



**È stata predisposta una revisione dell'ISTISAN Congressi 15/C4 in quanto durante la stesura del documento, i curatori hanno avuto dei problemi tecnici che hanno determinato l'inserimento di testi non aggiornati.**

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, 79 p. ISTISAN Congressi 15/C4 r

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

**Due to technical problems occurred during the editing of the document ISTISAN Congressi 15/C4, a revised version is published.**

Istituto Superiore di Sanità

**5<sup>th</sup> 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, 79 p. ISTISAN Congressi 15/C4 r (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](mailto:carlo.brera@iss.it)

Il Rapporto è disponibile online sul sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it)

Citare questo documento come segue:

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

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

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



## PROGRAMMA

### Lunedì 28 settembre 2015

08:00 Registrazione dei partecipanti

09:00 Indirizzo di benvenuto  
**Gualtiero Ricciardi**  
Presidente dell'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 *Il Protocollo d'intesa dell'Emilia-Romagna per la riduzione del rischio da micotossine nella fase di raccolta e stoccaggio del mais*  
**Daniele Govi**
- 15:40 *Impiego di farine contaminate a fini energetici (biogas): risultati di test in continuo in impianto pilota*  
**Lorella Rossi**
- 16:00 *Prevenzione e degradazione della aflatoossina B1 in mangimi a base di mais*  
**Corrado Fanelli**

- 16:20 *Regolamenti e metodi per la valutazione di efficacia degli additivi di mangimi per la riduzione della contaminazione da micotossine*  
**Giuseppina Avantageggiato**
- 16:40 *La filiera del frumento duro e tenero: focus su criticità e soluzioni*  
**Maurizio Monti**
- 17:00 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 Baccarini**
- 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 aflatoxina 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**
- 10:00 *Il sistema di gestione dati sui contaminanti dell'EFSA: dalla raccolta dati all'analisi*  
**Stefano Cappè**



- 10:20 *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**
- 10:40 Intervallo
- 11:00 *Sviluppo di un biosensore elettronico per la determinazione dell'aflatossina B1 nelle derrate alimentari*  
**Katia Spinella**
- 11:20 *Aspetti pratici legati ad una corretta esecuzione delle procedure di campionamento (proiezione DVD)*  
**Carlo Brera**
- 12:00 Discussione dei temi del congresso e conclusioni



## RELATORI E MODERATORI

<b>Avantaggiato Giuseppina</b>	Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari
<b>Brera Carlo</b>	Istituto Superiore di Sanità, Roma
<b>Baccarini Gianni</b>	Rotary Club, Ravenna
<b>Battilani Paola</b>	Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza
<b>Breidbach Andreas</b>	Joint Research Centre, Geel
<b>Cappè Stefano</b>	European Food Safety Authority, Bruxelles
<b>Causin Roberto</b>	Università degli Studi, Padova
<b>Colicchia Sonia</b>	University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna
<b>Dall'Asta Chiara</b>	Università degli Studi, Parma
<b>De Santis Barbara</b>	Istituto Superiore di Sanità, Roma
<b>Debegnach Francesca</b>	Istituto Superiore di Sanità, Roma
<b>Fanelli Corrado</b>	Sapienza Università di Roma, Roma
<b>Fedrizzi Giorgio</b>	Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia e Emilia-Romagna, Bologna
<b>Ferri Fulvio</b>	Azienda Sanitaria Locale, Reggio Emilia
<b>Gallo Antonio</b>	Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza
<b>Govi Daniele</b>	Regione Emilia-Romagna, Bologna
<b>Gregori Emanuela</b>	Istituto Superiore di Sanità, Roma
<b>Lattanzio Veronica</b>	Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari
<b>Locatelli Sabrina</b>	Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bergamo
<b>Logrieco Antonio</b>	Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari
<b>Macrì Agostino</b>	Unione Consumatori, Roma
<b>Maurizi Fernando</b>	Consiglio Nazionale dei Chimici, Roma
<b>Minervini Fiorenza</b>	Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari
<b>Monti Maurizio</b>	Associazione Nazionale Tecnici dell'Industria Molitoria, Roma
<b>Pecorelli Ivan</b>	Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche, Perugia
<b>Pietri Amedeo</b>	Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza
<b>Piva Gianfranco</b>	Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza

<b>Reyneri Amedeo</b>	Università degli Studi, Torino
<b>Rossi Lorella</b>	Centro Ricerche Produzioni Animali, Reggio Emilia
<b>Scarpino Valentina</b>	Università degli Studi, Torino
<b>Silvestri Marco</b>	Barilla, Parma
<b>Spinella Katia</b>	Università degli Studi Tor Vergata, Roma
<b>Villani Andrea</b>	AGER Borsa Merci, Bologna
<b>Verstraete Frans</b>	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'esposizione, 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 esposizione 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*

Rispetto al monogastrici, i ruminanti sono meno sensibili all'effetto negativo dall'ingestione di micotossine perché il microbiota ruminale e le particelle contenute nel rumine sono efficaci nella degradazione, disattivazione o sequestro delle micotossine. Ad ogni modo, le diete per i ruminanti includono cereali e alimenti proteici, i loro sottoprodotti e foraggi, sia affienati che insilati. I foraggi possono essere contaminati da diverse micotossine e molti altri esometaboliti funginei in grado di aumentare e diversificare il rischio di esposizione alle micotossine nei ruminanti rispetto ai monogastrici. Dati recenti indicano che la maggiore esposizione ad alcune micotossine regolamentate e a molti altri metaboliti secondari prodotti da diversi ceppi di *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Monascus* spp. potrebbe essere principalmente legata alla contaminazione dei foraggi, ma questo aspetto rimane poco studiato poiché i dati sulla presenza di micotossine nei fieni e negli insilati sono scarsi e molto frammentati. Negli animali, fenomeni di riduzione delle *performance* produttive, insorgenza di malattie e turbe riproduttive sono stati spesso associati all'ingestione di foraggi contaminati da micotossine. Ad ogni modo, una relazione diretta fra l'ingestione di micotossine prodotte da *Alternaria* spp. (es: alternariolo, acido tenauzoico, 4Z-infectoripirone etc.), *Aspergillus flavus* (es: acido kojico, acido ciclopiazonico, acido  $\beta$ -nitropropionico, etc.), *Aspergillus fumigatus* (es: gliotossina, agroclavine, elimoclavine, festuclavine, fumigaclavine, etc.), *Penicillium roqueforti* and *P. paneum* (es: acido micofenolico, roquefortine, PR tossina, marcfortine, etc.), *Monascus ruber* (es: citrinina e monacolina) o altre muffe in grado di crescere negli insilati e micotossicosi negli animale è stata spesso segnalata ma raramente confermata. Infatti, questi funghi filamentosi possono produrre diversi metaboliti con proprietà antimicrobiche e immunosoppressive che causano effetti indiretti negli animali, come riduzione della funzionalità ruminale o immunosoppressione, e perciò difficilmente isolabili nella realtà aziendale. Inoltre, al momento non ci sono informazioni circa l'efficacia di sequestro delle diverse tipologie di agenti adsorbenti nei confronti delle micotossine che possono contaminare i foraggi. Vi è perciò la necessità di effettuare studi specifici per verificare l'efficienza di sequestro dei diversi prodotti adsorbenti oggi presenti sul mercato.

