Fanelli C.; 17
Fedrizzi G.; 5
Ferri F.; 5; 55; 57
Ferrieri F.; 59
Fiume F.; 59
Fornara M.; 39; 42
Franchino C.; 50; 51
Frisullo S.; 66
Frisvad J.C.; 6
Gallo A.; 6

Gambacorta L.; 72
 Garbetta A.; 60
 Gargano A.; 55; 57
 Gattei D.; 55; 57
 Giorgi Rossi P.; 5; 55; 57
 Greco D.; 60; 62
 Gregori E.; 8; 10; 12; 31; 33; 63
 Grieco F.; 62
 Hardie L.; 11
 Intini N.; 59
 Iorfida D.; 8
 Knutsen H.; 11
 Kupski L.; 69
 La Penna M.P.; 35
 Lanzanova C.; 27
 Lanzone A.; 11
 Lattanzio V.M.T.; 35; 49
 Leonetti E.; 59
 Lippolis V.; 64; 65; 67
 Lo Greco F.; 59
 Lo Magro S.; 40; 41
 Locatelli S.; 27; 43
 Logrieco A.; 13
 Luberto F.; 55; 57
 Lupi F.; 66
 Macri A.; 29
 Magnani I.; 55; 57
 Magnani M.; 5
 Mancini C.; 47
 Mancuso P.; 5; 55; 57
 Marinaccio F.; 71
 Mascheroni S.; 27
 Masoero F.; 6
 Mazziere G.; 39
 Melloni S.; 42
 Mentana A.; 66
 Miano B.; 11
 Minervini F.; 7; 60
 Monti M.; 19
 Moracci G.; 31; 63
 Moretti G.; 11
 Mosiello L.; 36
 Mozzanica S.; 55; 57
 Mulazzi A.; 6; 26
 Muscarella M.; 40; 41
 Nardiello D.; 66
 Nielsen K.F.; 6
 Nigri A.; 8
 Nobili C.; 54
 Paduano S.; 21
 Pagnussatt F.A.; 70
 Paleologo O.M.; 68
 Palermo C.; 66
 Palma M.; 59
 Panzarini G.; 67
 Paoloni A.; 72
 Pascale M.; 49; 64; 65; 67
 Passaretti I.; 63
 Pecorelli I.; 24; 72
 Perrone G.; 67
 Piccinini S.; 16
 Pietri A.; 6; 16; 26; 53
 Pietricola C.; 17
 Pinto A.; 59
 Porricelli A.C.R.; 64
 Poturnayova A.; 36
 Powers S.; 35
 Prisciantelli C.; 67
 Quaranta F.; 39; 42
 Quinto M.; 66
 Rastelli S.; 6; 26
 Reverberi M.; 17
 Reyneri A.; 15; 22; 43; 46; 71
 Righetti L.; 68
 Ripa C.; 39
 Rizzi F.; 59
 Rizzo M.; 63
 Rosar G.; 68
 Rossi L.; 16
 Ruocco G.; 21
 Sabino N.; 59
 Sandvik M.; 11
 Santoro T.; 59
 Sathyapalan T.; 11
 Scaglioni P.T.; 69; 70
 Scarpari M.; 17
 Scarpino V.; 22; 46; 71
 Schena R.; 49
 Silvestri M.; 25
 Šnejdárková M.; 36
 Soldano M.; 16
 Solfrizzo M.; 72

Spaccini G.; 24
Spinella K.; 36
Sulyok M.; 71
Sulyok M.z; 22
Summa S.; 40; 41
Testa G.; 22
Tibor H.; 36
Trovato C.M.; 8
Valenzano S.; 64
Valiani A.; 24
Valitutti F.; 8

Vanara F.; 46
Ventrella A.; 59
Ventura V.; 67
Verstraete F.; 28
Vicentini L.; 52
Villani A.; 23
Visconti A.; 49
Vita V.; 50; 51
von Holst C.; 35
Wells L.; 11
White K.; 11

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

Roma, luglio-settembre 2015 (n.3)