



# RAPPORTI ISTISAN 16|28

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

V Congresso nazionale

## Le micotossine nella filiera agro-alimentare

Istituto Superiore di Sanità  
Roma, 28-30 settembre 2015

**ATTI**

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



EPIDEMIOLOGIA  
E SANITÀ PUBBLICA



**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

**V Congresso nazionale  
Le micotossine nella filiera agro-alimentare**

**Istituto Superiore di Sanità  
Roma, 28-30 settembre 2015**

**ATTI**

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

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

**Rapporti ISTISAN  
16/28**

Istituto Superiore di Sanità

**V Congresso Nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 28-30 settembre 2015. Atti.**

A cura di Carlo Brera, Barbara De Santis, Francesca Debegnach, Emanuela Gregori e Maria Cristina Barea Toscan  
2016, vi, 137 p. Rapporti ISTISAN 16/28

Il Congresso è giunto alla sua quinta edizione e ciò è stato possibile grazie al forte interesse mostrato dai partecipanti nelle precedenti edizioni. In questa edizione sono stati toccati argomenti per i quali necessita ancora un forte intervento in quanto rappresentano un reale rischio per la salute pubblica ed animale. Ad esempio, il primo di questi argomenti risiede nella reale impossibilità di correlare in modo univoco, specie nei Paesi industrializzati, il ruolo eziologico delle micotossine con alcune patologie ricorrenti nell'uomo e negli animali. Inoltre, data la forte associazione tra micotossine e condizioni climatiche è stato dato ampio spazio alla presentazione delle più promettenti e moderne soluzioni legate alle attività preventive e di controllo che sono state nel tempo acquisite e poi affinate dai vari comparti agro-alimentari per minimizzare il fenomeno. Infine, come tradizione, l'ultima giornata è stata dedicata alla diagnostica a cui, in ultima analisi, sono demandate le verifiche dell'efficacia delle azioni di autocontrollo e controllo ufficiale. Il Congresso, la cui prima edizione risale al 2004, è stato sempre organizzato presso l'Istituto Superiore di Sanità con frequenza media biennale. Tale evento scientifico costituisce un momento di incontro sia dei principali gruppi di ricerca che operano in ambito nazionale sia de, infine, della più qualificata rappresentanza degli organi deputati al controllo ufficiale dei prodotti alimentari e degli alimenti zootecnici.

*Parole chiave:* Micotossine; Analisi del rischio; Valutazione della esposizione; Analisi; Campionamento

Istituto Superiore di Sanità

**5<sup>th</sup> National Congress. Mycotoxins in agri-food chain. Istituto Superiore di Sanità. Rome, September 28-30 2015. Proceedings.**

Edited by Carlo Brera, Barbara De Santis, Francesca Debegnach, Emanuela Gregori and Maria Cristina Barea Toscan  
2015, vi, 137 p. Rapporti ISTISAN 15/28 (in Italian)

The 5<sup>th</sup> edition of the National Congress on Mycotoxins in Food Chain dealt with the most relevant issues related to the burden that these toxic compounds represent for animal and human health. The first issue regarded the still not fully understood relationship between human and animal pathologies and mycotoxins intake with diet. The second issue entailed all the preventive and corrective activities undertaken by food/feed business operator and Competent Authority within self-control and official control systems, respectively. The third issue will give the opportunity to the speakers to present an updated information on the new diagnostic scenarios and on the possible developments of new diagnostic platforms aimed at giving an answer to the main demand raised by the industry, i.e. fast and reliable analytical response for guaranteeing food/feed safety as much as possible. Since 2004 the National Congress has been held at the Istituto Superiore di Sanità (the National Institute of Health in Italy) with a two-year frequency on average. This scientific event is an opportunity of debate for researchers and stakeholders on the impact of mycotoxins on economics, agriculture, industry, safety and legislation.

*Keywords:* Mycotoxins; Risk analysis; Exposure assessment; Analysis; Sampling

Per informazioni su questo documento scrivere a: [carlo.brera@iss.it](mailto:carlo.brera@iss.it)

Il rapporto è accessibile online dal 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. Atti.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2016. (Rapporti ISTISAN 16/28).

---

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

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Paola De Castro* e *Sandra Salinetti*

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

# INDICE

<b>Premessa</b> .....	v
<b>Considerazioni generali sulla problematica delle micotossine</b> <i>Carlo Brera</i> .....	1
<b>Approccio geostatistico al problema del deossinivalenolo nel frumento duro: risultati preliminari</b> <i>Tiziana Amoriello, Gabriella Aureli, Andreina Belocchi, Mauro Fornara, Giuliano Mazzieri, Cecilia Ripa, Fabrizio Quaranta</i> .....	9
<b>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</b> <i>Antonio Armentano, Simona Summa, Sonia Lo Magro, Marilena Muscarella</i> .....	15
<b>Rilevazione di tossine T<sub>2</sub> + HT<sub>2</sub> nel frumento duro biologico coltivato in Italia</b> <i>Gabriella Aureli, Andreina Belocchi, Mauro Fornara, Sahara Melloni, Fabrizio Quaranta</i> .....	19
<b>Utilizzo di agenti di biocontrollo nella prevenzione dello sviluppo di <i>Aspergillus flavus</i> e della produzione di aflatossine</b> <i>Paola Battilani</i> .....	24
<b>Effetto del processo molitorio nella ripartizione della moniliformina in mais</b> <i>Massimo Blandino, Valentina Scarpino, Amedeo Reyneri, Francesca Vanara</i> .....	28
<b>Criteri di attivazione del piano nazionale di controllo ufficiale delle micotossine nei prodotti alimentari</b> <i>Carlo Brera, Francesca Debegnach, Barbara De Santis, Gerardo Califano, Sandra Paduano, Giuseppe Ruocco</i> .....	33
<b>Micotossine nella feed supply chain: stato dell'arte e prospettive future</b> <i>Federica Cheli, Vittorio Dell'Orto</i> .....	39
<b>Controlli ufficiali di aflatossina nella frutta a guscio di provenienza comunitaria ed extracomunitaria in entrata nel porto di Gioia Tauro</b> <i>Rita De Pace, Cinzia Franchino, Francesca Floridi, Valeria Vita</i> .....	43
<b>Monitoraggio dello sviluppo di funghi tossigeni su agrumi in post-raccolta</b> <i>Antonella Del Fiore, Chiara Nobili, Patrizia De Rossi</i> .....	49

<b>Inquinamento ed esposizione ad aflatossine in ambienti di lavoro</b> <i>Fulvio Ferri, Giorgio Fedrizzi, Lorena Bedogni, Sauro Capanni, Patrizia Ferdenzi, Massimo Magnani, Simonetta Menotta, Giuseppe Ombrini, Milva Olmi</i> .....	53
<b>Monitoraggio micotossine: attività 2011-2014 del Polo di specializzazione Alimenti ARPA Puglia</b> <i>Francesca Ferrieri, Maria Carmela Amenduni, Marco Barisonzo, Giovanni Corte, Nicola Intini, Egidio Leonetti, Francesco Lo Greco, Mariangela Palma, Aldo Pinto, Francesco Rizzi, Nicola Sabino, Tiziana Santoro, Andrea Ventrella, Francesco Fiume, Massimo Blonda, Giorgio Assennato</i> .....	60
<b>Presenza di micotossine nei foraggi e loro effetti sui ruminanti</b> <i>Antonio Gallo, Francesco Masoero, Jens C. Frisvad, Terenzio Bertuzzi, Amedeo Pietri, Annalisa Mulazzi, Silvia Rastelli, Kristian F. Nielsen</i> .....	65
<b>Citrinina in integratori a base di riso rosso fermentato. Determinazione mediante HPLC-FL e validazione <i>in-house</i></b> <i>Emanuela Gregori, Iaria Passaretti, Francesca Debegnach, Marianna Rizzo, Barbara De Santis, Gabriele Moracci, Carlo Brera</i> .....	74
<b>Protocollo d'intesa dell'Emilia-Romagna per la riduzione del rischio da micotossine nella fase di raccolta e stoccaggio del mais</b> <i>Daniele Govi</i> .....	79
<b>Mais: monitoraggio micotossine in Italia dal 2006 al 2014</b> <i>Sabrina Locatelli, Chiara Lanzasova, Fabrizio Facchinetti, Stefania Mascheroni, Gianfranco Mazzinelli, Carlotta Balconi</i> .....	82
<b>Validazione di metodi di screening secondo il Regolamento (UE) 519/2014. Caso studio: determinazione del deossinivalenolo in frumento mediante test immunocromatografico a flusso laterale</b> <i>Veronica Lattanzio, Maria Pina La Penna, Biancamaria Ciasca, Stephen Powers, Christoph von Holst</i> .....	87
<b>Immunodosaggi basati sulla polarizzazione di fluorescenza per la determinazione delle tossine T<sub>2</sub> e HT<sub>2</sub> in avena, orzo, segale e prodotti a base di cereali</b> <i>Vincenzo Lippolis, Anna Chiara R. Porricelli, Marina Cortese, Stefania Valenzano, Michelangelo Pascale</i> .....	91
<b>Metodo e-nose con tecnologia MOS per lo screening di crusca di frumento contaminata da deossinivalenolo</b> <i>Vincenzo Lippolis, Salvatore Cervellieri, Anna Damascelli, Nastasia Bernardi, Annalisa De Girolamo, Michelangelo Pascale</i> .....	95

<b>Fusarium spp. nel grano: SPME-GC-MS della componente volatile per l'individuazione di indicatori d'infezione</b>	
<i>Francesca Lupi, Carmen Palermo, Maurizio Quinto, Donatella Nardiello, Annalisa Mentana, Antonio Moretti, Salvatore Frisullo, Diego Centonze</i> .....	100
<b>Effetto del trattamento con ozono sulla contaminazione da funghi e micotossine in cariossidi di frumento</b>	
<i>Michelangelo Pascale, Giuseppe Panzarini, Salvatore Cervellieri, Cristina Prisciantelli, Vincenzo Lippolis, Vanda Ventura, Filomena Epifani, Giancarlo Perrone</i> .....	105
<b>Proposte di linee guida per il controllo delle micotossine nei cereali</b>	
<i>Amedeo Reyneri, Giampaolo Bruno, Carlotta Balconi, Maria Grazia D'Egidio, Sabrina Locatelli</i> .....	109
<b>Uso di farine contaminate a fini energetici (biogas): risultati di test in continuo in impianto pilota</b>	
<i>Lorella Rossi, Mariangela Soldano, Sergio Piccinini, Amedeo Pietri</i> .....	113
<b>Biodegradazione di ocratossina A da parte di <i>Trichoderma reesei</i></b>	
<i>Priscila Tessmer Scaglioni, Larine Kupski, Eliana Badiale Furlong</i> .....	117
<b>Inibizione della produzione di tricoteceni usando composti fenolici di <i>Spirulina sp</i></b>	
<i>Priscila Tessmer Scaglioni, Fernanda Arnhold Pagnussatt, Eliana Badiale-Furlong</i> .....	120
<b>Effetto dell'agrotecnica sulle micotossine nuove ed emergenti nel frumento</b>	
<i>Valentina Scarpino, Massimo Blandino, Federico Marinaccio, Amedeo Reyneri, Michael Sulyok</i> .....	124
<b>Micotossine nuove ed emergenti nel mais: diffusione e influenza dell'agrotecnica</b>	
<i>Valentina Scarpino, Massimo Blandino, Amedeo Reyneri, Giulio Testa, Michael Sulyok</i> .....	128
<b>Valutazione della contaminazione da aflatoossina B<sub>1</sub> in mangimi della Puglia e Basilicata dal 2010 al 2014</b>	
<i>Valeria Vita, Maria Teresa Clausi, Cinzia Franchino, Rita De Pace</i> .....	132



## PREMESSA

La quinta edizione del Congresso Nazionale sulle micotossine ha avuto come principio guida quello di verificare la presenza e di trovare le giuste risposte al quesito che ancora oggi caratterizza questo importante tema di salute pubblica, vale a dire: “Le micotossine rappresentano un rischio reale per il consumatore e per le specie animali?”. Ciò a dispetto della accertata azione tossica a carico degli studi effettuati sugli animali che da ormai decenni hanno portato alla classificazione di molte micotossine come responsabili di effetti genotossici e cancerogeni, ma non solo, sia nell’uomo che nelle specie animali.

Tuttavia, alcune domande restano ancora aperte soprattutto se si pone l’attenzione alla esposizione e quindi al potenziale rischio, derivante dalla dieta alimentare, di gruppi di popolazione particolarmente sensibili come i bambini in senso generale, sia in età pre- che post-natale, i vegetariani, le donne in gravidanza o soggetti affetti da patologie riconosciute come la celiachia.

Gli studi che si stanno avvicinando così come le più recenti opinioni dell’Autorità Europea di Sicurezza Alimentare (*European Food Safety Authority*, EFSA) stanno raccomandando in modo sempre più puntuale la estrema necessità di salvaguardare la salute di tali gruppi di consumatori attraverso l’assicurazione di una alta qualità dei prodotti alimentari a loro destinati, nonché a campagne educazionali rivolte ad esempio alle donne in gestazione sugli stili alimentari da adottare.

Ancora oggi, infatti, è alquanto incerta, se non addirittura impossibile, effettuare una associazione diretta tra patologia ed eziologia delle patologie che ricorrono nei Paesi industrializzati. Ciò a dispetto dei significativi progressi che nel campo della diagnostica hanno consentito di rilevare la presenza di tali sostanze a livelli sempre più bassi.

Quello che allora non è ancora stato pienamente definito è l’individuazione quali-quantitativa dei pattern metabolici delle micotossine, assolutamente indispensabili per una corretta caratterizzazione del rischio.

Altre lacune scientifiche ancora presenti riguardano la valutazione degli effetti sinergici o additivi derivanti dalla co-presenza di più micotossine nella nostra dieta, sia per quanto riguarda l’uomo che le specie animali.

In generale, a fronte delle innumerevoli analisi di controllo sul territorio nonché di quelle effettuate nell’ambito dei vari progetti di ricerca, il sistema Italia non è ancora stato in grado di istituire un database sistematico in cui raccogliere dati ed informazioni, utili a declinare nel modo più appropriato il rischio associato alla presenza delle micotossine nei prodotti alimentari così come in quelli zootecnici. Questa lacuna ha rappresentato uno dei principi ispiratori per la creazione del Piano Nazionale di Controllo delle Micotossine che sarà operativo a partire dal gennaio 2017. Tra gli obiettivi, vorrei ricordarne due: la armonizzazione delle modalità operative (campionamento, analisi, interpretazione del dato) nell’ambito del controllo ufficiale sul territorio e la possibilità di disporre di una fotografia attendibile delle condizioni di sicurezza dei prodotti alimentari esitati al consumatore, sia di produzione nazionale, di produzione UE, che di importazione. La disponibilità di tali dati contribuirà, assieme ad altre informazioni di diversa natura, a valutare la qualità sanitaria delle produzioni alimentari ed a fornire utili indicazioni sul livello di rischio cui il consumatore è esposto con la dieta, consentendo, in tal modo, alle Autorità Competenti l’attivazione di adeguati interventi per la gestione del rischio.

I contributi presentati in questo Congresso hanno cercato di fornire risposte al quesito iniziale risultando sia convincenti che propositive, come ad esempio quella relativa all’utilizzo di agenti di biocontrollo nella prevenzione dello sviluppo di *Aspergillus flavus* in campo, o

quella che ha enfatizzato la necessità di monitorare costantemente l'entità di una seconda via di assunzione delle micotossine, alternativa a quella alimentare, vale a dire quella derivante dalla inalazione di polveri contaminate in determinati luoghi di lavoro, od ancora alla individuazione di linee guida per il controllo delle micotossine nei cereali, alla associazione della presenza delle micotossine ad alimenti finora non pienamente investigati come gli integratori alimentari od, infine, alla raccolta di dati sulla contaminazione da micotossine emergenti. Questi aspetti ribadiscono, ancora una volta, che una risposta significativa alla domanda iniziale sta nel promuovere in modo sempre più rigoroso opportune azioni preventive in modo tale da minimizzare il fenomeno a partire dalla semina in campo. Particolarmente significative sono state le comunicazioni delle Autorità governative nazionali e comunitarie che hanno presentato le varie attività che sono sistemicamente promosse sul territorio, a testimonianza che il problema è ancora persistente ed in grado di esercitare un forte impatto non solo sul condizionamento delle produzioni agricole e dei mercati ma anche sul benessere delle specie animali e sulla salute del consumatore.

Vorrei pertanto rinnovare a tutti i convenuti, un sincero ringraziamento per l'interesse mostrato, per la professionalità e la viva partecipazione ai lavori del Congresso. Nell'augurare a tutti voi il mio consueto "buon lavoro", vi do appuntamento fin d'ora alla sesta edizione per la quale ho in animo di proporre nuove dinamiche di informazione al fine di costituire sempre più un unicum tra il produttore, il controllore ed il consumatore.

Carlo Brera  
*Dipartimento Sanità Pubblica Veterinaria  
e Sicurezza Alimentare  
Istituto Superiore di Sanità*

# CONSIDERAZIONI GENERALI SULLA PROBLEMATICHE DELLE MICOTOSSINE

Carlo Brera

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

## Introduzione

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

Il deterioramento delle colture a causa degli attacchi fungini, possono comportare gravi conseguenze economiche con perdite quantitative nei raccolti (25%) (1), e costi associati alle misure preventive o correttive da parte degli operatori del sistema agro-alimentare. L'esposizione umana alle micotossine deriva prevalentemente dal consumo di alimenti di origine vegetale contaminati o di origine animale come latte, carne e uova in virtù del trasferimento delle micotossine e dei loro metaboliti dai mangimi ai prodotti edibili. Una via di assunzione parallela, sia per gli animali che per l'uomo, è quella ambientale, derivante dalla inalazione di polveri di materie prime potenzialmente contaminate dalle micotossine, come i cereali e le spezie. Pertanto, la contaminazione da micotossine rappresenta un serio problema per la salute dell'uomo e per il benessere degli animali, in tutte le fasi della catena alimentare, dal campo alla tavola.

Nonostante quanto detto in premessa, ho voluto condividere in apertura di Congresso la mia posizione con quella dei partecipanti al fine di individuare una risposta al quesito: le micotossine rappresentano un rischio reale per il consumatore e per le specie animali?

Per alimentare il dibattito ho posto alcune domande, di seguito riportate, che ancora oggi non trovano risposte esaustive, in quanto non adeguatamente supportate da evidenze scientifiche.

Siamo in grado di effettuare una associazione diretta tra patologia ed eziologia delle patologie che ricorrono nei Paesi industrializzati?

Le nostre ricerche hanno individuato il pattern metabolico delle micotossine, indispensabile per una corretta caratterizzazione del rischio?

Siamo in grado di valutare quantitativamente gli effetti sinergici o additivi derivanti dalla co-presenza di più micotossine nella nostra dieta?

Siamo in grado di caratterizzare il rischio per la salute dei bambini dai 3 ai 10 anni derivante dai prodotti alimentari che hanno limiti massimi per le micotossine, pensati però per la popolazione adulta?

Possiamo con certezza escludere un rischio derivante dalla presenza, ampiamente documentata in letteratura, delle micotossine in taluni prodotti alimentari che sono ancora attualmente non regolamentati? Come fare per acquisire questa informazione?

Tra i vari approcci utilizzati dai ricercatori per valutare la esposizione del consumatore abbiamo individuato quello più attendibile? O sono tutti attendibili allo stesso modo?

In alcuni casi (citrinina, alcaloidi dell'ergot, alternaria, T2/HT2) la quantità e la qualità dei dati disponibili non è sufficiente a formulare una opinione sul rischio associato. Qual è la ragione principale?

Esiste un “sistema” riconosciuto che operi in modo coordinato per declinare in modo appropriato i vari risvolti della valutazione del rischio?

## Effetti tossici nell'uomo

Sebbene gli studi sugli animali abbiano fornito chiare indicazioni sui processi di interazione delle micotossine *in vivo*, non sono ancora state altrettanto ben definite le interazioni e i meccanismi di biotrasformazione nell'uomo. Attualmente, la ricerca deve ancora individuare con maggiore precisione i profili metabolici che caratterizzano le varie micotossine assunte con la dieta e che vengono poi trasformate, convertite ed eliminate dall'organismo sotto forma di metaboliti. Questa mancanza rende, pertanto, la valutazione del rischio per l'uomo un esercizio che in alcuni casi è in grado di dare una risposta quantitativa solo parziale. Altro aspetto fondamentale correlato è la mancanza di correlazione tra patologia e ruolo delle micotossine presenti nella dieta come agente eziologico. Infine, si registra 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.

Com'è noto, le micotossine sono state associate con un ampio spettro di patologie, sia acute che croniche (epatocarcinoma, epatopatie, cirrosi, tumore all'esofago, difetti del tubo neurale, nefropatia balcanica, beriberi, ergotismo, sindrome di Reye, Kwashiorkor) (2). La citata associazione, soprattutto nei Paesi industrializzati, non assume il significato di correlazione diretta ma solo di osservazione di co-incidenza tra contaminazione da micotossine e sviluppo della patologia. Ciò è dovuto sia alla presenza di molteplici fattori confondenti o concomitanti sia a quella di vari fattori coinvolti in una micotossicosi (fattori genetici, fisiologici, ambientali, oltre ai processi di assorbimento, distribuzione, biotrasformazione ed escrezione della micotossina), che finora hanno reso difficile il riconoscimento diretto del ruolo eziologico delle micotossine nello sviluppo ed evoluzione di talune patologie.

Gli effetti acuti dovuti a ingestione di alti livelli di contaminazione sono finora avvenuti solo nei Paesi in via di sviluppo, dove sussistono ancora problemi concomitanti di *food safety* e *food security*. Numerosi casi riportati sono consultabili in letteratura, dovuti prevalentemente alla ingestione di aflatoxina B<sub>1</sub> (India, Malesia, Kenia) con danni a livello epatico (3-5), e di fumonisine e deossinivalenolo con sintomi acuti a livello del sistema gastro-intestinale (6-8). Per quanto attiene la associazione tra zearalenone e menarca precoce, sussistono solo ipotesi non adeguatamente supportate a livello scientifico (9).

Infine, risale all'epoca del Medio Evo il fenomeno dell'ergotismo, riemerso in Etiopia nel 1978, relativo a consumo di prodotti a base di segale contaminata da alcaloidi dell'ergot (10-11).

Patologie croniche sono invece più frequentemente osservate nei Paesi industrializzati, dove i prodotti alimentari sono caratterizzati da bassi livelli di contaminazione, che se assunti con regolarità con la dieta giornaliera possono manifestare patologie molto gravi come le neoplasie, ritardi e/o difetti nella crescita e una sensibile immunodepressione.

Valutazioni, supportate scientificamente, sulla capacità di modificare l'azione del DNA da parte delle micotossine sono, inoltre, ampiamente disponibili.

L'esposizione ad aflatoxine è stata, ad esempio, associata alla mutazione 249ser del p53 con un aumento osservato della incidenza di epatocarcinoma di circa 3,5 volte. In uno studio effettuato in Gambia, la mutazione è stata rilevata nel plasma di soggetti apparentemente sani (5%), soggetti affetti da cirrosi (15%) e da epatocarcinoma (40%) (12).

È importante, inoltre, sottolineare che a dispetto di una ampia documentazione sulla esposizione *in utero* alle micotossine, scarsa attenzione è stata data dalla ricerca alla rilevanza di questa esposizione sui danni provocati a livello embrionale e al feto durante la gestazione.

In uno studio condotto nel Regno Unito, è stato descritto l'effetto teratogeno ed embriotossico di almeno 40 micotossine in alcune specie animali (13).

Recenti studi epidemiologici hanno rivelato che un'alta incidenza di difetti del tubo neurale era associata ad una significativa contaminazione da fumonisine di alcuni prodotti a base di mais consumati in alcune regioni del Texas, Cina, Guatemala e di alcuni Paesi del Sud Africa (14).

Poiché è nota l'interferenza che le fumonisine sono in grado di esercitare con il metabolismo dei folati ed è altrettanto nota la relazione tra difetti del tubo neurale e deficienza dei folati, l'ipotesi di un ruolo eziologico delle fumonisine in questa patologia è alquanto verosimile.

Con riferimento ai difetti nella crescita, gli studi sperimentali sugli animali hanno chiaramente dimostrato che la presenza delle micotossine nella razione induce in modo pressoché sistematico il rifiuto del cibo e un conseguente danneggiamento del regolare sviluppo dell'animale (15).

Uno studio condotto nel 2002 in Paesi africani (16) ha evidenziato che in bambini di età compresa tra i 5 mesi e i 9 anni, l'esposizione da aflatossine era accompagnata da arresto della crescita e forte sottopeso. Questo andamento era probabilmente associabile allo stato di malnutrizione durante il periodo di gestazione e conseguentemente anche dopo la nascita. Un'altra condizione molto interessante legata a questo studio era la concomitante alta presenza di malattie infettive, ponendo forti indizi che la co-presenza di questi due fattori acuisce la gravità degli effetti legati a una crescita ritardata.

Infine, relativamente alla sindrome *Kwashiorkor*, non è ancora stato stabilito se una alta incidenza di addotti delle aflatossine nei bambini affetti da questa patologia sia una causa o una conseguenza.

Per quanto riguarda l'effetto di immunosoppressione, è noto che tale effetto tossico sia causato negli animali da pressoché tutte le maggiori micotossine. Anche nell'uomo sussistono evidenze sostanziali che la presenza delle micotossine sia in grado di indurre effetti immunotossici sulla risposta cellulare, sui fattori umorali e sul ruolo delle citochine come mediatori del sistema immunitario.

Per quanto detto, la ricerca in questo settore dovrebbe essere quindi orientata verso lo sviluppo di modelli sperimentali alternativi a quelli derivanti dagli studi sugli animali e finalizzati alla valutazione in vivo degli effetti tossici delle micotossine sulla modulazione della espressione dei fattori che regolano la risposta immunitaria.

## Valutazione dell'esposizione

Un nuovo approccio che si sta affacciando è quello legato alla definizione dell'esposoma, vale a dire la totalità delle fonti di esposizione derivanti dagli ambienti e stili di vita, quindi non di natura genetica, cui l'uomo è esposto dalla nascita in poi. La sua declinazione, tuttavia, è ancora lontana dall'essere effettuata in modo sistematico in quanto si tratta di un'analisi alquanto complessa e di lunga durata (17).

Attualmente, per valutare il rischio di esposizione del consumatore derivante dalla presenza delle micotossine nella dieta, sono ancora ampiamente utilizzati approcci deterministici e/o probabilistici, sia attraverso la valutazione della contaminazione nei prodotti alimentari attraverso metodologie diverse come gli studi di dieta totale o la dieta in doppio, o attraverso l'analisi dei biomarcatori nei fluidi biologici (sangue, urine, feci, latte materno).

In tutti i casi citati, sussistono numerose variabilità (quote di consumo, durata della esposizione, tempi di vita attesi, ecc.) e incertezze (processi di estrapolazione all'uomo della dose tossica e la durata dell'effetto, differenti suscettibilità tra uomo e specie animali, così come tra i gruppi di popolazione considerati, stima dei valori inseriti, calcolo, interpretazione e documentazione dei risultati ottenuti) che possono condizionare l'attendibilità dei risultati che si ottengono ed è quindi imperativo, per diminuirne gli effetti, valutarne la loro presenza sia qualitativamente che quantitativamente.

In particolare, per quanto riguarda i biomarcatori di esposizione che si ricercano nei fluidi biologici, condizione necessaria è la loro caratterizzazione quali-quantitativa, per poter correlare la loro presenza, sia sottoforma di tossina principale sia come metabolita, con gli effetti tossici che ne possono derivare.

Ad esempio, per le aflatoossine sono stati individuati metaboliti nelle urine (aflatoossina M<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>-N<sub>7</sub>-Gua, aflatoossina P<sub>1</sub>, aflatoossina Q<sub>1</sub> e il coniugato aflatoossina B<sub>1</sub>-acido mercapturico) e nel siero (addotti aflatoossina-albumina).

Le fumonisine, altra classe di micotossine ampiamente diffuse nelle nostre coltivazioni di mais, sono rivelabili nelle urine e nelle feci, principalmente nella loro forma inalterata, in quanto recentemente il biomarcatore di esposizione che è stato ricercato per molti anni, vale a dire l'aumento del rapporto sfinganina/sfingosina come risultato della inibizione dell'enzima ceramide sintasi, non sembra trovare più ampio consenso a favore della più recente individuazione della 1-deossisfinganina per lo stesso effetto inibitore.

Per altre micotossine come lo zearalenone e il deossinivalenolo, sono da ricercare essenzialmente le forme glucosidate (zearalenone-16-O-β-glucoside, zearalenone-4-glucoside, zearalenone-14-glucoside e il deossinivalenolo-3-glucoside) e quelle acetilate, prevalentemente nelle urine (18-20).

Queste forme sono state recentemente oggetto di una opinione della *European Food Safety Authority* (EFSA), che ha formulato, tra l'altro, un nuovo termine per la loro caratterizzazione, vale a dire "micotossine modificate", comprendendo le cosiddette micotossine mascherate, coniugate, nascoste e legate (21).

Anche se sulla base di pochi dati a disposizione, il *panel* CONTAM di EFSA ha stabilito che la tossicità delle forme modificate è comparabile a quella delle micotossine precursori, sulla base della evidenza scientifica che la potenziale tossicità si riferisce al possibile rilascio in vivo dopo idrolisi nel tratto gastrointestinale.

Per quanto detto, la valutazione della esposizione di una popolazione di soggetti, effettuata attraverso la valutazione delle tossine nei fluidi biologici, non può più prescindere dalla valutazione quali-quantitativa di tutte le forme in cui la micotossina è effettivamente presente nell'organismo umano.

Per riprendere una delle domande iniziali, un'ormai pressoché costante osservazione che scaturisce dagli studi di esposizione è che i bambini di età compresa tra i 3 e i 10 anni risultano quasi sempre sovraesposti a livelli che in alcuni casi superano i cosiddetti *Health-Based Guidance Values* (HBGV) anche solo con il consumo di un solo alimento.

## 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 e 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 a breve, i cui criteri sono descritti in una presentazione all'interno di questo Congresso.

Inoltre, sarebbe fondamentale acquisire dati di incidenza di contaminazione da micotossine in quei prodotti che non sono attualmente regolati, a livello comunitario, da limiti massimi tollerabili.

## **Normativa**

È doveroso ricordare che la fissazione di un limite massimo tollerabile non è strettamente correlato agli aspetti sanitari legati alla valutazione del rischio quanto piuttosto alla incapacità a livello di filiera di commercializzare prodotti a livelli inferiori a quelli definiti come limiti di legge. Il superamento dei limiti, infatti, di fatto non comportando, tendenzialmente, alcun effetto immediato e grave sulla salute del consumatore, comporta e implica solo l'eventuale ritiro dal commercio, in quanto a quel superamento corrisponde, di fatto, una non appropriata effettuazione delle attività di produzione, vale a dire una non corretta effettuazione delle buone pratiche di coltivazione, stoccaggio, trasformazione e commercializzazione del prodotto alimentare.

Va però anche sottolineato, che, 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 e sorveglianza come precedentemente osservato. Alimenti come i legumi, gli integratori alimentari ad eccezione del riso rosso fermentato, le erbe infusionali, i prodotti carnei e altri prodotti che entrano in modo significativo nella nostra dieta alimentare sono privi di un limite massimo tollerabile, lasciando una lacuna informativa che non consente di disporre di un quadro completo dei livelli di assunzione da parte del consumatore. Stesso discorso per quanto riguarda gli alimenti zootecnici; come noto, solo l'aflatossina B<sub>1</sub> è regolamentata, mentre per le altre micotossine esistono solo livelli guida secondo la Raccomandazione 576/2006/CE (22). 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**

Come detto, la fissazione di un limite massimo tollerabile, pur non rappresentando un indicatore di rischio reale per la salute del consumatore, costituisce per il produttore una soglia di riferimento a cui prestare la massima attenzione, vista anche la piena responsabilità della sicurezza d'uso degli alimenti, che gli è stata attribuita con il Regolamento (CE) 178/2002 (23).

Per tale ragione, è noto che i livelli di micotossine, come di altri contaminanti, adottati nella maggior parte delle aziende rispondono maggiormente a livelli di azione piuttosto che alla osservanza dei livelli di legge, ove esistenti.

Da sempre, il ricorso alla considerazione che l'adozione di misure preventive è l'unica strategia percorribile per minimizzare il fenomeno si scontra con la difficile applicabilità nelle condizioni reali. Così, nonostante le innumerevoli informazioni che a livello scientifico sono

state prodotte per minimizzare il problema a partire dalla fase pre-raccolto, 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.

Per contro, non è altrettanto immaginabile "alfabetizzare" il consumatore sui prodotti alimentari maggiormente a rischio, attraverso l'utilizzo di *claims* in etichetta, in quanto finora non è stata ancora effettuata, per quanto attiene la contaminazione da micotossine, una corretta comunicazione del rischio in fatto di origine, tipologia, composizione e probabilità di rischio associato al consumo dei prodotti alimentari che caratterizzano la dieta del consumatore italiano.

Altro punto è che a livello dell'autocontrollo, la principale condizione da rispettare è quella di ottenere risultati in breve tempo (non più di 15 minuti in fase di accettazione). Ciò non risulta possibile senza un concomitante livello di incertezza derivante dalla non rappresentatività dei campioni prelevati e da una precaria linearità della risposta di test rapidi o di screening. Pertanto, ogniqualvolta sia esercitato il controllo del materiale in entrata, dovrebbe essere stata preventivamente assicurata almeno l'attendibilità degli strumenti diagnostici di rapida esecuzione, tramite studi comparativi con metodi di conferma.

Ritengo sia doveroso, inoltre, puntualizzare che è dalla gestione del controllo della presenza delle micotossine subito dopo la fase del raccolto che possono innescarsi strategie pericolose di personalizzazione della conduzione delle attività finalizzate alla riduzione della contaminazione.

## Conclusioni

Per quanto detto, si ritiene che la domanda iniziale dovrebbe essere rivolta anche a chi decide le priorità di assegnazione dei fondi per la ricerca, per consentire a chi è responsabile della sicurezza alimentare di acquisire la necessaria informazione per garantire in modo sempre più concreto la tutela della salute del consumatore e di quella degli animali.

La sicurezza alimentare deve, insomma, poter contare su forti investimenti per prevenire il rischio, gestire crisi ed emergenze che si possono venire a creare e assicurare un'attività di controllo contraddistinta da un elevato livello di qualità.

## Bibliografia

1. Mannon J, Johnson E. Fungi down on the farm. *New Scientist* 1985;105:12-6.
2. Bryden WL. Mycotoxins in the food chain: human health implications. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 2007;16 Suppl 1:95-101.
3. Bhat RV. Aflatoxins: successes and failures of three decades of research. *ACIAR Proceedings* 1991;36:77-82.
4. Lye MS, Ghazali AA, Mohan J, Alwin N, Mair RC. An outbreak of acute hepatic encephalopathy due to severe aflatoxicosis in Malaysia. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* 1995;53:68-72.
5. Shephard GS. Mycotoxins worldwide: current issues in Africa. In: Barug D, van Egmond H, Lopez-Garcia R, van Ossenberg T, Visconti A (Ed.). *Meeting the mycotoxin menace*. Wageningen, the Netherlands: Wageningen Academic Publishers; 2004. p. 81-8.