## FUMONISINE, OCRATOSSINA E STRESS OSSIDATIVO

Minervini F.

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

Le micotossine, frequenti contaminanti degli alimenti, rappresentano un serio problema per la salute umana e animale. Lo studio sulla tossicità indotta da naturali livelli di esposizione alle micotossine è necessario per una valutazione del rischio di tali sostanze. Recentemente è stato individuato per alcune micotossine, quali le Fumonisine (FBs) e l'Ocratossina A (OTA), l'induzione di stress ossidativo come principale e precoce meccanismo di tossicità in studi *in vitro*. Si è voluto verificare se questo meccanismo di tossicità fosse presente in altri organi *target* e fosse determinato da naturali livelli di esposizione. Nel caso delle FBs lo studio è stato condotto sull'intestino, principale *target* di esposizione. Si è utilizzato un modello che ha riprodotto fisiologicamente l'esposizione intestinale alle micotossine con gli alimenti; in particolare sono stati sottoposti a un processo di digestione *in vitro*, i campioni di mais naturalmente o artificialmente contaminati da FBs e i campioni di chimo ottenuti sono stati utilizzati per una breve esposizione di porzioni di intestino (umano e di ratto) tramite la camera di Ussing. È stata registrata una riduzione del parametro elettrico della corrente di cortocircuito in porzioni di intestino esposti a chimo senza FBs (conseguente all'osmolalità del chimo). Questa variazione del trasporto ionico non si è ritrovata in porzioni di intestino esposti a chimo contenente FBs (probabilmente per interferenza del trasporto ionico del Na<sup>+</sup>) con conseguente sbilancio idrico-salino. Sui campioni di intestino esposti ai diversi campioni di chimo, si è anche osservato un aumento dei livelli di malondialdeide (MDA), marker di tossicità dello stress ossidativo fortemente influenzato dall'effetto della digestione, dai livelli di FBs e dall'origine dei campioni intestinali (ratto e uomo). Questi risultati testimoniano come lo stress ossidativo rappresenti anche in studi *ex vivo* su porzioni di intestino il principale meccanismo di tossicità. Nel caso dell'OTA, l'induzione dello stress ossidativo, evidenziato in diversi modelli cellulari, è stato anche ritrovato in cellule mesenchimali staminali ottenute da cordone ombelicale prelevato da cagne, un utile modello *in vitro* per valutare la tossicità riproduttiva e dello sviluppo fetale. Dopo esposizione a livelli di OTA sovrapponibili a quelli serici riportati in bibliografia (da 0,25 pM a 25 nM), si è osservato un effetto inibitorio dei parametri cinetici relativi alla proliferazione cellulare e al *doubling time* a tutte le concentrazioni di OTA testate. L'effetto tossico indotto dall'OTA sulla proliferazione era secondario all'induzione di un processo apoptotico, osservato tramite analisi confocale della condensazione e frammentazione della cromatina. Il danno cromatinico era conseguente a stress ossidativo, come evidenziato dall'aumento di fluorescenza generato dal danno ossidativo del DNA indotto dall'OTA e valutato con il kit 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (Biotrin). Il riscontro di questo effetto tossico indotto da bassi livelli di OTA, simili a quelli serici, potrebbe essere correlato con l'elevato effetto embriotossico e teratogeno dell'OTA riportato in bibliografia.

*Parte del lavoro è stato finanziato dal progetto MycoRed EC KBBE -2007-222690-2.*

## **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 in colonna 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*

Le micotossine sono metaboliti secondari prodotti da alcune specie di funghi filamentosi o muffe (genere *Fusarium*, *Aspergillum*, *Penicillium*). La formazione e la crescita di micotossine è strettamente collegata al tipo di substrato infestato dal fungo e alle condizioni climatiche e ambientali. I prodotti maggiormente a rischio contaminazione risultano essere cereali, cacao, frutta secca e spezie. Le micotossine possono essere assunte dall'uomo per via diretta ossia tramite l'assunzione di prodotti contaminati, o per via indiretta assumendo prodotti di origine animale (latte, uova) che risultano contaminati qualora l'animale sia stato nutrito con mangimi infestati. A causa della tossicità e, in alcuni casi, della loro cancerogenicità, è necessaria una continua attività di monitoraggio che consenta di stabilire la presenza di micotossine nei prodotti quotidianamente consumati e poter infine valutarne l'esposizione. L'Unione Europea, con il Regolamento (CE) 1881/2006, definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti alimentari, comprese le micotossine. Secondo tale regolamento, i limiti di legge sulle micotossine variano in funzione della matrice ma soprattutto in funzione della fascia di popolazione a cui gli alimenti sono destinati. I tenori massimi consentiti negli alimenti per l'infanzia risultano, infatti, essere circa due o tre volte inferiori rispetto ai limiti applicabili ai prodotti per adulti. Ciò è ragionevole poiché gli infanti hanno una dieta più ristretta rispetto agli adulti (in base al mese di vita e allo sviluppo) e assumono una quantità di cibo maggiore in relazione al peso corporeo. Pertanto sono maggiormente esposti al rischio connesso alla contaminazione da micotossine e quindi più suscettibili alla loro tossicità. Lo scopo di questo lavoro, finanziato dall'Associazione Italiana Industrie Prodotti Alimentari (AIIPA), è stato la valutazione dell'incidenza di contaminazione di micotossine negli alimenti per l'infanzia e un successivo studio di esposizione. Aflatossina M1, Deossinivalenolo (DON), Zearalenone (ZON),  $\alpha$ -Zearalenolo ( $\alpha$ -ZEL) and  $\beta$ -Zearalenolo ( $\beta$ -ZEL) sono state le micotossine di interesse. AFM1 è classificata dallo IARC come Possibile Cancerogeno per gli umani. DON è un immunosoppressore e ZON,  $\alpha$ -ZEL and  $\beta$ -ZEL sono dotati di attività estrogenica. Sono stati analizzati diversi tipi di prodotti, per l'infanzia e non, campionati nei supermercati italiani. Nello specifico: 344 campioni comprendenti pasta, biscotti, latte e omogeneizzati a base di formaggio e a base di carne, sono stati analizzati tramite l'utilizzo di metodi basati su HPLC messi a punto e validati *in-house*. Lo scenario ottenuto è stato il seguente: AFM1, DON e  $\alpha$ -ZEL sono stati rilevati, rispettivamente, nel 24,27%, 59,67% e 2% dei campioni. ZON and  $\beta$ -ZEL non sono stati rilevati. Ciò nonostante, tutti i



campioni sono risultati conformi ai limiti massimi consentiti dall'UE. L'esposizione è stata valutata sulla base dei dati di consumo forniti dal database ufficiale dell'INRAN . Sono state considerate tre fasce di età (6, 9 e 12 mesi). I dati di consumo corrispondenti al 50°, 95° e 99° percentile sono stati incrociati con i valori medi di contaminazione e con i pesi corporei medi relativi alle tre fasce di età considerate. Non essendo stabilita una TDI per l'AFM1, abbiamo utilizzato il principio del più basso ragionevolmente raggiungibile (ALARA- As Low As Reasonably Achievable). Si evince che l'esposizione derivante dal latte di crescita e di proseguimento risulta più bassa (da un decimo ad un terzo) rispetto al latte vaccino. Per il DON, la cui TDI ufficiale è 1 µg/kg bw/day, la situazione è analoga. Infatti, l'esposizione nella pastina e nei biscotti per bambini è più bassa comparata ai corrispettivi prodotti per adulti.

## 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*

Negli ultimi decenni la popolazione italiana, ma non solo, ha aumentato il consumo di prodotti salutistici per migliorare lo stato di benessere e una condizione generale di salute e per contribuire a ridurre il rischio di malattie. Fra i prodotti salutistici, gli integratori alimentari di origine vegetale vengono largamente consumati perché richiamano l'idea di prodotti salutari non di sintesi. Secondo la Direttiva 2002/46/CE gli integratori alimentari di definiscono "prodotti alimentari destinati ad integrare la dieta normale e che costituiscono una fonte concentrata di sostanze nutritive o di altre sostanze aventi un effetto nutritivo o fisiologico". Proprio per il loro effetto fisiologico è fondamentale effettuare un'analisi del rischio/beneficio per la salute pubblica. L'approccio proposto dall'EFSA (*European Food Safety Authority*) per la valutazione del rischio-beneficio consiste in due separati e indipendenti processi, uno di valutazione del rischio e uno di valutazione del beneficio. Entrambi i processi includono quattro momenti: identificazione del possibile pericolo e dell'effetto positivo, e dove possibile il loro meccanismo biologico; la caratterizzazione del pericolo e dell'effetto positivo rispetto alla severità, reversibilità e secondo la relazione dose-risposta; la caratterizzazione del rischio e del beneficio, che rappresenta la probabilità che si abbia un positivo effetto nella popolazione o su un suo sottogruppo; ed infine, l'unica fase in comune fra i due processi, la valutazione dell'esposizione, momento in cui si valuta quanto il possibile effetto avverso e il possibile beneficio incidono sulla popolazione e/o su un suo sottogruppo. Alla fine di questo approccio i rischi e i benefici vengono combinati e pesati in modo da garantire giuste decisioni per la sicurezza alimentare. 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. Si pensi, ad esempio, alla presenza di citrinina, micotossina nefrotossica, nei prodotti a base di riso rosso fermentato a cui è riconosciuto potere ipocolesterolemizzante. Per garantire un uso appropriato di questa tipologia di prodotti è importante poterne valutare il rischio-beneficio e di conseguenza è necessario disporre di dati scientifici accurati sia riguardo gli studi di tossicità e del beneficio sia riguardo i dati di incidenza di contaminazione negli alimenti.

## GESTIONE INTEGRATA DELLE MICOTOSSINE IN PRE- E POST-RACCOLTO

Logrieco A

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

Le micotossine sono metaboliti secondari tossici prodotti da diverse specie e generi fungini in particolare da *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Tali miceti presentano un'elevata plasticità e possono attaccare e colonizzare piante e derrate in successione e in diverse condizioni ambientali. Per tale ragione non è possibile sviluppare un solo metodo di controllo che possa assicurare la prevenzione e la riduzione di tutte le micotossine presenti in ogni derrata. Inoltre il cambiamento climatico e l'aumento costante del commercio di derrate ha permesso il diffondersi e lo sviluppo di specie tossigeni in nuove aree geografiche, rappresentando un ulteriore motivo di preoccupazione. Considerando tutti questi fattori, lo sviluppo di un programma di sicurezza alimentare per il controllo/prevenzione delle micotossine si presenta articolato e complesso. Un possibile approccio per la gestione del rischio associato alle micotossine è l'uso di un sistema integrato basato sull'*Hazard Analysis and Critical Control Point* (HCCP) mediante strategie di buone pratiche per la prevenzione e controllo lungo la filiera. La prevenzione attraverso la gestione pre-raccolta è il miglior metodo per controllare la contaminazione da micotossine ma, quando tale contaminazione si verifica, i rischi associati alle micotossine devono essere gestiti attraverso procedure di post-raccolta, nel caso in cui il prodotto deve essere utilizzato per l'alimentazione umana o animale. Idealmente, i rischi associati con pericoli micotossine dovrebbe essere minimizzati in ogni fase della produzione. Fra le pratiche di pre-raccolto sono da ricordare l'uso di varietà/ibridi resistenti, la rotazione, la detossificazione in planta, l'uso di fungicidi, il controllo biologico, la gestione delle malerbe e degli insetti, e le misure agronomiche. Nel post-raccolto, risulta strategico controllare i parametri (*in primis* temperatura e umidità) che favoriscono lo sviluppo dei funghi tossigeni e l'accumolo di micotossine durante la conservazione o il trasporto delle derrate. Inoltre, tecniche avanzate di selezione e l'uso di detossificanti/adsorbenti stanno permettendo di ridurre significativamente il rischio da micotossine nelle derrate alimentari e nei mangimi. Lo sviluppo di nuove tecnologie, soprattutto nel campo della sensoristica, ed una maggiore disponibilità e conoscenza delle *omics* stanno dando un significativo contributo ad una migliore gestione integrata delle micotossine lungo le diverse filiere.