6. Bhat RV, Sherry PH, Amruth RP, Sudershan RV. A foodborne disease outbreak due to the consumption of mouldy sorghum and maize containing fumonisins mycotoxins. *Journal of Toxicology Clinical Toxicology* 1997;35:249-55.
7. Luo XY. Outbreaks of moldy cereals poisoning in China. In: *Issues in food safety*. Washington, DC: Toxicology Forum; 1988. p 56-63.
8. Bhat RV, Beedu SR, Ramakrishna Y, Munski KL. Outbreak of tricothecene mycotoxicosis associated with consumption of mould-damaged wheat production in Kashmir Valley, India. *Lancet* 1989;1:35-7.
9. Hagler Jr. WM, Towers NR, Mirocha CJ, Eppley RM, Bryden WL. Zearalenone: mycotoxin or mycoestrogen? In: Summerell BA, Leslie JF, Backhouse D, Bryden WL, Burgess LW (Ed.). *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium*. St Paul, Minnesota: APS Press; 2001. p. 321-31.
10. Matossian MK. *Poisons of the past*. New Have: Yale University Press; 1998.
11. King B. Outbreak of ergotism in Wollo, Ethiopia. *Lancet* 1979;1:1411.
12. Kirk GD, Lesi OA, Mendy M, Szymańska K, Whittle H, Goedert JJ, Hainaut PE, Montesano R. 249(serr) TP53 mutation in plasma DNA, hepatitis B viral infection, and risk of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2005;24:5858-67.
13. Cawdell-Smith AJ, Edwards MJ, Bryden WL. Mycotoxins and abnormal embryonic development. In: Panter KE, Wierenga TL, Pfister JA (Ed.). *Poisonous plants: global research and solutions*. Wallingford, UK: CABI Publishing; 2007. p. 525-32.
14. Voss KA, Gelineau-vanWaes JB, Riley RT. Fumonisins: current research trends in developmental toxicology. *Mycotoxin Research* 2006;22:61-9.
15. Dersjant-Li Y, Versteegen MWA, Gerrits WJJ. The impact of low concentrations of aflatoxin, deoxynivalenol or fumonisins in diets on growing pigs and poultry. *Nutrition Research Reviews* 2003;16:223-39.
16. Gong YY, Cardwell K, Hounsa A, Egal S, Turner PC, Hall AJ, Wild CP. Dietary aflatoxin exposure and impaired growth in young children from Benin and Togo: Cross sectional study. *British Medical Journal* 2002;325:20-1.
17. Wild C. Complementing the genome with an “exposome”: the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 2005;14:1847-50.
18. Zitomer NC, Mitchell T, Voss KA, Bondy GS, Pruett ST, Garnier-Amblard EC, Liebeskind LS, Park H, Wang E, Sullards MC, Merrill AH Jr, Riley RT. Ceramide synthase inhibition by fumonisin B1 causes accumulation of 1-deoxysphinganine: a novel category of bioactive 1-deoxysphingoid bases and 1-deoxydihydroceramides biosynthesized by mammalian cell lines and animals. *Journal Biological Chemistry* 2009;284:4786-95.
19. Wild CP, Gong YY. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis* 2010;31(1):71-82.
20. Kovalsky Paris MP, Schweiger W, Hametner C, Stückler R, Muehlbauer GJ, Varga E, Krska R, Berthiller F, Adam G. Zearalenone-16-O-glucoside: a new masked mycotoxin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2014;62(5):1181-9.
21. European Food Safety Authority. Scientific opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed. *EFSA Journal* 2014;12(12):3916.
22. Europa. Raccomandazione 576/2006/CE della Commissione del 17 agosto 2006 sulla presenza di deossinivalenolo, zearalenone, ocratossina A, tossine T-2 e HT-2 e fumonisine in prodotti destinati all'alimentazione degli animali. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 229/7 del 23 agosto 2006.

23. Europa. Regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 28 gennaio 2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare. *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* L 31/1 del 1° febbraio 2002.

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

Tiziana Amoriello (a), Gabriella Aureli (b), Andreina Belocchi (b), Mauro Fornara (b),  
Giuliano Mazzieri (c), Cecilia Ripa (b), Fabrizio Quaranta (b)

(a) *Centro di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione, Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Roma, Italia*

(b) *Unità di Ricerca per la Valorizzazione Qualitativa dei Cereali, Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Roma, Italia*

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

## Introduzione

Le micotossine sono prodotti del metabolismo secondario di alcuni funghi, tossiche per la salute umana e animale. La contaminazione da micotossine comporta ricadute negative sulla qualità della materia prima, sui prodotti derivati, sugli aspetti economico-commerciali ad esse collegati e sulla sicurezza dei consumatori ed è una delle problematiche più sentite in alcune filiere agroalimentari, in particolare in quella cerealicola. Tra le tossine che possono ritrovarsi nel frumento duro (*Triticum durum* Desf.), il deossinivalenolo (DON) è una tra le più frequenti, in particolare nelle aree di coltivazione dell'Italia centrale e settentrionale. Il DON è un metabolita di funghi appartenenti al genere *Fusarium* spp., in particolare *F. graminearum* e il *F. culmorum* (Boutigny *et al.*, 2008; Miller, 2008; Xu, 2003), agenti della fusariosi della spiga (*Fusarium Head Blight*, FHB). L'incidenza della fusariosi e la produzione del DON dipendono da molti fattori, alcuni legati al rapporto ospite-patogeno (es. caratteristiche tossigene del fungo, suscettibilità delle cultivar, ecc.), altri legati all'ambiente (es. stress abiotici e/o biotici subiti dalle piante, condizioni climatiche caldo-umide intorno alla fase di fioritura, pratiche agronomiche, ecc.). La resistenza del DON alla degradazione ne favorisce la permanenza anche nelle fasi di post-raccolta, fino al prodotto finito. Non potendo intervenire con azioni di detossificazione sulla materia prima (Regolamento (CE) 1881/2006), la migliore strategia per la riduzione dell'accumulo delle micotossine nelle cariossidi si esplica soprattutto attraverso azioni di prevenzione e gestione del rischio da parte degli operatori della filiera, che comprende, fra l'altro, l'adozione di idonee tecniche agronomiche. La conoscenza della diffusione e dell'entità di contaminazione, derivante dal monitoraggio del territorio, costituiscono di per sé elementi fondamentali nella prevenzione.

Una mappatura delle aree, tracciata con approccio geostatistico in base al livello di rischio di contaminazione, può rappresentare un utile strumento sia per razionalizzare il campionamento, evidenziando la necessità di aumentare la numerosità campionaria nelle zone potenzialmente ad alto rischio, sia per una stima del rischio anche in zone non campionate. La disponibilità di mappe aggiornate potrebbe fornire agli operatori del settore un ulteriore supporto nelle decisioni su eventuali interventi di difesa fitosanitaria, in relazione all'andamento climatico stagionale.

Lo scopo di questo studio è stato quello di svolgere un'indagine conoscitiva sulla distribuzione spaziale del DON nella regione Marche attraverso l'applicazione di un metodo geostatistico per l'elaborazione dei dati di contaminazione del frumento duro in coltura convenzionale provenienti da campionamenti effettuati nel poliennio 2006-2014.

## Materiali e metodi

Lo studio è stato effettuato su 821 campioni di frumento duro raccolti in diversi ambiti territoriali e con differenti condizioni pedo-climatiche della regione Marche nel poliennio 2006-2014. La contaminazione da DON è stata valutata con metodo immunoenzimatico ELISA utilizzando il Ridascreen® DON (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germania) con limite di rivelabilità (LOD dall'inglese *Limit of Detection*) pari a 18,5 µg/kg. Per effettuare l'analisi statistica dei dati, il valore dei campioni risultati negativi al test è stato posto uguale LOD/2 (9,25 µg/kg). Il limite massimo ammesso per il DON è pari a 1750 µg/kg, riferito alla materia prima non trasformata (Regolamento (CE) 1881/2006) che deve tenere conto anche della misura dell'incertezza del dato analitico (Brera, 2011).

I dati ottenuti sono stati inizialmente elaborati con la statistica descrittiva classica secondo la quale si assume l'indipendenza spaziale dei campioni e la casualità della variabilità spaziale intorno alla media, senza riferimento alla posizione geografica dei singoli punti di campionamento. In realtà spesso la dipendenza e la variabilità spaziale contengono una componente strutturale dovuta a molti fattori interconnessi (es. l'azione degli agenti atmosferici, le caratteristiche pedologiche, ecc.), per cui siti vicini risultano meno simili tra loro e più simili ad altri posti a distanze maggiori. Ciò si traduce in una distribuzione non casuale e in una correlazione spaziale dei valori della contaminazione da DON che viene valutata attraverso un'analisi geostatistica dei punti campionati (Oliver & Webster, 2014). Nell'approccio geostatistico le relazioni tra i punti campionati possono essere espresse in termini delle loro distanze relative  $h$  (*lag* o ritardo) e non in funzione delle posizioni assolute. Nell'ipotesi di stazionarietà intrinseca, una misura della variabilità spaziale è data dalla semivarianza  $\gamma(h)$ , stimata dalla media delle differenze al quadrato fra le osservazioni separate dallo stesso *lag* e rappresentata attraverso il semivariogramma. In generale la semivarianza aumenta con la distanza tra i punti, fino a raggiungere un valore più o meno costante (*sill*) ad una certa distanza di separazione (*range*). I campioni separati da una distanza maggiore del *range* possono considerarsi spazialmente non correlati. Il *nugget* rappresenta la varianza intrinseca dei dati quando il *lag* tende a zero, dovuta generalmente ad una variabilità su una scala più piccola di quella scelta per il campionamento e/o ad errori di misura. Il fitting del variogramma si ottiene attraverso modelli matematici. La scelta del modello è essenziale per la successiva fase di interpolazione (*ordinary kriging*) che permette di ottenere stime ottimali e non distorte della variabile regionalizzata in punti non campionati e quindi la produzione di mappe tematiche. La precisione della stima in punti non campionati può essere determinata dalla radice quadrata della varianza di *kriging* e rappresentata attraverso una mappa di errore. Per l'analisi geostatistica sono stati utilizzati solo i campioni risultati positivi ( $DON \geq LOD$ ) nel poliennio per ognuna delle 91 località sul territorio marchigiano e mediati sugli anni. Solo 73 località hanno mostrato valori superiori al limite di rivelabilità. I dati sono stati log-trasformati per soddisfare il requisito del metodo che necessita di dati distribuiti normalmente. La spazializzazione dei dati e la creazione delle mappe tematiche sono state effettuate mediante il software ISATIS® (Geovariances, 2014).

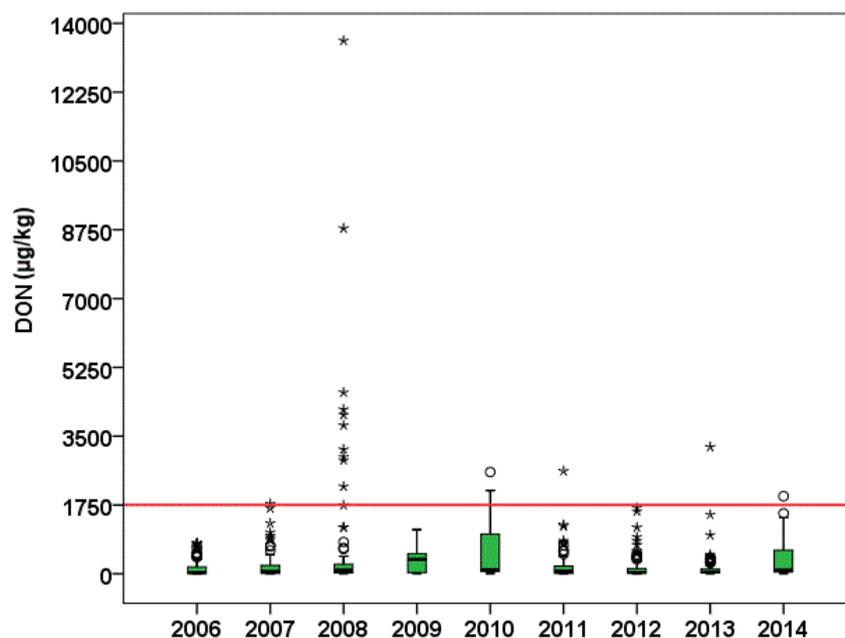
## Risultati e discussione

Nel poliennio 2006-2014, il 73% dei campioni di frumento duro provenienti dalla regione Marche è risultato positivo alla contaminazione da DON (Tabella 1).

**Tabella 1. Statistiche descrittive della contaminazione da DON: media, deviazione standard (DS), range (min-max), mediana (Q2), 75-esimo percentile (Q3), 95-esimo percentile (P95). Campioni positivi: percentuale di campioni positivi e media corrispondente. LOD = 18,5 µg/kg. I valori al di sotto del LOD sono stati posti uguali a 9,25 µg/kg**

Anni	Intero dataset (n.=821)						Campioni positivi (conc. DON ≥LOD)	
	Media µg/kg	DS µg/kg	Range µg/kg	Q2 µg/kg	Q3 µg/kg	P95 µg/kg	Campioni %	Media µg/kg
<b>2006</b>	136	204	<LOD – 784	29	192	668	54	244
<b>2007</b>	190	309	<LOD – 1780	52	214	886	70	269
<b>2008</b>	734	1967	<LOD – 13561	87	247	4138	86	853
<b>2009</b>	361	350	<LOD – 1123	364	523	1106	83	432
<b>2010</b>	605	883	<LOD – 2587	107	1204	2188	89	679
<b>2011</b>	174	326	<LOD – 2614	56	198	761	74	232
<b>2012</b>	129	251	<LOD – 1678	40	132	568	63	198
<b>2013</b>	130	327	<LOD – 3223	46	119	416	84	158
<b>2014</b>	372	541	<LOD – 1974	86	649	1442	95	414
<b>2006-2014</b>	243	730	<LOD – 13561	55	192	1009	73	330

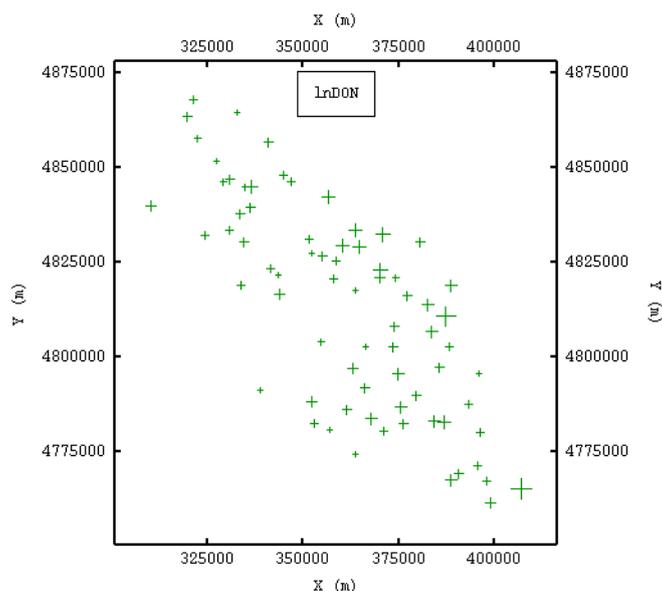
I valori di contaminazione sono risultati tuttavia piuttosto contenuti (media: 243 µg/kg; mediana: 55 µg/kg; 95-esimo percentile: 1009 µg/kg) e generalmente molto al di sotto del valore di 1750 µg/kg (Figura 1), soglia superata solo dal 3% dei campioni analizzati.



**Figura 1. Box plot delle concentrazioni di DON (µg/kg) per anno. I dati anomali sono indicati con i cerchi, gli outliers con le stelle**

Le distribuzioni annuali dei livelli di contaminazione registrati sono risultate fortemente asimmetriche; il 2008 e il 2010 sono stati gli anni nettamente più contaminati, con valori medi pari a 734  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e 605  $\mu\text{g}/\text{kg}$  rispettivamente. In queste due annate le condizioni climatiche dell'ambiente di coltivazione (precipitazioni abbondanti che hanno favorito la dispersione dell'inoculo, elevata umidità e bagnatura superficiale della spiga) sono risultate più favorevoli all'evoluzione epidemica della malattia fungina durante le fasi di spigatura/primo stadio di riempimento.

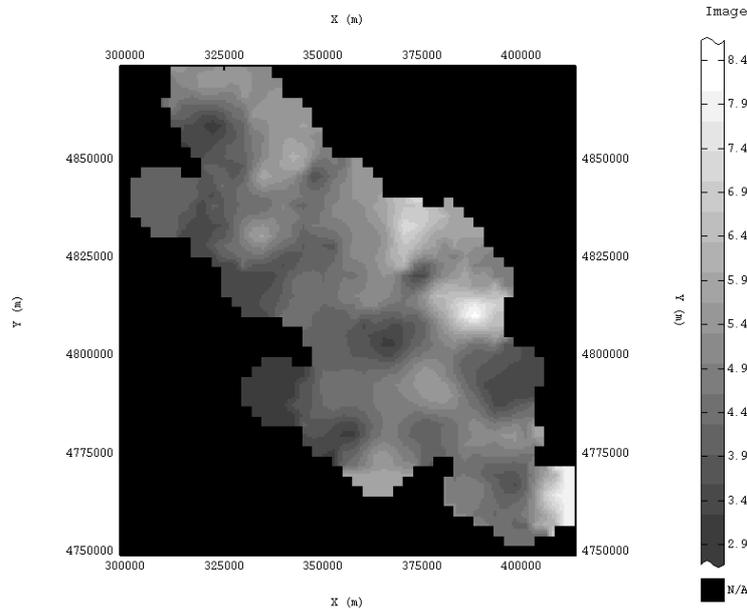
La distribuzione geografica dei livelli medi di contaminazione log-trasformati ( $\ln\text{DON}$ ) per i campioni risultati positivi nel poliennio 2006-2014 è rappresentata in Figura 2. Attraverso la trasformazione logaritmica è stata rilevata una certa eterogeneità dei livelli di contaminazione ma, allo stesso tempo, è stato possibile evidenziare un gradiente di contaminazione crescente dalle zone interne verso quelle costiere della Regione.



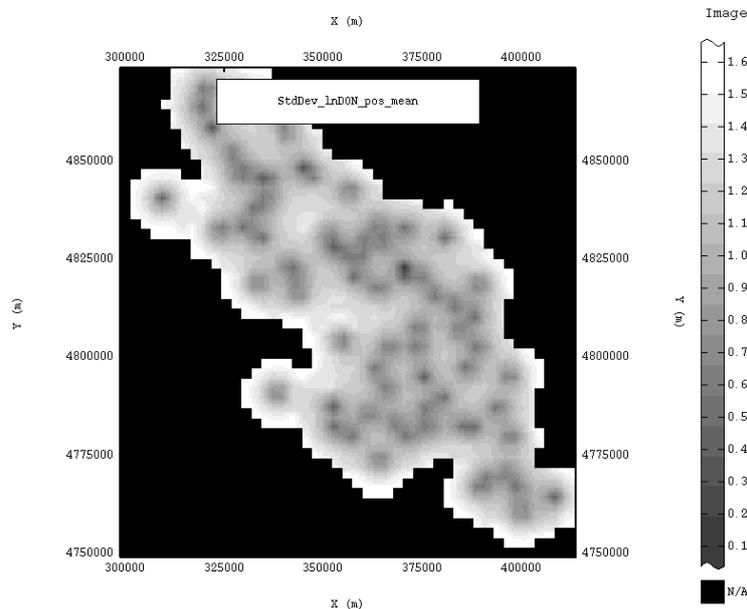
**Figura 2. Distribuzione geografica dei livelli medi di contaminazione log-trasformati ( $\ln\text{DON}$ ) per i campioni risultati positivi nel 2006-2014. I simboli più grandi corrispondono a valori più elevati di DON. X e Y = coordinate geografiche delle Marche in metri**

Nell'analisi geostatistica è stata inizialmente verificata l'eventuale sussistenza di anisotropia spaziale. Poiché il test è risultato negativo, la variabile è stata analizzata in modo omnidirezionale nella costruzione del semivariogramma. Il semivariogramma sperimentale dei livelli di contaminazione è stato spazializzato sulla base di un modello con una combinazione di un effetto nugget e di una struttura sferica ( $\text{lag} = 3600 \text{ m}$ ;  $\text{sill} = 1,27$ ;  $\text{range} = 9248 \text{ m}$ ;  $\text{nugget} = 0,67$ ). Il *nugget* diverso da zero indica probabilmente la presenza di una variabilità su una scala più piccola di quella scelta per il campionamento. La correlazione spaziale si annulla a distanze superiori a 9 km: ciò fornisce un'indicazione importante nella programmazione dei piani di campionamento. La mappa tematica risultante dalla modellizzazione con il metodo di interpolazione dell'*ordinary kriging* (Figura 3) ha permesso di mostrare una stima della distribuzione spaziale del DON nel frumento duro nei siti non campionati sul territorio marchigiano. È evidente una differente severità della contaminazione che è risultata più accentuata verso le zone costiere, dove l'influenza del mare (umidità più elevate) associata ad altitudini minori si riflette sull'ambiente di coltivazione creando delle condizioni probabilmente

favorevoli all'insorgenza e alla diffusione delle fusariosi. Gli errori di stima (Figura 4) sono piuttosto contenuti su quasi tutta l'area in esame con l'eccezione degli effetti di bordo e di alcune piccole aree interne, dove dovrebbe essere infittito il campionamento per una maggiore precisione della stima.



**Figura 3. Distribuzione geografica dei livelli medi di contaminazione log-trasformati (lnDON) per i campioni risultati positivi nel poliennio 2006-2014. Le aree in grigio scuro sono stimate, con il metodo di interpolazione dell'ordinary kriging, a basso rischio di contaminazione da DON mentre le aree in bianco a maggior rischio. X e Y = coordinate geografiche delle Marche in metri**



**Figura 4. Distribuzione geografica degli errori di stima per i livelli medi di contaminazione log-trasformati (lnDON). Le aree in grigio scuro sono quelle stimate con una maggiore precisione mentre per quelle in bianco gli errori di stima sono più elevati. X e Y = coordinate geografiche delle Marche in metri**

Nel lungo periodo di studio (9 anni) sono stati registrati livelli di contaminazione da DON nelle Marche generalmente moderati. L'analisi geostatistica, oltre a fornire delle stime sui siti non campionati, ha permesso di analizzare la distribuzione spaziale dei livelli di DON, evidenziando un gradiente che aumenta dalle zone interne verso quelle costiere, probabilmente a causa di condizioni pedo-climatiche più favorevoli allo sviluppo dei *Fusarium* DON-produttori. Le mappe tematiche ottenute in via preliminare sul frumento duro possono rappresentare un punto di partenza per migliorare la caratterizzazione degli areali di coltivazione, per ottimizzare i piani di campionamento e per fornire agli operatori agricoli uno strumento innovativo e utile nella programmazione delle azioni di prevenzione di contaminazione da DON, al fine di un miglioramento della qualità igienico-sanitaria delle produzioni cerealicole.

## Bibliografia

- Boutigny AL, Forget FR, Barreau C. Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium* trichothecenes. *Eur Plant Pathol* 2008;121:411-23.
- Brera C. *Linea guida sulla interpretazione dei regolamenti comunitari nella valutazione della conformità del Deossinivalenolo (DON) nel frumento e prodotti derivati*. Milano: ITALMOPA; 2011.
- Europa. Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 364/5 del 20 dicembre 2006
- Miller JD. Mycotoxins in small grains and maize: Old problems, new challenges. *Food Addit Contam* 2008;25(2):219-30.
- Oliver MA, Webster R. A tutorial guide to geostatistics; Computing and modelling variograms and kriging. *Catena* 2014;113:56-9.
- Wegulo SN. Factors influencing deoxynivalenol accumulation in small grain cereals. *Toxins* 2012;4:1157-80.
- Xu X. Effects of environmental conditions on the development of *Fusarium* ear blight. *European Journal of Plant Pathology* 2003;109:683-9.

# 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

Antonio Armentano, Simona Summa, Sonia Lo Magro, Marilena Muscarella  
*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia, Italia*

## Introduzione

La frutta a guscio è fra i prodotti alimentari maggiormente soggetti a possibile contaminazione da aflatossine totali (AF<sub>tot</sub>). Negli ultimi anni in Italia è aumentata l'importazione di frutta a guscio da Paesi extra-europei soprattutto asiatici, 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 (*Food and Feed Safety Alerts*), 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. Tra i numerosi metodi presenti in letteratura per la determinazione delle aflatossine nei prodotti alimentari (metodi di screening immunoenzimatici, metodi cromatografici), la cromatografia liquida ad alte prestazioni (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) abbinata alla rivelazione fluorimetrica con derivatizzazione fotochimica post-colonna offre un'elevata affidabilità e sensibilità dell'analisi senza costi elevati per l'acquisto e la gestione della strumentazione. I limiti di legge per l'aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) e per le aflatossine totali (AF<sub>tot</sub>: AFB<sub>1</sub> + AFB<sub>2</sub> + AFG<sub>1</sub> + AFG<sub>2</sub>) nella frutta a guscio destinata al consumo umano diretto o utilizzata come ingrediente sono riportati nel Regolamento (CE) 165/2010 (1). I valori variano da 2 a 12 µg/kg per l'AFB<sub>1</sub> e da 4 a 15 µg/kg per le AF<sub>tot</sub>. Questo Regolamento modifica il precedente Regolamento (CE) 1881/2006 (2) innalzando i tenori massimi di AF contenute nelle mandorle, nelle nocciole e nei pistacchi, nonché in prodotti derivati. Tale innalzamento nelle suddette matrici avrebbe effetti modesti sui margini di esposizione alimentare calcolati e sul rischio di tumori. Il Regolamento (CE) 178/2010 (3), invece, fissa i criteri per il campionamento, principale fonte di errore nella determinazione del tenore di aflatossine, data la loro eterogenea distribuzione nelle partite alimentari. In questo studio sono riportati i risultati di un monitoraggio, condotto negli anni 2012-2014, sulla presenza di AFB<sub>1</sub> e AF<sub>tot</sub> in frutta a guscio di provenienza extra-europea. L'analisi dei campioni è stata effettuata mediante un metodo analitico strumentale basato sull'uso di HPLC/FLD (*High Performance Liquid Chromatography with fluorescence detector*) (4) e derivatizzazione fotochimica post-colonna già sviluppato presso il nostro laboratorio e validato in accordo ai limiti di legge riportati nel Regolamento (CE) 1881/2006 (2). Per poter effettuare analisi sulle matrici mandorle, nocciole e pistacchi, il metodo è stato rivalidato ai livelli stabiliti dal più recente Regolamento (CE) 165/2010 (1).

## Materiali e metodi

### Reagenti e apparecchiature

I solventi usati per la preparazione dei campioni e per l'analisi cromatografica sono stati metanolo (Panreac Quimica S.L.U, Barcellona, Spagna), acetonitrile (Sigma-Aldrich,

Laborchemikalien, Seelze, Germania), acqua per HPLC (Fisher Scientific, Leics, Regno Unito). Sodio cloruro, sodio fosfato bibasico monoidrato, sodio fosfato monobasico sono stati forniti dalla Ditta Carlo Erba (con sede Milano, Italia). Tween 20<sup>®</sup> è stato acquistato dalla Sigma-Aldrich (Germania). Per la fase di purificazione sono state usate colonnine ad immunoaffinità AflaCLEAN<sup>™</sup> (LCTech GmbH, Dorfen, Germania). La soluzione standard delle Aftot (aflatossine totali) (5 µg/mL) è stata acquistata dalla Riedel-de Haën (Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze, Germania). La triturazione è stata effettuata con una grattugia/affetta mandorle (Dell'oro srl, Valmadrera, Italia). Le analisi strumentali sono state eseguite mediante cromatografo liquido Agilent Technologies SL 1200 Series (Waldbronn, Germania) corredato di rivelatore fluorimetrico e di un dispositivo per la derivatizzazione fotochimica on-line UVE<sup>™</sup> (LCTech GmbH, Dorfen, Germania). La colonna analitica usata è una Zorbax Eclipse<sup>®</sup> XDB-C18 (Agilent Technologies, 150 mm x 4,6 mm i.d., dimensioni particelle 5 µm), alla temperatura di 40°C e flusso pari a 1.0 mL/min, con volume di iniezione di 20 µL e fase mobile costituita da acqua/acetonitrile/metanolo (55/15/30, v/v/v). La derivatizzazione fotochimica è stata eseguita alla lunghezza d'onda  $\lambda = 254$  nm. Il rivelatore fluorimetrico è stato impostato alla  $\lambda_{eccitazione} = 365$  nm e  $\lambda_{emissione} = 435$  nm.

## Preparazione del campione

La preparazione del campione è già descritta in letteratura (4). A 15 g di campione di frutta a guscio macinata sono aggiunti 30 mL di una miscela metanolo/acqua 80/20 (v/v). Dopo agitazione in vortex per 1 min e filtrazione mediante filtri Whatman 40, 2 mL dell'estratto sono aggiunti a 8 mL di PBS (*Phosphate Saline Buffer*). La soluzione viene caricata su colonnine ad immunoaffinità (AflaCLEAN<sup>™</sup>, 3 mL). Dopo lavaggio con 10 mL di acqua, si procede ad eluizione con 2 mL di metanolo. In seguito ad evaporazione dell'eluato sotto flusso di azoto a 40° C, il residuo è ricostituito con 2 mL di fase mobile (acqua/acetonitrile/metanolo, 55/15/30) e filtrato su membrane Anotop 10 LC (0,2 µm, 10 mm, Whatman).

## Raccolta, campionamento e pretrattamento

73 campioni di frutta a guscio d'importazione, pervenuti all'IZS di Puglia e Basilicata negli anni 2012-2014, sono stati prelevati nei porti di Bari e di Gioia Tauro (RC). La maggior parte dei campioni erano rappresentati da pistacchi sgusciati per lo più provenienti dalla Turchia e mandorle sgusciate provenienti dagli USA. In Figura 1 è riportata la distribuzione dei campioni in base alla provenienza.

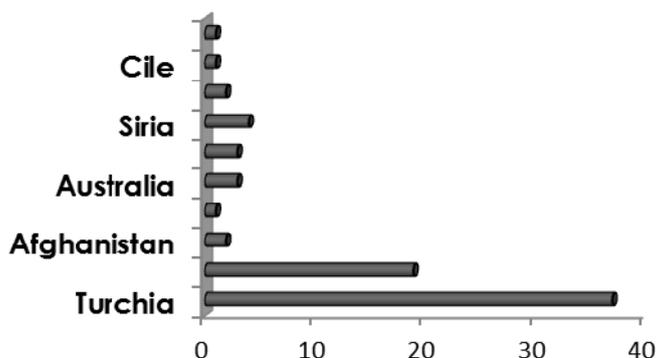


Figura 1. Distribuzione dei campioni in base alla provenienza

Poiché le partite di frutta a guscio erano tutte all'incirca pari a 15 tonnellate, il campionamento è stato effettuato in accordo al Regolamento (CE) 178/2010 (3), prelevando un campione globale di 20 kg, suddiviso ulteriormente in due aliquote da 10 kg (A e B). La frutta a guscio poteva essere destinata al consumo umano diretto o da sottoporre ad altri trattamenti prima del consumo. Tale distinzione è importante poiché i limiti di legge sono più bassi nel caso di prodotti destinati al consumo umano diretto (8 per AFB<sub>1</sub> e 10 µg/kg per le AF<sub>tot</sub> per le mandorle, pistacchi e semi di albicocche) rispetto a quelli fissati per prodotti da sottoporre ad altri trattamenti prima del consumo (12 per AFB<sub>1</sub> e 15 µg/kg per le AF<sub>tot</sub>). Dopo la triturazione, ciascuna delle due aliquote è stata ulteriormente suddivisa in tre sotto-aliquote. Il laboratorio ha eseguito l'analisi su una sotto-aliquota sia dell'aliquota A che della B. In accordo al Regolamento (CE) 401/2006 (5) il risultato dell'analisi è corretto per il recupero ed espresso con il valore di incertezza estesa. Per i prodotti destinati al consumo diretto, per il giudizio di non-conformità è sufficiente il superamento del limite anche per una sola delle aliquote (A e B). Per i prodotti da sottoporre ad altri trattamenti prima del consumo, per stabilire la conformità del campione si valuta la media delle concentrazioni di AFB<sub>1</sub> e AF<sub>tot</sub> riscontrate nelle aliquote A e B.

## Risultati e discussione

Il metodo adoperato per l'esecuzione delle analisi è stato rivalidato ai limiti di legge imposti dal Regolamento (CE) 165/2010 (1) considerando le performances analitiche e i criteri di rendimento riportati nel Regolamento (CE) 882/2004 (6) e Regolamento (CE) 401/2006 (5). Le performances analitiche sono state valutate in condizioni di riproducibilità intra-laboratorio (due sedute analitiche, sei prove per ogni seduta) ai livelli di additivazione di 10 µg/kg e 15 µg/kg di AF<sub>tot</sub> sulla matrice mandorle. Sono stati valutati i nuovi valori di precisione, di recupero e di incertezza, nonché la linearità del metodo ai nuovi livelli di validazione. Studi di robustezza hanno dimostrato che il metodo è applicabile anche alle matrici pistacchi e nocciole. Per quanto riguarda lo studio di monitoraggio, la distribuzione in base la conformità/non-conformità è riportata in Figura 2.

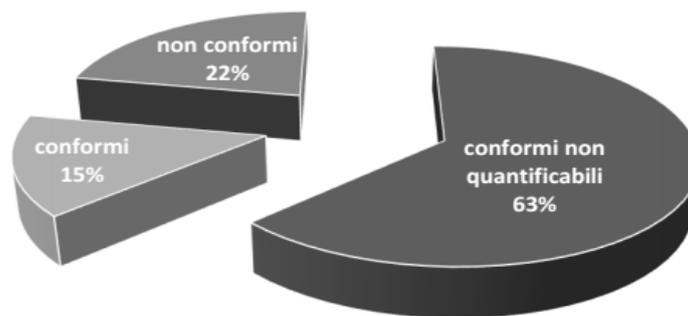


Figura 2. Distribuzione dei campioni in base alla conformità/non-conformità

Dei 73 campioni (146 aliquote), 46 (63%) hanno presentato concentrazioni di AFB<sub>1</sub> e di AF<sub>tot</sub> non quantificabili (valori inferiori al limite di quantificazione del metodo (*Limit of Quantification*, LOQ); LOQ<sub>AFB1</sub> = 0,6 µg/kg; LOQ<sub>AFtot</sub> = 0,9 µg/kg). 16 campioni (22%), tutti destinati al consumo umano diretto, 7 dei quali 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, evidenziando la disomogeneità nella distribuzione delle AF nei campioni analizzati. Tutti i campioni non-conformi presentavano positività sia per l'AFB<sub>1</sub> che per le AF<sub>tot</sub>. Il 15% dei campioni è risultato conforme con concentrazioni superiori al limite di quantificazione del metodo. Tra i campioni analizzati, i pistacchi sono stati individuati come la matrice maggiormente contaminata (33% su un totale di 42 campioni). 11 campioni di pistacchi su 14 non-conformi erano provenienti da Paesi asiatici. Nonostante l'innalzamento dei limiti dei tenori massimi di AF in accordo al Regolamento (CE) 165/2010, il numero di campioni non-conformi risulta significativo con un potenziale rischio per il consumatore.

## Conclusioni

In questo lavoro è stato effettuato uno studio di monitoraggio, relativo agli anni 2012-2014, sulla presenza di AFB<sub>1</sub> e AF<sub>tot</sub> in frutta a guscio di provenienza extra-europea. Le analisi sono state effettuate con un metodo HPLC con rivelazione fluorimetrica previa derivatizzazione fotochimica post-colonna, sviluppato e validato nel nostro laboratorio in accordo ai limiti di legge riportati nel Regolamento (CE) 165/2010 (1). Sebbene una considerevole percentuale di campioni risultasse non contaminata, è stata riscontrata la presenza di AFB<sub>1</sub> e AF<sub>tot</sub> a concentrazioni superiori ai limiti di legge con un'alta incidenza soprattutto nei pistacchi. Un aumento della frequenza dei controlli per la frutta a guscio di importazione sarebbe, quindi, opportuno al fine di tutelare la salute dei consumatori.

## Bibliografia

1. Europa. Regolamento (CE) n. 165/2010 della Commissione del 26 febbraio 2010 recante modifica, per quanto riguarda le aflatoxine del regolamento (CE) n 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 50/8 del 27 febbraio 2010.
2. Europa. Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 364/5 del 20 dicembre 2006.
3. Europa. Regolamento (CE) n. 178/2010 della Commissione del 2 Marzo 2010 che modifica il regolamento (CE) n.401/2006 per quanto concerne le arachidi, gli altri semi oleosi, la frutta a guscio, i semi di albicocche, la liquirizia e l'olio vegetale. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 52/32 del 3 marzo 2010.
4. Muscarella M, Iammarino M, Nardiello D, Lo Magro S, Palermo C, Centonze D, Palermo D. Validation of a confirmatory analytical method for the determination of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in foods and feed materials by HPLC with on-line fotochemical derivatization and fluorescence detection. *Food Addit Contam* 2009;26:1402-10.
5. Europa. Regolamento (CE) n. 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 70/12, del 9 marzo 2006.
6. Europa. Regolamento (CE) n. 882/2004 della Parlamento europeo e del Consiglio del 29 Aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 165/1 del 30 aprile 2004.

# RILEVAZIONE DI TOSSINE T<sub>2</sub> + HT<sub>2</sub> NEL FRUMENTO DURO BIOLOGICO COLTIVATO IN ITALIA

Gabriella Aureli, Andreina Belocchi, Mauro Fornara, Sahara Melloni, Fabrizio Quaranta  
 Unità di Ricerca per la Valorizzazione Qualitativa dei Cereali, Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Roma, Italia

## Introduzione

Il crescente apprezzamento per l'agricoltura biologica è strettamente legato allo sviluppo di una cultura basata essenzialmente sulla sostenibilità dei sistemi agricoli, l'utilizzo razionale ed equilibrato delle risorse naturali dell'ecosistema e, non ultima, la tutela del benessere dell'uomo e degli animali. I prodotti biologici rispondono alla richiesta dei consumatori di disporre di alimenti sani e di elevata qualità in quanto derivanti da materie prime prodotte senza l'impiego di fitofarmaci, fertilizzanti di sintesi e di organismi geneticamente modificati. Per la potenziale capacità di coniugare una produzione di qualità con le esigenze di conservazione e sostenibilità ambientale, la coltivazione in biologico continua a rappresentare un aspetto di grande interesse anche nel nostro Paese nel quale ha occupato una superficie di poco superiore a 1,3 milioni di ettari nel 2013 pari al 10,3% della superficie totale in biologico in Europa (1). In Italia il 15% della superficie a biologico è stata coltivata a cereali e tra questi il frumento duro (*Triticum durum* Desf.) si è confermata la coltura più diffusa con circa 74.000 ettari (2). Come per altre coltivazioni in biologico, anche per quelle cerealicole, la possibilità di produrre materia prima con elevati standard igienico-sanitari dipende principalmente dall'efficacia delle azioni di prevenzione in campo, basate soprattutto sulla scelta degli ambienti pedoclimatici maggiormente vocati per ciascuna specie e sull'impiego di buone pratiche agronomiche che prevedono, tra l'altro, l'uso di varietà resistenti o tolleranti alle fitopatie.

Fra gli elevati standard qualitativi richiesti dal mercato dei cereali uno dei più importanti riguarda il controllo della presenza di contaminanti ambientali della materia prima come le micotossine, metaboliti tossici per l'uomo e per gli animali prodotti da specie fungine tossigene largamente diffuse nelle colture cerealicole. I cereali e i prodotti derivati rappresentano la maggiore fonte di esposizione dell'uomo alle micotossine prodotte da *Fusarium* spp. (fusariotossine) (3, 4) per alcune delle quali è stato già stabilito il livello massimo consentito nei diversi alimenti (5, 6). Fra le micotossine non ancora soggette a limiti di natura normativa, ma che sono tuttavia oggetto di attenzione e studio da parte della Commissione Europea, le tossine T<sub>2</sub> e HT<sub>2</sub>, tricoteceni di tipo A prodotti principalmente da *F. langsethiae* e *F. sporotrichioides* (7, 8), assumono una particolare importanza per l'elevato grado di tossicità, la resistenza alla degradazione e, di conseguenza, la tendenza a permanere nella materia prima e nei prodotti di trasformazione. La recente Raccomandazione del 27 marzo 2013, adottata dalla Commissione Europea (9) sulla presenza di tossine T<sub>2</sub> e HT<sub>2</sub> nei cereali e nei prodotti a base di cereali, definisce un livello indicativo di 100 µg/kg relativo alla somma delle due tossine nella materia prima non trasformata, con l'invito agli Stati membri ad effettuare indagini per raccogliere informazioni sui fattori che determinano tenori relativamente elevati delle tossine T<sub>2</sub> e HT<sub>2</sub> nei cereali e nei prodotti a base di cereali stessi.

Il lavoro svolto ha riguardato una prima indagine sulla presenza della somma delle tossine T<sub>2</sub> e HT<sub>2</sub> (T<sub>2</sub>+HT<sub>2</sub>) in campioni di granella di frumento duro di varietà coltivate, in due annate

agrarie consecutive (2012-2013 e 2013-2014), in campi afferenti alla Rete nazionale di confronto varietale in biologico, localizzati in diversi areali di coltivazione.

## Materiali e metodi

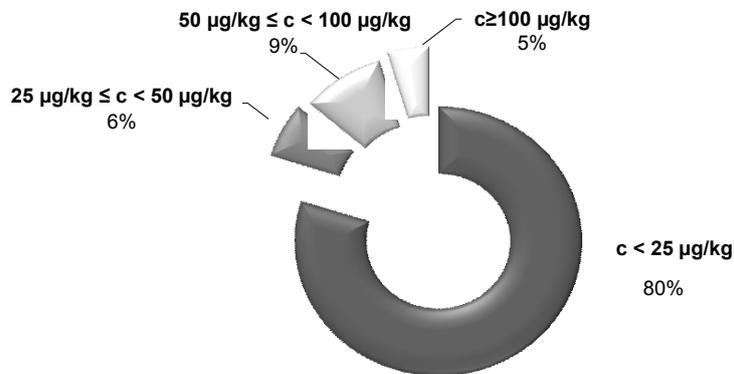
I campioni di granella di frumento duro, riferiti a 11 varietà, coltivate secondo uno schema a blocchi randomizzati (parcelle di 10 m<sup>2</sup>) con 3 o 4 ripetizioni, e relativi a due annate agrarie consecutive (raccolti 2013 e 2014) sono stati prelevati nei seguenti 6 campi sperimentali della Rete nazionale di frumento duro in biologico (10) relativi a diversi ambienti di coltivazione del territorio nazionale: Sant'Angelo Lodigiano (LO), San Pancrazio (PR) per l'areale Nord, Jesi (AN) per il Centro-adriatico, Campobasso per il Sud, Santo Stefano Quisquina (AG) per la Sicilia e Ussana (CA) per la Sardegna. Le varietà considerate sono state le seguenti: Anco Marzio, Claudio, Creso, Duilio, Dylan, Iride, Normanno, Saragolla, Simeto, Svevo e Tirez. In totale sono stati raccolti 110 campioni. Dal campione riunito di granella derivante dalle diverse ripetizioni parcellari è stato prelevato un sub-campione rappresentativo del precedente e sottoposto a macinazione con setaccio da 1 mm di diametro (Cyclotec, PBI). Lo sfarinato integrale di ciascun sub-campione è stato analizzato con metodo Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Veratox® for T<sub>2</sub>/HT<sub>2</sub>, Neogen), con un limite minimo rivelabile (LOD) di 25 µg/kg nel campione e una percentuale media di recupero del 115% (RSD = 8%) per l'intervallo di contaminazione 50-100 µg/kg (11). La concentrazione della somma delle tossine T<sub>2</sub> e HT<sub>2</sub>, riportata di seguito come tal quale nei campioni, è stata ottenuta tramite lettura fotometrica con Sirio-S Microplate Reader (SEAC, Radim Group, Italia) e l'uso del RIDA® Soft Win software (R-Biopharm AG, Germania). L'elaborazione dei dati è stata effettuata su 109 campioni per l'eliminazione di un dato anomalo. L'analisi statistica con test t di Student è stata svolta tramite software Excel (versione Office 2013).

## Risultati e discussione

Il metodo immunoenzimatico utilizzato in questa prima indagine sulla presenza delle tossine T<sub>2</sub>+HT<sub>2</sub> su campioni di frumento duro biologico è stato in precedenza sottoposto a uno studio di validazione sulla matrice frumento (12) dal quale ne è risultata l'idoneità d'uso per lo screening su questo tipo di matrice, salvo conferma con metodi cromatografici. Inoltre, uno studio di confronto fra lo stesso metodo ELISA e il metodo *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC) su campioni di frumento duro ha evidenziato una buona correlazione ( $r= 0,9639$ ) per tutti i campioni risultati positivi e con valori di concentrazione compresi nell'intervallo 25-305 µg/kg (10).

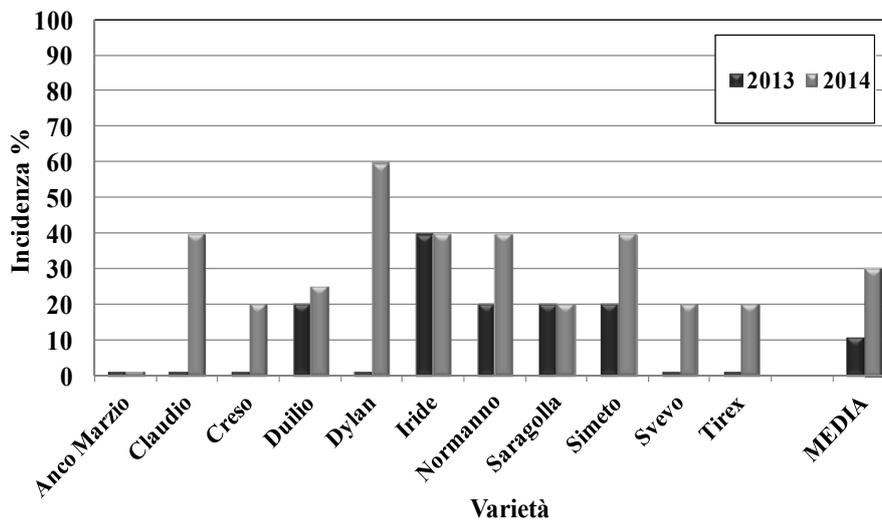
I risultati dello screening biennale effettuato sui 109 campioni di frumento duro biologico hanno evidenziato un'eterogenea diffusione delle micotossine in funzione dell'areale di provenienza. In particolare, l'incidenza percentuale dei campioni risultati positivi, cioè con concentrazione di T<sub>2</sub>+HT<sub>2</sub> uguale o superiore al limite di rivelabilità del metodo (LOD = 25 µg/kg), è stata del 5% nell'areale Nord, del 29% al Sud e del 68% nel Centro-adriatico. Di particolare interesse, inoltre, l'assenza di campioni positivi (incidenza nulla) per quanto riguarda la Sicilia e la Sardegna. Questo tipo di distribuzione dell'incidenza di contaminazione, anche se riferita a un numero limitato di località nell'ambito del territorio nazionale, conferma in via preliminare quanto già osservato per le coltivazioni convenzionali (13); altri dati riportati dalla letteratura forniscono però informazioni contrastanti sulla rilevazione delle tossine T<sub>2</sub> e HT<sub>2</sub> su

campioni di frumento duro biologico di produzione nazionale (14, 15). Tuttavia, a fronte di una constatata presenza di tossine T<sub>2</sub>+HT<sub>2</sub>, i risultati in merito alla distribuzione per fasce di contaminazione sono particolarmente interessanti soprattutto perché l'80% dei campioni analizzati è risultato negativo all'analisi di screening e solo il 5% ha presentato un valore di concentrazione superiore a 100 µg/kg (Figura 1).



**Figura 1. Distribuzione percentuale delle concentrazioni (µg/kg) delle tossine T<sub>2</sub>+HT<sub>2</sub> per fasce di contaminazione nei campioni di frumento duro biologico in prova nel biennio 2013-2014**

Nelle varietà testate si è osservato un differente grado di sensibilità all'accumulo di T<sub>2</sub>+HT<sub>2</sub> nella granella ad eccezione della varietà Anco Marzio, per la quale, nel biennio in esame, non sono stati riscontrati campioni positivi (Figura 2). L'incidenza percentuale dei campioni positivi nelle singole varietà di frumento duro è risultata significativamente (p<0,05) più elevata nell'annata agraria 2014 rispetto alla precedente, suggerendo per questo tipo di micotossine un ruolo importante dell'andamento meteorologico dell'annata anche nelle coltivazioni in biologico e a conferma, fra l'altro, di alcuni dati riportati in letteratura (16).



**Figura 2. Incidenza percentuale dei campioni positivi (concentrazione ≥ 25 µg/kg) di frumento duro biologico per ciascuna varietà e anno**

## Conclusioni

I risultati dell'indagine di screening, svolta su campioni di frumento duro provenienti da coltivazioni della Rete nazionale di confronto varietale in biologico, costituiscono uno studio preliminare svolto su un numero limitato di campioni che dovrebbe essere supportato da ulteriori esami con metodi analitici di conferma. I dati finora acquisiti forniscono comunque un punto di partenza per ulteriori approfondimenti riguardo soprattutto alle modalità di diffusione e all'entità di contaminazione da tossine T2+HT2 sul frumento duro biologico, al fine di poter applicare efficaci azioni di prevenzione del rischio e, nel contempo, preservare e valorizzare le pregevoli potenzialità della produzione nazionale.

## Bibliografia

1. Willer H, Lernoud J (Ed.) *The world of organic agriculture. Statistics and emerging trends 2015*. FiBL-IFOAM Report. Frick, Bonn: Research Institute of Organic Agriculture, International Federation of Organic Agriculture Movements; 2015.
2. ISMEA, MIPAAF, CIHEAM. *SINAB Sistema d'informazione nazionale sull'agricoltura biologica. Bio in cifre 2014*. Roma: SINAB; 2014. Disponibile all'indirizzo: [http://www.sinab.it/sites/default/files/share/bio%20in%20cifre%202014\\_7.pdf](http://www.sinab.it/sites/default/files/share/bio%20in%20cifre%202014_7.pdf); ultima consultazione 6/6/16.
3. European Food Safety Authority. Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed. *EFSA Journal* 2011;9(12):2481.
4. Foroud NA, Eudes F. Trichothecenes in cereal grains. *International Journal of Molecular Sciences* 2009;10(1):147-73.
5. Europa. Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 364/5 del 20 dicembre 2006.
6. Europa. Regolamento (CE) n. 1126/2007 della Commissione del 28 settembre 2007, che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari per quanto riguarda le Fusarium-tossine nel granoturco e nei prodotti a base di granoturco. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 255/14 del 29 settembre 2007.
7. Edwards SG, Imathiu SM, Ray RV, Back M, Hare MC. Molecular studies to identify the Fusarium species responsible for HT-2 and T-2 mycotoxins in UK oats. *International Journal of Food Microbiology* 2012;156:168-75.
8. Thrane U, Adler A, Clasen P-E, Galvano F, Langseth W, Lew H, Logrieco A, Nielsen KF, Ritieni A. Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*. *International Journal of Food Microbiology* 2004;95:257-66.
9. Europa. Raccomandazione (UE) n. 165/2013 della Commissione del 27 marzo 2013, relativa alla presenza delle tossine T-2 e HT-2 nei cereali e nei prodotti a base di cereali. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 91/12 del 3 aprile 2013.
10. Quaranta F, Aureli G, Iori A, Nocente F, Pasquini M, Belocchi A, Camerini M, Cecchini C, Fornara M, Gosparini E, Matere A, Melloni S, Cammerata A, D'Egidio MG. Varietà di frumento duro per l'agricoltura biologica. *Dal Seme* 2014;9(3):19-30.
11. Pascale M, Haidukowski M, Visconti A, Aureli G, Melloni S, D'Egidio MG. Confronto tra metodo ELISA e UPLC/DAD per la determinazione delle tossine T-2 e HT-2 in frumento. In: *Atti Progetto MICOPRINCEM "Micotossine principali ed emergenti nei cereali"*; 2014, p. 23-25.

12. Pascale M, Aureli G, Haidukowski M, Melloni S, D'Egidio MG, Visconti A. Comparison between ELISA and UPLC methods for the determination of T<sub>2</sub> and HT<sub>2</sub> toxins in wheat. In: *International Mycotoxin Conference 2014, Perspectives on the Global Prevention and Control of Mycotoxins. Book of Abstracts. Beijing, PR China, 19-23 May 2014.* p. 258.
13. Aureli G, Amoriello T, Belocchi A, D'Egidio MG, Fornara M, Melloni S, Quaranta F. Preliminary survey on the co-occurrence of DON and T<sub>2</sub>+HT<sub>2</sub> toxins in durum wheat in Italy. *Cereal Research Communications* 2015;43(3):481-91.
14. Fagnano M, Fiorentino N, D'Egidio MG, Quaranta F, Ritieni A, Ferracane R, Raimondi G. Durum wheat in conventional and organic farming: yield amount and pasta quality in southern Italy. *The Scientific World Journal* 2012;(2012): Article ID 973058, 9 pages.
15. Juan C, Ritieni A, Mañes J. Occurrence of Fusarium mycotoxins in Italian cereal and cereal products from organic farming. *Food Chemistry* 2013;14:1747-55.
16. Edwards SG. Fusarium mycotoxin content of UK organic and conventional wheat. *Food Additives and Contaminants* 2009;26(4):496-506.

# UTILIZZO DI AGENTI DI BIOCONTROLLO NELLA PREVENZIONE DELLO SVILUPPO DI *ASPERGILLUS FLAVUS* E DELLA PRODUZIONE DI AFLATOSSINE

Paola Battilani

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

## Introduzione

*Aspergillus flavus* è un fungo saprofito ubiquitario capace di crescere in un ampio intervallo di temperature (12-48°C), con un optimum compreso tra 36 e 38°C. Durante il suo sviluppo il fungo può produrre una serie di metaboliti secondari, tossici per l'uomo e gli animali superiori, definiti micotossine, quali aflatoSSine e acido ciclopiazonico. Le aflatoSSine prodotte da questa specie sono l'aflatoSSina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. L'aflatoSSina B<sub>1</sub> è il composto naturale più tossico che si conosca, sia per l'uomo sia per gli animali. L'Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC) ha classificato questa molecola di classe 1 poiché è stata dimostrata la sua capacità cancerogena nei confronti dell'uomo.

Le aflatoSSine possono essere prodotte in campo su diverse colture quali mais, cotone, arachidi pistacchio e in generale sui cosiddetti nuts. Il problema delle aflatoSSine era ritenuto fino a pochi anni fa prerogativa delle zone tropicali del pianeta, ma i cambiamenti climatici hanno determinato un allargamento della zona di rischio fino alle aree temperate (Piva *et al.*, 2006).

La contaminazione da aflatoSSine sulle colture è un problema di sicurezza alimentare che è stato affrontato sia con la stesura di regolamenti che definiscono il massimo contenuto ammesso nei prodotti destinati all'alimentazione umana (Regolamento della Commissione Europea 1881/2006 e successive modifiche) e animale, sia con lo sviluppo di linee guida per la corretta gestione colturale.

Diversi approcci sono stati seguiti per cercare di eliminare il problema aflatoSSine, quali la resistenza genetica dell'ospite e l'utilizzo di fungicidi, approcci generalmente efficaci nel controllo dei funghi fitopatogeni. Nessuna di queste strategie è risultata efficace ed è stata quindi intrapresa una via innovativa, quella di combattere il fungo con le sue stesse armi. In particolare, è noto che le popolazioni naturali di *A. flavus* comprendono sia ceppi produttori di aflatoSSine sia ceppi non produttori (atossigeni). Le popolazioni possono essere caratterizzate per l'appartenenza a gruppi di compatibilità vegetativa (*Vegetative Compatibility Groups*, VCG); i membri di una stessa VCG possono scambiare materiale genetico per via vegetativa, ovvero indipendentemente dalla riproduzione sessuata. La possibilità di ceppi atossigeni di riacquisire i geni di produzione delle tossine può essere sostanzialmente esclusa in quanto questi appartengono a VCG diverse rispetto ai ceppi tossigeni.

L'intuizione è stata quella di approfittare di questi ceppi atossigeni per ostacolare lo sviluppo di quelli tossigeni, ovvero sfruttare la lotta biologica, in particolare la competizione tra funghi della medesima specie (Cotty, 1994). Si tratta quindi di selezionare un fungo altamente competitore, molto ben adattato all'ambiente, per poi distribuirlo artificialmente in campo ad una concentrazione superiore rispetto a quella naturalmente presente. Si ottiene in questo modo una "esclusione per competizione" che ha dimostrato di essere il sistema più efficace in aree geografiche in cui il problema aflatoSSine è molto sentito, quali il sud degli Stati Uniti e l'Africa.

Infatti, negli USA e in Africa sono disponibili rispettivamente 2 (AF36 e AFLAGUARD) ed 1 (AFLASAFE) prodotti commerciali, i primi in uso da più di 20 anni.

Il ceppo di *A. flavus* da utilizzare come agente di biocontrollo (BCA) deve possedere una serie di requisiti quali: i) essere autoctono dell'areale dove verrà utilizzato, ii) non avere i geni che codificano per le micotossine, iii) appartenere a VCG che includano solo ceppi atossigeni; iv) essere molto competitivo nei confronti dei ceppi tossigeni, v) non alterare la micoflora, ad eccezione dei ceppi tossigeni, vi) essere efficace quando applicato in pieno campo.

Scopo del lavoro svolto è stato quello di selezionare nell'ambito della micoflora associata al mais in Nord Italia un ceppo di *A. flavus* rispondente ai requisiti e di renderlo disponibile per gli agricoltori, come aiuto concreto alla maiscoltura nazionale.

## Materiali e metodi

### Raccolta e caratterizzazione degli isolati di *Aspergillus flavus*

La selezione del ceppo da utilizzare come BCA è partita da una popolazione di *A. flavus* composta da 138 isolati prelevati da granella di mais tra il 2003 e il 2010 (Giorni *et al.*, 2006). La granella utilizzata per isolare i funghi proveniva da campi presenti in Piemonte, Emilia Romagna, Lombardia, Veneto e Friuli-Venezia-Giulia. La popolazione di *A. flavus* è stata caratterizzata per la produzione di aflatossine, per l'appartenenza a gruppi di compatibilità vegetativa (VCG) e per la presenza dei geni che codificano per le aflatossine e l'acido ciclopiazonico. Un set di ceppi atossigeni selezionati è stato impiegato per testare *in vitro* la capacità di ridurre la produzione di aflatossine da parte di un ceppo tossigeno. Successivamente, sono stati selezionati 2 ceppi da impiegare in una prova di efficacia in pieno campo.

### Prove di efficacia in pieno campo

Nel 2012 in 8 località distribuite tra le province di Rovigo, Mantova, Verona e Parma, sono stati individuati campi commerciali di circa 2 ha; 1 ha è stato trattato con l'agente di biocontrollo, ovvero il ceppo selezionato sulla base delle ricerche descritte, inoculato su sorgo, distribuito alla dose di 25 kg/ha di granella inoculata. L'ettaro non trattato è stato utilizzato come testimone. Il sorgo è stato distribuito in campo con un comune spandiconcime nella fase di levata del mais, allo stadio di 5-8 foglie (Figura 1).



**Figura 1. Applicazione del prodotto in pieno campo con spandiconcime e piante allo stadio di 5-8 foglie**

Alla raccolta, sono stati ottenuti campioni di granella in triplicato, sia nell'area trattata sia in quella testimone, sui quali è stata eseguita la conta delle Unità Formanti Colonia (UFC/g), la determinazione delle VCG presenti e la quantificazione di aflatossine e fumonisine.

## Risultati

### Caratterizzazione degli isolati di *Aspergillus flavus*

L'analisi dei 138 ceppi di *A. flavus* ha evidenziato che il 46% (64 ceppi) dei ceppi testati non era in grado di produrre aflatossine, mentre i restanti ne erano produttori.

Riguardo alle VCG, sono state individuate 48 VCG di cui 23 contenevano esclusivamente ceppi tossigeni, mentre alle restanti sono stati attribuiti solo ceppi atossigeni. Inoltre, nessuna VCG conteneva contemporaneamente ceppi tossigeni e atossigeni, come confermato da diversi studi precedenti. Tra le VCG atossigene, la VCG IT006 è quella a cui è stato attribuito il maggior numero di isolati, pari a 6. I membri di questa VCG sono stati isolati in anni diversi e in 4 delle 5 regioni da cui provenivano i campioni di mais utilizzati per gli isolamenti (Mauro *et al.*, 2013).

### Prove di efficacia

Venti dei 64 ceppi atossigeni raccolti sono stati utilizzati per le prove di efficacia *in vitro*, quindi per verificarne la capacità di ridurre il contenuto di aflatossine prodotta da un ceppo tossigeno. L'analisi dei geni di produzione delle tossine (aflatossine e acido ciclopiazonico), eseguita su questi ceppi, ha evidenziato l'assenza dei suddetti geni.

Cinque dei ceppi atossigeni testati hanno mostrato una riduzione del contenuto di aflatossine di oltre l'80%, in linea con i valori del ceppo utilizzato, principio attivo per il prodotto commerciale distribuito negli USA (Mauro *et al.*, 2015). Tra questi 5 ceppi era presente anche un membro della VCG IT006, identificata come la più presente nell'areale preso in considerazione. Questo ceppo, insieme a quello che ha mostrato la maggiore efficacia *in vitro* (riduzione del 90%), sono stati scelti per le prove di pieno campo del 2012.

Otto campi sono stati allestiti per le prove di efficacia, ma solo 4 hanno mostrato contaminazione da aflatossine e la riduzione media della contaminazione nelle aree trattate con i ceppi atossigeni è stata superiore al 90% (Mauro *et al.*, in preparazione). La conta delle UFC ha mostrato valori comparabili sia di *A. flavus* sia di altri funghi nelle tesi trattate e testimone. Anche la contaminazione da fumonisine non è risultata differente nel trattato rispetto al testimone.

Riguardo alle VCG, la IT006 ha rappresentato il 65% circa dei ceppi di *A. flavus* isolati dalla granella delle tesi trattate, mentre solo il 20% era costituito dall'altro ceppo.

## Conclusioni

I risultati ottenuti negli studi svolti dal 2003 al 2012 hanno permesso di individuare un ottimo candidato BCA, ovvero un ceppo atossigeno di *A. flavus* autoctono, molto competitivo, che può essere considerato per un futuro impiego in campo.

Il ceppo è stato depositato a maggio 2013 in una micoteca ufficiale e gli è stato attribuito il codice MUCL54911. Sempre nello stesso periodo è stata depositata domanda di brevetto per

l'impiego del ceppo al fine di ridurre la contaminazione da aflatossine ed è stato rilasciato il 4 settembre 2015 con il n. 001417885.

Con questo si sono esaurite le attività possibili per un ente di ricerca, ma fortunatamente stanno proseguendo le verifiche di efficacia in campo (anni 2013-2015) ed è iniziata la raccolta dei dati necessari per la preparazione del dossier per la richiesta di registrazione come fitofarmaco, modalità con cui potrà essere commercializzato secondo quanto definito dalla Commissione Europea.

## Ringraziamenti

Si ringraziano il MIPAAF e la Regione Emilia Romagna per aver parzialmente finanziato l'attività di ricerca svolta, la scuola di Dottorato Agrisystem nell'ambito della quale il Dott. Antonio Mauro ha svolto la sua tesi di dottorato, la Dott. Paola Giorni e il Dott. Antonio Mauro per il contributo alla raccolta dei dati presentati ottenuti nell'ambito delle loro tesi di dottorato.

## Bibliografia

- Cotty PJ. Influence of field application of an atoxigenic strain of *Aspergillus flavus* on the populations of *A. flavus* infecting cotton bolls and on aflatoxin content of cottonseed. *Phytopathology* 1994;84:1270-7.
- Europa. Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 364/5 del 20 dicembre 2006.
- Giorni P, Magan N, Pietri A, Bertuzzi T, Battilani P. Studies on *Aspergillus* Section Flavi isolated in northern Italy from maize. *International Journal of Food Microbiology* 2007;113:330-8.
- Mauro A, Battilani P, Callicott KA, Giorni P, Pietri A, Cotty PJ. Structure of an *Aspergillus flavus* population from maize kernels in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology* 2013;162(1):1-7.
- Mauro A, Battilani P, Cotty PJ. Atoxigenic *Aspergillus flavus* endemic to Italy for biocontrol of aflatoxins in maize. *BioControl* 2015;60:125-34.
- Piva G, Battilani P, Pietri A. Emerging issues in Southern Europe: aflatoxins in Italy. In: Barug D, Bhatnagar D, van Egmond HP, van der Kamp JW, van Osenbruggen WA, Visconti A (Ed.). *The mycotoxin factbook*. Wageningen: The Netherlands 2006. p. 139-53.

# EFFETTO DEL PROCESSO MOLITORIO NELLA RIPARTIZIONE DELLA MONILIFORMINA IN MAIS

Massimo Blandino, Valentina Scarpino, Amedeo Reyneri, Francesca Vanara  
*Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino, Grugliasco,  
Torino, Italia*

## Introduzione

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 (1). 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 (2), 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 alimentari o *hominy grits*.

## Materiali e metodi

A tal proposito sono stati esaminati presso un molino industriale 5 diversi lotti delle campagne 2011, 2012, 2013 e 2014, 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 µm), medio (2500-4000 µm), fine (1200-2500 µm) –; il processo di molitura a secco per la produzione di farina bramata (500-800 µm); fioretto (350-500 µm) e fumetto (< 350 µm); e i sottoprodotti germe e farinetta. In Figura 1 sono schematizzati i processi di lavorazione analizzati e i prodotti e sottoprodotti analizzati.

La metodica di campionamento ha seguito il Regolamento (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 (dall'inglese *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) (3).

## Estrazione e *clean-up*

Per la determinazione della MON 25 g di sfarinato di mais è stato estratto utilizzando 100 mL di una miscela di acetonitrile/acqua 84:16 (v/v) e la purificazione è stata condotta mediante l'impiego delle colonne di *clean-up* Mycosep<sup>®</sup> 240 Mon (Romer Labs<sup>®</sup>). Il contenuto in fumonisine B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> è stato determinato estraendo 50 g di campione macinato con 100 mL di una soluzione di metanolo/acqua 80:20 (v/v) e la purificazione è stata condotta mediante l'impiego delle colonne di immunoaffinità FUMtest (VICAM<sup>®</sup>).

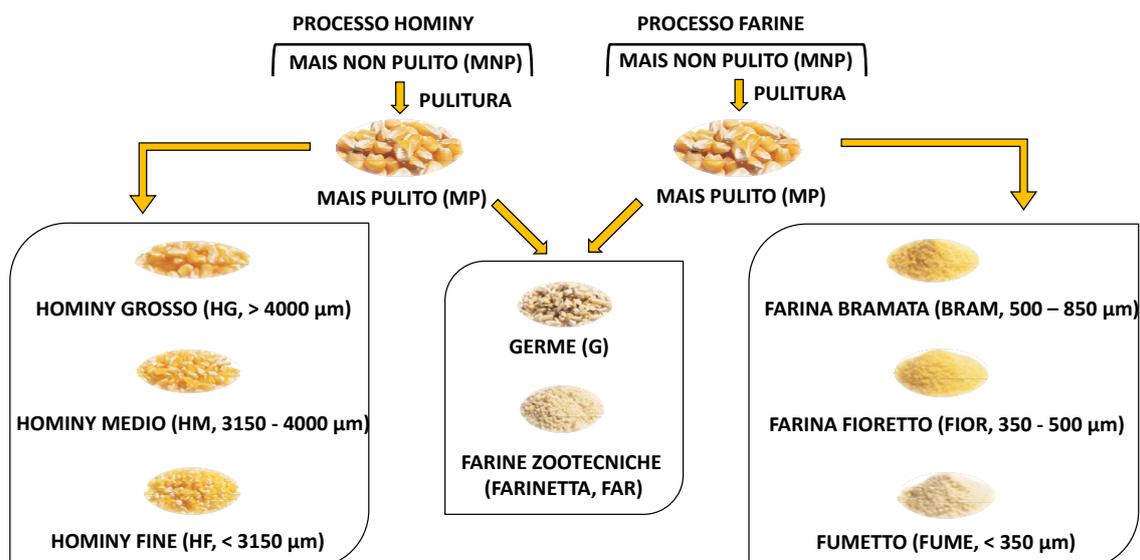


Figura 1. Sistemi di lavorazione e prodotti e sottoprodotti esaminati

## Analisi HPLC-ESI-MS/MS

La metodica HPLC-MS/MS (*High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) è stata condotta mediante strumentazione Varian 212-LC Chromatography Pump (Colonna per la MON: Merck, SeQuant, ZIC<sup>®</sup>-HILIC 100×2,1 mm, 3,5 µm, 100 Å, Colonna per le FB: Varian, Pursuit 5 C18 50×2,1 mm) / ProStar 410 AutoSampler / 310-MS TQ Mass Spectrometer. Per la determinazione della MON la corsa cromatografica in gradiente della durata di 17 minuti ha previsto l'uso di acetonitrile e formiato di ammonio 100 mM come eluenti ( $t_R$  MON = 3,8 min). Con l'impiego di un triplo quadrupolo si è proceduto alla rivelazione della MON con la sorgente ESI (*Electrospray Ionisation*) in modalità ioni negativi e la molecola deprotonata è stata frammentata nel suo ione prodotto a 41 m/z. Lo ione prodotto a 41 m/z è stato utilizzato per l'identificazione mentre lo ione precursore a 97 m/z per la quantificazione. Per la determinazione delle FB la corsa cromatografica in gradiente della durata di 15 minuti ha previsto l'uso di acetonitrile e acqua acidificata allo 0.1% con acido acetico come eluenti ( $t_R$  FB<sub>1</sub> = 4,9 min;  $t_R$  FB<sub>2</sub> = 5,6 min). Con l'impiego di un triplo quadrupolo si è proceduto alla rivelazione delle FB con la sorgente ESI in modalità ioni positivi e per la FB<sub>1</sub> la molecola protonata è stata frammentata nei suoi ioni prodotto a 318 m/z e 336 m/z. Lo ione prodotto a 318 m/z è stato utilizzato per l'identificazione mentre lo ione prodotto a 336 m/z per la quantificazione. Per la FB<sub>2</sub> la molecola protonata è stata frammentata nei suoi ioni prodotto a 334 m/z e 352 m/z. Lo ione prodotto a 334 m/z è stato utilizzato per l'identificazione mentre lo ione prodotto a 352 m/z per la quantificazione.