## **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*

La contaminazione da aflatossine in mais è un problema abbastanza recente in Italia. Nel 2003 per la prima volta ci furono contaminazioni significative della granella con conseguenze serie per il latte ed i derivati. Dopo questa esperienza, abbiamo imparato che le aflatossine sono presenti nel mais quasi tutti gli anni, seppure in misura modesta. Nel 2012 si è poi verificata una seconda esperienza ancora più critica, con maggiore estensione al territorio Europeo, coinvolgendo importanti aree maidicole, quali la Romania. L'unico intervento riconosciuto come efficace a livello mondiale è la prevenzione delle contaminazioni in campo con l'impiego di ceppi di *Aspergillus flavus*, il fungo responsabile della produzione di aflatossine, atossigeni, non in grado di sintetizzare le tossine in quanto sprovvisti di parte o tutto il cluster dei geni coinvolti. Quindi un intervento di bio-controllo che si basa sull'esclusione competitiva dei ceppi tossigeni presenti in natura. Sono necessari ceppi autoctoni, altamente competitivi, per poter ottenere buoni risultati. Per questo la raccolta e selezione di ceppi italiani è iniziata nel 2003 ed è terminata nel 2010 e durante questo periodo è anche iniziata la loro caratterizzazione, completata nel 2012. Tra i ceppi atossigeni individuati ne è stato poi scelto uno, depositato in micoteca (MUCL) e come brevetto per la distribuzione in campo. Le prove di campo, eseguite in vari anni su un numero progressivamente crescente di aziende, ha confermato una elevata capacità del ceppo di ridurre la contaminazione da aflatossine nella granella di mais alla raccolta. Il prodotto da impiegare in campo consiste di una matrice, attualmente granella di sorgo, inoculata con l'agente di biocontrollo, distribuita in campo con spandiconcime aziendali nelle fasi precoci di sviluppo delle piante, quando la loro altezza consente che il passaggio con lo spandiconcime non arrechi danno. Le analisi eseguite sulla granella raccolta dai campi trattati non ha mostrato differenze di contaminazione per tutte le tossine analizzate (Fumonisine, Deossinivalenolo e analoghi, tossina T2 e H-T2, Moniliformina, Beauvaricina) rispetto ai testimoni non trattati. La metodologia di applicazione in campo è semplice, efficace e non mostra effetti collaterali indesiderati, ma al momento non è ancora uno strumento disponibile per gli agricoltori in quanto è in corso l'iter registrativo come fitofarmaco. È stata però recentemente concessa l'autorizzazione eccezionale alla vendita per 120 giorni.

## **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*

Negli ultimi anni le granelle di frumento e mais sono state oggetto di una serie di stagioni produttive caratterizzate da elevate contaminazioni da micotossine. Tale contaminazione è causa di significative difficoltà commerciali che determinano una riduzione apprezzabile della redditività di tutte le componenti della filiera. Il sistema Italiano di stoccaggio è in genere caratterizzato da un livello elevato di professionalità e gli impianti appaiono spesso adeguati; pertanto, come è stato più volte evidenziato, le cause delle elevate contaminazioni da micotossine sono da ricercarsi soprattutto nelle avverse condizioni che si generano in campo. Fermo restando il ruolo dell'andamento meteorologico durante il ciclo produttivo, le pratiche colturali hanno evidenziato di influenzare in modo importante il contenuto finale delle contaminazioni, ma a differenza dei fattori meteorologici tali pratiche possono essere impostate in modo da ridurre, se non ostacolare la proliferazione delle muffe tossigene. È quindi urgente e necessario estendere al più ampio numero di aziende agricole che coltivano mais, le corrette pratiche colturali che possono contribuire a contenere le contaminazioni. Le Linee Guida (LG) presentate svolgono quindi questo compito raggruppando e ordinando le indicazioni emerse dalla ricerca più avanzata, svolta nell'ambito dei progetti Micoprincem e RQC (Rete Qualità Cereali) Mais finanziate dal Mipaaf nel quadro del Piano Cerealicolo Nazionale. Le LG presentano un approccio sistemico attraverso percorsi produttivi basati sull'applicazione di una serie di misure nel corso di tutte le fasi del ciclo colturale. I funghi tossigeni che colpiscono la spiga e quindi la granella sono numerosi e sono caratterizzati da differenti ecologie e quindi da condizioni ottimali di crescita diverse. Pertanto le LG sono impostate tenendo conto di questa molteplicità di condizioni e propongono evidenziando per ciascuna micotossina i percorsi produttivi più sicuri dal campo, alla conservazione attraverso il post raccolta. Nella versione attuale le LG riguardano le seguenti micotossine: su frumento il DON; su mais le aflatoxine, le fumonisine, il DON e lo Zearalenone. Infine per rendere più accessibili le LG, è stata predisposta e messa a disposizione una application per Smartphone consultabile dalla Rete.

## **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 ( $39 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), con un carico organico volumetrico (COV) pari a 3,8-4,0 kg SV/giorno per  $\text{m}^3$  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

Le aflatossine, metaboliti secondari con attività citotossiche, mutagene e cancerogene nell'uomo e negli animali, rappresentano attualmente uno dei problemi più importanti in termini di qualità e sicurezza alimentare. Il mais è uno dei *target* più significativi di contaminazione da parte di queste tossine prodotte principalmente da *Aspergillus flavus*. Il mais è anche tra le materie prime maggiormente utilizzate per l'alimentazione del bestiame. Ad oggi, nonostante il notevole sforzo fatto dai *breeders* del mais, dai chimici fitosanitari e dai gestori dei processi alimentari, il contenuto di aflatossine negli alimenti è in crescita in tutta Europa. Negli ultimi anni sono stati individuati alcuni metodi efficaci per prevedere e prevenire la contaminazione in campo da aflatossine, mentre esistono pochi sistemi eco-sostenibili per prevenire lo sviluppo di *Aspergillus flavus* o per contenere la contaminazione da aflatossine nel *post-harvest*. Il nostro studio decennale ha focalizzato la sua attenzione sulla selezione di composti bioattivi, esopolisaccaridi ed enzimi ossidasici, prodotti da funghi eduli del genere *Trametes*, per prevenire e detossificare le aflatossine nel mais. Le due formulazioni a basso costo proposte, sono stati in grado di inibire, quasi completamente, la neosintesi di Aflatossina B1 da *A. flavus* durante lo stoccaggio, e di degradare fino al 40% di Aflatossina B1 già presente nel mais. Per verificare l'efficacia degli enzimi ossidasici a degradare l'Aflatossina B1 in sfarinati di mais utilizzati per comporre il mangime di vacche da latte *ex vivo* ed *in vivo*, sono stati condotti esperimenti in ruminante artificiale bovino ed in stalla.