## Risultati e discussione

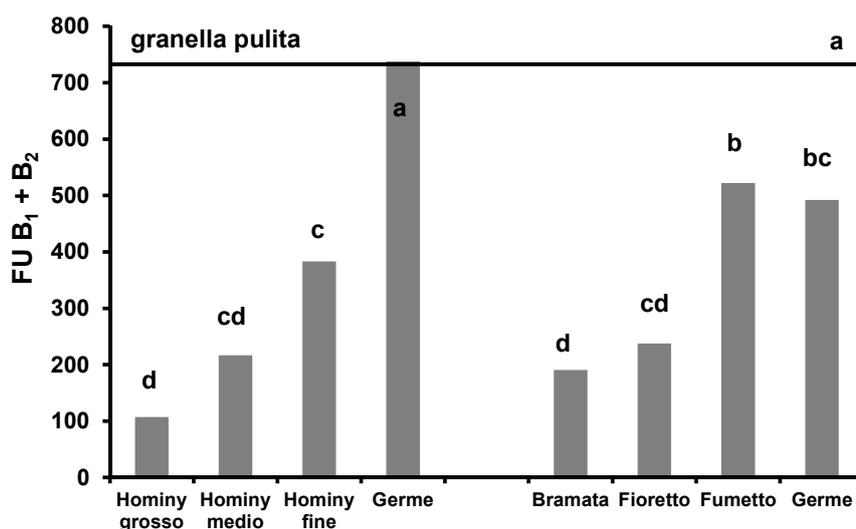
La contaminazione della granella intera a inizio lavorazione dei lotti esaminati è risultata molto variabile nelle diverse campagne maidicole e mediamente inferiore per MON (tra  $203 \mu\text{g kg}^{-1}$  e  $844 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) rispetto alle FB (tra  $344 \mu\text{g kg}^{-1}$  e  $2980 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Le operazioni di pulitura con l'ausilio di un sistema di aspirazione meccanica e con una selezionatrice ottica hanno ridotto la contaminazione da FB e MON rispettivamente di 2,3 (56%) e 1,5 volte (35%) (Tabella 1).

La farinetta, ovvero la frazione contenente anche le parti cruscali, destinata ad uso zootecnico, 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.

**Tabella 1. Effetto delle operazioni di pulitura della granella sulla contaminazione da fumonisia B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> (FB) e moniliformina (MON).**

Anno	Ibrido	FB (B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> )			MON		
		Non pulito ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	pulito ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Riduzione (%)	Non pulito ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	pulito ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Riduzione (%)
2011	P1543	455 a	156 b	66	318 a	228 b	28
2012	Lolita	1738 a	961 b	45	691 a	461 b	33
2012	P1547	1530 a	733 b	52	205 a	173 a	16
2014	P0722	1584 a	858 b	46	646 a	299 b	54
2014	PR32B10	2462 a	926 b	62	263 a	116 b	56

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 (Figure 2 e 3).



**Figura 2. Ripartizione di FB ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) nei prodotti e sottoprodotti dei processi molitori**

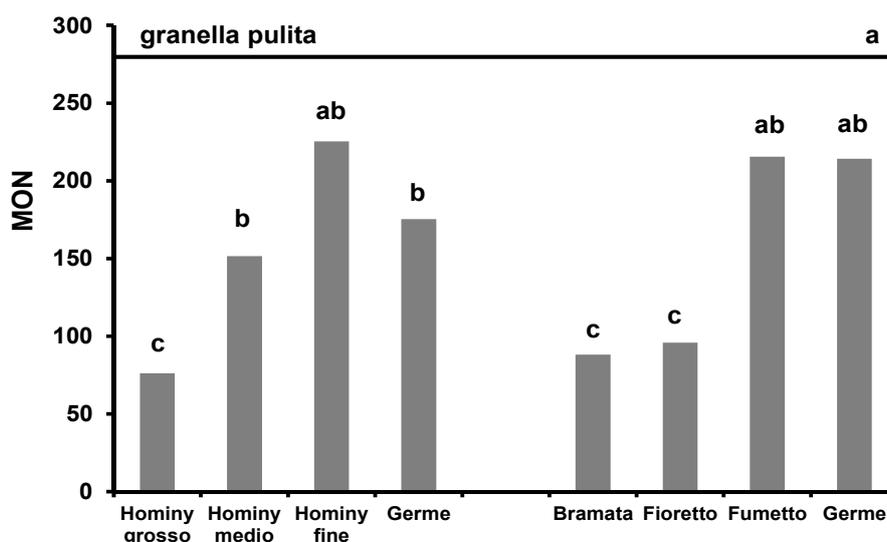


Figura 3. Ripartizione di MON ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) nei prodotti e sottoprodotti dei processi molitori

La frazione derivante dall'endosperma farinoso, il fumetto, ha sempre mostrato un minor contenuto di entrambe le 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.

## Conclusioni

I risultati confermano che così come per le fumonisine, anche la contaminazione della moniliformina nei prodotti della lavorazione molitoria della granella di mais si riduce all'aumentare della granulometria del prodotto finito. Tale comportamento si è osservato per entrambi i processi di trasformazione considerati. In media l'intensità di decontaminazione nei prodotti finiti della moniliformina risulta inferiore rispetto a quello delle fumonisine, forse per una più interna localizzazione di questa tossina nell'endosperma della cariosside di mais.

I dati raccolti forniscono una prima base per la valutazione del rischio di contaminazione da moniliformina nei prodotti molitori della filiera maidicola alimentare.

La principale strategia di abbattimento del livello di contaminazione di fumonisine e moniliformina è rappresentata da attenti interventi di pulitura, utilizzando sia metodi meccanici sia ottici.

Tuttavia ulteriori e più decisivi miglioramenti della qualità sanitaria dei prodotti si possono raggiungere solo tramite un approccio integrato di filiera. È quindi necessario analizzare nel dettaglio il processo produttivo e individuare le strategie preventive e di lotta più idonee a garantire un minor rischio di contaminazione anche della moniliformina, in aggiunta a quanto già attuato per le fumonisine.

## Bibliografia

1. Vanara F, Reyneri A, Blandino M. Fate of fumonisin B<sub>1</sub> in the processing of whole maize kernels during dry-milling. *Food Control* 2009;20:235-8.
2. Blandino M, Scarpino V, Vanara F, Sulyok M, Krska R, Reyneri A. The role of the European corn borer (*Ostrinia Nubilalis*) on contamination of maize with thirteen *Fusarium* mycotoxins. *Food Addit Contam A* 2015;32(4):533-43.
3. Scarpino V, Blandino M, Vanara F, Negre M, Reyneri A. Moniliformin analysis in maize samples from North-West Italy using multifunctional clean-up columns and the LC-MS/MS detection method. *Food Addit Contam A* 2013;30:876-84.

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

Carlo Brera (a), Francesca Debegnach (a), Barbara De Santis (a), Gerardo Califano (b),  
Sandra Paduano (b), Giuseppe Ruocco (b)

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

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

## Introduzione

Al fine di organizzare un sistema di controllo ufficiale sul territorio, armonizzato ed efficace, e garantire la sicurezza dei prodotti alimentari, la Direzione generale per l'igiene e la sicurezza degli alimenti e la nutrizione del Ministero della Salute, con il supporto e collaborazione del Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) per le micotossine presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS), 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 Nuovo Sistema Informativo Sanitario (NSIS) già operativo presso il Ministero. L'approvazione del piano sia da parte del Coordinamento interregionale, sia da parte dei diversi uffici del Ministero interessati, consentirà la successiva adozione a livello nazionale. Tale piano di controllo costituirà parte integrante del Piano Nazionale Integrato (PNI) di cui all'art. 41 del Regolamento (CE) 882/2004 (1). L'obiettivo del piano è 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 (Uffici di Sanità Marittima, Aerea e di Frontiera) 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 (ri)emergenti, delle risultanze dei controlli sul territorio e all'importazione e delle notifiche di allerta UE. Il piano, inoltre, permetterà la trasmissione all'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (*European Food Safety Authority*, EFSA) 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) 1881/2006 (2) e al paragrafo 3 dell'art. 23 del Regolamento (CE) 178/2002 (3), nei confronti di tale Autorità e della Commissione Europea.

## Categorizzazione dei rischi

Con riferimento alla individuazione delle priorità di intervento, è di fondamentale importanza effettuare una accurata categorizzazione dei rischi associati alla presenza delle micotossine nei prodotti alimentari, basandosi sulla considerazione di indicatori, tra i quali si riportano i più rilevanti:

1. la collocazione della Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (*International Agency for Research on Cancer, IARC*), che classifica le micotossine in gruppi diversi: aflatossine, gruppo 1 (evidenza di cancerogenicità per l'uomo), ocratossina A, gruppo 2B (possibilità di cancerogenicità per l'uomo), fusariotossine, gruppo 3 (probabilità di cancerogenicità per l'uomo);
2. la presenza costante nel tempo nelle segnalazioni RASFF (*Food and Feed Safety Alerts*);
3. la accertata alta percentuale di raccolti contaminati da micotossine come riportato da dati della *Food and Agriculture Organization (FAO)*;
4. la presenza sistematica delle micotossine in un ampio spettro di prodotti alimentari, sia come materie prime che prodotti finiti;
5. la possibilità di esercitare effetti tossici (neurotossici, in particolare) già a partire dalla formazione del feto fino ad interessare tutte le altre classi di consumatori.

Sulla base di queste indicazioni, il Piano indicherà di concentrare le attività di controllo, sia in ambito di monitoraggio che di sorveglianza che quelle relative alle attività extra-piano, sulle combinazioni matrice alimentare/micotossina descritti di seguito in Tabella 1. Le citate combinazioni appartengono al campo degli alimenti per i quali sono previsti limiti massimi tollerabili.

**Tabella 1. Combinazioni matrice alimentare/micotossine oggetto di priorità di controllo**

Micotossina	Matrice	Esempi
Aflatossine B e G	Frutta secca ed essiccata/a guscio e prodotti derivati	Pistacchi, arachidi, mandorle, ingredienti per gelati a base di frutta a guscio
Aflatossina M1	Latte e prodotti derivati	Latte HT, latte fresco pastorizzato, latte crudo al dettaglio (con esclusione del latte crudo in allevamento)
Ocratossina A	Vino	Vino rosso e da dessert
	Caffè torrefatto	Caffè istantaneo
Deossinivalenolo	Prodotti trasformati a base di frumento duro e tenero	Pasta, pane, alimenti per la prima colazione
Fumonisine	Prodotti trasformati a base di mais	Farina per polenta, polenta istantanea, popcorn
Citrinina	Integratori alimentari	Riso rosso fermentato
Zearalenone	Prodotti alimentari a base di mais	Olio raffinato, prodotti per l'infanzia, farina per polenta
Patulina	Succhi e purea di mela	Prodotti per l'infanzia e per la popolazione adulta

Le attività di controllo, saranno, inoltre, guidate da considerazioni strettamente inerenti le condizioni di possibile rischio, vale a dire:

- quando l'alimento mostra presenza visibile di muffe
- quando l'alimento non mostra presenza visibile di muffe ma è considerato a rischio in base a valutazioni specifiche
- quando si osservino dei sostanziali cambiamenti delle condizioni climatiche potenzialmente favorevoli allo sviluppo di muffe e produzione di micotossine
- quando sussistano probabilità di rischio per la salute pubblica particolarmente significative in base alla valutazione del rischio (es. prodotti per l'infanzia, alimenti per celiaci, prodotti comunemente presenti nelle allerte comunitarie, prodotti per i quali siano documentabili informazioni storiche di contaminazione).

## Campionamento

Il prelievo dei campioni dovrà essere effettuato in tutte le fasi della produzione, inclusa quella primaria (dopo il raccolto), la trasformazione, la distribuzione dei prodotti alimentari intesi sia come ingredienti sia come prodotti processati finiti, ivi compresa l'importazione. Principio guida sarà quello di focalizzare maggiormente le attività di campionamento nelle prime fasi della filiera alimentare rispetto a quelle relative alla vendita al dettaglio, in quanto il prelievo nella fase della commercializzazione, pur rappresentando una verifica della bontà delle azioni preventive messe in atto in fase di produzione, non tutela adeguatamente il consumatore.

I punti di campionamento più strategici ai fini del controllo saranno i molini, i siti di stoccaggio della aziende di trasformazione, i punti vendita all'ingrosso, le farmacie, ecc.

## Modalità di prelievo

Come ormai noto, le modalità di campionamento condizionano in modo cruciale le successive procedure di controllo analitico; pertanto, l'attuazione di buone pratiche di campionamento è uno strumento indispensabile per evitare contenziosi dovuti a vizi procedurali. In particolare, nel controllo delle micotossine, data la estrema eterogeneità della contaminazione con cui le micotossine sono presenti in una derrata alimentare, è noto che la fase di campionamento rappresenta il punto in cui si rilevano le criticità più significative. Come principio generale, il campionamento rappresenta una fase del controllo che deve essere svolta prevalentemente all'inizio della filiera agro-alimentare, pertanto in ordine decrescente per rilevanza, dalla produzione delle materie prime alla commercializzazione dei prodotti finiti; inoltre, altro principio cardine è che i campioni prelevati per il controllo e la ricerca delle micotossine siano caratterizzati dalla massima rappresentatività della partita campionata.

Per quanto detto, il campionamento dei prodotti alimentari sarà effettuato conformemente al Regolamento (CE) 401/2006 e successive modifiche e secondo quanto previsto dal DPR 26 marzo 1980, n. 327.

Al fine di assicurare una realizzazione del controllo secondo le buone pratiche di campionamento riportate nel Regolamento (CE) 401/2006 (4), dovranno essere rispettate le seguenti condizioni:

- identificazione della partita o della sottopartita (vale a dire se destinata al consumo umano diretto, consumo umano, previo trattamento fisico, ingrediente di prodotti alimentari);
- valutazione della grandezza della partita o sottopartita (da cui dipende il calcolo dei campioni incrementali o elementari);
- valutazione del tipo di campionamento da effettuare (statico vs dinamico);

- calcolo e prelievo dei campioni elementari (a seconda della tipologia di prodotto e del peso della partita);
- formazione del campione globale (previa riunione e omogeneizzazione dei campioni elementari);
- formazione del campione di laboratorio (se previsto);
- formazione delle aliquote (previa omogeneizzazione e macinazione del campione globale o dei campioni di laboratorio).

## Controllo analitico

Il controllo analitico dei prodotti alimentari sarà effettuato dai laboratori ufficiali di controllo, nel rispetto dei requisiti di cui agli art. 11 e 12 del Regolamento (CE) 882/2004 (1) e in conformità a quanto previsto dal DPR 327/1980 (5).

I laboratori ufficiali di controllo riceveranno, in funzione delle tipologie di prodotti alimentari, campioni globali, campioni di laboratorio (campioni globali suddivisi) e aliquote ufficiali (nel caso di costituzione sul luogo di prelievo). Le aliquote ufficiali, ricevute dal laboratorio o costituite presso il laboratorio, dovranno essere opportunamente sigillate e conservate a temperature tra +4°C (aliquote da macinazione a secco) e -20°C (aliquote ufficiali ottenute tramite slurry) fino all'atto dell'analisi. Alla formazione delle aliquote di legge assisterà il personale di cui all'art. 7 del DPR 327/1980 (5).

I metodi di analisi impiegati per le attività di controllo ufficiale dovranno rigorosamente attenersi a quanto previsto dall'art. 12 del Regolamento (CE) 882/2004 (1) e dovranno rispettare i parametri di efficienza riportati nel Regolamento (CE) 401/2006 (4).

L'LNR per le micotossine, presso l'ISS, assolverà i compiti di cui all'art. 33 del Regolamento (CE) 882/2004 (1), quelli per la revisione di analisi di cui all'art. 19 del succitato DPR (5) nonché quelli di supporto per la trasmissione dei dati tramite il sistema NSIS.

## Controllo all'importazione

Le attività dei controlli all'importazione dei prodotti alimentari di origine non animale, dovranno ottemperare a quanto riportato negli art. 15 e 16 del Regolamento (CE) 882/2004 (1), che prevedono l'organizzazione dei controlli sulla base dei rischi potenziali.

L'art. 15 paragrafo 5 del succitato regolamento prevede la possibilità di un livello accresciuto di controlli, esplicitato attraverso l'applicazione del Regolamento (CE) 669/2009 (6) e successive modifiche anche per le micotossine, individuando la frequenza dei controlli fisici e di identità e i Paesi di origine.

Il Regolamento (UE) 884/2014 (1) definisce, inoltre, speciali condizioni, inclusa la frequenza dei controlli fisici e di identità, di importazione per taluni prodotti alimentari da specifici Paesi terzi, in base al rischio di contaminazione da aflatossine (misure di salvaguardia).

Infine, il Regolamento (UE) 2015/949 (7), invece, stabilisce la riduzione della frequenza dei controlli all'importazione di specifici prodotti alimentari provenienti da definiti Paesi terzi, quali il Canada e gli Stati Uniti.

Le procedure di campionamento, anche all'importazione, sono quelle indicate nel Regolamento (CE) 401/2006 (4) e successive modifiche di cui al Regolamento (UE) 178/2010 (8) e al Regolamento (UE) 519/2014 (9), dove sono descritte procedure specifiche per il controllo delle grandi partite di cereali di dimensioni superiori alle 500 t.

## Trasmissione dei dati

I dati sul campionamento e analitici dovranno essere inseriti, dai laboratori ufficiali, nel flusso VIG (vigilanza e controllo di alimenti e bevande) del sistema NSIS. L'ISS, quale LNR, curerà la verifica tecnica dei dati inseriti dai laboratori.

Le Autorità regionali e delle Province autonome effettueranno la validazione dei dati inseriti successivamente alla verifica dell'LNR. L'ufficio competente del DGISAN (Direzione Generale per l'Igiene e la Sicurezza degli Alimenti e la Nutrizione) del Ministero della Salute, effettuerà la validazione, nel sistema NSIS, dei dati derivanti dai campionamenti condotti presso gli USMAF, successivamente alla verifica dell'LNR.

L'ISS, dopo valutazione dei dati validati, invierà un rapporto al Ministero della Salute, al fine di consentire al Ministero di redigere il rapporto finale da pubblicare nel PNI e da inviare alla Commissione UE.

Tale rapporto finale includerà una valutazione complessiva dei risultati ottenuti ed eventuali indicazioni correttive ai fini di una razionalizzazione dei controlli per gli anni successivi.

Infine, i dati validati dalle Autorità regionali/delle Province autonome saranno trasmessi dal Ministero all'EFSA, annualmente, tramite il sistema NSIS.

## Conclusioni

I risultati attesi dalla effettuazione delle attività di controllo ufficiale così come previste dal Piano Nazionale, forniranno una fotografia attendibile delle condizioni di sicurezza dei prodotti alimentari esitati al consumatore, sia di produzione nazionale, di produzione UE, che di importazione. Il piano, quindi, renderà disponibili una congrua quantità di dati, caratterizzati dalla necessaria attendibilità, indispensabili per valutare il livello di rischio a cui il consumatore è esposto con la dieta, consentendo, in tal modo, alle Autorità Competenti adeguati interventi per la gestione del rischio.

## Bibliografia

1. Europa. Regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L161/1 del 30 aprile 2004.
2. Europa.Regolamento (CE) n. 1881/2006 che stabilisce i livelli massimi per certi contaminanti negli alimenti. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 364/5 del 20 dicembre 2006.
3. Europa.Regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 28 gennaio 2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 31/1 del 1 febbraio 2002.
4. Europa. Regolamento (CE) n. 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 70/12, del 9 marzo 2006.
5. Italia. Decreto del Presidente della Repubblica 26 marzo 1980, n.327 Regolamento di esecuzione della legge 30 aprile 1962, n. 283, e successive modificazioni, in materia di disciplina igienica della

produzione e della vendita delle sostanze alimentari e delle bevande. *Gazzetta Ufficiale* n. 193 del 16 luglio 1980.

6. Europa. Regolamento (CE) n. 669/2009 della Commissione del 24 luglio 2009 recante modalità di applicazione del Regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo al livello accresciuto di controlli ufficiali sulle importazioni di alcuni mangimi e alimenti di origine non animale e che modifica la decisione 2006/504/CE della Commissione. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L194/11 del 25 luglio 2009.
7. Europa. Regolamento di esecuzione (UE) 2015/949 della Commissione del 19 giugno 2015 che approva i controlli pre-esportazione eseguiti da alcuni Paesi terzi su determinati alimenti riguardo alla presenza di alcune micotossine. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L156/2 del 20 giugno 2015.
8. Europa. Regolamento (UE) n. 178/2010 che modifica il Regolamento CE 401/2006 per quanto concerne le arachidi, gli altri semi oleosi, la frutta a guscio, le mandorle di albicocche, la liquirizia e l'olio vegetale. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L52/32 del 3 marzo 2010.
9. Europa. Regolamento (UE) n. 519/2014 che modifica il Regolamento CE 401/2006 per quanto riguarda i metodi di campionamento per le grandi partite, per le spezie e gli integratori alimentari, i criteri di rendimento per le tossine T-2 e HT-2 e per la citrinina, nonché i metodi di analisi di screening. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 147/29 del 17 maggio 2014.

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

Federica Cheli, Vittorio Dell'Orto

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

## Introduzione

Il *Feed supply chain* rappresenta un elemento cruciale per tutti i sistemi produttivi. Secondo i dati della FEFAC (1), all'interno dell'Unione Europea-28, annualmente vengono consumati indicativamente 475 milioni di tonnellate di mangimi e foraggi. Nel 2014, rispetto ad una produzione globale di mangimi pari a 964 milioni di tonnellate, sono stati prodotti 153.4 milioni di tonnellate di mangimi dall'industria mangimistica europea (1). Le micotossine rappresentano uno dei maggiori rischi legati alla sicurezza dei mangimi con un elevato impatto sulla salute, nonché sull'economia e il commercio internazionale (2). 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 e i prodotti di origine animale. Infatti, il *carry over* di alcune micotossine nei prodotti di origine animale può avere un ulteriore importante impatto sulla salute umana.

In questo contesto, una delle principali problematiche che l'industria mangimistica deve affrontare è legata all'elevata incidenza di co-contaminazione degli alimenti per animali. Inoltre, l'industria mangimistica possiede ampie potenzialità in termini di utilizzo e rivalorizzazione dei sottoprodotti dell'industria alimentare. La gestione dei sottoprodotti, con particolare riferimento ai cereali, deve considerare il fatto che le micotossine si concentrano nei sottoprodotti destinati all'alimentazione animale. Una precisa conoscenza della distribuzione delle micotossine nei sottoprodotti, in relazione al livello di contaminazione iniziale dei cereali, alla tipologia di contaminazione, alla tipologia e complessità del processo tecnologico, è un fattore critico per l'accettabilità, il corretto impiego e uso sostenibile di tali sottoprodotti come ingredienti di mangimi.

## Micotossine nei mangimi

I risultati emersi da recenti pubblicazioni, che hanno valutato la tipologia e l'incidenza delle micotossine nei mangimi, hanno confermato dati già noti ed evidenziato problematiche emergenti (3). aflatossine, deossinivalenolo (DON), Fumonisine, Ocratossina A, tossina T<sub>2</sub> e Zearalenone (ZEA) si sono confermate come le principali micotossine contaminanti i mangimi, con significative differenze per quanto riguarda il tipo e la prevalenza delle diverse micotossine in diverse regioni del mondo. Dai lavori di revisione bibliografica, sono emersi principalmente due dati interessanti: 1) la percentuale di campioni non conformi rispetto ai limiti massimi ammissibili e/o raccomandati dalle normative europee non è risultata elevata; 2) un'alta percentuale di campioni analizzati è risultata caratterizzata da una co-contaminazione con diverse micotossine (Tabella 1).

**Tabella 1. Incidenza della co-contaminazione con micotossine nei mangimi**

Mangimi	Campioni (n)	Micotossine	Positivi (%)	Rif.
Mangimi composti	4500	AF, OTA, ZEA, DON, FUM	58	(4)
Cereali, sottoprodotti dei cereali, insilati, mangimi composti	1468	DON, ZEA, FB <sub>1</sub> FB <sub>2</sub>	57	(5)
Mangimi composti	1000	AF, ZEA, DON, FUM, OTA	Europa, 39 America 40 Asia 82	(6)
Cereali, materie prime per mangimi	6058	AF, ZEA, DON, FUM, OTA	50	(7)
Mangimi completi (suino)	277	OTA, ZEA, DON	10	(8)
Materie prime per mangimi, mangimi composti	416	AF, ZEA, DON, AcDON, T <sub>2</sub> , HT <sub>2</sub> , FUM, OTA	22	(9)
Cereali, mangimi completi (scrofa)	82	23 micotossine	75	(10)
Mangimi completi (avicoli)	50	Tricoteceni, ZEA	84	(11)

**AF:** aflatossine, **OTA:** ocratossina A, **ZEA:** zearalenone, **DON** : deossinivalenolo, **FUM:** fumonisine, **FB<sub>1</sub>:** fumonisina B<sub>1</sub>, **FB<sub>2</sub>:** fumonisina B<sub>2</sub>, **AcDON:** acetil-deossinivalenolo.

I mangimi composti, completi e complementari, in quanto miscele di vari ingredienti, possono essere particolarmente vulnerabili alla contaminazione da micotossine multipla. Inoltre, la globalizzazione del mercato delle materie prime può contribuire ad un'ampia diffusione e distribuzione delle micotossine al di fuori di precise aree geografiche, rendendo complessa la previsione della tipologia di contaminazione. I dati relativi all'incidenza della co-contaminazione con micotossine si riferiscono soprattutto ai mangimi. Va sottolineato che anche i foraggi possono rappresentare un'importante fonte di contaminazione in alimentazione animale. Nel ruminante, i foraggi rappresentano la principale componente della razione giornaliera. Nei foraggi insilati, la multi-contaminazione con micotossine è stata ampiamente dimostrata (12).

In questo contesto, quando si considera l'esposizione degli animali alle micotossine, l'esposizione cronica a bassi livelli di contaminazione e la multi-contaminazione rappresentano una tematica di grande interesse in relazione agli effetti additivi/sinergici, non ancora ben noti, delle micotossine.

## Micotossine nei cereali e sottoprodotti dei cereali

Per il 2015, la stima della produzione cerealicola mondiale è risultata pari a 2.540 milioni di tonnellate. Un'elevata percentuale di cereali è destinata all'alimentazione animale. In particolare, nel 2014-2015, l'utilizzo dei cereali nell'UE-28 è risultato ripartito tra l'alimentazione animale (60%), l'alimentazione umana (23%), la produzione di biocarburanti (4%), la produzione di sementi (2%), altro uso (11%). Pertanto, i cereali e i sottoprodotti dei cereali rappresentano le principali componenti dei mangimi industriali.

Le micotossine che contaminano i cereali non vengono distrutte durante la maggior parte delle operazioni tecnologiche dell'industria alimentare. Si verifica, invece, una ripartizione delle micotossine tra i prodotti e i sottoprodotti dei cereali. Gli effetti della macinazione di frumento e mais sulla distribuzione delle micotossine sono ben noti (13, 14). I dati pubblicati indicano una elevata concentrazione delle micotossine nelle frazioni destinate principalmente all'alimentazione animale, rispetto alla contaminazione dei cereali non trasformati. Considerando i livelli che indicati dalla legislazione europea, i risultati della letteratura indicano che a volte i limiti per i cereali non trasformati non sono in grado di garantire il rispetto dei limiti per i sottoprodotti. Un altro esempio di sottoprodotti che possono entrare nella formulazione dei mangimi è costituito dai DDGS (*Dried Distillers Grains with Solubles*). I volumi crescenti di produzione di bioetanolo da cereali comportano un aumento della disponibilità di DDGS che possono essere utilizzati in alimentazione animale. L'uso di tali prodotti come mangimi per animali non è un concetto nuovo. I DDGS rappresentano un ingrediente in grado di sostituire altri mangimi proteici ad un prezzo competitivo per l'industria. I principali ostacoli per una maggiore accettazione di DDGS in alimentazione animale sono legati alla variabilità nella composizione dei nutrienti, al loro elevato contenuto in fibra, nonché alla elevata percentuale di campioni co-contaminati con micotossine (15, 16). Le micotossine non vengono distrutte durante il processo di fermentazione alcolica o durante la produzione di DDGS. Un arricchimento di DON e ZEA pari a 3-3,5 volte nei DDGS è stato riportato (16).

L'ampia variabilità di ripartizione delle micotossine nei sottoprodotti dei cereali è legata a numerosi fattori: livello di contaminazione iniziale dei cereali, alla tipologia di contaminazione, alla tipologia e complessità del processo tecnologico. Pertanto, la conoscenza dei fattori di distribuzione delle micotossine nei sottoprodotti dei cereali rappresenta, a livello mondiale, una tematica di forte impatto economico oltre che per gli importanti riflessi sulla salute animale e uno strumento importante per la gestione del rischio e un corretto impiego e uso sostenibile dei sottoprodotti dei cereali da parte dell'industria mangimistica.

## Conclusioni

Nonostante gli sforzi di controllo della contaminazione da funghi, la contaminazione di mangimi e alimenti con micotossine è inevitabile e imprevedibile. Un'alta incidenza di co-contaminazione è stata riportata nei mangimi. Anche se ancora solo un numero molto limitato di micotossine è stato analizzato e la percentuale di campioni non conformi rispetto ai limiti massimi ammissibili e/o raccomandati dalle normative europee non è risultata elevata, la co-contaminazione è una tematica di particolare interesse a causa dei potenziali effetti additivi e/o sinergici delle micotossine. In tale contesto, le principali sfide future sono: 1) aumentare il numero di micotossine analizzate e loro metaboliti; 2) studio delle micotossine modificate; 3) migliore conoscenza sugli effetti tossicologici della co-contaminazione. L'industria mangimistica possiede ampie potenzialità in termini di utilizzo e rivalorizzazione dei sottoprodotti dell'industria alimentare. La gestione dei sottoprodotti, con particolare riferimento ai cereali, deve considerare il fatto che le micotossine si concentrano nei sottoprodotti destinati all'alimentazione animale. La precisa comprensione della distribuzione delle micotossine durante i processi tecnologici rappresenta un fattore critico per una maggiore accettazione di diversi sottoprodotti come ingredienti per mangimi, per definire modalità di utilizzo per ridurre i rischi per la salute animale, nonché per ottenere dati scientifici a supporto di possibili revisioni delle linee guida o dei livelli massimi nei mangimi per garantire la massima protezione per la salute umana e animale. L'elevata variabilità nella contaminazione da micotossine nei mangimi sottolinea infine la necessità di un sempre attento monitoraggio dei livelli di contaminazione.

Nell'ambito dell'industria mangimistica, il corretto campionamento e la diagnosi rapida rappresentano sempre una sfida e importanti strumenti decisionali per un sicuro utilizzo dei mangimi.

## Bibliografia

1. FEFAC. *From farm to table: statistics 2014/2015 in charts*. Bruxelles: European Feed Manufacturers' Federation; 2016. Disponibile all'indirizzo: <http://www.fefac.eu/publications.aspx?CategoryID=2061&EntryID=10646>; ultima consultazione 29/6/16
2. Bryden WL. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Anim Feed Sci Tech* 2012;173:134-58.
3. Binder EM, Tan LM, Chin LJ, Handl J, Richard J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Anim Feed Sci Tech* 2007;137:265-82.
4. Streit E, Naehrer K, Rodrigues I, Schatzmayr G. Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: long-term analysis with special focus on Europe and Asia. *J Sc Food Agr*, 2013, 93:2892-2899.
5. Borutova R, Acosta Aragon Y, Nährer K, Berthiller F. Co-occurrence and statistical correlations between mycotoxins in feedstuffs collected in the Asia-Oceania in 2010. *Anim Feed Sci Tech* 2012;178:190-7.
6. Rodrigues I, Naehrer K. A Three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed. *Toxins* 2012;4:663-75.
7. Rodrigues I, Naehrer K. Prevalence of mycotoxins in feedstuffs and feed surveyed worldwide in 2009 and 2010. *Phytopathologia Mediterranea*, 2012; 51:175-192.
8. Almeida I, Martins HM, Santos S, Costa JM, Bernardo F. Co-occurrence of mycotoxins in swine feed produced in Portugal. *Mycotoxin Res* 2011; 27:177-181.
9. Griessler K, Rodrigues I, Handl J, Hofstetter U. Occurrence of mycotoxins in Southern Europe. *World Mycotoxin J* 2010;3:301-9.
10. Monbaliu S, van Poucke C, Detavernier CL, Dumoulin FR, van De Velde M, Schoeters E, van Dyck S, Averkieva O, van Peteghem C, de Saeger S. Occurrence of mycotoxins in feed as analyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. *J Agric Food Chem* 2010;58:66-71.
11. Labuda R, Parich A, Berthiller F, Tančinová D. Incidence of trichothecenes and zearalenone in poultry feed mixtures from Slovakia. *Int J Food Microbiol* 2005;105:19-5.
12. Dell'Orto V, Baldi G, Cheli F. Mycotoxins in silage: checkpoints for effective management and control. *World Mycotoxin J* 2015;8:603-17.
13. Cheli F, Pinotti, L, Rossi L, Dell'Orto V. Effect of milling procedures on mycotoxin distribution in wheat fractions: A review. *LWT-Food Sci Technol*, 2013; 54:307-314.
14. Brera C, Catano C, De Santis B, Debegnach F, De Giacomo M, Pannunzi E, Miraglia M. Effect of Industrial Processing on the Distribution of Aflatoxins and Zearalenone in Corn-Milling Fractions. *J Agric Food Chem* 2006;54:5014-9.
15. Liu K. Chemical composition of distillers grains, a review. *J Agric Food Chem* 2011;59:1508-26.
16. Rodrigues I, Chin LJ. A comprehensive survey on the occurrence of mycotoxins in maize dried distillers' grain and solubles sourced worldwide. *World Mycotoxin J* 2012;5:83-8.

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

Rita De Pace, Cinzia Franchino, Francesca Floridi, Valeria Vita

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

## Introduzione

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, metaboliti secondari tossici prodotti da miceti che si sviluppano sulle derrate alimentari. La funzione delle tossine è, molto probabilmente, una risposta a stress esterni o una difesa da altri patogeni con i quali il fungo può entrare in competizione. È risaputo che non esiste una relazione diretta tra l'incidenza dell'attacco fungino e il livello di micotossine, e questo suggerisce come la semplice verifica di ammuffimento non sia necessariamente indicativa di contaminazione. Premesso che i fattori geografici e stagionali hanno un ruolo decisivo, la presenza di micotossine negli alimenti coinvolge tutta la filiera produttiva, dal campo alla tavola. È noto, infatti, che, sono condizionanti nella contaminazione le tecniche agronomiche, l'andamento meteorologico, le operazioni di post-raccolta, la fase di magazzinaggio e l'infestazione da insetti nonché le fasi domestiche di conservazione o di manipolazione degli alimenti (1). In generale le condizioni che influenzano lo sviluppo delle micotossine sono: temperatura, umidità dell'ambiente, ventilazione, umidità dell'alimento e pH. È noto che i vegetali favoriscono la produzione di micotossine, più dei substrati animali, infatti, la presenza soprattutto di amido sembra incrementarla, così come pure la presenza di zinco. La prevenzione si attua operando sul substrato, sull'ambiente, ma, anche utilizzando fungicidi e fungistatici. La produzione delle micotossine di interesse alimentaristico può essere ricondotta principalmente a tre generi di funghi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*. Queste tossine raramente portano ad intossicazioni acute ma la loro pericolosità dipende dalla capacità di determinare intossicazioni croniche conseguenti all'ingestione di piccole dosi ripetute nel tempo. Le aflatoossine (AF) sono micotossine prodotte da alcune specie di *Aspergillus*. Si ritiene generalmente che *Aspergillus flavus* (ubiquitario, diffuso nei climi temperati) produca le aflatoossine B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, mentre *Aspergillus parasiticus* (maggiormente diffuso nei climi tropicali e subtropicali) produca le aflatoossine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>. Gli *Aspergillus* possono essere presenti ovunque, ma la loro proliferazione è favorita da un ambiente caldo e umido. La temperatura ottimale di crescita per questi funghi è di circa 36-38°C e sono favoriti da un'umidità relativa dell'aria pari o superiore all'85%; l'infestazione è agevolata anche da condizioni di stress idrico della pianta. Sintesi e rilascio di aflatoossine possono verificarsi sia nella fase di "pre" che di "post" raccolta e la maggiore produzione avviene tra 24°C e 27°C per l'AFB<sub>1</sub> e tra 29°C e 30°C per l'AFG<sub>1</sub>. La presenza di insetti spesso coincide con alti livelli di aflatoossine (specie nel caso del mais), in quanto essi sono da considerare tra i maggiori responsabili della contaminazione sia per il trasporto delle spore fungine sia per il danneggiamento della pianta, con aumentata esposizione

della stessa all'attacco dei miceti. Inoltre la presenza contemporanea sullo stesso substrato di più specie fungine riduce la produzione di micotossine per competizione delle muffe o a causa di enzimi degradanti (1). Nel 1993 la IARC (*International Agency for Research on Cancer*) ha classificato le AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub> nel Gruppo 1, cioè come "agenti cancerogeni per l'uomo" (2). L'AFB<sub>1</sub> ha effetti cancerogeni, epatotossici, immunosoppressori e provoca danni al DNA (3). Valori massimi ammissibili di aflatossine negli alimenti sono stabiliti sia dalla Circolare n. 10, 9 giugno 1999 (4) che dal Regolamento (UE) 165/2010 (5). In questa ottica di salvaguardia della salute pubblica negli anni 2013-2015, l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata, quale organo preposto a tali controlli e accreditato ai sensi del Regolamento (CE) 882/2004 (6), ha iniziato a monitorare le aflatossina B<sub>1</sub> 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 dai tecnici degli USMAF (Uffici di Sanità Marittima Aerea e di Frontiera) di Reggio Calabria.

## Materiali e metodi

### Prelievo, macinazione dei campioni e preparazione del campione

Le partite di frutta secca con guscio, importate da Paesi comunitari ed extracomunitari, sono controllate nelle località di entrata della merce nel nostro Paese, nel nostro caso l'USMAF di Reggio Calabria. In applicazione del Regolamento (UE) 178/2010 (7) e del Regolamento (CE) 882/2004 (6), si procede al prelievo dei campioni elementari che formeranno il campione globale, in genere di circa 20 kg rappresentativo dell'intera partita. Questo, sigillato e accompagnato dal verbale di prelievo, è consegnato all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Foggia, che provvede alla macinazione, omogeneizzazione e formazione delle aliquote per ulteriori indagini analitiche. Questa procedura garantisce una maggiore omogeneità delle micotossine nel campione, poiché, generalmente, queste si distribuiscono a macchia di leopardo. Per la fase di estrazione della AFB<sub>1</sub> e AFT (aflatossine totali) dai campioni di frutta secca, abbiamo utilizzato le procedure indicate dalle ditte produttrici dei kit immunoenzimatici, che, prevedono per le aflatossine totali, l'utilizzo di metanolo al 33%, filtrazione con whatman n°1 e diluizione con metanolo al 33%, mentre per la AFB<sub>1</sub>, estrazione con metanolo al 60% filtrazione con whatman n°1 infine per entrambe le estrazioni si procederà all'esecuzione del kit.

I kit immunoenzimatici, sono accreditati ai sensi UNI CEI EN ISO / IEC/17025 (8), in ottemperanza all'art.12 del Regolamento (CE) 882/2004 (6), alla Decisione 2002/657/CE (9) e al Regolamento (UE) 519/2014 del 16 maggio 2014 (10) che modifica il Regolamento (CE) 401/2006 (11). Sono controllati periodicamente con carte di controllo e circuiti interlaboratorio organizzati da FAPAS (*Food Chemistry Proficiency Testing*). I parametri considerati nella validazione, sono: specificità, verifica dell'errore  $\beta$ , precisione, robustezza. Valutati utilizzando i test statistici del calcolo della varianza (test ANOVA), test di Fisher e il test di Student. I metodi immunoenzimatici, possono presentare una leggera sovrastima perciò i campioni positivi allo Screening Elisa (Enzime-Lynked Immunosorbent) sono stati confermati con metodo cromatografico HPLC (High Performance Liquid Chromatography) riscontrando concentrazioni di micotossine sovrapponibili.

I parametri delle due validazioni sono stati verificati sperimentalmente con i seguenti risultati:

– *Aflatossine totali in frutta a guscio*

Limiti di rivelazione: 0,1 µg/kg

Specificità:

Analisi dei bianchi/campioni: 4 campioni di mais, 4 di grano, 4 di orzo, 2 di mandorle, 2 di arachidi, 2 di nocciole e 2 di pistacchi.

Valore medio B/Bo: 89,81% prima seduta analitica, 89,82% seconda seduta analitica.

Scarto tipo: 3,0% prima seduta analitica, 3,0% seconda seduta analitica.

Analisi campioni fortificati:

Livello di fortificazione: 4 µg/kg

Valore medio B/Bo: 60,6% prima seduta analitica, 60,4% seconda seduta analitica.

Scarto tipo: 2,45% prima seduta, 2,36% seconda seduta.

Precisione:

1° Livello di fortificazione: 4 µg/kg

Valore medio: 3,61 µg/kg (R = 90%)

CV%: 10%

2° Livello di fortificazione: 10 µg/kg

Valore medio: 9,47 µg/kg (R = 95%)

CV%: 7%

Robustezza:

Variabili testate. Agitazione, percentuale di metanolo nella miscela di estrazione, conservazione estratto, filtrazione del campione, quantità di campione, ditta metanolo, apertura kit.

Il metodo risulta robusto.

– *Aflatossina B<sub>1</sub> in frutta secca a guscio*

Limiti di rivelazione: 1 µg/kg

Specificità:

Analisi dei bianchi/campioni: 4 campioni di pistacchi, 4 di arachidi, 4 di mandorle, 2 di armellino dolce, 2 di armellino amaro, 2 di nocciole e 2 di noce.

Valore medio B/Bo: 99,39% prima seduta analitica, 101,77% seconda seduta analitica.

Scarto tipo: 4,10% prima seduta analitica, 6,01% seconda seduta analitica.

Analisi campioni fortificati:

Livello di fortificazione: 5 µg/kg

Valore medio B/Bo: 40,22% prima seduta analitica, 42,53% seconda seduta analitica.

Scarto tipo: 3,59% prima seduta, 3,03% seconda seduta.

Precisione:

1° livello di fortificazione: 5 µg/kg

Valore medio: 3,96 µg/kg (R = 79%)

CV%: 5%

2° livello di fortificazione: 8 µg/kg

Valore medio: 7,31 µg/kg (R = 91%)

CV%: 11%

3° livello di fortificazione: 12 µg/kg  
Valore medio: 13,18 µg/kg (R = 109,9%)  
CV%: 10%  
Robustezza variabili testate: Aggiunta di 1 g di NaCl, percentuale di metanolo nella miscela di estrazione, conservazione estratto, filtrazione del campione, ditta metanolo, apertura del kit.

Il metodo risulta robusto.

## Discussione dei risultati

In Figura 1, sono riportate le percentuali dei campioni di frutta secca provenienti da Paesi extracomunitari negli anni 2013-2015. Il Paese da cui si importa la maggior parte della merce è l'USA (42%) seguita dalla Turchia (24%), Brasile, Vietnam, Afganistan, Australia (5%), Iran, Georgia, Egitto (4%) e Cina (2%) (Figura 1). In questi anni abbiamo eseguito 614 analisi di aflatossine (B<sub>1</sub> e totali) su campioni di frutta secca con guscio (pistacchi, arachidi e mandorle) importati dai Paesi sopraelencati. Dalle analisi eseguite abbiamo riscontrato che solo 64 campioni pari al 11%, sono risultati positivi alle micotossine considerate. Invece 89% dei campioni è conforme a quanto indicato dal Regolamento (UE) 165/2010 (5), che definisce rispettivamente concentrazioni di aflatossine B<sub>1</sub>, pari a 8 µg/kg e aflatossine totali pari a 10 µg/kg in campioni di mandorle, pistacchi e semi di albicocche destinati al consumo umano diretto. Riassumendo, quindi, abbiamo che il 71% dei campioni è inferiore al limite di rilevabilità del metodo, il 18% è minore dello stesso Regolamento sopra evidenziato e solo 11% non è conforme ai limiti di legge.

Due importanti fattori da tenere sotto controllo per il rischio di contaminazione delle micotossine sono il tempo (produzione-trasformazione) e le diverse lavorazioni che le materie prime devono subire, e che potrebbero determinare un notevole abbattimento delle micotossine. Un esempio sono i pistacchi utilizzati in diversi processi produttivi alimentari attraverso trasformazioni che vanno dall'arrostimento alla salatura per arrivare alla fornitura di ingredienti base per l'industria alimentare e dolciaria. Questa matrice, infatti, è quella maggiormente importata e maggiormente contaminata, perciò il dato analitico deve essere valutato in base alla destinazione del prodotto, considerando che la lavorazione inciderà sulla concentrazione finale della micotossina nel prodotto finale. Inoltre, una catena di distribuzione che impiega diversi passaggi prima di arrivare al consumatore finale è ovviamente soggetta a maggiori rischi. In particolare sono le fasi di trasporto che devono essere considerate le più critiche a causa soprattutto delle condizioni di temperatura e umidità (12). Il controllo di prodotti all'importazione è strettamente legato anche ad aspetti economici, infatti, in questi anni, è stato osservato un calo dei quantitativi di frutta secca con guscio in ingresso nel porto di Gioia Tauro e conseguentemente del numero di campioni analizzati. Nonostante la diminuzione delle importazioni e le basse concentrazioni di aflatossine riscontrate è opportuno anche non diminuire i controlli poiché piccole quantità di tossina assunte costantemente nel tempo possono indurre i temuti effetti cronici, primo tra questi la cancerogenesi.

## Conclusioni

Da quanto descritto, risulta, quindi, fondamentale la corretta applicazione del sistema di autocontrollo nelle principali fasi dei processi di trasporto e produttivi, HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*), per salvaguardare la salute del consumatore (12).

I risultati analitici riscontrati in questi anni sono stati, in definitiva, abbastanza confortanti, solo l'11% dei campioni sono risultati non conformi in base al Regolamento (UE) 165/2010 (5), tuttavia, è importante continuare l'attività di sorveglianza in maniera continua e costante per garantire l'efficacia del processo HACCP (12) e responsabilizzare gli operatori del settore sulle buone pratiche che assicurerebbero la salvaguardia della salute dei consumatori e una migliore resa economica delle produzioni.

## Bibliografia

1. Piro R, Biancardi A. *Micotossine*. Brescia: Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "B. Ubertini"; 2010.
2. International Agency for Research on Cancer. *Chemical agents and related occupations - A review of human carcinogens*. IARC Monography; 2012; 100F: 225-48.
3. Caloni F, Nebbia C. Micotossine. In: Nebbia C (Ed.). *Residui di farmaci e contaminazioni ambientali nelle produzioni animali*. Napoli: Edises; 2009. p. 453-78.
4. Italia. Circolare 9 giugno 1999, n. 10. Direttive in materia di controllo ufficiale sui prodotti alimentari: valori massimi ammissibili di micotossine nelle derrate alimentari di origine nazionale, comunitaria e Paesi terzi. *Gazzetta Ufficiale* n. 135, 11 giugno 1999.
5. Europa. Regolamento (UE) della commissione del 26 febbraio 2010, n. 165. Recante modifica, per quanto riguarda le aflatossine, del regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale del Unione Europea* L 50, del 27 febbraio 2010.
6. Europa. Regolamento (CE) del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004, n. 882. Relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali. *Gazzetta Ufficiale del Unione Europea* L 165/1, 30 aprile 2004.
7. Europa. Regolamento (UE) della commissione del 2 marzo 2010, n. 178. Modifica il Regolamento (CE) n. 401/2006 per quanto concerne le arachidi, gli altri semi oleosi, la frutta a guscio, le mandorle di albicocche, la liquirizia e l'olio vegetale. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 52/32 del 03 marzo 2010.
8. UNI CEI EN ISO/IEC/17025. Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2005.
9. Europa. Decisione della commissione del 12 agosto 2002, n.657. Attua la direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* Serie L 221/8, del 17 agosto 2002.
10. Europa. Regolamento (UE) n. 519/2014 della Commissione del 16 maggio 2014 che modifica il regolamento (CE) n. 401/2006 per quanto riguarda i metodi di campionamento per le grandi partite, per le spezie e gli integratori alimentari, i criteri di rendimento per le tossine T<sub>2</sub> e HT<sub>2</sub> e per la citrinina, nonché i metodi di analisi di screening. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 147/43 del 17 maggio 2014.

11. Europa. Regolamento (CE) n. 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 70/12, del 9 marzo 2006.
12. Maurizi D. Applicazione dei principi HACCP nel controllo delle micotossine nelle produzioni alimentari. In: Brera C, De Santis B, Debegnach F, Gregori E, Pannunzi E, Barea Toscan MC (Ed.). *IV Congresso Nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 11-13 giugno 2012. Atti.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2013. (Rapporti ISTISAN 13/18). p. 99-105.

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

Antonella Del Fiore, Chiara Nobili, Patrizia De Rossi  
 Polo di Specializzazione Alimenti, ARPA Puglia, Bari, Italia

## Introduzione

La filiera dei prodotti agrumicoli è una delle più importanti del comparto ortofrutticolo italiano, rappresentandone circa il 10% del valore complessivo (Figura 1). Il 99% della produzione italiana di agrumi è concentrato nelle regioni meridionali, in particolare in Sicilia e Calabria (1). La produzione agrumicola è destinata prevalentemente al consumo del prodotto fresco, solo un terzo, invece, alla trasformazione industriale.

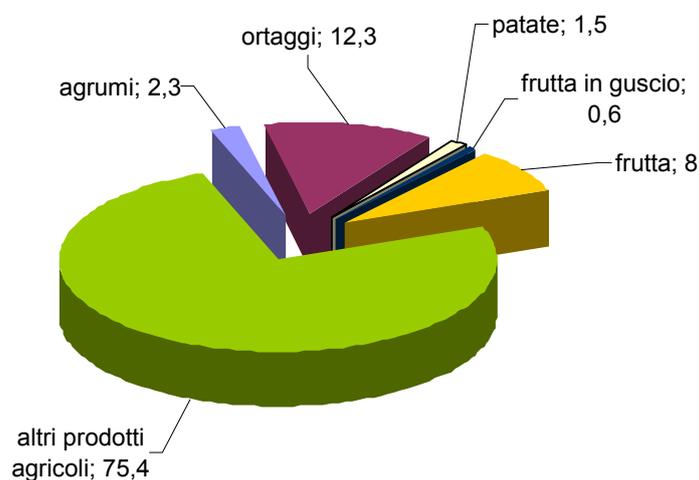


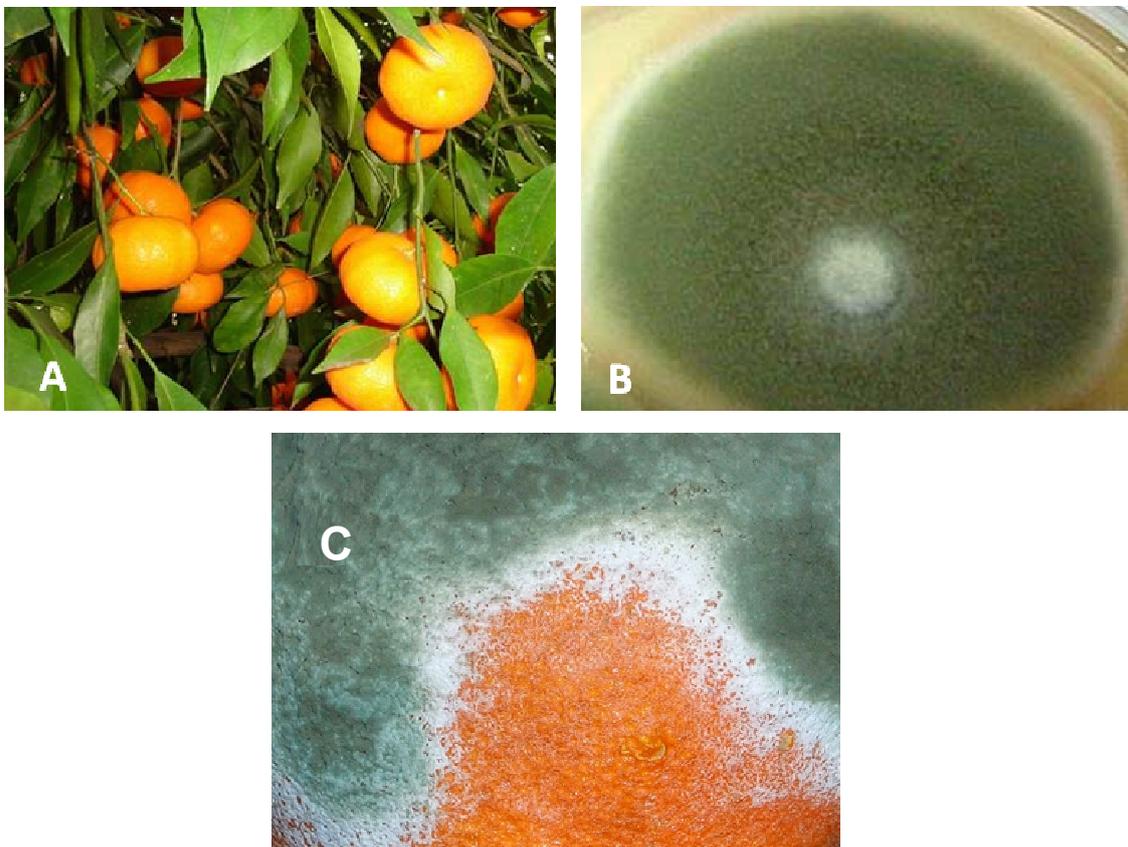
Figura 1. Incidenza del settore agrumicolo sull'agricoltura. Dati ISMEA (2014)

Numerose sono le alterazioni microbiologiche che possono verificarsi a carico degli agrumi in post-raccolta, con conseguenti gravi degradazioni sensoriali, perdite di prodotto e danni economici. Perdite significative di prodotto possono determinarsi nelle fasi di conservazione e commercializzazione degli agrumi in seguito ad infezioni da specie fungine appartenenti al genere *Penicillium*, quali *Penicillium digitatum* (muffa verde) e *Penicillium italicum* (muffa blu). Tali funghi possono inoltre produrre in particolari situazioni ambientali metaboliti secondari tossici, le triptochialanine, ad azione tremorgenica negli animali e nell'uomo (2).

Obiettivo del presente lavoro è la messa a punto di un protocollo biomolecolare qualitativo (PCR Real time) per la determinazione di *Penicillium digitatum* su agrumi in post-raccolta.

## Materiali e metodi

Le attività sperimentali sono state condotte su campioni di “Mandarino Tardivo di Ciaculli” (*Citrus reticulata* sp.) (Figura 2).



**Figura 2. A: Mandarino tardivo di Ciaculli; B: *Penicillium digitatum*; C: dettaglio di mandarino contaminato da micelio fungino**

I frutti sono stati inoculati artificialmente con sospensioni conidiche di *Penicillium digitatum* (proveniente dalla collezione del laboratorio di microbiologia del centro ENEA Trisaia) a concentrazione nota. È stata quindi monitorata l'evoluzione dell'infezione fungina nel tempo in condizioni di temperatura controllata (5°C).

L'estrazione del DNA totale da ciascun campione è stata effettuata con il metodo C-TAB (3). Per l'amplificazione specie-specifica del DNA di *Penicillium digitatum* è stata utilizzata una coppia di primers disegnati su un gene (Tabella 1) codificante per una poligalatturonasi (Gene Bank: BAA77297.1, CDS), enzima responsabile dei processi di degradazione dei tessuti vegetali,

La specificità del protocollo di amplificazione è stata verificata rispetto a DNA estratto da micelio isolato da colture pure di ceppi di differenti specie fungine. Al fine di quantificare il DNA fungino in mandarini commerciali è stata realizzata una curva di calibrazione utilizzando diluizioni seriali di DNA di *Penicillium digitatum*.

Tabella 1. Sequenze primers utilizzate nello studio.

GP1 Forward 5' - 3'	GP1 Reverse 5' - 3'	Lunghezza amplicone (bp)
CCCTGCGCTAACATCCTCAT	AGGATGTCTCGGCCCTTA	284

## Risultati e discussione

Il protocollo Real time PCR messo a punto in questo lavoro ha permesso l'amplificazione specifica del DNA del fungo target. La curva di calibrazione ottenuta si caratterizza per un elevato coefficiente di correlazione ( $R^2=0,99$ ) e una buona efficienza di reazione (dati non mostrati).

I risultati della curva di crescita di *Penicillium digitatum* (Figura 3) mostrano che nelle condizioni testate la crescita fungina ha un andamento esponenziale a partire dall'8° giorno di incubazione, quando ancora non è visibile la contaminazione mediante osservazione al microscopio. I risultati del monitoraggio di campioni commerciali (mandarini non inoculati artificialmente) mostrano la presenza del DNA fungino a partire dal 15° giorno (Figura 3). Il metodo PCR Real time messo a punto si è dimostrato sensibile e specifico per una valutazione quali-quantitativa dell'entità della patogenesi.

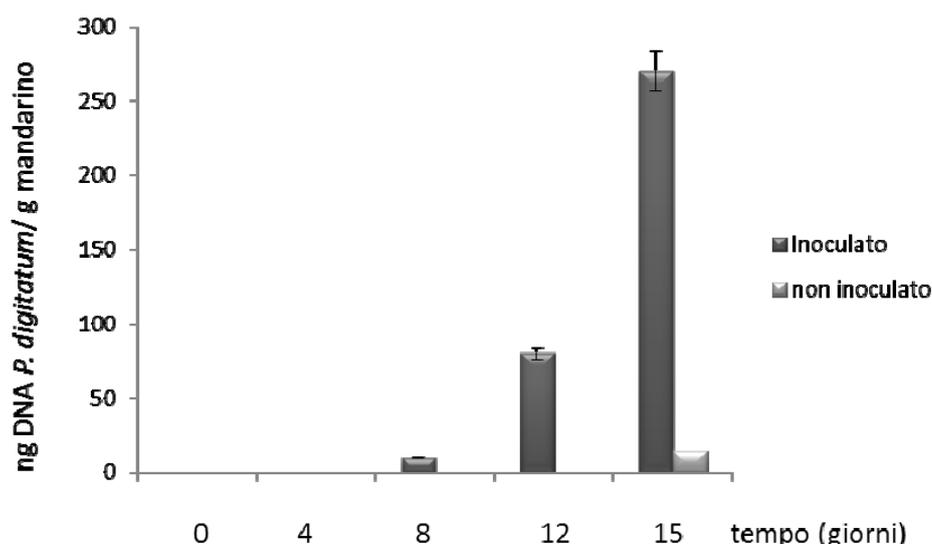


Figura 3. Quantificazione di DNA fungino in campioni di mandarino, inoculati e non con *Penicillium digitatum* ( $10^5$  conidi/mL). Prove condotte con un Termociclatore PCR Real-time Applied Biosystems 7000. I dati rappresentano la media  $\pm$  DS dei valori risultanti da 3 serie di esperimenti (n=9)

## Conclusioni

Nel presente lavoro è stata sviluppata una metodica molecolare di rilevamento precoce della contaminazione fungina in agrumi (mandarini) basata sull'amplificazione di sequenze target di

DNA fungino con primers specie-specifici. Alle condizioni testate la coppia di primers scelta si è contraddistinta per specificità ed elevata sensibilità nei confronti della sequenza target di DNA.

I risultati ottenuti hanno evidenziato una sensibilità del metodo tale da permettere la determinazione nelle fasi iniziali dell'infezione, quando il micelio fungino non è ancora visibile ad una osservazione allo stereomicroscopio.

## Ringraziamenti

Ricerca eseguita nell'ambito del Progetto ORTOFRULOG, "Piattaforma logistica innovativa per le produzioni ortofrutticole nazionali destinate ai mercati interni ed esteri", finanziato dal MiSE attraverso Industria 2015, Bando "Nuove Tecnologie per il Made in Italy" Programma n. MI01\_00304.

## Bibliografia

1. ISMEA. *Scheda di settore: agrumi*. Roma: Istituto di Servizi per il Mercato Agricolo Alimentare 2014
2. Ariza MR, Larsen TO, Petersen BO, Duus JØ, Barrero AF. Penicillium digitatum metabolites on synthetic media and citrus fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002;50:6361-5.
3. Weiland JJ. Rapid procedure for the extraction of DNA from fungal spores and mycelia. *Fungal Genetics Reports* 1997; 44: 60-63)

# INQUINAMENTO ED ESPOSIZIONE AD AFLATOSSINE IN AMBIENTI DI LAVORO

Fulvio Ferri (a) Giorgio Fedrizzi (b) Lorena Bedogni (a), Sauro Capanni (a), Patrizia Ferdenzi (a), Massimo Magnani (a), Simonetta Menotta (b), Giuseppe Ombrini (a), Milva Olmi (a)  
(a) Servizio Prevenzione e Sicurezza Ambienti di Lavoro, AUSL, Reggio Emilia, Italia  
(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Lombardia ed Emilia Romagna, Bologna, Italia

## Introduzione

È notevole la sorpresa che un operatore della prevenzione può provare quando, osservando le condizioni di lavoro di un'azienda della filiera agroalimentare (un essiccatoio di cereali, un mangimificio, un allevamento di suini), si trova davanti ad una situazione in cui:

- per un verso sono trattati materiali (in genere derrate alimentari) contenenti aflatossine cancerogene (AfB<sub>1</sub>, AfG<sub>1</sub>, AfM<sub>1</sub>)
  - ad azione genotossica, riconosciuti cancerogeni da molto tempo;
  - i cui effetti sulle popolazioni animali e umane esposte per ragioni alimentari (quelle dei Paesi asiatici e africani, soprattutto) sono ampiamente noti e studiati da decenni (1-3);
  - che possono giocare un ruolo causale diretto nel 4,6-28,2% di tutti i casi di epatocarcinoma (1);
  - la cui pericolosità è stata documentata ed è storicamente collegata alla possibile assunzione per via alimentare, attraverso cibi contaminati (4), ma il cui assorbimento nell'organismo, come è noto, può avvenire anche attraverso la via respiratoria o, addirittura, per via cutanea (5-8);
  - per i quali le normative internazionali prevedono dei limiti *politici* di accettabilità del loro contenuto nei cibi per il consumo umano e nei mangimi,
  - che troviamo ampiamente presenti nella catena agroalimentare su numerosi prodotti di origine vegetale (mais, riso, frumento e cereali vari, frutta secca, frutta essiccata, spezie, cotone) e, quindi, in tutte le aziende che hanno a che fare con tali prodotti, (produzione, lavorazione, commercializzazione), ma anche in aziende di altri settori, (allevamenti avicoli o di suini o bovini, trasporti, industria tessile del cotone, laboratori, produzione di biogas) (9, 10);
- mentre, dall'altro lato, deve constatare una carente attenzione/conoscenza (e una scarsa regolamentazione) sulla possibile esposizione professionale e sulla prevenzione dei loro effetti nocivi.

È facile verificare, infatti, come sia limitato il numero di studi epidemiologici o approfondimenti sperimentali su livelli di esposizione professionale, indicatori biologici ed effetti sanitari, nelle pur numerose aziende che trattano, direttamente o indirettamente, prodotti alimentari o mangimi contaminati (9-12); stupisce, infine, l'assenza di pressoché qualsiasi normativa specifica di prevenzione a tutela dei lavoratori esposti ad aflatossine che, paradossalmente, non sono comprese nella lista dei cancerogeni professionali, predisposti dalla UE.

Unico segnale di attenzione al problema, in Italia, è costituito dal recente inserimento dell'epatocarcinoma tra le *malattie professionali* da denunciare obbligatoriamente in caso di insorgenza in lavoratori esposti ad aflatossina B<sub>1</sub> (codice I.6.45 – C22.0) (Ministero del Lavoro

e della Politiche Sociali, Decreto 10 giugno 2014. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale* n. 212 del 12-9-2014). Perché questo sostanziale “disinteresse”? Forse perché:

- le AF sono cancerogeni *naturali*, prodotti da muffe, ubiquitari, a cui non è semplice sottrarsi; quindi la loro nocività spaventa meno e suscita minori conflitti o allarmi sociali rispetto a cancerogeni *di sintesi* prodotti dal settore industriale; oppure
- in quanto il problema, dal punto di vista epidemiologico, si è manifestato con particolare virulenza soprattutto in quei Paesi (Asia o Africa) dove ampie fasce di popolazione non possono permettersi il lusso di selezionare le sementi o i prodotti della terra, scartando o destinando ad altro impiego quelli contaminati da aflatossine e li mangiano anche se sono fortemente inquinati.

Amesso che conoscano il problema, si preferisce l'esposizione alimentare ad aflatossine con il rischio di sviluppare un cancro epatico (che resta comunque una probabilità) piuttosto che affrontare la pressoché sicura morte per denutrizione. Laddove, invece (come nei Paesi occidentali), i limiti di contaminazione sono tenuti in considerazione e, sostanzialmente, vengono fatti rispettare, l'evidenza epidemiologica di danni da ingestione di aflatossine o le variazioni di indicatori biologici specifici di assorbimento sono difficili da documentare. Da tutto ciò deriva, appunto, che solo raramente queste sostanze vengono considerate tra i fattori di rischio professionali, anche in quelle aziende in cui l'esposizione dei lavoratori (per via respiratoria, soprattutto) è consistente, nonostante la possibilità di una specifica via di attivazione polmonare dell'aflatossina B1 in epossido sia già stata ampiamente dimostrata e da ciò deriva la verosimile azione cancerogena anche a livello polmonare.

## Livelli di inquinamento/esposizione

L'esposizione professionale per via inalatoria è stata ben documentata, soprattutto da lavori condotti all'estero, ma anche da un recente lavoro, condotto in collaborazione tra Azienda Unitaria Sanitaria Locale di Reggio Emilia e l'Istituto Superiore di Sanità (11-13). La Tabella 1 fornisce una sintesi dei livelli di esposizione professionale ad aflatossine *aerodisperse*, tratta dalla letteratura scientifica degli ultimi decenni (11, 14, 15).

**Tabella 1. Inquinamento da aflatossine in ambienti di lavoro: analisi sintetica dei range di valori minimi e massimi**

Comparto produttivo	Afla-tossine	Aflatossine aerodisperse (in ng/m <sup>3</sup> )				Studi e dati considerati
		valori minimi		valori massimi		
		range	mediana	range	mediana	
Agricoltura cerea-licola (sprtt mais)*	B <sub>1</sub> -B <sub>2</sub>	nd-88	nd	11,1-1505	92	6 studi, 31 dati
	totali	nd-384	8	24-13000	1680	
Mangimifici	B <sub>1</sub>	nd-0,016	0,002	0,027-0,052	0,040	5 studi, 14 dati
	totali	0,006-0,016	0,04	0,038-13,26	1,55	
Lavorazione arachidi	B <sub>1</sub>	0,2-0,87	0,45	7,6-300	19	4 studi, 15 dati
Caffè, cacao e spezie	B <sub>1</sub>	nd-nd	nd	0,029-0,045	0,037	2 studi, 6 dati
	totali	nd-nd	nd	-	-	
Lavorazione/macinazione riso o mais	totali	nd-8	0,05	7,39-28	19,11	2 studi, 8 dati
Allevamenti (suini e avicoli)	B <sub>1</sub>	5-124	64,5	0,08-4849	421	2 studi, 5 dati
Rifiuti	B <sub>1</sub>	0,6-1,7	1,15	1,5-62,3	27,55	1 studio, 12 dati

\* Raccolta, Carico-scarico, Stoccaggio, Pulizia ambienti di stoccaggio, Essiccatoi, Contenitori vari

Quali effetti dannosi sui lavoratori esposti?

Pochi i dati certi: nei Paesi Bassi (lavorazioni di arachidi) è stato osservato un aumento mortalità per tumori delle vie respiratorie in gruppi di lavoratori esposti ad aflatossine vs gruppo di non esposti; in mangimifici danesi, è stato rilevato un eccesso di tumori a fegato, vie biliari, ghiandole salivari e mediastino, negli addetti con anzianità lavorativa(> 10 anni) rispetto alla popolazione generale.

## Diffusione dell'esposizione professionale ad aflatossine in Italia

Per rappresentare adeguatamente il problema occorre innanzitutto conoscerne la possibile estensione (aziende e lavoratori interessati), oltre che i possibili livelli di esposizione professionale (già illustrati in Tabella 1). Usando le basi dati dell'INAIL ("Flussi INAIL") disponibili e i codici di classificazione ATECO (ATtività ECONomiche) dell'attività produttiva delle aziende è stato possibile stimare il numero di aziende (del settore Industria) potenzialmente interessate al problema e i relativi occupati, potenzialmente esposti ad aflatossine. I risultati di tale analisi sono riportati in Tabella 2 e Tabella 3.