## **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 misure preventive applicate nella fase di pre-raccolta delle derrate agrarie rappresentano il sistema migliore e più efficace per contenere la contaminazione da micotossine; tuttavia, queste strategie da sole possono non essere sufficienti per risolvere il problema e garantire un prodotto alimentare sicuro. Un'ampia gamma di approcci chimici, fisici e biologici sono stati sperimentati nel tentativo di recuperare derrate contaminate. Sebbene alcuni trattamenti siano in grado di ridurre i livelli di specifiche micotossine, al momento, non si dispone di un metodo singolo in grado di decontaminare/detossificare il *pool* di micotossine diverse che sovente si ritrova in alimenti e/o mangimi. Molti di questi approcci, inoltre, non rispondono ai requisiti richiesti, soprattutto a quelli riguardanti la sicurezza dei prodotti di reazione e la salvaguardia delle caratteristiche degli alimenti e dei mangimi trattati. Per questo motivo, gli approcci nutrizionali come l'aggiunta ai mangimi di sostanze antiossidanti, estratti di vegetali, adsorbenti di origine minerale e biologica rappresentano il sistema più promettente per proteggere gli animali dagli effetti dannosi delle micotossine. Di recente, in Europa, l'uso e la commercializzazione delle sostanze per la riduzione della contaminazione da micotossine dei mangimi è stato regolamentato e ha portato all'apertura di una nuova classe di additivi funzionali all'interno della categoria degli additivi tecnologici (Regolamento CE 386/2009). Questi additivi 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. Ovviamente il loro impiego non ha lo scopo di aumentare i livelli massimi/livelli guida stabiliti nel contesto dell'EU ma di garantire un miglioramento della qualità dei mangimi legalmente commercializzati. A seconda della composizione, questi additivi possono agire legando le micotossine sulla loro superficie (adsorbimento) o degradandole/trasformandole in metaboliti meno tossici (biotrasformazione). Gli adsorbenti di micotossine, quali carboni attivi, silicati (bentoniti, zeoliti), microrganismi (batteri, lieviti e loro derivati), sono gli additivi per mangimi più studiati e, al momento, i più utilizzati considerando anche la loro limitata o nulla interferenza nei processi di produzione alimentare. Tuttavia, come evidenziato in questo lavoro, ulteriori ricerche si rendono necessarie per verificare le capacità detossificanti degli agenti proposti *in vivo* e nei confronti di micotossine strutturalmente diverse, la fattibilità tecnica ed economica, la potenziale tossicità di alcuni di essi.

## 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*

Il Rotary Club Ravenna, nell'ambito delle sue iniziative in favore del territorio e particolarmente dei giovani, ha programmato un progetto pluriennale a partire dall'anno rotariano 2014-2015, collegando il tema della sicurezza alimentare con le pratiche agricole necessarie per una produzione di qualità, con assegnazione ogni anno di uno o più premi a tesi, su un argomento stabilito, compilata da uno studente o da un gruppo di studenti o da una classe sul tema: La sicurezza alimentare: un problema di tutti. Il primo convegno si è tenuto il 21 ottobre 2014 presso la Sala Muratori della Biblioteca Classense di Ravenna, con il tema : "Un contaminante naturale: le micotossine", con relazioni, fra gli altri del Dott. Carlo Brera, del Prof. Amedeo Reyneri e del Dott. Daniele Govi dell'Assessorato all'Agricoltura della Regione Emilia-Romagna. Sabato 23 maggio presso l'Aula Magna dell'Istituto Tecnico Agrario Luigi Perdisa di Ravenna, alla presenza del corpo insegnante, dei rappresentanti delle Organizzazioni professionali e degli Ordini è poi avvenuta la consegna dei premi; il primo premio è stato assegnato al video sul tema "Micotossine: i rischi nell'alimentazione umana e zootecnica, i danni che recano alle filiere cerealicole e metodi di prevenzione" che viene proiettato.

## **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

Le micotossine cosiddette nuove ed emergenti sono metaboliti secondari, non ancora normati a livello internazionale, ma su cui è in corso un intenso esame per valutarne la diffusione e le implicazioni sanitarie. L'obiettivo di questo studio è stato quello di fornire nuove informazioni in grado di migliorare la conoscenza di tali micotossine valutandone la diffusione ed esaminando il ruolo dell'ambiente e dell'agrotecnica sulla loro contaminazione negli areali maidicoli del Nord-Italia. Tra le pratiche colturali comunemente adottate, il controllo della piralide del mais (*Ostrinia nubilalis*) svolge un ruolo molto importante nel contenere le infezioni da *Fusarium verticillioides* e *F. proliferatum* (sezione *Liseola*), e la conseguente contaminazione da fumonisine della granella di mais. Oggigiorno, non sono ancora note informazioni circa il ruolo della piralide sulle cosiddette micotossine emergenti. A tale scopo sono state condotte due sperimentazioni nel corso del quinquennio 2008-2012 mettendo a confronto l'infestazione naturale della piralide rispetto alla protezione dall'infestazione, ottenuta rispettivamente con una rete entomologica o con l'applicazione di un insetticida piretroide. In seguito all'analisi con un metodo LC-MS/MS multi-micotossina, 13 micotossine prodotte da *Fusarium* spp. sono state rilevate. L'attività trofica della piralide ha favorito la contaminazione da micotossine prodotte da *Fusarium* spp. della sezione *Liseola* (Moniliformina, Beauvericina, Bikaverina, Acido Fusarico e Fusaproliferina oltre alle fumonisine) ma non da quelle prodotte dalle sezioni *Discolor* e *Roseum*. Inoltre, nel corso del triennio 2011-2013 è stato valutato l'effetto della densità colturale sulle micotossine nuove ed emergenti ponendo a confronto 2 investimenti. Densità di semina elevate ottenute con un sistema innovativo non hanno presentato per nessuna delle micotossine rilevate un significativo peggioramento della qualità sanitaria delle produzioni. Infine nel biennio 2012-2013 è stato esaminato l'effetto della concimazione azotata su tali micotossine ponendo a confronto livelli di concimazione azotata crescenti: 0, 100, 200, 300 e 400 kg di azoto/ha. Un apporto di azoto di 200 kg/ha è risultato essere la miglior soluzione per la sicurezza sanitaria delle produzioni. Mediamente, nelle annate con condizioni meteorologiche predisponenti alla contaminazione da micotossine prodotte da *Fusarium* spp. della sezione *Liseola* le concentrazioni più elevate si sono evidenziate con carenze nutrizionali; invece, per quelle prodotte da *Fusarium* spp. delle sezioni *Discolor* e *Roseum* si è verificato un aumento ad elevati apporti di azoto. In conclusione, i risultati hanno mostrato che le comuni pratiche colturali adottate nelle zone temperate per controllare e ridurre il contenuto di fumonisine o DON sono risultate essere anche le più efficaci per il contenimento delle principali micotossine emergenti prodotte da *Fusarium* spp. rispettivamente della Sezione *Liseola* o *Discolor* e *Roseum*.

## MICOTOSSINE E MERCATO DEI CEREALI: EFFETTI ECONOMICI E PRATICHE CONTRATTUALI

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

Le micotossine rappresentano un'importante sfida per la filiera cerealicola. La prevenzione e la gestione del rischio micotossine coinvolge tutti i passaggi di filiera: inizia prima della semina e non termina con il raccolto. Gli aspetti tecnici interessati sono quindi molteplici: agronomici, di miglioramento e di difesa delle colture, fino ai sistemi di gestione degli stoccaggi ed alla trasformazione industriale. Lo scopo della comunicazione è quello di porre in luce gli effetti mercantili della presenza di contaminazione da micotossine sui prodotti: sia sui prezzi di mercato che sulle pratiche di scambio. La presenza di micotossine nei raccolti si è dimostrata in grado di condizionare - per le conseguenze nella determinazione delle possibili destinazioni d'uso - il valore mercantile dei prodotti e quindi influire sul reddito dei produttori e degli operatori. Recenti campagne di commercializzazione sia dei grani che del mais hanno fornito esempi in tal senso. Può quindi essere importante, anche per capire meglio la portata del problema, tentarne una quantificazione economica di massima. Naturalmente, tutto ciò ha anche comportato effetti sulle pratiche e sugli strumenti contrattuali di scambio con l'individuazione di pattuizioni e modalità di esecuzione specifiche che devono essere conosciute. Sempre da un punto di vista mercantile - ma non solo - può poi essere utile una riflessione sull'evoluzione dei flussi e delle geografie di importazione dei cereali nel nostro Paese. Ciò tenuto conto che l'Italia già oggi importa circa il 50% dei propri fabbisogni di filiera. L'aumento negli ultimi anni delle importazioni - soprattutto di granoturco (cereale per il quale fino a pochi anni fa vi era una sostanziale autosufficienza produttiva) - ha le sue ragioni anche nelle problematiche di qualità in cui sono incorsi i raccolti nazionali.

## **DETERMINAZIONE DI AFLATOSSINA M<sub>1</sub> 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*

L'Aflatossina M<sub>1</sub> è una micotossina, escretata nel latte, che deriva dalla idrossilazione a livello epatico dell'Aflatossina B<sub>1</sub> assunta mediante alimenti e mangimi contaminati. La sua presenza nel latte e nei prodotti da esso derivati rappresenta un rischio per il consumatore motivo per il quale è stato fissato, nel Regolamento (CE) N. 1881/2006, un tenore massimo ammesso pari a 0,050 µg/kg nel latte. Il medesimo Regolamento, all'articolo 2, stabilisce che, per i prodotti alimentari essiccati, diluiti, trasformati e composti vengano forniti, dall'OSA, degli specifici fattori di conversione che consentano l'applicazione dei tenori massimi a queste specifiche categorie di alimenti. Va altresì considerato, nel caso dei formaggi, che le tecnologie di produzione sono estremamente differenti le une dall'altre non consentendo l'agevole individuazione di fattori di trasformazione generici. Il Decreto MIPAF del 31 luglio 2003 fissa dei coefficienti di trasformazione in equivalente latte nei formaggi, ricompresi tra 6 e 15 tenendo in considerazione la sola resa ponderale ma non altri aspetti fondamentali legati alle dinamiche di concentrazione della micotossina quali la bassa affinità del contaminante per la porzione lipidica e, di contro, la sua elevata affinità per la frazione proteica. In base a quanto riportato il Comitato Nazionale per la Sicurezza Alimentare ha emesso il Parere N. 13 del 10-06-2013 nel quale vengono stabiliti, in via provvisoria, dei coefficienti di concentrazione pari a 3,0 per i formaggi a pasta tenera e prodotti derivati dal siero e 5,5 per i formaggi a pasta dura; auspica, inoltre, l'avvio di studi *ad hoc* per la definizione di puntuali coefficienti di concentrazione per le principali tipologie di prodotti caseari. Presso i laboratori dell'IZSUM sono state avviate una serie di attività volte alla valutazione di tale fattore di concentrazione nel formaggio pecorino a latte crudo. È stato messo a punto e validato un metodo per la determinazione di Aflatossina M<sub>1</sub> nei formaggi; utilizzando i controlli di routine sono stati reperiti dodici batch di latte ovino naturalmente contaminato da AFL M<sub>1</sub> a concentrazioni comprese tra 0,024 e 0,117 µg/kg determinando, anche, i principali parametri compositivi. Successivamente, con ciascuna partita di latte, è stato prodotto un formaggio pecorino a latte crudo con metodo tradizionale standardizzato. Per ciascun lotto di pecorino sono stati analizzati campioni di formaggio stagionato (1, 7, 15, 30 e 45 giorni) determinando l'AFL M<sub>1</sub> ed i principali parametri bromatologici. È stato quindi calcolato il fattore di concentrazione teorico legato alla resa proteica del procedimento, che è risultata essere  $4,36 \pm 0,29$ , e quello legato alla resa ponderale ( $3,86 \pm 0,81$ ). La sperimentazione ha consentito di determinare il fattore di concentrazione per questa specifica tipologia di prodotto e dimostra come l'utilizzo della resa proteica, associato alla concentrazione di AFL M<sub>1</sub> rilevata nel formaggio, consenta una efficace ed affidabile valutazione della conformità della materia prima utilizzata.







## **MAIS: MONITORAGGIO MICOTOSSINE IN ITALIA DAL 2006 AL 2014**

Locatelli S., Lanzasova C., Facchinetti F., Mascheroni S., Mazzinelli G., Balconi C.  
*Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria, Bergamo*

Il mais è una coltura fondamentale in Italia, dove svolge un ruolo importante per l'alimentazione animale, il consumo umano diretto e come fonte di molti prodotti commerciali. Il mais è soggetto all'attacco di funghi tossigeni, in grado cioè di produrre micotossine pericolose per la salute sia dell'uomo che degli animali. *Fusarium graminearum*, *F. verticillioides*, e *Aspergillus flavus* sono i funghi responsabili della presenza delle tossine più diffuse, rispettivamente Deossinivalenolo (DON) e Zearalenone (ZEA), Fumonisine (FB) e Aflatossine (AFB). La presenza dei diversi funghi e delle relative micotossine è variabile con gli ambienti e gli anni; infatti, lo sviluppo dei funghi su mais e il conseguente accumulo di sostanze tossiche a carico delle cariossidi è fortemente condizionato da: i) fattori climatici (temperatura, umidità); ii) fattori biotici (attacchi di insetti); iii) fattori abiotici (grandine, danni meccanici); iv) condizioni di stress della pianta in campo (siccità). Particolare attenzione nel corso degli anni è stata posta da parte dall'Unità di Ricerca per la Maiscoltura (CRA-MAC) alla valutazione della contaminazione delle principali micotossine nelle fasi di stoccaggio: dal 1999 CRA-MAC coordina una Rete di circa 50 impianti, stabile negli anni di indagine, distribuiti nelle regioni maggiormente vocate alla produzione maidicola (Piemonte, Lombardia, Veneto, Friuli Venezia Giulia, Emilia-Romagna). Da questi centri vengono annualmente raccolti campioni di granella di mais e analizzati per il loro contenuto nelle principali micotossine. I risultati relativi alle indagini condotte nel corso delle campagne maidicole dal 2006 al 2014 confermano che la granella di mais prodotta nella Pianura Padana è regolarmente contaminata da fumonisine in quantità variabile a seconda dell'andamento climatico stagionale; peraltro, a questa micotossina, nelle annate particolarmente calde e siccitose, come ad esempio il 2012, si aggiungono le aflatossine mentre, nelle annate molto fresche e piovose, come il 2014, i Tricoteceni e lo Zearalenone. Per questo motivo, la possibile presenza di micotossine in mais non può più essere affrontata con una logica di emergenza ma deve essere compresa nei normali protocolli di produzione e lavorazione. In questo contesto, rimane fondamentale l'attività di monitoraggio delle produzioni, che consente di verificare il livello di contaminazione nelle diverse annate.