**Tabella 2. Distribuzione delle Aziende italiane del settore industria (accorpate per categoria produttiva) potenzialmente interessate al problema Aflatossine (Anno 2013). Sono indicati i codici ATECO utilizzati per selezionarle e accorparle**

Lavorazioni per gruppi (ATECO 2007)	Addetti (n.)	Aziende (n.)	Codici ATECO considerati
Coltivazione cereali	3343	1619	A 0111; A 01111; A 011110
Coltivazione semi oleosi e misti (oleosi e non)	33243	2907	A 01112; A 011120; A 01113; A 011130; A 01114; A 011140
Coltivazione di riso	246	191	A 0112; A 01120; A 011200
Coltivazione di spezie, piante aromatiche e farmaceutiche	140	118	A 0128; A 01280; A 012800
Allevamenti suini, bovini, avicoli con eventuali coltivazioni	3404	1311	A 014100; A 0142; A 01420; A 014200; A 0146; A 01460; A 014600; A 0147; A 014700; A 01499; A 014990; A 01500; A 015000;
Attività di supporto alla produzione vegetale	10868	6079	A 0161; A 01610; A 016100
Attività successive alla raccolta di vegetali	2831	492	A 0163; A 01630; A 016300
Pulitura, cernita e altre lavorazioni di semi e granaglie	108	14	A 016401; A 016409
Produzione di olio raffinato o grezzo da semi oleosi o frutti oleosi (eccetto olio di mais)	1303	193	C 10412; C 104120
Lavorazione delle granaglie, produzione di amidi e di prodotti amidacei	10680	1687	C 106; C 1061; C 10611; C 106110; C 10612; C 106120; C 10613; C 106130; C 10614; C 106140; C 1062; C 10620
Produzione di cacao, cioccolato, tè, caffè, confetterie	28097	2062	C 1082; C 10820; C 108200; C 1083; C 10830; C 108301
Produzione di condimenti e spezie	1865	274	C 1084; C 10840; C 108400
Produzione di mangimi per l'alimentazione degli animali da allevamento	6449	662	C 1091; C 10910; C 109100
Preparazione e filatura di fibre tessili	20266	2281	C 131; C 13100; C 131000
Riparazione e manutenzione di altre macchine per agricoltura, silvicoltura e la zootecnia	5	2	C 331270
Totale nazionale	122.848	19.892	

**Tabella 3. Distribuzione nelle varie regioni italiane di aziende industriali, potenzialmente interessate al problema aflatossine e relativi occupati (da Flussi INAIL 2013)**

Regioni italiane	Addetti		Aziende	
	n.	%	n.	%
Abruzzo	2075,0	1,7	499	2,5
Basilicata	849,8	0,7	221	1,1
Calabria	984,5	0,8	498	2,5
<b>Campania</b>	<b>3849,9</b>	<b>3,1</b>	<b>912</b>	<b>4,6</b>
<b>Emilia Romagna</b>	<b>10551,7</b>	<b>8,6</b>	<b>2166</b>	<b>10,9</b>
<b>Friuli-Venezia Giulia</b>	<b>3091,2</b>	<b>2,5</b>	<b>611</b>	<b>3,1</b>
<b>Lazio</b>	<b>9685,2</b>	<b>7,9</b>	<b>811</b>	<b>4,1</b>
Liguria	773,1	0,6	197	1,0
<b>Lombardia</b>	<b>21948,3</b>	<b>17,9</b>	<b>2421</b>	<b>12,2</b>
<b>Marche</b>	<b>20152,4</b>	<b>16,4</b>	<b>1263</b>	<b>6,3</b>
Molise	349,7	0,3	367	1,8
<b>Piemonte</b>	<b>21350,2</b>	<b>17,4</b>	<b>1979</b>	<b>9,9</b>
Bolzano	782,1	0,6	264	1,3
Trento	1419,2	1,2	201	1,0
Puglia	2703,4	2,2	938	4,7
Sardegna	663,1	0,5	291	1,5
<b>Sicilia</b>	<b>2749,7</b>	<b>2,2</b>	<b>1161</b>	<b>5,8</b>
<b>Toscana</b>	<b>8249,8</b>	<b>6,7</b>	<b>2135</b>	<b>10,7</b>
Umbria	1848,7	1,5	627	3,2
Valle d'Aosta	125,5	0,1	31	0,2
<b>Veneto</b>	<b>8645,1</b>	<b>7,0</b>	<b>2299</b>	<b>11,6</b>
Totale nazionale	122847,6	100,0	19892	100,0

In grassetto le prime 10 regioni, per addetti esposti

## Che fare

Chi opera nell'ambito di un Dipartimento di Sanità Pubblica per la tutela della salute dei lavoratori, si pone il problema di individuare gli strumenti normativi più adeguati per indicare i provvedimenti di prevenzione più praticabili ed efficaci contro questo specifico fattore di rischio e di farli adottare dalle aziende interessate.

Una preoccupazione di cui anche la Regione Emilia Romagna si è di recente fatta carico pubblicando una monografia sul tema incentrata in gran parte proprio sulle modalità per prevenire o limitare l'esposizione (sia alimentare che per via respiratoria) (11).

Le misure da adottare sono:

### – *Informare*

La prima misura da adottare è quella di informare adeguatamente i soggetti interessati e, soprattutto, gli esposti. L'informazione va fornita per incrementare la consapevolezza in tutti gli attori interessati sulla presenza del rischio, le sue fonti, le modalità di esposizione, ecc. e anche sui provvedimenti di prevenzione efficaci per limitarla o abbatterla.

### *Riferimenti normativi*

Sul piano normativo si registra il sorprendente mancato riconoscimento ufficiale delle aflatossine come cancerogeni professionali (art. 234 DL.vo 81/2008). Tale situazione non vincola i datori di lavoro, che se le trovano nel ciclo produttivo, a considerarle e trattarle come tali. Essi non sono tenuti, ad esempio a registrare i dipendenti nel *registro degli esposti a cancerogeni* (ex art. 243 DL.vo 81/2008)

Tuttavia la normativa attuale offre tre interessanti e preziosi elementi che possono utilizzarsi con profitto:

i. Obbligo di valutare tutti i rischi sul luogo di lavoro

Esiste l'obbligo per il datore di lavoro di valutare tutti i rischi presenti sul luogo di lavoro (DL.vo 81/2008, art. 17, c.1 lett.a), anche le aflatossine, quantomeno come *agenti chimici nocivi*, devono essere considerate e valutate nel DVR, così come devono essere individuati i provvedimenti necessari a ridurre il negativo impatto per la salute degli esposti.

ii. Obbligo di fornire informazioni adeguate al livello scientifico delle conoscenze

Sempre il DL.vo 81/2008 prevede che l'attività del medico competente (art. 39 "Svolgimento dell'attività di medico competente") è svolta secondo i principi della medicina del lavoro e del codice etico della *International Commission on Occupational Health* (ICOH) e i medici competenti (art. 6 "Informazioni su sicurezza e salute"), come tutti gli Osservatori del Mercato del Lavoro (OML), devono fornire informazioni ai lavoratori sui fattori di rischio professionali cui possono essere esposti in maniera obiettiva e comprensibile, non omettendo alcun fatto e sottolineando le misure preventive. Essi dovranno collaborare con il datore di lavoro, i lavoratori e i loro rappresentanti, garantendo un'adeguata informazione e formazione sulla salute e la sicurezza sia a livello di dirigenti che dei lavoratori. Gli OML dovranno fornire informazioni adeguate ai datori di lavoro, ai lavoratori e ai loro rappresentanti sul livello di fondamento scientifico dei fattori di rischio noti o sospetti nell'ambiente di lavoro.

Ciò vincola il medico competente ad una serie di comunicazioni e di atti conseguenti: il medico competente deve dire chiaramente (al direttore dei lavori e ai rappresentanti dei lavoratori oltre che ai lavoratori stessi), cosa sono le aflatossine, cosa provocano, facendolo opportunamente verbalizzare nelle riunioni periodiche a cui partecipa e puntando alla piena consapevolezza di tutti gli attori del sistema Aziendale Sicurezza e igiene del lavoro.

Ciò che non può entrare dalla porta (per una paradossale disattenzione normativa), può e deve entrare dalla finestra, anche grazie al codice etico ICOH, richiamato dalla norma come imprescindibile elemento di indirizzo della attività del medico competente. Una condotta che non si uniformi a tale codice è, per legge, sanzionabile

iii. Obbligo di denuncia di eventuale epatocarcinoma per soggetti esposti ad aflatossine

Questa eventualità (ai sensi dell'art. 139 del DPR 1124/65), seppure si possa presentare con evento raro o eccezionale, rafforza la considerazione che l'esposizione ad aflatossine va considerata come rischio professionale e contenuta il efficacemente possibile.

– **Misurare per decidere (polvere e aflatossine)**

Mentre si studiano i provvedimenti più adatti per limitare l'esposizione professionale e per orientare al meglio le scelte sul da farsi, è molto utile (se non indispensabile) misurare i livelli di polverosità e di aflatossine aerodisperse negli ambienti di lavoro potenzialmente interessati dal rischio e i livelli di esposizione personale dei lavoratori.

Anche se non sono previsti valori limite di esposizione professionale ad aflatossine (né a livello nazionale né internazionale), conoscerne la concentrazione in aria permette

- di avere un'idea dell'intensità del rischio nella realtà studiata, rapportando i nostri dati con quelli della scarsa letteratura internazionale;

- di graduare e individuare priorità negli interventi di prevenzione;
- di verificarne l'efficacia attraverso il ricontrollo dei parametri indagati prima della loro applicazione, documentando l'auspicato cambiamento intervenuto (livelli di esposizione e di inquinamento ambientale).

## Misure di prevenzione

La pubblicazione della Regione Emilia Romagna (11) ci aiuta:

- a riassumere quanto già, in buona parte, pubblicato dall'Istituto Superiore di Sanità e in altri molteplici documenti,
- a valorizzare quanto scaturito da esperienze recenti.

Esse si possono distribuire in cinque gruppi:

1. Misure orientate a limitare la contaminazione dei prodotti agricoli in campo o la proliferazione degli aspergilli responsabili sulle piante. Si riprende qui quanto da tempo indicato in "Cinque domande sulle aflatossine" (16) sui provvedimenti da adottare nelle varie fasi della coltivazione, del raccolto e della conservazione dei prodotti vegetali, per evitare di trovarli contaminati da aspergilli e da aflatossine.  
Possono essere adottate tecniche e strategie agronomiche, anche con particolari caratteristiche a seconda della specie. Si rinvia per approfondimento agli articoli e documenti originali richiamati in (11).
2. Misure orientate a risanare le granaglie dalla muffa e conseguentemente dall'aflatossina (essiccazione, cernita e selezione delle materie prime). Vale la pena richiamare il fatto sul progresso tecnico che oggi, offre la disponibilità di macchine vagliatrici di elevata efficienza e produttività, in grado di distinguere e separare, in modo molto selettivo, singoli chicchi attaccati dalla muffa da quelli indenni.
3. Misure orientate ad abbattere, prima della loro dispersione in aria, le polveri contaminate da aflatossine (aspirazioni, manutenzione, pulizia) o a diluire l'inquinamento già presente (ventilazione generale, ricambi d'aria).
4. Misure per prevenire l'inalazione di polvere durante operazioni di mobilitazione di granaglie con pale meccaniche o ruspe (cabine aspirate e climatizzate).
5. Adozione di DPI appropriati e adeguati anche alle talora impegnative condizioni ambientali (la semplice mascherina può non bastare o risultare inadeguata).

## Conclusioni

L'esposizione professionale ad aflatossine (e a micotossine, in generale) costituisce un problema più ampio e rilevante di quanto non venga percepito. Esso è strettamente connesso con il problema della polverosità ambientale, spesso di cospicua entità, riscontrabile nelle aziende della filiera agro-alimentare e indotta da polveri di cereali e di farine contaminate. Esso va affrontato aggredendolo da diversi, possibili punti di attacco e con approcci multidisciplinari. Solo in questo modo si potrà sperare in successi e risultati utili alla salute pubblica.

Un punto imprescindibile, tuttavia, va rimarcato: occorre che l'anomalia normativa di considerare le aflatossine cancerogene solo per i consumatori di derrate alimentari e di mangimi, disconoscendone nel contempo l'attività patogena per i lavoratori professionalmente esposti, venga al più presto sanata.

## Bibliografia

1. Liu Y, Wu F. Global burden of Aftoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environ Health Perspect* 2010;118(6):818-24.
2. Olsen JH, Dragsted L, Autrup H. Cancer risk and occupational exposure to Aftoxins in Denmark. *Br J Cancer* 1988;58:392-6.
3. Wu HC, Wang Q, Yang HI, Ahsan H, Tsai WY, Wang LY, Chen SY, Chen CJ, Santella RM. Aftoxin B1 Exposure, Hepatitis B Virus Infection and Hepatocellular Carcinoma in Taiwan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:846-53.
4. European Commission. *Reports of the Scientific Committee for Food: (Thirty-fifth series). Opinions of the Scientific Committee for Food*. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 1996.
5. International Agency for Research on Cancer. *Chemical agents and related occupations - A review of human carcinogens*. IARC Monographs; 2012; 100F:225-48.
6. Jakab GJ, Hmieleski RR, Zarba A, Hemenway DR, Groopman JD. Respiratory aftoxinosis: suppression of pulmonary and systematic host defenses in rats and mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994;125(2):198-205.
7. Sabourin PJ, Price JA, Casbohm SL, Perry MR, Tuttle RS, Rogers JV, Rowell KS, Estep JE, Sabourin CL. Evaluation of acute immunotoxicity of aerosolized AftoxinB<sub>1</sub> in female C57BL/6N mice. *J Immunotoxicol*, 2006;3(1):11-20.
8. Rastogi S, Dogra RK, Khanna SK, Das M. Skin tumorigenic potential of Aftoxin B<sub>1</sub> in mice. *Food Chem Toxicol* 2006;44(5):670-7.
9. Saad-Hussein A, Beshir S, Moubarz G, Elserougy S, Ibrahim Mohamed I.M. Effect of occupational exposure to aftoxins on some liver tumor markers in textile workers. *Am J Ind Med* 2013;56:818-24.
10. Brochard G, LeBacle C. Mycotoxines en milieu de travail. II. Exposition, risques, prevention. *Dossier Médico-Technique* 2010;121:33-62.
11. Ferri F, Fedrizzi G, et al. Problematiche connesse all'esposizione ad aflatossine nei luoghi di lavoro. In: 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 r). p. 5.
12. Ferri F, Brera C, et al. Livelli sierici e urinari di aflatossine in lavoratori professionalmente esposti e in un gruppo di controllo. In: 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 r). p. 59
13. Ferri F, Brera C, et al. Livelli di aflatossine sieriche e urinarie in soggetti che assumono cibi potenzialmente contaminati. In: 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 r). p. 57.
14. *Aflatossine: conoscenza e prevenzione*. Bologna: Regione Emilia Romagna; 2015.
15. Hayes RB, Van Nieuwenhuize JP, et al. Aftoxin exposures in the industrial setting: an epidemiologic study of mortality. *Food Chem Toxicol* 1984;22(1):39-43.
16. Brera C. *Cinque domande sulle aflatossine*. Roma: Istituto Superiore di Sanità. Disponibile all'indirizzo: [www.iss.it/binary/efsa/cont/Aflatossine\\_Brera.pdf](http://www.iss.it/binary/efsa/cont/Aflatossine_Brera.pdf); ultima consultazione 6/6/16.

# **MONITORAGGIO MICOTOSSINE: ATTIVITÀ 2011-2014 DEL POLO DI SPECIALIZZAZIONE ALIMENTI ARPA PUGLIA**

Francesca Ferrieri, Maria Carmela Amenduni, Marco Barisonzo, Giovanni Corte, Nicola Intini, Egidio Leonetti, Francesco Lo Greco, Mariangela Palma, Aldo Pinto, Francesco Rizzi, Nicola Sabino, Tiziana Santoro, Andrea Ventrella, Francesco Fiume, Massimo Blonda, Giorgio Assennato  
*Agenzia Regionale Protezione Ambiente (ARPA) Puglia, Bari, Italia*

## **Introduzione**

Il Laboratorio Chimico del Polo di Specializzazione Alimenti ARPA Puglia di Bari conduce da diversi anni, su scala regionale, il monitoraggio sulla contaminazione da 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 nell'ambito di particolari campagne di monitoraggio.

Il presente lavoro riporta i risultati relativi al monitoraggio sulle micotossine condotto nel quadriennio 2011-2014. Tale attività risulta di grande importanza dal momento che le micotossine possono essere annoverate tra i contaminanti alimentari più pericolosi per la salute umana.

Nel periodo considerato il laboratorio ha analizzato 660 campioni alimentari ricercando aflatossine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> (AFLA), Ocratossina A (OTA), deossinivalenolo (DON) e Zearalenone (ZEA). Per oltre il 30% dei campioni si sono riscontrate "positività", ossia valori quantificabili per una o più micotossine, ma solo per 5 campioni si è riscontrato il superamento dei tenori massimi previsti dalla normativa vigente (1, 2).

## **Materiali e metodi**

Dei campioni analizzati, il 66% è stato prelevato sul territorio regionale dal personale ASL e il 12% dai Nuclei Antisofisticazioni e Sanità dell'Arma dei Carabinieri (NAS); il 22% invece è stato campionato nell'ambito dei controlli sulle merci di importazione dal personale USMAF.

In Tabella 1 sono riportati i campioni raggruppati per macrocategorie e le relative analisi effettuate.

Le determinazioni analitiche di micotossine sono state complessivamente 2121: le AFLA sono state ricercate in cereali e derivati, spezie, frutta secca e a guscio; la ricerca dell'OTA è stata condotta su vino, birra, caffè, cereali e derivati; il DON e lo ZEA sono stati entrambi ricercati su cereali e derivati e su baby food.

Il laboratorio opera nell'ambito di un sistema di gestione della qualità conforme alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 "Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura"(3) e impiega i seguenti metodi di prova normati: UNI EN 14133:2009 per l'OTA nel vino e birra (4); UNI EN 14132:2009 per l'OTA nel caffè e una sua estensione per l'OTA nei cereali e prodotti derivati (5); UNI EN 16050:2011 per le aflatossine nei cereali (6); UNI EN

14123:2008 per le aflatossine nella frutta secca e a guscio e spezie (7); UNI EN 15891:2010 per il DON nei cereali e negli alimenti per l'infanzia (8); UNI EN 15850:2010 per lo zearalenone nei cereali e negli alimenti per l'infanzia (9). Le metodiche impiegate prevedono l'estrazione degli analiti con solvente, la purificazione con colonnine di immunoaffinità e l'analisi strumentale mediante cromatografia liquida ad alta prestazione a fase inversa (HPLC-FL HPLC/FL, *High Performance Liquid Chromatography with fluorescence detector*) e rivelazione spettroscopica (tramite rivelatore a serie di diodi, DAD).

**Tabella 1. Campioni analizzati e analisi di micotossine effettuate nel periodo 2011-2014.**

Alimenti	Campioni analizzati	Numero di determinazioni			
		OTA	AFLA	DON	ZEA
Vini e mosti	321	321	-	-	-
Frutta secca e a guscio	130	-	884	-	-
Cereali e derivati	127	115	492	92	92
Birre	53	53	-	-	-
Spezie e caffè	25	16	48	-	-
Baby food	4	-	-	4	4
Totale	660	505	1424	96	96

## Discussione dei risultati

La distribuzione dei campioni analizzati nel periodo 2011-2014 è stata la seguente: vini (48,6%), frutta secca e a guscio (19,7%), cereali e prodotti derivati (19,2%), birre (8,0%), spezie e caffè (3,8%), baby food (<1%).

La rilevante percentuale dei campioni di vino evidenzia l'attenzione rivolta verso questa matrice alimentare di notevole importanza socio-economica per il territorio pugliese. Va tuttavia evidenziato che, a seguito di un progressivo aumento dei campioni di grano e frutta a guscio tra le merci di importazione, nel 2014 tali categorie sono divenute quelle maggiormente monitorate.

La più elevata percentuale di determinazioni ha riguardato le AFLA (67,1%), seguite da OTA (23,8%), DON (4,5%) e ZEA (4,5%). L'OTA è stata la micotossina determinata sulla più ampia gamma di matrici.

È interessante considerare che il 33,0% dei campioni e il 49,7% delle determinazioni del quadriennio sono da attribuire al solo anno 2014: ciò mette in luce il progressivo potenziamento della linea analitica "micotossine", in ottemperanza alle sempre più specifiche richieste derivanti dai Piani di controllo ufficiale.

In Tabella 2 è possibile osservare il numero e le percentuali di campioni risultati positivi (30,6%), ovvero quelli per cui si è riscontrato un livello quantificabile di micotossina. Vengono altresì riportati i campioni "non conformi" (0,8%), ossia quelli in cui è verificato il superamento del tenore massimo previsto dalla normativa.

Si nota che le categorie di alimenti con una maggiore incidenza di positività sono rappresentate da vini e cereali e derivati in quanto la matrice baby food, con i suoi 3 campioni positivi su 4 analizzati, non costituisce una matrice numericamente rappresentativa. La frutta secca e a guscio invece, pur presentando positività "solo" nel 10,8% dei casi, è stata l'unica categoria in cui si sono riscontrati campioni non conformi.

**Tabella 2. Campioni positivi e campioni non conformi nel periodo 2011-2014.**

Alimenti	Campioni positivi	% positivi per tipologia	Campioni non conformi
Vini e mosti	127	39,6	-
Frutta secca e a guscio	14	10,8	5
Cereali e derivati	48	37,8	-
Birre	2	3,8	-
Spezie e caffè	8	32,0	-
Baby food	3	75,0	-
Totale	202	30,6	5

Si è trattato di 3 campioni di noccioli di albicocca (uno proveniente dal Tajikistan e due dall'Uzbekistan), di un campione di mandorle (provenienti dall'Afghanistan), e di un campione di pistacchi prelevato alla distribuzione ma di origine extracomunitaria (Iran). Per tali campioni si sono rilevati livelli di AFLA pari fino a 8 volte il tenore massimo consentito. È importante notare che dei campioni non conformi, 4 derivavano dal controllo sulle merci all'importazione e sono stati dunque respinti; il quinto campione, prelevato nell'ambito del Piano regionale di controllo ufficiale, ha portato all'attivazione del "Sistema di Allerta Rapido per gli Alimenti e i Mangimi" (RASFF).

Tra le micotossine ricercate, il DON rappresenta quella più frequentemente riscontrata (positività pari al 51,0% delle determinazioni), in particolare sul grano, pur non essendo state mai riscontrate non conformità. Di contro le AFLA, con il 6,5% di determinazioni positive, sono state le uniche a presentare superamenti dei tenori massimi. L'OTA è risultata positiva nel 29,7% delle sue determinazioni e circa l'85% di tali positività è stato riscontrato su campioni di vino. Lo ZEA è risultato quantificabile in un numero di casi molto ridotto rispetto alle altre micotossine (1,0%).

Relativamente alla matrice vino, largamente campionata nell'ambito del Piano regionale di controllo ufficiale, vi è stata una preponderanza dei vini rossi (51,6%), seguiti dai bianchi (31,8%) e dai rosati (16,7%). Il 39,6% dei vini analizzati è risultato positivo all'OTA mentre le percentuali di positività per tipologia di vino sono state le seguenti: 58,5% per i vini rossi, 41,5% per i rosati e 7,9% per i bianchi. Fra i campioni naturalmente contaminati, il 7,9% (tutti vini rossi) ha presentato livelli superiori a 1 µg/L, ovvero il 50% del tenore massimo (2 µg/L), ma non sono mai stati riscontrati casi di non conformità.

Un discorso a parte va fatto sulle merci di importazione, i cui campioni costituiscono una percentuale considerevole dei campioni complessivamente analizzati nel quadriennio. Tali campioni sono stati rappresentati da frutta secca e a guscio (54,7%), cereali e derivati (42,6%), birre (2,0%), caffè (<1%). Vi è stata una forte rappresentanza di campioni provenienti dal Nord America (21,6% da USA e 21,6% da Canada), seguiti da campioni provenienti da Turchia (14,9%), Messico (6,8%), Australia (6,8%), Albania (6,1%), Uzbekistan (4,1%), Tajikistan (3,4%), Macedonia (2,7%), Afghanistan (2,7%) e altre origini extracomunitarie.

L'incidenza dei casi di positività sulle merci di importazione è stata del 55,6% nel caso dei cereali e derivati e del 16,0% nel caso della frutta secca e a guscio, mentre non vi sono stati casi di positività per birre e caffè (campioni comunque numericamente non rappresentativi). Le non conformità sono state riscontrate solo nei 4 casi già descritti in precedenza e appartenenti alla categoria frutta secca e a guscio.

È interessante evidenziare i risultati relativi al monitoraggio del DON sul grano di importazione, dal momento che tale micotossina è quella che nel quadriennio ha mostrato la più larga percentuale di positività. Il grano analizzato proveniva da Canada (55,2%), Messico

(17,2%), USA (10,3%), Australia (8,6%), Russia (3,4%), Moldavia (1,7%), Turchia (1,7%), Ucraina (1,7%). Il 60,3% dei campioni di grano di importazione è risultato positivo al DON, ma non si sono mai riscontrati superamenti dei tenori massimi (1250 e 1750 µg/kg, rispettivamente, per grano tenero e grano duro non trasformati). L'incidenza delle positività è risultata fortemente influenzata dalla provenienza dei grani stessi: i campioni provenienti dal Canada sono risultati positivi nel 100% dei casi, mentre per i campioni provenienti da USA e Messico le percentuali di positività sono state rispettivamente 33,3% e 10,0%. Tra tutti i campioni risultati positivi, il 14,3% (grano duro) ha mostrato valori superiori a 1000 µg/kg; di questi, il campione di grano con il livello più alto di DON (1540 µg/kg) proveniva dagli USA, mentre i restanti erano di origine canadese con valori fino a 1370 µg/kg.

## Conclusioni

Nell'ambito del monitoraggio ufficiale sulla contaminazione da micotossine negli alimenti effettuato da ARPA Puglia nel 2011-2014, si è riscontrata una esigua percentuale di campioni non conformi rispetto ai tenori massimi. Tuttavia i campioni non conformi, tutti appartenenti alla categoria frutta a guscio, hanno presentato elevati livelli di contaminazione.

In larga percentuale tali non conformità sono state riscontrate su merci di importazione che quindi sono state respinte prima di poter entrare nel mercato europeo. I risultati riportati nel presente lavoro evidenziano dunque quanto sia importante mantenere elevato il livello di efficacia dei controlli sulle merci all'importazione al fine di assicurare un altrettanto elevato livello di tutela della salute dei consumatori.

## Bibliografia

1. Europa. Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006 e s.m. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 364/5 del 20 dicembre 2006.
2. Ministero della Sanità. Circolare del Ministero della Sanità 9 giugno 1999, n. 10. *Gazzetta Ufficiale* n. 135, 11 giugno 1999.
3. UNI CEI EN ISO/IEC 17025 "Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura".
4. UNI EN 14133:2009. *Prodotti alimentari - Determinazione di ocratossina A nel vino e nella birra - Metodo per cromatografia ad alta risoluzione (HPLC) con purificazione in colonna di immunoaffinità*. Milano: Ente Italiano di Normazione; 2009.
5. UNI EN 14132:2009. *Prodotti alimentari - Determinazione di ocratossina A in orzo e caffè tostato - Metodo per cromatografia ad alta risoluzione (HPLC) con purificazione in colonna di immunoaffinità*. Milano: Ente Italiano di Normazione; 2009.
6. UNI EN 16050:2011. *Prodotti alimentari - Determinazione di aflatossina B1 e del contenuto totale di aflatossine B1, B2, G1 e G2 nei cereali, nelle noci e nei prodotti derivati - Metodo per cromatografia liquida ad alta risoluzione*. Milano: Ente Italiano di Normazione; 2011.
7. UNI EN 14123:2008. *Prodotti alimentari - Determinazione di aflatossina B1 e della somma di aflatossina B1, B2, G1 e G2 in nocciole, nella crema di arachidi, in pistacchi, in fichi e nella paprica in polvere - Metodo per cromatografia liquida ad alta risoluzione con derivatizzazione post-colonna e purificazione in colonna di immunoaffinità*. Milano: Ente Italiano di Normazione; 2008.

8. UNI EN 15891:2010. *Prodotti alimentari - Determinazione di deossinivalenolo nei cereali, prodotti derivati e alimenti a base di cereali per lattanti e prima infanzia - Metodo HPLC con purificazione in colonna di immunoaffinità e rivelazione*. Milano: Ente Italiano di Normazione; 2010.
9. UNI EN 15850:2010. *Prodotti alimentari - Determinazione di zearalenone in alimenti per bambini a base di mais, farina di orzo, farina di mais, polenta, farina di frumento e alimenti a base di cereali destinati a lattanti e prima infanzia - Metodo per cromatografia ad alta risoluzione (HPLC) con purificazione in colonna di immunoaffinità e rivelazione a fluorescenza*. Milano: Ente Italiano di Normazione; 2010.

# PRESENZA DI MICOTOSSINE NEI FORAGGI E LORO EFFETTI SUI RUMINANTI

Antonio Gallo (a), Francesco Masoero (a), Jens C. Frisvad (b), Terenzio Bertuzzi (a), Amedeo Pietri (a), Annalisa Mulazzi (a), Silvia Rastelli (a), Kristian F. Nielsen (b)

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

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

## Introduzione

Le micotossine sono molecole di basso peso molecolare prodotte da funghi capaci di contaminare gli alimenti sia in campo, che durante il trasporto e lo stoccaggio degli alimenti destinati al consumo umano e animale (Zain, 2011; Zinedine *et al.*, 2007; Fink-Gremmels, 2008). Molte di esse sono sostanze stabili e tutte vengono prodotte dal metabolismo secondario di funghi micotossicogeni. I principali ceppi fungini in grado di produrle afferiscono ai generi *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* spp. (Scudamore & Livesey, 1998; Kabak *et al.*, 2006). Ad ogni modo, a generi come *Alternaria*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Claviceps*, *Diplodia*, *Myrothecium*, *Monascus*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Pithomyces*, *Trichoderma* e *Stachybotrys* afferiscono funghi micotossicogeni (Bryden, 2012; Storm *et al.*, 2008; Jennessen *et al.*, 2005; O'Brien *et al.*, 2007; Nielsen *et al.*, 2006). Le micotossine rappresentano un problema globale e, ad oggi, sono stati classificati più di 18.000 metaboliti secondari di funghi nel database Antibase2014, anche se un ristretto numero di esse (Cole & Cox, 1981) ha ricevuto un qualche interesse scientifico dagli anni '60 ad oggi (Tabella 1) (Gallo *et al.*, 2015a).

Le micotossine che sono state più studiate sono quelle per le quali esiste una regolamentazione/raccomandazione comunitaria (aflatossine, citrinina, tricoteceni come il deossinivalenolo o DON, patulina, ocratossina A, fumonisine e zearalenone) e alcune delle tossine prodotte da funghi endofitici (ergotamine).

## Micotossicosi e ruminanti

Con il termine micotossicosi si fa riferimento alla sindrome causata dall'ingestione, contatto o inalazione di questi metaboliti fungini negli organismi superiori (Zain, 2011; Bryden, 2012; Richard, 2007; Santos & Fink-Gremmels, 2014; Giovati *et al.*, 2014; Murugesan *et al.*, 2015; DeVries, 2002). Quando gli animali da reddito ingeriscono una o più micotossine, gli effetti sul loro stato sanitario possono essere acuti, con sintomi evidenti di intossicazione o nei casi peggiori morte degli individui. Ad ogni modo, le intossicazioni acute sono eventi rari nella realtà aziendale. Gli effetti dell'ingestione di micotossine negli animali da reddito sono per lo più cronici con segni più o meno evidenti dell'ingestione di micotossine sul comportamento alimentare degli animali, alterazioni delle *performance* produttive, dello stato sanitario e delle performance riproduttive (Fink-Gremmels, 2008a; Storm *et al.*, 2008; Jouany & Diaz, 2005). Questi effetti possono causare ingenti danni economici negli allevamenti e più in generale nell'intero comparto zootecnico.

**Tabella 1. Elenco di alcuni dei principali metaboliti secondari prodotti da funghi micotossicogeni e interesse scientifico valutato annoverando il numero di citazioni presenti nel motore di ricerca Scopus**

Metaboliti secondari <sup>1</sup>	Citazioni in Scopus	Metaboliti secondari <sup>1</sup>	Citazioni in Scopus
AAL toxin	100	Infectopyrones	3
Aflatoxins	16939	Islanditoxin	10
Aflavinine	12	Luteoskyrin	135
Agroclavine	214	Marcfortine A, B and C	38
Alternariol	396	Monacolins	242
Andrastins	30	Moniliformin	399
Aspergillilic Acid	66	Monoacetoxyscirpenol	64
Aurofusarin	55	Mycophenolic acid	241
Beauvericin	441	Neosolaniol	242
B-nitropropionic acids	4	Nivalenol	1014
Botryodiploidin	36	Novae-zelandins	1
Butenolide	1337	Ochratoxins	5162
Byssochlamic acid	31	Oosporein	45
Chlamydosporol	21	Orsellinic acid	205
Chrysogine	18	Paspalitrems	7
Citreoviridin	124	Patulin	1606
Citrinin	1994	Penicillic acid	437
Citroisocoumarin	9	Penitrem	202
Clavine alkaloids	146	Phomopsis	123
Culmorin	33	PR toxin	320
Cyclopiazonic Acid	2307	PR-amide	6
Deoxynivalenol	3720	PR-imine	5
Diacetoxyscirpenol	759	Pseurotins	56
Dicoumarol	3811	Roquefortines	213
Diketopiperazines	1	Roridins	32
Eremofortin C	10	Rubratoxin	191
Ergot toxins	7567	Rubrofusarin	75
Ergotamine	7298	Scirpentriol	69
Flestuclavine	74	Slaframine	103
Fumagillin	939	Sphingofungin	47
Fumigatins	23	Sporidesmin	207
Fumiquinazolines	56	Stachbotryotoxins	1
Fumitremorgen	11	Sterigmatocystin	1000
Fumitremorgines	357	T2 toxin	388
Fumonisin	3542	Tentoxin	208
Fusarenone-X	54	Tenuazonic acid	256
Fusaric Acid	675	Tremorgens	37
Fusarins	100	Tremorgens	46
Fusariocin	2	Trypacidin	20
Gibepyrone A	6	Verruculogen	112
Helvolic acid	89	Zearalenone	3443

<sup>1</sup> Il nome dei metaboliti secondari non è stato tradotto dall'inglese all'italiano.

I ruminanti sono considerati meno suscettibili all'azione delle micotossine rispetto ai monogastrici in quanto la microflora e la microfauna del ruminale sono attivi nella degradazione, de-attivazione e nel sequestro delle micotossine (Fink-Gremmels, 2008a; Scudamore & Livesey, 1998; Pestka, 2007; Mobashar *et al.*, 2010; Cheli *et al.*, 2013; Gallo & Masoero, 2009; Niderkorn *et al.*, 2007), così da rappresentare una difesa attiva per gli animali.

Esempi della produzione di metaboliti nell'ambiente ruminale e l'entità della riduzione dell'attività biologica delle molecole parenterali sono stati forniti da Fink-Gremmels (Fink-Gremmels, 2008b).

Ad ogni modo, le diete per ruminanti contengono cereali, proteaginose e loro sottoprodotti così come foraggi insilati (mais, sorgo, cereali autunno vernini, erba medica e altre leguminose, loietto, ecc.) e affienati.

## Micotossine nei foraggi

Ricerche condotte recentemente da diversi gruppi di ricerca europei e americani suggeriscono che la maggiore esposizione alle micotossine nei ruminanti, nelle lattifere in particolare, deriva dall'assunzione di foraggi contaminati (O'Brien *et al.*, 2007; Boysen *et al.*, 2000; Sumarah *et al.*, 2005; Driehuis *et al.*, 2008).

Ad ogni modo, questi aspetti rimangono poco studiati. Come riportato in Figura 1, la produzione scientifica che ha riguardato lo studio della presenza delle micotossine in foraggi affienati o insilati appare limitata a pochi articoli e sicuramente il problema è stato meno studiato rispetto a quanto fatto nei cereali. Inoltre, molte micotossine diverse da quelle riportate in precedenza possono contaminare i foraggi, anche se la conoscenza riguardo l'incidenza di queste tossine nei foraggi così come i livelli ai quali queste vengono determinate sono veramente scarse (Gallo *et al.*, 2015a).