*La ricerca si è svolta nell'ambito dei progetti di ricerca: MICOCER "Valutazione e controllo della contaminazione da micotossine nelle produzioni cerealicole italiane" (2006-2008), finanziato da Regione Lombardia, MICOPRINCEM "Micotossine principali ed emergenti nei cereali" (2010-2013), e RQC-Mais "Rete Qualità Cereali plus - Mais" (2014-2017) finanziati dal Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, MiPAAF.*



## **LA PERCEZIONE DEL PROBLEMA DELLE MICOTOSSINE DA PARTE DEI CITTADINI**

Macrì 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 aflatoxina 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 aflatoxina 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'LNRMicotossine 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, Geel, Belgium*

Tra le metodiche di screening da utilizzare *on site*, quelle basate sull'uso di *dipstick* o *lateral flow devices* sono attualmente le più diffuse per la determinazione rapida delle micotossine sottoposte a regolamentazione in cereali non processati. Prima del loro impiego, tuttavia, anche i metodi rapidi, come quelli convenzionali, devono essere sottoposti a esperimenti di validazione, al fine di valutare le loro caratteristiche analitiche. Le linee guida per la validazione dei metodi di *screening* per micotossine sono descritte nel recente Regolamento 519/2014/EU. Obiettivo del presente lavoro è stato quello di elaborare un disegno sperimentale per la validazione intra-laboratorio di un metodo rapido per la determinazione semi-quantitativa del Dossinivalenolo (DON) in frumento duro, in accordo con le linee guida del suddetto Regolamento. Il metodo è basato su un test immunocromatografico a flusso laterale. Il disegno sperimentale applicato ha fornito informazioni sul profilo di precisione del metodo, sul *cut-off* e sulle percentuali di falsi positivi e falsi negativi. La precisione intermedia (riproducibilità intra-laboratorio) variava tra 16 e 28%. L'Analisi della Varianza (ANOVA) ha inoltre rivelato che, tra le varie sorgenti di errore considerate (variazione tra giorni, varietà di frumento, differenti lotti di produzione e ripetibilità) il maggiore contributo è rappresentato dalla ripetibilità. La percentuale di falsi positivi per campioni contaminati al di sotto del limite di legge è risultata inferiore all'1%, mentre la percentuale di falsi negativi per campioni contaminati al di sopra del limite di legge era 1,7%. Inoltre, è stato elaborato un disegno fattoriale per valutare quantitativamente l'influenza delle principali forme modificate del DON (3-acetil-DON, 15-acetil-DON e DON-3-glucoside) sui risultati del test, e in particolare sul rischio di falsi positivi. Infine, l'applicabilità del metodo validato a campioni reali è stata valutata mediante analisi di 47 campioni di frumento duro naturalmente contaminati. I risultati delle analisi hanno mostrato una buona correlazione ( $r=0,87$ ) con quelli ottenuti mediante un metodo di conferma LC-MS/MS.

## 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), Mazzieri 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 aflatoxina B1 (AFB1) nel mais. Conseguentemente, anche il latte è risultato una matrice particolarmente a rischio per contaminazione da Aflatoxina 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 aflatoxine 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 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> 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 (AFtot: 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 AFtot 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 AFtot non quantificabili (AFB1<0,6 µg/kg; AFtot<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 AFtot. 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.

## **PS** 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 grattugiati prevede l'uso della crosta fino ad un massimo del 18%, lo scopo di questo studio è di valutare la presenza di OTA in grattugiati 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 idroacetone nitrilica; 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  $\nu=56$ , 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 (2.500-4.000  $\mu\text{m}$ ), fine (1.200-2.500  $\mu\text{m}$ )]; il processo di molitura a secco per la produzione di farina bramata (500-800  $\mu\text{m}$ ); fioretto (350-500  $\mu\text{m}$ ) 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 aflatoxine, 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 B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) e B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) 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 PHFB<sub>1</sub>, PHFB<sub>2</sub>, HFB<sub>1</sub> e HFB<sub>2</sub>. 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 (AfB1), AflatoSSina M1 (AfM1) e AflatoSSicolo (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<sub>1</sub>. Poche informazioni sono disponibili per altre micotossine come OTA, FB<sub>1</sub>, 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 tetrossilicati), 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 µg/mL di AFB<sub>1</sub>, ZEA, OTA, FB<sub>1</sub>, 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<sub>1</sub>>FB<sub>1</sub>>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<sub>1</sub> ad entrambi i valori di pH; OTA e FB<sub>1</sub> al solo pH gastrico. I tetrossilicati (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<sub>1</sub> era correlato al contenuto in ceneri. Infine, dei 52 prodotti presi in esame, solo 4 sono risultati capaci a sequestrare simultaneamente AFB<sub>1</sub>, ZEA, OTA, FB<sub>1</sub> 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., Avantageggiato 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 AFB<sub>1</sub>, ZEA, OTA, FB<sub>1</sub> 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 AFB<sub>1</sub>, 83% di ZEA, 83% di OTA e 47% di FB<sub>1</sub> 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 AFB<sub>1</sub>, 2,7 µg di ZEA, 2,8 µg di OTA e 1,2 µg di FB<sub>1</sub> 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]  $\leq 400$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e classe B ([DON]  $> 400$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). 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  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . 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,  $\gamma$ -caprolattone, 1-pentanololo, 1-otten-3-olo, esanale, 1-esanololo 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/m<sup>3</sup>) 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/m<sup>3</sup> 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/m<sup>3</sup>) 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 $\alpha$ ), 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<sub>medium</sub> è stata coltivata in piastre di Petri contenenti 15 mL di PDA e OTA a 1,5 mg/mL<sub>medium</sub> (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 $\alpha$ . 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 $\alpha$  è stata osservata dopo 48 ore di cultura, con la concentrazione massima di 179,6 ng/g<sub>medium</sub> 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 $\alpha$ ) che presenta effetti tossici inferiore. Sarà necessario valutare le condizioni operative migliori per ottimizzare la trasformazione di OTA in OT $\alpha$  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<sup>-1</sup> di NIV, mentre con la più alta concentrazione di estratto fenolico, la produzione è stata ridotta a 0,6 ug g<sup>-1</sup>, evidenziando una riduzione del 98%. L'isolato *Fgra*08Tr022 ha prodotto 28,6 ug g<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>, 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 B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>, Ocratossina A, Zearalenone, Deossinivalenolo, Tossina T-2, HT-2, Fumonisine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e B<sub>3</sub> 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 <sup>13</sup>C 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.; 12  
Amenduni M.C.; 61  
Amoriello T.; 41  
Angelucci A.; 18  
Armentano A.; 42; 43  
Assennato G.; 61  
Aureli G.; 41; 44  
Avantaggiato G.; 19; 62; 64  
Baccarini G.; 21; 24  
Badiale-Furlong E.; 71; 72  
Balconi C.; 16; 28; 45  
Barbato M.; 8  
Barbani G.; 54  
Barisonzo M.; 61  
Battilani P.; 15; 45; 55  
Bello C.; 18  
Belocchi A.; 41; 44  
Benvenuto E.; 49  
Bernardi M.; 30  
Bernardi N.; 67  
Bertocchi L.; 18  
Bertuzzi T.; 6; 27; 55  
Biancardi A.; 18; 46; 47  
Bibi R.; 25; 74  
Blandino M.; 23; 48; 73  
Blonda M.; 61  
Brantsaer A.L.; 12  
Breidbach A.; 31  
Brera C.; 3; 8; 10; 12; 13; 22; 32; 34; 57;  
59; 65  
Bruno G.; 16  
Buonsenso D.; 12  
Califano G.; 22  
Camardo Leggieri M.; 55  
Capodicasa C.; 49  
Cappè S.; 35  
Castillo G.; 37  
Catassi C.; 8  
Catellani M.; 49  
Centonze D.; 68  
Cerasi M.; 49  
Cervellieri S.; 67; 69  
Cheli F.; 50  
Chiaretti A.; 12  
Ciasca B.; 36  
Ciriaci M.; 25; 74  
Clausi M.T.; 53  
Colicchia S.; 10  
Collini G.; 5; 57; 59  
Conticelli A.; 42  
Corte G.; 61  
Cortese M.; 66  
Crespi E.; 57; 59  
Cucchiara S.; 8  
D'Antini P.; 42  
D'Egidio M.G.; 16  
Dall'Asta C.; 9; 18; 46; 47; 70  
Damascelli A.; 64; 67  
De Girolamo A.; 51; 67  
De Pace R.; 52; 53  
De Paoli M.; 54  
De Pauli P.; 54  
De Rossi P.; 56  
De Santis B.; 8; 10; 12; 22; 32; 34; 57;  
59; 65  
Debegnach F.; 8; 10; 12; 22; 32; 34; 65  
Decontardi S.; 55  
Del Fiore A.; 56  
Del Sordo G.; 12  
Dell'Orto V.; 50  
Diamanti I.; 25  
Epifani F.; 69  
Eriksen G.S.; 12  
Facchinetti F.; 28  
Fanelli C.; 18  
Fedrizzi G.; 5  
Ferri F.; 5; 57; 59  
Ferrieri F.; 61  
Fiume F.; 61  
Fornara M.; 41; 44  
Franchino C.; 52; 53  
Frisullo S.; 68  
Frisvad J.C.; 6  
Gallo A.; 6