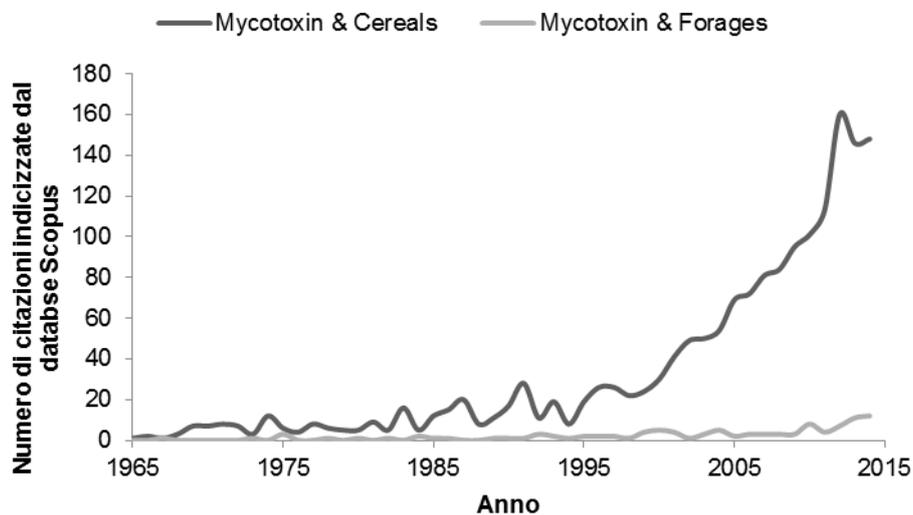


Figura 1. Numero di citazioni che vengono restituite dal motore di ricerca Scopus utilizzando le parole chiave "Mycotoxin & Cereals" o "Mycotoxin & Forages"

Dagli anni '70 ad oggi diverse pubblicazioni hanno raccolto e sintetizzato le informazioni che riguardavano l'incidenza della contaminazione da micotossine nei cereali, proteaginose e loro sottoprodotti, così come i livelli ai quali tali micotossine vengono riscontrate (Bryden, 2012; Streit *et al.*, 2012; Placinta *et al.*, 1999; Filtenborg *et al.*, 1996; Meister & Springer, 2004; Leung *et al.*, 2006; Binder *et al.*, 2007; Reddy *et al.*, 2009; Streit *et al.*, 2013; Lazzaro *et al.*, 2015; Prandini *et al.*, 2009).

Solo negli ultimi anni vi è un interesse crescente da parte della comunità scientifica riguardo la contaminazione di micotossine nei foraggi e dei fattori che ne influenzano la presenza sia in campo che durante le fasi di insilamento, fienagione o conservazione post-raccolta. Ne è riprova il fatto che questi argomenti sono stati trattati da diversi autori (Scudamore & Livesey, 1998; Storm *et al.*, 2008; Cheli *et al.*, 2013; Driehuis *et al.*, 2008; Fink-Gremmels & Diaz, 2005; Cheeke, 1995, 1998; Alonso *et al.*, 2013).

Fra i principali funghi micotossigeni che contaminano i foraggi in campo, i più diffusi afferiscono ai generi *Aspergillus*, *Fusarium* e *Alternaria* spp. (Storm *et al.*, 2008).

In particolare, gli ultimi due sono spesso classificati come funghi di campo, mentre diverse specie afferenti al genere *Aspergillus* possono contaminare gli alimenti sia in campo che durante lo stoccaggio dei foraggi. La presenza di questi funghi è legata a diversi fattori che includono le pratiche agronomiche con i quali i foraggi vengono coltivati e le condizioni climatiche nelle quali crescono (Mansfield *et al.*, 2007; Pelhate, 1977).

Ad ogni modo, vi sono altre specie come *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium roqueforti*, *P. paneum*, *F. oxysporum* e *Monascus ruber* capaci di crescere in presenza di alti livelli di acidi organici e di anidride carbonica e a basse concentrazioni di ossigeno.

Negli insilati, l'attività dei batteri lattici è efficiente nell'inibire la crescita di questi funghi. Ad ogni modo, un piccolo aumento nella presenza di ossigeno nella massa foraggera stoccata può favorire la loro crescita.

Inoltre, se la concentrazione di acido lattico e acetico diminuisce e aumenta la presenza di ossigeno, tutti i funghi micotossigeni, compresi quelli associati alla contaminazione di cereali, possono svilupparsi e produrre micotossine (Storm *et al.*, 2008; Gallo *et al.*, 2015b; Gallo *et al.*, 2016).

Esiste un'alta variabilità nella presenza di micotossine negli insilati e nella loro concentrazione e questo è principalmente legato a

- *fattori ambientali*  
(condizioni meteorologiche, agronomiche, di insilamento, gestione dei cantieri di lavoro, tipologia di foraggio stoccato, ecc.)
- *fattori di laboratorio*  
(campionamento, stoccaggio e preparazione dei campioni, tecniche analitiche, ecc.)

che possono influenzarne la determinazione nei foraggi.

Le principali micotossine riscontrate nei foraggi sono elencate in Tabella 2, dove si forniscono anche i riferimenti ai lavori che le hanno quantificate nelle diverse tipologie foraggere (Gallo *et al.*, 2015a).

Tabella 2. Elenco delle principali micotossine prodotte da funghi che contaminano i foraggi

Micotossine prodotte da:	Bibliografia
<b><i>Alternaria</i> spp.</b> AAL TA toxin, AAL TB toxin, Alternariol, Alternariol ME	Yu <i>et al.</i> , 1999; Mansfield & Kuldau, 2007; Storm <i>et al.</i> , 2014
<b><i>Aspergillus flavus</i> e <i>A. parasiticus</i></b> AFB <sub>1</sub> , β-nitropropionic acid	Richard <i>et al.</i> , 2009; Keller <i>et al.</i> , 2013; Garon <i>et al.</i> , 2006; Santos & Fink-Gremmels, 2014
<b>Vari <i>Aspergillus</i> spp. e <i>Penicillium</i> spp.</b> Cyclopiazonic acid	Santos & Fink-Gremmels, 2014; Yu <i>et al.</i> , 1999; Mansfield <i>et al.</i> , 2008
<b><i>Aspergillus fumigatus</i></b> Gliotoxin	Pereyra <i>et al.</i> , 2008; Richard <i>et al.</i> , 2009; Santos & Fink-Gremmels, 2014; Gallo <i>et al.</i> , 2016
<b><i>Fusarium</i> spp.</b> Trichothecenes type A: 3-acetyl DON, 5-acetyl DON 15-acetyl DON, DON, Fusarenon X, Nivalenol	Santos & Fink-Gremmels, 2014; Storm <i>et al.</i> , 2014; Driehuis <i>et al.</i> , 2008; Keller <i>et al.</i> , 2013; Gallo <i>et al.</i> , 2016; Yu <i>et al.</i> , 1999; Garon <i>et al.</i> , 2006; Schollenberger <i>et al.</i> , 2006; Storm <i>et al.</i> , 2010; Eckard <i>et al.</i> , 2011; Oldenburg & Eijner, 2005; Mansfield <i>et al.</i> , 2005
Trichothecenes type B: 15monoacetoxyscirpenol, T2 e HT2 toxins	Schollenberger <i>et al.</i> , 2006; Storm <i>et al.</i> , 2010; Eckard <i>et al.</i> , 2011
Fumonisin	Santos & Fink-Gremmels, 2014; Keller <i>et al.</i> , 2013; Yu <i>et al.</i> , 1999; Mansfield <i>et al.</i> , 2007; Cavallarin <i>et al.</i> , 2004; Driehuis <i>et al.</i> , 2008; Kim <i>et al.</i> , 2004
ZEA	Santos & Fink-Gremmels, 2014; Storm <i>et al.</i> , 2014; Driehuis <i>et al.</i> , 2008; Yu <i>et al.</i> , 1999; Cavallarin <i>et al.</i> , 2004; Garon <i>et al.</i> , 2006; Schollenberger <i>et al.</i> , 2006; Eckard <i>et al.</i> , 2011; Borreani <i>et al.</i> , 2005; Buckley <i>et al.</i> , 2007
Beauvericin e Enniatins	McElhinney <i>et al.</i> , 2015; Storm <i>et al.</i> , 2014
<b><i>Penicillium</i> spp.</b> PR toxin, Andrastin A, Citreoisocoumarin, Marcfortine A, Agroclavine, Festuclavine, Mycophenolic Acid, Roquefortine A, Roquefortine B, Roquefortine C, Roquefortine D	O'Brien <i>et al.</i> , 2006; Santos & Fink-Gremmels, 2014; Storm <i>et al.</i> , 2014; Driehuis <i>et al.</i> , 2008; Gallo <i>et al.</i> , 2016; Yu <i>et al.</i> , 1999; Mansfield <i>et al.</i> , 2008; McElhinney <i>et al.</i> , 2015; Schneweis <i>et al.</i> , 2000; Auerbach <i>et al.</i> , 1998; Tüller <i>et al.</i> , 1998
<b><i>Monascus ruber</i></b> Monacolins, Citrinin	Richard <i>et al.</i> , 2009; Garon <i>et al.</i> , 2006; Schneweis <i>et al.</i> , 2000

AAL TA toxin, *Alternaria alternata* toxins type A; AAL TB toxin, *Alternaria alternata* toxins type A; aflatoxin B<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>; Alternariol ME, alternariol monomethyl ether; deoxynivalenol, DON; zearalenone, ZEA.

## Conclusioni

I foraggi sono spesso contaminati da diverse micotossine e altri esometaboliti prodotti da funghi che possono essere prodotti prima della raccolta o durante le fasi di fienagione o insilamento. Anche se vi è un crescente interesse scientifico riguardo la contaminazioni di queste micotossine nei foraggi, i dati di incidenza e di contaminazione media sono ancora scarsi per poter valutare al meglio il rischio per i ruminanti, lattifere in particolare.

Di conseguenza, i foraggi dovrebbero essere analizzati non solo per le caratteristiche chimiche, biologiche o per la qualità fermentativa, ma anche per la presenza di micotossine. Solo in questo modo si possono mettere in atto pratiche nutrizionali atte a ridurre il rischio di ingestione di queste micotossine negli animali. Lo scopo di questa comunicazione è stato quello di introdurre e presentare brevemente le informazioni riguardo la contaminazione da micotossine nei foraggi. Si rimanda ad una recente pubblicazione prodotta da questo gruppo di ricerca (Gallo *et al.*, 2015a) per maggiori dettagli riguardanti l'effetto che le micotossine che possono contaminare i foraggi hanno sugli animali da reddito così come le pratiche da seguire in campo o durante lo stoccaggio dei foraggi per ridurre la contaminazione.

## Bibliografia

- Alonso VA, Pereyra CM, Keller LAM, Dalcerro AM, Rosa CAR, Chiacchiera SM, Cavaglieri LR. Fungi and mycotoxins in silage: An overview. *J Appl Microbiol* 2013;115:637-43.
- Auerbach H, Maas RFM, Op Den Camp HJM, Pol A, Fink Gremmels J. Biodegradation of aflatoxin B<sub>1</sub> by bovine rumen microorganisms in vitro and its effects on rumen fermentation. In: *Mycotox 98. Mycotoxins in Food Chain: processing and toxicological aspects. Mycotox 98. Les Mycotoxines dans la Chaîne Alimentaire: aspects toxicologiques et technologiques*, Toulouse (France), 2-4 Jul 1998.
- Binder EM, Tan LM, Chin LJ, Handl J, Richard J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Anim Feed Sci Technol* 2007;137:265-82.
- Borreani G, Tabacco E, Antoniazzi S, Cavallarin L. Zearalenone contamination in farm maize silage. *Ital J Anim Sci* 2005;4:162-5.
- Boysen ME, Jacobsson KG, Schnurer J. Molecular identification of species from the *Penicillium roqueforti* group associated with spoiled animal feed. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:1523-6.
- Bryden WL. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Anim Feed Sci Technol* 2012;173:134-58.
- Buckley T, Creighton A, Fogarty U. Analysis of Canadian and Irish forage, oats and commercially available equine concentrate feed for pathogenic fungi and mycotoxins. *Ir Vet J* 2007;60:231-6.
- Cavallarin L, Borreani G, Tabacco E, Lüscher A, Jeangros B, Kessler W, Huguenin O, Lobsiger M, Millar N, Suter D. Mycotoxin occurrence in farm maize silages in northern Italy. In: *Proceedings of the 20th General Meeting of the European Grassland Federation*, Luzern, Switzerland, 21-24 June 2004.
- Cheeke PR. Endogenous toxins and mycotoxins in forage grasses and their effects on livestock. *J Anim Sci* 1995;73:909-18.
- Cheeke PR. *Natural toxicants in feeds, forages, and poisonous plants*. 2nd ed. Prairie Village, KS: Interstate Publishers, Inc., 1998.
- Cheli F, Campagnoli A, Dell'Orto V. Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis. *Anim Feed Sci Technol* 2013;183:1-16.

- Cole RJ, Cox RH. *Handbook of toxic fungal metabolites*. London, New York: Academic Press; 1981.
- Driehuis F, Spanjer MC, Scholten JM, te Giffel MC. Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes. *J Dairy Sci* 2008;91:4261-671.
- Eckard S, Wettstein FE, Forrer HR, Vogelgsang S. Incidence of Fusarium species and mycotoxins in silage maize. *Toxins* (Basel). 2011;3:949-67.
- Filtenborg O, Frisvad JC, Thrane U. Moulds in food spoilage. *Int J Food Microbiol* 1996; 33:85-102.
- Fink-Gremmels J, Diaz DE. Mycotoxins in forages. In: Diaz DE (Ed.). *The mycotoxin blue book*. Nottingham: University Press; 2005. p. 249-68.
- Fink-Gremmels J. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *Vet J* 2008;176:84-92.
- Fink-Gremmels, J. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2008;25:172-80.
- Gallo A, Giuberti G, Frisvad J, Bertuzzi T, Nielsen K. Review on mycotoxin issues in ruminants: occurrence in forages, effects of mycotoxin ingestion on health status and animal performance and practical strategies to counteract their negative effects. *Toxins* 2015a;7(8):3057-111.
- Gallo A, Giuberti G, Bruschi S, Fortunati P, Masoero F. Use of principal factor analysis to generate a corn silage fermentative quality index to rank well- or poorly-preserved forages. *J Sci Food Agric* 2015b;96(5):1686-96.
- Gallo A, Bertuzzi T, Giuberti G, Moschini M, Bruschi S, Cerioli C, Masoero F. New assessment based on the use of principal factor analysis to investigate corn silage quality from nutritional traits, fermentation end products and mycotoxins. *J Sci Food Agric* 2016;96(2):437-48.
- Gallo A, Masoero F. In vitro models to evaluate the capacity of different sequestering agents to adsorb aflatoxins. *Ital J Anim Sci* 2009;9:109-16.
- Garon D, Richard E, Sage L, Bouchart V, Pottier D, Lebaillly P. Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: Experimental study. *J Agric Food Chem* 2006;54:3479-84.
- Giovati L, Gallo A, Masoero F, Cerioli C, Ciociola T, Conti S, Magliani W, Polonelli L. Vaccination of heifers with anaflatoxin improves the reduction of aflatoxin B1 carry over in milk of lactating dairy cows. *PLoS One* 2014;9:e94440.
- DeVries JW, Trucksess MW, Jackson LS (Ed.). *Mycotoxins and food safety*. New York: Kluwer Academics; 2002. (Advances in Experimental Medicine and Biology 504).
- Jennessen J, Nielsen KF, Houbraken J, Lyhne EK, Schnorer J, Frisvad JC, Samson RA. Secondary metabolite and mycotoxin production by the Rhizopus microsporus group. *J Agric Food Chem* 2005;53:1833-40.
- Jouany JP, Diaz DE. Effects of mycotoxins in ruminants. In: Diaz DE (Ed.). *The mycotoxin blue book*. Nottingham: University Press; 2005. p. 295-321.
- Kabak B, Dobson ADW, Var I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2006;46:593-619.
- Keller LAM, González Pereyra ML, Keller KM, Alonso VA, Oliveira AA, Almeida TX, Barbosa TS, Nunes LMT, Cavaglieri LR, Rosa CAR. Fungal and mycotoxins contamination in corn silage: Monitoring risk before and after fermentation. *J Stored Prod Res* 2013;52:42-7.
- Kim EK, Maragos CM, Kendra DF. Liquid chromatographic determination of fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, and B<sub>3</sub> in corn silage. *J Agric Food Chem* 2004;52:196-200.
- Lazzaro I, Moretti A, Giorni P, Brera C, Battilani P. Organic vs conventional farming: Differences in infection by mycotoxin-producing fungi on maize and wheat in Northern and Central Italy. *Crop Prot* 2015;72:22-30.

- Leung MCK., Diaz-Llano G, Smith TK. Mycotoxins in pet food: a review on worldwide prevalence and preventative strategies. *J Agric Food Chem* 2006;54:9623-35.
- Mansfield MA, Archibald DD, Jones AD, Kuldau GA. Relationship of sphinganine analog mycotoxin contamination in maize silage to seasonal weather conditions and to agronomic and ensiling practices. *Phytopathology* 2007;97:504-11.
- Mansfield MA, De Wolf ED, Kuldau GA. Relationships between weather conditions, agronomic practices, and fermentation characteristics with deoxynivalenol content in fresh and ensiled maize. *Plant Dis* 2005;89:1151-7.
- Mansfield MA, Jones AD, Kuldau GA. Contamination of fresh and ensiled maize by multiple penicillium mycotoxins. *Phytopathology* 2008;98:330-6.
- Mansfield MA, Kuldau GA. Microbiological and molecular determination of mycobiota in fresh and ensiled maize silage. *Mycologia* 2007;99:269-78.
- McElhinney C, Danaher M, Elliott CT, O'Kiely P. Mycotoxins in farm silages - a 2-year Irish national survey. *Grass Forage Sci* 2015;71:339-52.
- Meister U, Springer M. Mycotoxins in cereals and cereal products: occurrence and changes during processing. *J Appl Bot Food Qual* 2004;78:168-73.
- Mobashar M, Hummel J, Blank R, Südekum KH. Ochratoxin A in ruminants—a review on its degradation by gut microbes and effects on animals. *Toxins* (Basel) 2010;2:809-39.
- Murugesan GR, Ledoux DR, Naehrer K, Berthiller F, Applegate TJ, Grenier B, Phillips TD, Schatzmayr G. Prevalence and effects of mycotoxins on poultry health and performance, and recent development in mycotoxin counteracting strategies. *Poult Sci* 2015;94(6):1298-315.
- Niderkorn V, Morgavi DP, Pujos E, Tissandier A, Boudra H. Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an in vitro simulated corn silage model. *Food Addit Contam* 2007;24:406-15.
- Nielsen KF, Sumarah MW, Frisvad JC, Miller JD. Production of metabolites from the *Penicillium roqueforti* complex. *J Agric Food Chem* 2006;54:3756-63.
- O'Brien M, Nielsen KF, O'Kiely P, Forristal PD, Fuller HT, Frisvad JC. Mycotoxins and other secondary metabolites produced in vitro by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland. *J Agric Food Chem* 2006; 54:9268-76.
- O'Brien M, O'Kiely P, Forristal PD, Fuller HT. Visible fungal growth on baled grass silage during the winter feeding season in Ireland and silage characteristics associated with the occurrence of fungi. *Anim Feed Sci Technol* 2007;139:234-56.
- Oldenburg E, Eiiner F. Fusarium mycotoxins in forage maize - Detection and evaluation. *Mycotoxin Res* 2005;21:105-7.
- Pelhate J. Maize silage: incidence of moulds during conservation. *Folia Vet Lat* 1997;7:1-16.
- Pereyra CM, Alonso VA, Rosa CAR, Chiacchiera SM, Dalcero AM, Cavaglieri LR. Gliotoxin natural incidence and toxigenicity of *Aspergillus fumigatus* isolated from corn silage and ready dairy cattle feed. *World Mycotoxin J* 2008;1:457-62.
- Pestka JJ. Deoxynivalenol: toxicity, mechanisms and animal health risks. *Anim Feed Sci Technol* 2007;137:283-98.
- Placinta CM, D'Mello JPF, MacDonald AMC. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins. *Anim Feed Sci Technol* 1999;78:21-37.
- Prandini A, Sigolo S, Filippi L, Battilani P, Piva G. Review of predictive models for Fusarium head blight and related mycotoxin contamination in wheat. *Food Chem Toxicol* 2009;47:927-31.
- Reddy KRN, Abbas HK, Abel CA, Shier WT, Oliveira CAF, Raghavender CR. Mycotoxin contamination of commercially important agricultural commodities. *Toxin Rev* 2009;28:154-68.

- Richard E, Heutte N, Bouchart V, Garon D. Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. *Anim Feed Sci Technol* 2009; 148:309-20.
- Richard JL. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-An overview. *Int J Food Microbiol* 2007; 119:3-10.
- Santos RR, Fink-Gremmels J. Mycotoxin syndrome in dairy cattle: characterisation and intervention results. *World Mycotoxin J* 2014;7:357-66.
- Schneweis I, Meyer K, Hormansdorfer S, Bauer J. Mycophenolic acid in silage. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:3639-41.
- Schollenberger M, Müller HM, Rühle M, Suchy S, Plank S, Drochner W. Natural occurrence of 16 Fusarium toxins in grains and feedstuffs of plant origin from Germany. *Mycopathologia* 2006;161:43-52.
- Scudamore KA, Livesey CT. Occurrence and Significance of Mycotoxins in Forage Crops and Silage: a Review. *J Sci Food Agric* 1998;77:1-17.
- Storm IMLD, Kristensen NB, Raun BML, Smedsgaard J, Thrane U. Dynamics in the microbiology of maize silage during whole-season storage. *J Appl Microbiol* 2010;109:1017-26.
- Storm IMLD, Rasmussen RR, Rasmussen PH. Occurrence of pre- and post-harvest mycotoxins and other secondary metabolites in Danish maize silage. *Toxins* 2014;6:2256-69.
- Storm IMLD, Sørensen JL, Rasmussen RR, Nielsen KF, Thrane U. Mycotoxins in silage. *Stewart Postharvest Rev* 2008;4:1-12.
- Streit E, Naehrer K, Rodrigues I, Schatzmayr G. Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: Long-term analysis with special focus on Europe and Asia. *J Sci Food Agric* 2013;93:2892-9.
- Streit E, Schatzmayr G, Tassis P, Tzika E, Marin D, Taranu I, Tabuc C, Nicolau A, Aprodu I, Puel O, Oswald IP. Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed focus on Europe. *Toxins (Basel)* 2012;4:788-809.
- Sumarah MW, Miller JD, Blackwell BA. Isolation and metabolite production by *Penicillium roqueforti*, *P. paneum* and *P. crustosum* isolated in Canada. *Mycopathologia* 2005;159:571-7.
- Tüller G, Armbruster G, Wiedenmann S, Hänichen T, Schams D, Bauer J. Occurrence of roquefortine in silage - toxicological relevance to sheep. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 1998;80:246-9.
- Yu W, Yu FY, Undersander DJ, Chu FS. Immunoassays of selected mycotoxins in hay, silage and mixed feed. *Food Agric Immunol* 1999;11:307-19.
- Zain ME. Impact of mycotoxins on humans and animals. *J Saudi Chem Soc* 2011;15:129-44.
- Zinedine A, Soriano JM, Moltó JC, Mañes J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food Chem Toxicol* 2007;45:1-18.

# CITRININA IN INTEGRATORI A BASE DI RISO ROSSO FERMENTATO. DETERMINAZIONE MEDIANTE HPLC-FL E VALIDAZIONE *IN-HOUSE*

Emanuela Gregori, Iliaria Passaretti, Francesca Debegnach, Marianna Rizzo, Barbara De Santis, Gabriele Moracci, Carlo Brera  
*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Introduzione

L'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (*European Food Safety Authority*, EFSA), ha recentemente posto la sua attenzione verso gli integratori a base di riso rosso fermentato. Il riso rosso fermentato è il riso comune, denominato *Oryza sativa*, che viene fermentato dal lievito *Monascus purpureus*, conferendogli così il caratteristico colore rosso. Esso rappresenta un componente tradizionale della fitoterapia cinese, ma è molto conosciuto anche in occidente per le preziose proprietà ipolipidemizzanti dovute alla presenza della monacolina K, sostanza prodotta dal processo di fermentazione. Il gruppo di esperti scientifici dell'EFSA sui prodotti dietetici, l'alimentazione e le allergie – gruppo NDA (*Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies*) – ritiene che, secondo evidenze scientifiche, la monacolina K da lievito di riso rosso contribuisce al mantenimento di livelli ematici normali di colesterolo. Al fine di ottenere l'effetto dichiarato, la monacolina K presente nei preparati a base di lievito di riso rosso fermentato deve essere assunta nella dose giornaliera di 10 mg (1). Accanto a questa evidenza scientifica si è però presentato il problema di verificare la presenza di citrinina (CIT), una micotossina altamente nefrotossica co-prodotta dal *Monascus purpureus*, nei prodotti a base di riso rosso fermentato. Proprio per controllare la presenza di tale contaminante negli integratori commerciali a base di riso rosso fermentato, l'Unione Europea ha fissato con il Regolamento (UE) 212/2014 (2) un tenore massimo di citrinina pari a 2000 µg/kg, corrispondente a circa il 50% del livello di nefrotossicità per l'adulto. Al fine di controllare la presenza di citrinina nell'integratore, si stanno sviluppando a livello sia nazionale che internazionale, metodi di analisi per la determinazione di questa micotossina nelle preparazioni commerciali di riso rosso fermentato da *Monascus purpureus* (3).

In letteratura sono presenti numerosi metodi applicati alla determinazione della citrinina in campioni di riso rosso fermentato che differiscono principalmente nella fase estrattiva o di purificazione, basati sulla cromatografia liquida accoppiata con diversi rivelatori (4-7).

In questo lavoro è stato ottimizzato e validato in house un metodo analitico semplice, economico e accurato per la determinazione quantitativa della citrinina nel riso rosso fermentato, basato sulla cromatografia liquida a fase inversa con rivelazione fluorimetrica.

## Materiali e metodi

### Materiali e apparecchiature

Acetonitrile, etanolo e metanolo per HPLC sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich (St. Louis, Stati Uniti); l'acqua è stata purificata con un sistema Milli-Q Academic della Millipore; il

Tween 20 è stato fornito dalla Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, Stati Uniti); l'acido fosforico 85% è stato acquistato dalla Carlo Erba Reagenti (Milano, Italia); l'acido trifluoroacetico è stato fornito dalla Merck (Germania). I materiali di riferimento certificati in soluzione sono stati forniti dalla Orsell (Limidi di Soliera, Modena, Italia).

Per l'analisi cromatografica è stato utilizzato un sistema HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) Gilson Inc. (Middleton, Stati Uniti) equipaggiato con spettrofluorimetro FP-1520 Jasco (Easton, Stati Uniti) e software di gestione Unipoint-Gilson.

## Estrazione e analisi cromatografica

Il metodo messo a punto prevede un'estrazione con metanolo 100% seguita da analisi cromatografica in HPLC con rivelazione spettrofluorimetrica. La procedura analitica può essere così descritta: ad 1,00 g di campione in un tubo Falcon (50 mL) e si aggiungono 25 mL di metanolo, il campione viene sottoposto ad agitazione mediante agitatore a braccia per 45 minuti, seguita da ultrasonicazione per 30 minuti a 30°C. In seguito, prima dell'analisi cromatografica, il campione viene centrifugato a 6000 rpm per 10 minuti e filtrato su filtri Minisart 0,20 µm (Sartorius, Göttingen, Germania) aventi una membrana in acetato di cellulosa. La scelta della soluzione utilizzata nella fase di estrazione è stata condotta confrontando con esattezza i diversi metodi presenti in letteratura (4-7), allo scopo un campione non contaminato di riso rosso fermentato è stato addizionato con citrinina e sottoposto alla preparazione presentata. In Tabella 1 sono descritti i risultati degli esperimenti condotti.

**Tabella 1. Risultati, in termini del fattore di recupero, degli esperimenti per la scelta della miscela estraente utilizzata.**

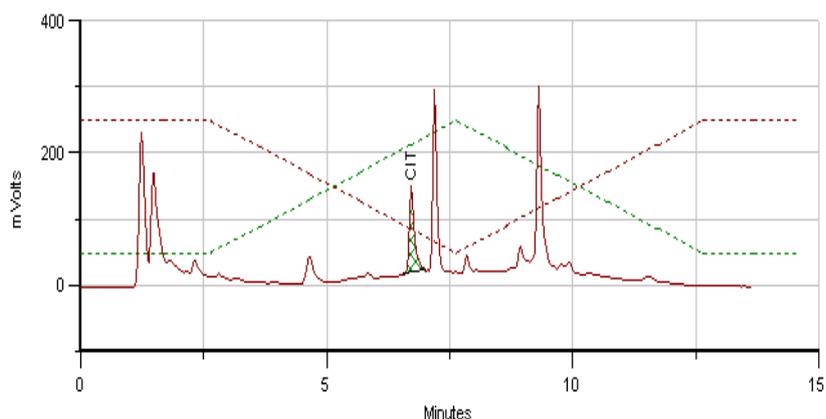
Metodo	Solvente estrazione v/v	Recupero% a 2000 µg/kg
EURL- Mycotoxins	Metanolo:acqua / 70:30	50%
Rui Liu & Baojun Xu, 2013	Etanolo:acqua / 50:50	30%
Weiping Wang <i>et al.</i> , 2014	Etanolo:acqua / 70:30	60%
Xiaofeng Ji <i>et al.</i> , 2015	Metanolo 100	105%

L'analisi quantitativa è stata eseguita tramite HPLC-fluorimetro, utilizzando miscele di acetonitrile e acqua allo 0,05% di acido trifluoroacetico a pH 2-2,5 come fasi mobili secondo un gradiente lineare. Le condizioni cromatografiche possono essere così riassunte: flusso di 1 mL/min, una rilevazione fluorimetrica a  $\lambda_{ecc}=331$  nm e  $\lambda_{em}=500$  nm; colonna cromatografica Phenomenex, Kinetex EVO C18, *Core-Shell technology* (150 x 4,6 mm ID, 5 µm).

L'acidificazione dell'eluente è obbligatoria in cromatografia per la natura acida della citrinina, perché l'acidificazione riduce le interazioni tra gli analiti e i gruppi silanolicci liberi della fase stazionaria (4). La forza dell'acido può essere responsabile della forma del picco, con una attesa maggiore tendenza per il fenomeno del *tailing* secondo l'ordine: acido trifluoroacetico < acido ossalico < acido maleico < acido fosforico < acido citrico (8). Di conseguenza, nella fase mobile è stato deciso di utilizzare l'acido trifluoroacetico (TFA). Nello specifico, la fase mobile A preparata è stata formata da acqua allo 0,05% di TFA a pH 2-2,5.

La quantificazione della citrinina è stata condotta costruendo una curva di taratura su 5 diversi livelli di concentrazione dell'analita stesso, interpolando le aree dei picchi, fornite dal sistema di integrazione strumentale, con la quantità di analita iniettato. Per ottenere le soluzioni di taratura, il materiale di riferimento certificato è stato diluito con gli opportuni volumi della miscela metanolo:acqua acidificata allo 0,1% di acido fosforico in rapporto 70:30 (v/v).

In Figura 1, a titolo di esempio è riportato il cromatogramma di un campione di integratore a base di riso rosso fermentato fortificato con 1000 µg/kg di CIT .



**Figura 1. Cromatogramma di un campione di integratore a base di riso rosso fermentato fortificato con 1000 µg/kg di CIT**

## Validazione del metodo

Il metodo ottimizzato è stato in seguito sottoposto al processo di validazione secondo l'approccio *in-house*. Sulla base delle linee guida EURACHEM (9) e IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry (10), sono state valutate le prestazioni del metodo in termini di selettività, precisione ed esattezza. Sono stati determinati, inoltre, il campo di applicazione, il limite di rivelabilità (LOD, *Limit of Detection*), il limite di quantificazione (LOQ, *Limit of Quantification*) e l'incertezza di misura secondo l'approccio EURACHEM (11).

## Risultati e discussione

L'esattezza è stata valutata attraverso la misura del fattore di recupero. Non essendo disponibili in commercio materiali di riferimento certificati (CRM) né materiali di riferimento in matrice per il riso rosso fermentato, si è fatto ricorso alla preparazione di campioni artificialmente fortificati al valore massimo ammissibile per la citrinina previsto dal Regolamento (UE) N. 212/2014, ossia 2000 µg/kg. Nella Tabella 2 sono riportati i dati relativi alla validazione in house del metodo per la determinazione della citrinina nel riso rosso fermentato. Sono stati considerati 3 livelli di contaminazione: il 1° livello coincide con il LOQ (150 µg/kg), il 2° livello è pari a 1000 µg/kg e il 3° livello coincide con il limite di legge per la citrinina nel riso rosso fermentato (2000 µg/kg). Per il primo e il secondo livello sono state calcolate la ripetibilità e l'incertezza di misura effettuando 6 repliche di due campioni naturalmente contaminati. Mentre per il terzo livello sono state calcolate la ripetibilità, l'incertezza e l'esattezza facendo 6 repliche di un campione artificialmente contaminato (spike) a 2000 µg/kg.

Il metodo in esame è stato applicato in un intervallo di concentrazioni compreso tra 150 µg/kg e 3570 µg/kg.

**Tabella 2. Dati di validazione del metodo per la determinazione della citrinina nel riso rosso fermentato**

Livello	Parametro	Valore
<b>1° livello</b>		
Ripetibilità (n=6)	Media ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	148
	Scarto tipo di ripetibilità, $S_r$ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	19
	RSD <sub>r</sub> (%)	13
Incertezza	Incertezza estesa, U ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	64
<b>2° livello</b>		
Ripetibilità (n=6)	Media ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	1019
	Scarto tipo di ripetibilità, $S_r$ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	153
	RSD <sub>r</sub> (%)	15
Incertezza	Incertezza estesa, U ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	331
<b>3° livello</b>		
Ripetibilità (n=6)	Media ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	2086
	Scarto tipo di ripetibilità, $S_r$ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	310
	RSD <sub>r</sub> (%)	15
Esattezza (2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Recupero (%)	104
Incertezza	Incertezza estesa, U ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	634
LOD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		90
LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		150
Campo di applicazione ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		150-3570

## Conclusioni

Il metodo messo a punto si è dimostrato di facile applicabilità e con una buona selettività. I risultati della validazione hanno soddisfatto pienamente i requisiti indicati nel Regolamento (CE) 401/2006 (testo consolidato) (12), infatti, la precisione espressa come coefficiente di variazione (RSD%) è rientrata nel limite del 22% e l'esattezza nel range 70%-120%. Il metodo presentato è stato utilizzato per partecipare nell'anno 2015 al *Proficiency Test* per la determinazione della citrinina nel riso rosso fermentato organizzato dal Laboratorio Comunitario di Riferimento per le micotossine e ha ottenuto un risultato più che soddisfacente confermando le prestazioni della validazione.

## Bibliografia

1. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to monacolin K from red yeast rice and maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 1648, 1700) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 2011;9(7):2304-20.
2. Europa. Regolamento (UE) n. 212/2014 della Commissione del 6 marzo 2014 che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 per quanto riguarda i tenori massimi del contaminante citrinina negli integratori alimentari a base di riso fermentato con lievito rosso *Monascus purpureus*. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 67/3 del 7 marzo 2014.
3. European Food safety Authority. Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. *EFSA Journal* 2012;10(3):2605-93.