Gambacorta L.; 74  
 Garbetta A.; 62  
 Gargano A.; 57; 59  
 Gattei D.; 57; 59  
 Giorgi Rossi P.; 5; 57; 59  
 Greco D.; 62; 64  
 Gregori E.; 8; 10; 13; 32; 34; 65  
 Grieco F.; 64  
 Hardie L.; 12  
 Intini N.; 61  
 Iorfida D.; 8  
 Knutsen H.; 12  
 Kupsi L.; 71  
 La Penna M.P.; 36  
 Lanzanova C.; 28  
 Lanzone A.; 12  
 Lattanzio V.M.T.; 36; 51  
 Leonetti E.; 61  
 Lippolis V.; 66; 67; 69  
 Lo Greco F.; 61  
 Lo Magro S.; 42; 43  
 Locatelli S.; 28; 45  
 Logrieco A.; 14  
 Luberto F.; 57; 59  
 Lupi F.; 68  
 Macrì A.; 30  
 Magnani I.; 57; 59  
 Magnani M.; 5  
 Mancini C.; 49  
 Mancuso P.; 5; 57; 59  
 Marinaccio F.; 73  
 Mascheroni S.; 28  
 Masoero F.; 6  
 Mazzieri G.; 41  
 Mazzinelli G.; 28  
 Melloni S.; 44  
 Mentana A.; 68  
 Miano B.; 12  
 Minervini F.; 7; 62  
 Monti M.; 20  
 Moracci G.; 32; 65  
 Moretti G.; 12  
 Mosiello L.; 37  
 Mozzanica S.; 57; 59  
 Mulazzi A.; 6; 27  
 Muscarella M.; 42; 43  
 Nardiello D.; 68  
 Nielsen K.F.; 6  
 Nigri A.; 8  
 Nobili C.; 56  
 Paduano S.; 22  
 Pagnussatt F.A.; 72  
 Paleologo O.M.; 70  
 Palermo C.; 68  
 Palma M.; 61  
 Panzarini G.; 69  
 Paoloni A.; 74  
 Pascale M.; 51; 66; 67; 69  
 Passaretti I.; 65  
 Pecorelli I.; 25; 74  
 Perrone G.; 69  
 Piccinini S.; 17  
 Pietri A.; 6; 17; 27; 55  
 Pietricola C.; 18  
 Pinto A.; 61  
 Porricelli A.C.R.; 66  
 Poturnayova A.; 37  
 Powers S.; 36  
 Prisciantelli C.; 69  
 Quaranta F.; 41; 44  
 Quinto M.; 68  
 Rastelli S.; 6; 27  
 Reverberi M.; 18  
 Reyneri A.; 16; 23; 45; 48; 73  
 Righetti L.; 70  
 Ripa C.; 41  
 Rizzi F.; 61  
 Rizzo M.; 65  
 Rosar G.; 70  
 Rossi L.; 17  
 Ruocco G.; 22  
 Sabino N.; 61  
 Sandvik M.; 12  
 Santoro T.; 61  
 Sathyapalan T.; 12  
 Scaglioni P.T.; 71; 72  
 Scarpari M.; 18  
 Scarpino V.; 23; 48; 73  
 Schena R.; 51  
 Silvestri M.; 26  
 Šnejdárková M.; 37  
 Soldano M.; 17

Solfrizzo M.; 74  
Spaccini G.; 25  
Spinella K.; 37  
Sulyok M.; 73  
Sulyok M.z; 23  
Summa S.; 42; 43  
Testa G.; 23  
Tibor H.; 37  
Trovato C.M.; 8  
Valenzano S.; 66  
Valiani A.; 25  
Valitutti F.; 8

Vanara F.; 48  
Ventrella A.; 61  
Ventura V.; 69  
Verstraete F.; 29  
Vicentini L.; 54  
Villani A.; 24  
Visconti A.; 51  
Vita V.; 52; 53  
von Holst C.; 36  
Wells L.; 12  
White K.; 12



*Roma, luglio-settembre 2015 (n.3) 1° Suppl.*

*Stampato in proprio  
Settore Attività Editoriali - Istituto Superiore di Sanità  
Roma, settembre 2015*