4. Xu Bj, Jia Xq, Gu Lj, Sung Ck. Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. *Food Control* 2006;17:271-85.
5. Wang W, Chen Q, Zhang X, Zhang H, Huang Q, Li D, Yao J. Comparison of extraction methods for analysis of citrinin in red fermented rice. *Food Chemistry* 2014;157:408-12.
6. Liu R, Xu Bj. Optimization of extraction conditions of citrinin from red yeast rice by orthogonal design and quantification of citrinin by High-Performance Liquid Chromatography. *Food Anal Methods* 2013;6:677-82.
7. Ji X, Xu J, Wang X, Qi P, Wei W, Chen X, Li R, Zhou Y. Citrinin determination in red fermented rice products by optimized extraction method coupled to Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *Journal of Food Science* 2015;80(6):T1438-T1443.
8. Reinhard H, Zimmerli B. Reversed-phase liquid chromatographic behavior of the mycotoxins citrinin and ochratoxin A. *Journal of Chromatography A* 1999;862:147-59.
9. Magnusson B, Örnemark U (Ed.). *Eurachem guide: the fitness for purpose of analytical methods – a laboratory guide to method validation and related topics*. 2<sup>nd</sup> ed. Eurachem: 2014.
10. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. Harmonizes guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry* 2002;74(5):835-55.
11. Ellison SLR, Williams A (Eds). *Eurachem/CITAC guide: quantifying uncertainty in analytical measurement*. 3<sup>rd</sup> ed. Eurachem: 2012.
12. Europa. Regolamento (CE) n. 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 70/12, del 9 marzo 2006.

# **PROTOCOLLO D'INTESA DELL'EMILIA-ROMAGNA PER LA RIDUZIONE DEL RISCHIO DA MICOTOSSINE NELLA FASE DI RACCOLTA E STOCCAGGIO DEL MAIS**

Daniele Govi

*Servizio Sviluppo Produzioni Vegetali, Regione Emilia-Romagna, Direzione Agricoltura, Bologna, Italia*

## **Introduzione**

Anche in Emilia-Romagna si verificano spesso condizioni ambientali favorevoli alla contaminazione da micotossine nei cereali, contaminazione che in certe annate può raggiungere livelli fortemente critici. Ne consegue che il controllo e la riduzione del rischio micotossine rappresentano i presupposti essenziali per fare sì che la cerealicoltura regionale sia competitiva, in quanto caratterizzata da una elevata qualità, anche sanitaria, delle produzioni. È in tale contesto che si inseriscono sia la realizzazione delle Linee guida del MIPAAF per il mais e per i cereali autunno-vernini – redatte per favorire l'adozione di corrette pratiche volte alla riduzione del rischio contaminazione da micotossine in campo e durante lo stoccaggio – sia l'iniziativa di elaborare e diffondere un apposito documento che favorisse l'impegno da parte di tutti gli operatori della filiera alla esecuzione delle pratiche stabilite dalle Linee guida per il mais e alla adozione di un corretto piano di autocontrollo.

È infatti ampiamente riconosciuto che la prevenzione, unita all'autocontrollo, risulta essere la migliore strategia di contrasto alla contaminazione da micotossine, purché sia applicata su tutta la filiera a partire dal campo, fino al prodotto finito (es. mangime).

L'impegno, anche formale, da parte di tutti gli operatori della filiera è dunque particolarmente importante.

## **Materiali e metodi**

### **Elaborazione e principali contenuti del “Protocollo d'intesa”**

La regione Emilia-Romagna dunque, oltre ad avere redatto le linee guida citate, si è attivata per quanto attiene specificatamente al mais, effettuando l'elaborazione, promozione e diffusione di un apposito documento: il “Protocollo d'intesa per la riduzione del rischio da micotossine nella fase di raccolta e stoccaggio del mais” che, periodicamente aggiornato, viene sottoscritto ogni anno dalle principali strutture regionali di stoccaggio (cooperative e private), dalle rappresentanze dei produttori agricoli (organizzazioni professionali agricole e organizzazioni dei produttori) e dai rappresentanti dei contoterzisti/ trebbiatori.

Il “protocollo d'intesa”, che viene sinteticamente descritto, oltre ad impegnare all'adozione di quanto previsto dalle linee guida, viene utilizzato per la predisposizione dei piani di autocontrollo aziendali dalla fase di raccolta della granella fino alla vendita post stoccaggio. Le aziende devono infatti adottare una efficace procedura di autocontrollo (elaborato secondo i principi del sistema HACCP, *Hazard Analysis and Critical Control Points*), descrivendo il proprio processo produttivo attraverso un diagramma di flusso che identifichi tutte le fasi e i

potenziali rischi di contaminazione del prodotto, nonché le azioni preventive utilizzabili per un loro controllo.

Il documento in questione è stato elaborato da un apposito Gruppo di Lavoro, costituito dalla Regione, del quale fanno parte esperti qualificati appartenenti al mondo accademico, a laboratori di analisi riconosciuti, a strutture di stoccaggio, a organizzazioni di produttori agricoli, a servizi e strutture della Regione che seguono la materia.

Il documento individua innanzitutto le diverse procedure da seguire in fase di raccolta e stoccaggio del prodotto, che dovranno garantire la conformità alle prescrizioni del protocollo. Si tratta di procedure per la pulizia e la disinfestazione dei locali, per il controllo, pulizia e manutenzione degli impianti e delle attrezzature, per la definizione dei criteri di conformità del prodotto accettato, per la definizione dei tempi massimi di sosta pre-essiccazione, per il monitoraggio del prodotto in stoccaggio e per le azioni preventive e azioni correttive. Il documento riporta poi indicazioni e prescrizioni per: la stesura del diagramma del processo produttivo, l'identificazione dei pericoli e delle misure preventive, la determinazione dei punti di controllo (*Control Point*, CP) e dei punti critici di controllo (*Critical Control Point*, CCP), la raccolta del prodotto, l'accettazione, l'essiccazione, lo stoccaggio e conservazione, la gestione dei lotti non conformi ed, infine, la consegna del prodotto. Vi è poi uno specifico allegato con linee guida per il campionamento. Tra i principali punti critici individuati dal protocollo, per fasi che devono essere monitorate e registrate, si segnalano: l'umidità relativa della granella alla accettazione (che dovrebbe essere superiore al 20%), la tempistica per l'avvio alla essiccazione e il grado di umidità, l'analisi e il controllo delle temperature in fase di stoccaggio e conservazione. È previsto ad esempio che su ciascun conferimento considerato ad elevato rischio, cioè con umidità inferiore al 20%, siano effettuati controlli definiti dal centro di stoccaggio (sistemi rapidi di screening, confermati da periodiche analisi più accurate), in caso contrario le partite devono essere separate e segregate a parte. I lotti valutati a rischio di non conformità devono inoltre essere sottoposti ad azioni correttive quali ventilazione, pulitura, ecc., ed essiccati il prima possibile. Tali partite potranno rientrare nel circuito del prodotto conforme solo dopo un controllo con esito favorevole. L'essiccazione deve avvenire entro 24 ore dal ricevimento se il rischio è elevato o comunque entro 48 ore, riducendo l'umidità al valore del 14%, e se il tenore residuo fosse al di fuori del limite si deve procedere con misure correttive (es. ventilazione, ecc.). Le analisi di controllo vengono effettuate almeno in due momenti: il primo dopo l'essiccazione e/o in fase di cumulo in magazzino, il secondo durante la fase di stoccaggio /conservazione. Le strutture di stoccaggio prima della commercializzazione devono verificare in autocontrollo il livello di contaminazione e, se questo è superiore ai limiti di legge previsti per l'aflatossina B1, possono procedere con ulteriori processi di pulitura della granella tramite l'utilizzo di sistemi fisici tradizionali (setacci, aspiratori, spazzolatrici, ecc.) e/o selezionatrici ottiche, al fine di ridurre tale contaminazione. Terminata l'operazione devono essere effettuati controlli supplementari e tali operazioni devono essere documentate. Nel caso le operazioni di pulitura non ottenessero il risultato di fare rientrare il mais nei limiti previsti dalla normativa questo non può avere una destinazione alimentare/mangimistica. Nei documenti deve chiaramente essere individuata la destinazione alternativa. Nella fase di consegna del prodotto conforme deve essere prevista la pulizia dei sistemi di convogliamento/movimentazione/trasporto.

Il protocollo d'intesa comprende infine un allegato con linee guida per un corretto campionamento in autocontrollo, che riguarda sia la fase di accettazione sia l'intero processo.

## Conclusioni

Il “Protocollo d’intesa” rappresenta un utile e importante ed strumento per la filiera maidicola regionale che impegna e aiuta gli operatori ad adottare quanto previsto dalle Linee guida per la prevenzione del rischio di contaminazione da micotossine in fase di raccolta e stoccaggio del mais e ad effettuare un corretto piano di autocontrollo. Il documento viene annualmente sottoscritto dai principali operatori della filiera e arriva a rappresentare oltre il 60% della produzione maidicola regionale.

## Bibliografia

- Brera C, Debegnach F, Pannunzi E, Gregori E, Prantera E, De Santis B. Aspetti pratici legati ad una corretta esecuzione delle procedure di campionamento. In: Brera C, De Santis B, Debegnach F, Gregori E, Pannunzi E, Barea Toscan MC (Ed.). *IV Congresso Nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 11-13 giugno 2012. Atti.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2013. (Rapporti ISTISAN 13/18).p. 24-30.
- Brera C, Pannunzi E, Montepeloso E, Soricelli S, Debegnach F, Gregori E, Prantera E, De Santis B. Ripartizione della contaminazione da aflatossine e fumonisine nella preparazione del campione. In: Brera C, De Santis B, Debegnach F, Gregori E, Pannunzi E, Barea Toscan MC (Ed.). *4° Congresso nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 11-13 giugno 2012. Riassunti.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2012 (ISTISAN Congressi 12/C3). p. 41
- Brera C, Soricelli S, Pannunzi E, Nigri A, Prantera E, Grandi A, Grandi F, Castiglioni M, De Santis B. Campionatori automatici nelle attività di autocontrollo. In: Brera C, De Santis B, Debegnach F, Gregori E, Pannunzi E, Barea Toscan MC (Ed.). *4° Congresso nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 11-13 giugno 2012. Riassunti.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2012 (ISTISAN Congressi 12/C3). p. 51.
- ISO 24333:2009. *Cereals and cereal products – Sampling.* Geneva; International Organization for Standardization; 2009.
- Ministero della Salute. *PNAA 2015-2016-2017. Piano nazionale di controllo ufficiale sull'alimentazione degli animali.* Roma: Ministero della Salute; 2015. Disponibile all'indirizzo: [http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pubblicazioni\\_2269\\_allegato.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2269_allegato.pdf); ultima consultazione 6/6/16.
- Europa. Regolamento (CE) n. 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 70/12, del 9 marzo 2006.

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

Sabrina Locatelli, Chiara LanzaNova, Fabrizio Facchinetti, Stefania Mascheroni,  
Gianfranco Mazzinelli, Carlotta Balconi

Unità di ricerca per la Maiscoltura, Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia  
agraria, Bergamo, Italia

### Introduzione

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 sintetizzare 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 deossivalenolo (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 del Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA-MAC) alla valutazione della contaminazione delle principali micotossine nelle fasi di stoccaggio: dal 1999 CREA-MAC coordina una Rete di circa 50-70 impianti (Figura 1), stabile negli anni di indagine, distribuiti nelle regioni maggiormente vocate alla produzione maidicola (Piemonte, Lombardia, Veneto, Friuli-Venezia Giulia, Emilia-Romagna).



Figura 1. Rete di monitoraggio dei centri di essiccazione-stoccaggio CREA-MAC

Da questi centri vengono annualmente raccolti campioni di granella di mais e analizzati per il loro contenuto nelle principali micotossine.

Il presente lavoro illustra i risultati relativi alle indagini condotte nel corso della campagne maidicole dal 2006 al 2008 e dal 2011 al 2014.

## Materiali e metodi

### Campionamento dei materiali

È noto che le contaminazioni da micotossine su mais sono di tipo puntiforme, non sono omogeneamente distribuite per cui, tanto più il campione da sottoporre ad analisi è rappresentativo dell'intera partita, tanto più il risultato analitico rappresenterà effettivamente un dato reale di contaminazione. Pertanto, i campioni per le analisi sono stati ottenuti con metodi di campionamento dinamico: da prodotto in movimento (durante le operazioni di carico degli autotreni in uscita o in occasione delle movimentazioni interne) è stato derivato un campione globale di 8-20 kg da cui, con metodi di sample sorting, è stato ottenuto un campione di 1,5-2 kg per il laboratorio di analisi (1). Da ciascun centro di stoccaggio sono stati prelevati mediamente 8-12 campioni contrassegnati con un codice identificativo dell'anno e della zona agraria di provenienza.

### Analisi delle micotossine

Il numero di centri di stoccaggio aderenti e dei campioni analizzati per ogni campagna maidicola è riportato in Tabella 1.

**Tabella 1. Numero di campioni analizzati e di centri di essiccazione - stoccaggio aderenti per ogni anno d'indagine**

Numero	2006	2007	2008	2011	2012	2013	2014
Centri	82	100	95	48	46	53	49
Campioni	697	760	818	462	362	389	356

I campioni di granella sono stati macinati con mulino Retsch - ZM 200 con vaglio da 0,5 mm. I livelli di concentrazione di micotossine sono stati determinati con metodo immunoenzimatico ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). I test kit Ridascreen® R-Biopharm sono stati eseguiti utilizzando il preparatore automatico Chemwell (Awareness Technology, Inc.).

## Risultati e discussione

### Fumonisine

Le fumonisine, prodotte da *F. verticillioides*, appaiono come le tossine più diffuse nelle nostre partite commerciali. Pochissimi campioni tra i circa 4000 raccolti sono risultati negativi

all'analisi. Questo dato conferma la presenza endemica di *F. verticillioides* nell'areale maidicolo italiano (2). Nella campagna maidicola 2011, l'11% dei campioni analizzati superava il valore di 4000 µg/kg, indicato in sede europea come limite per l'utilizzo alimentare del mais grezzo (3); nell'annata 2006, invece, ben il 75% dei campioni analizzati superava tale soglia (Figura 2).

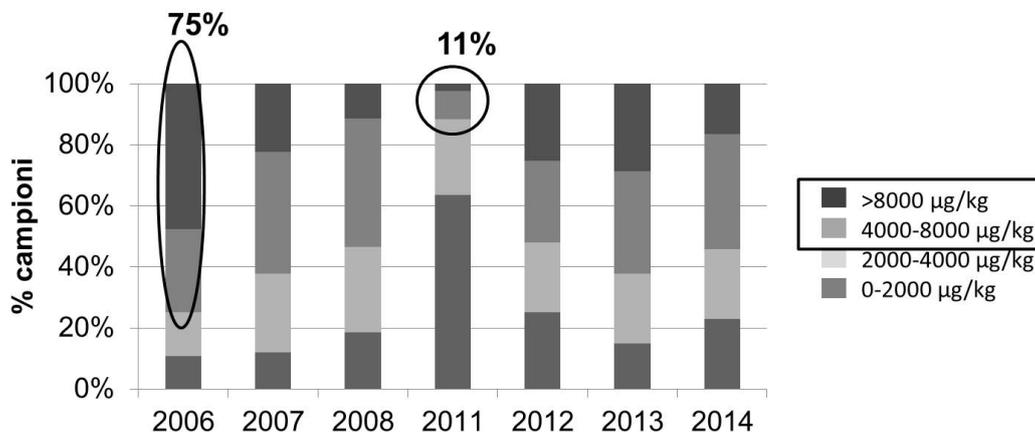


Figura 2. Distribuzione percentuale del contenuto in fumonisine (µg/kg) in campioni di mais provenienti dalla Rete di monitoraggio CREA-MAC dal 2006 al 2014

### Aflatossina B<sub>1</sub>

Nessuno dei campioni di mais analizzati nel corso del monitoraggio della campagna 2014 risulta avere un livello di aflatossina B<sub>1</sub> superiore ai 20 µg/kg, contenuto massimo per il mais destinato a materia prima nei mangimi (4). Le condizioni meteo-climatiche e vegetative che hanno interessato le coltivazioni di mais nel 2014 sono state assai diverse da quelle del 2012, anno nel quale le piante di mais hanno sofferto elevate temperature e carenza idrica, fattori di stress che favoriscono la contaminazione da aflatossine; nel 2012, infatti, il 22% dei campioni di mais superava tale soglia.

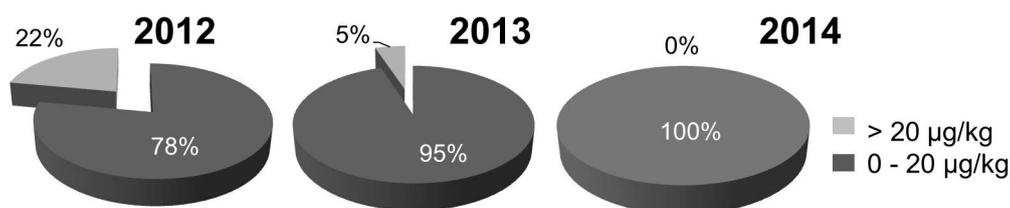


Figura 3. Distribuzione percentuale del contenuto in aflatossina B<sub>1</sub> (µg/kg) in campioni di mais provenienti dalla Rete di monitoraggio CREA-MAC dal 2012 al 2014

### Deossivalenolo e zearalenone

Nel 2014 le analisi si sono incentrate soprattutto sulla ricerca di DON (deossivalenolo o vomitossina) dato che le abbondanti piogge e le temperature contenute hanno creato le

condizioni ideali per uno sviluppo lussureggiante dei funghi della specie *Fusarium* produttori di tale tossina. In effetti, il 21% dei campioni di mais analizzati risulta avere un contenuto in DON superiore a 8000 µg/kg, valore di riferimento per il mais destinato a materia prima nei mangimi (5); il 6% dei campioni analizzati nel 2013 superavano tale valore.

Il DON è una micotossina “spia”: la sua presenza nel campione indica che, con elevata probabilità, esso risulterà contaminato anche da altre micotossine quali fumonisine e zearalenone (ZEA). Questo è stato confermato dalle analisi condotte: il 40% dei campioni analizzati presso CREA-MAC mostra un contenuto di ZEA superiore ai 350 µg/kg, tenore massimo per il mais ad uso alimentare umano (3).

## Conclusioni

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.

## Ringraziamenti

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.

## Bibliografia

1. Europa. Regolamento (CE) n. 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell’Unione Europea* L 70/12, del 9 marzo 2006.
2. Berardo N, Lanzanova C, Locatelli S, Laganà P, Verderio A, Motto M. Levels of total fumonisins in maize samples from Italy during 2006-2008. *Food Additives and Contaminants, Part B* 2011;4(2):116-24.
3. Europa. Regolamento (CE) n. 1126/2007 della commissione del 28 settembre 2007 che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari per quanto riguarda le *Fusarium*-tossine nel granoturco e nei prodotti a base di granoturco. *Gazzetta ufficiale dell’Unione europea* L 255/14 del 29 settembre 2007.
4. Europa. Regolamento (UE) n. 574/2011 della commissione del 16 giugno 2011 che modifica l’allegato I della direttiva 2002/32/CE del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda i livelli massimi di nitrito, melamina, Ambrosia spp. e carry-over di alcuni coccidiostatici e

istomonostatici e che consolida gli allegati I e II. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 159/7 del 17 giugno 2011.

5. Europa. Raccomandazione (CE) n. 576/2006 della commissione del 17 agosto 2006 sulla presenza di deossinivalenolo, zearalenone, ocratossina A, tossine T-2 e HT-2 e fumonisine in prodotti destinati all'alimentazione degli animali. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 229/7 del 23 agosto 2006.

# 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 (a), Maria Pina La Penna (a), Biancamaria Ciasca (a), Stephen Powers (b), Christoph von Holst (c)

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

(b) *Vicam, A Waters Business, Milford, Stati Uniti*

(c) *European Commission, DG Joint Research Centre, Belgium*

## Introduzione

Il Regolamento (CE) 1881/2006 definisce i limiti massimi ammissibili per il deossinivalenolo (DON) in cereali e prodotti derivati. Tali limiti sono stati fissati a 1750 µg/kg per il frumento duro non trasformato e a 1250 µg/kg per altri cereali non trasformati compreso il frumento tenero. A seguito della normativa vigente, la necessità da parte degli operatori del settore cerealicolo di migliorare la qualificazione delle partite in funzione della destinazione d'uso finale rende necessaria la disponibilità e l'applicazione di metodiche rapide, ma allo stesso tempo affidabili per il controllo della contaminazione da DON.

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.

Il recente Regolamento (UE) 519/2014 (1) stabilisce i criteri di prestazione per le metodiche di screening per micotossine, definendo linee guida ufficiali per verificare le caratteristiche analitiche delle metodiche rapide e stabilirne l'idoneità allo scopo.

Obiettivo del presente lavoro è stato quello di elaborare un disegno sperimentale per la validazione intra-laboratorio di un metodo rapido, basato su un test immunocromatografico a flusso laterale, per la determinazione semi-quantitativa del DON in frumento duro, in accordo con le linee guida del suddetto Regolamento.

Il disegno sperimentale applicato ha fornito informazioni sul profilo di precisione del metodo, sul valore soglia (*cut-off*) e sulle percentuali di falsi sospetti e falsi negativi. Inoltre, è stato elaborato un disegno fattoriale per valutare quantitativamente l'influenza di forme modificate del DON (3/15-acetilDON (3/15AcDON), DON-3-glucoside (DON-3G)) sui risultati del test. Infine, sono stati confrontati i risultati dell'analisi di un set di campioni naturalmente contaminati ottenuti mediante strip test e LC-MS/MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) (2).

## Materiali e metodi

### Saggio immunocromatografico

Il saggio immunocromatografico utilizzato in questo studio (DON-V®, Vicam, a Waters Business) è basato sull'approccio competitivo indiretto. L'intensità del colore sviluppato in corrispondenza della linea test (T) e della linea di controllo (C) viene misurata da un lettore ottico. Il rapporto T/C viene convertito in concentrazione di DON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) attraverso una curva di calibrazione fornita dal produttore. Per le analisi, 5 g di campione macinato venivano estratti con 20 mL di acqua mediante agitazione su vortex per 3 min. Quindi venivano prelevati 100  $\mu\text{L}$  di estratto e diluiti con 200  $\mu\text{L}$  di acqua. Un'aliquota di estratto diluito (100  $\mu\text{L}$ ) veniva addizionata con 100  $\mu\text{L}$  di diluente (incluso nel kit commerciale) e incubato a 40°C per 2 min. Infine, 100  $\mu\text{L}$  di campione finale venivano depositati sullo strip immunocromatografico e lasciati migrare per 5 min, a 40°C. Dopo la corsa, lo strip veniva immediatamente posizionato all'interno del lettore per la lettura e l'interpretazione del risultato.

## Risultati e discussione

La procedura di validazione descritta nel Regolamento (UE) 519/2014 (1) è finalizzata a dimostrare l'idoneità allo scopo (*fitness for purpose*) del metodo di screening. Ciò avviene mediante la determinazione dei seguenti parametri: valore soglia (*cut off*), tasso di falsi sospetti, tasso di falsi negativi. La valutazione del tasso di falsi sospetti e falsi negativi include misure di sensibilità, selettività e precisione. Per ottenere la precisione intermedia (riproducibilità intra-laboratorio) del metodo, gli esperimenti di validazione sono stati organizzati secondo un disegno Nested, suddivisi in 5 giorni, e utilizzando 3 diverse varietà di frumento duro, analizzate in condizioni di ripetibilità (fase 1). Il disegno sperimentale è stato ripetuto per 4 livelli di concentrazione di DON, ovvero per campioni esenti da contaminazione (bianchi), e campioni contaminati a 50, 100 e 150% del limite massimo ammissibile (ML, 1750  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Successivamente il disegno è stato ripetuto inserendo la variabilità tra due differenti lotti di produzione come ulteriore sorgente di errore (fase 2).

I risultati del test per i suddetti campioni, espressi come  $\mu\text{g}/\text{kg}$  di DON, sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) per calcolare la precisione intermedia (varianza totale) e il contributo di ciascuna fonte di errore. I risultati sono riportati in Tabella 1. La Tabella riporta inoltre il valore del *cut off* calcolato come descritto nel Regolamento (UE) n. 519/2014 (1). 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-AcDON, 15-AcDON e DON-3G) sui risultati del test, e in particolare sul rischio di falsi sospetti. Il disegno fattoriale considerava 3 variabili (presenza/assenza del 3-AcDON, 15-AcDON e del DON-3G) e 3 livelli per ciascun fattore: un livello alto (400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), un livello basso (0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e un livello centrale (200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). È stato calcolato che la presenza di 3-AcDON o di DON-3G a 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  genererebbe un segnale pari a 2750  $\mu\text{g}/\text{kg}$  o 870  $\mu\text{g}/\text{kg}$  di DON, rispettivamente, incrementando significativamente il rischio di falsi sospetti. La presenza di 15-AcDON a 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  generava invece effetti non significativi.

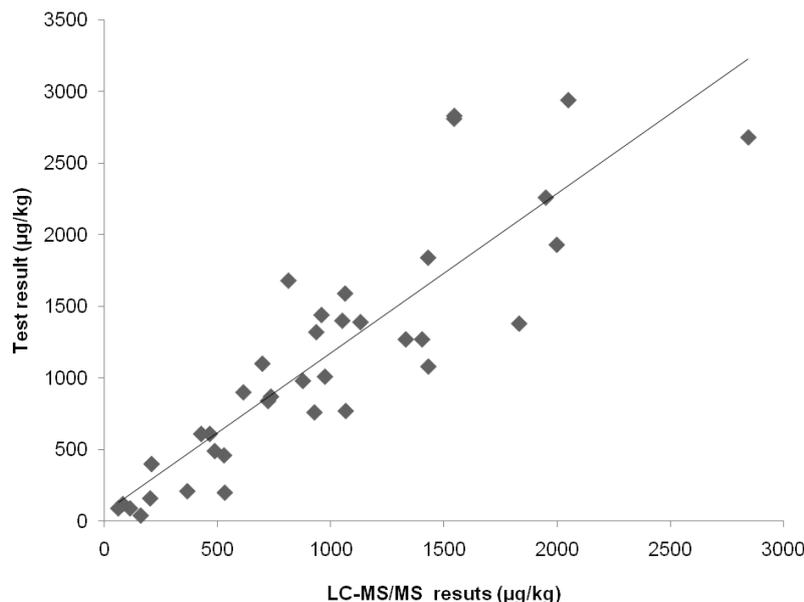
**Tabella 1** Caratteristiche analitiche del test immunocromatografico validato per la determinazione di DON in frumento

Livello di contaminazione	Parametro	Fase 1	Fase 2
<b>Bianchi</b>	Risposta media ( $\mu\text{g/kg}$ ) <sup>a</sup>	30	60
	RSD (%) <sup>b</sup>	62	110
	<i>Sorgente di errore (% della varianza totale)</i>		
	Giorno	0	0
	Varietà di frumento	58	3
	Lotto		81
	Ripetibilità	42	16
	Falsi sospetti, %	<0,1	< 0,1
<b>50% ML (875 <math>\mu\text{g/kg}</math>)</b>	Risposta media ( $\mu\text{g/kg}$ ) <sup>a</sup>	730	
	RSD (%) <sup>b</sup>	19	
	<i>Sorgente di errore (% della varianza totale)</i>		
	Giorno	20	
	Varietà di frumento	0	
	Lotto	-	
	Ripetibilità	80	
	Falsi sospetti, %	< 0,1	
<b>ML (1750 <math>\mu\text{g/kg}</math>)</b>	Risposta media ( $\mu\text{g/kg}$ ) <sup>a</sup>	1840	1750
	RSD (%) <sup>b</sup>	16	28
	<i>Sorgente di errore (% della varianza totale)</i>		
	Giorno	0	0
	Varietà di frumento	0	40
	Lotto	-	22
	Ripetibilità	100	38
<b>150% ML (2600 <math>\mu\text{g/kg}</math>)</b>	Risposta media ( $\mu\text{g/kg}$ ) <sup>a</sup>	2490	
	RSD (%) <sup>b</sup>	20	
	<i>Sorgente di errore (% della varianza totale)</i>		
	Giorno	17	
	Varietà di frumento	47	
	Lotto		
	Ripetibilità	36	
	Falsi negativi, %	1,7	
<b>Cut off (<math>\mu\text{g/kg}</math>)</b>		1350	920

ML: Massimo Livello

Infine l'applicabilità del metodo validato a campioni reali è stata valutata mediante analisi di 47 campioni di frumento duro naturalmente contaminati. I livelli di DON nei campioni analizzati erano compresi tra 62 e 2843  $\mu\text{g/kg}$ , mentre le forme modificate erano nell'intervallo nd-172  $\mu\text{g/kg}$ , per la somma di 3- e 15-AcDON, e nd-412  $\mu\text{g/kg}$ , per DON-3G.

Come mostrato in Figura 1, è stata osservata una buona correlazione ( $r = 0,87$ ) tra i risultati delle analisi effettiate con il test immunocromatografico e quelli ottenuti mediante un metodo di conferma LC-MS/MS (2).



**Figura 1. Correlazione tra i risultati (concentrazione di DON, µg/kg) ottenuti, per un set di 47 campioni di frumento naturalmente contaminati, mediante analisi effettuate con test immunocromatografico e metodo di conferma LC-MS/MS**

## Conclusioni

Nel presente lavoro è stato proposto un disegno sperimentale per la validazione intra-laboratorio di un metodo rapido, basato su un test immunocromatografico a flusso laterale, per la determinazione semi-quantitativa del DON in frumento duro, in accordo con le linee guida del Regolamento (UE) 519/2014. Il disegno di validazione applicato ha fornito le seguenti informazioni: 1) profilo di precisione del metodo, 2) effetto matrice, 3) valore soglia (*cut off*), 4) tasso di falsi sospetti e falsi negativi per campioni contenenti DON a livelli inferiori o superiori al limite di legge rispettivamente. Inoltre, è stata valutata quantitativamente l'influenza di forme modificate del DON sui risultati del test. Infine, l'analisi di campioni naturalmente contaminati ha mostrato una correlazione soddisfacente tra i risultati ottenuti mediante il kit validato e quelli ottenuti mediante un metodo di conferma LC-MS/MS. I risultati ottenuti hanno confermato l'idoneità allo scopo dell'immunosaggio studiato.

## Bibliografia

1. Europa. Regolamento (UE) n. 519/2014 della Commissione del 16 maggio 2014 che modifica il regolamento (CE) n. 401/2006 per quanto riguarda i metodi di campionamento per le grandi partite, per le spezie e gli integratori alimentari, i criteri di rendimento per le tossine T-2 e HT-2 e per la citrinina, nonché i metodi di analisi di screening. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 147/29 5 del 17 maggio 2014.
2. Lattanzio VMT, Della Gatta S, Suman M, Visconti A. Development and in house validation of a robust and sensitive solid phase extraction - LC-MS/MS method for the quantitative determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, ochratoxin A, deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxins in cereal based foods. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2011;25:1869-80.

# IMMUNODOSAGGI BASATI SULLA POLARIZZAZIONE DI FLUORESCENZA PER LA DETERMINAZIONE DELLE TOSSINE T<sub>2</sub> E HT<sub>2</sub> IN AVENA, ORZO, SEGALE E PRODOTTI A BASE DI CEREALI

Vincenzo Lippolis, Anna Chiara R. Porricelli, Marina Cortese, Stefania Valenzano, Michelangelo Pascale  
*Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari, Italia*

## Introduzione

Le tossine T<sub>2</sub> e HT<sub>2</sub> sono tricoteceni di tipo A, prodotte da diverse specie di *Fusarium*, che in condizioni ambientali favorevoli possono colonizzare vari cereali, in particolare avena, frumento, mais, orzo e segale (1). 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 e animale (2). Per tale ragione, assume una notevole rilevanza la necessità di sviluppare nuovi metodi analitici sensibili e accurati che consentano la loro determinazione nei cereali non processati e prodotti derivati. In letteratura sono riportati vari metodi analitici comunemente utilizzati per la determinazione delle tossine T<sub>2</sub> e HT<sub>2</sub> – GC/ECD (*Gas Chromatography/Electron Capture Detector*, gascromatografia con rivelatore a cattura di elettroni) o MS (*Mass Spectrometry*); HPLC/FD (*High-Performance Liquid Chromatography/Fluorescence Detection*) o MS; UHPLC/PDA (*Ultra-High Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array*) (3, 4). Sebbene tali metodi analitici siano accurati, precisi e sensibili, richiedono stadi preliminari di purificazione, tempi lunghi di analisi, costi strumentali elevati e sono inadeguati ai fini di analisi di screening. Per tali motivi risulta crescente l'attenzione anche verso lo sviluppo di metodi sensibili e poco costosi che consentano una determinazione rapida delle tossine T<sub>2</sub> e HT<sub>2</sub> in matrici agroalimentari. In particolare, fra i vari metodi di screening riportati in letteratura, gli immunosaggi basati sulla polarizzazione di fluorescenza (FP) stanno assumendo particolare rilevanza in questi ultimi anni. L'immunosaggio FP è un saggio omogeneo basato sulla competizione in soluzione tra l'analita di interesse e il suo derivato fluorescente (tracciante) al fine di legare un anticorpo monoclonale specifico per esso. La presenza dell'analita libero in soluzione riduce la quantità di anticorpo che può legare il tracciante e ciò comporta un decremento del valore di polarizzazione. Pertanto il segnale misurato (P) risulterà inversamente proporzionale alla concentrazione dell'analita che si vuol determinare. Di recente presso i laboratori dell'Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) è stato messo a punto un immunosaggio FP che consente una determinazione quantitativa di T<sub>2</sub> e HT<sub>2</sub>, come somma delle due tossine, in campioni di frumento (5). Il metodo presenta prestazioni in termini di sensibilità, accuratezza e precisione paragonabili al metodo HPLC di riferimento, una notevole rapidità di analisi (circa 10 min), bassi costi e semplicità di realizzazione. Per tali motivi, lo scopo del presente lavoro è stato quello di estendere l'applicabilità di tale immunosaggio FP ad altri cereali non trasformati, quali avena, orzo e segale e prodotti derivati, come pasta, fiocchi di avena e prodotti da forno a base di avena.

## Materiali e metodi

Il protocollo di analisi sviluppato prevede l'estrazione con 100 mL di metanolo:acqua (90:10, v/v) mediante agitazione ad alta velocità (*blending*) per 3 min del campione finemente macinato (50 g di orzo e pasta; 25 g di avena, segale, fiocchi di avena e prodotti da forno a base di avena) e addizionato con NaCl (1 g per orzo e pasta; 2,5 g per avena, segale, fiocchi di avena e prodotti da forno a base di avena). Successivamente l'estratto è filtrato con filtro in carta, diluito con acqua (per orzo e pasta) o con una soluzione acquosa di NaCl (1% NaCl per avena, fiocchi di avena e prodotti da forno a base di avena; 4% per segale) in rapporto 1:5 (v/v) e infine filtrato con filtro in microfibra di vetro e analizzato mediante immunosaggio FP, senza alcuna purificazione dell'estratto. Nel caso della diluizione con la soluzione acquosa di NaCl prima della filtrazione occorre attendere la precipitazione di sostanze interferenti per un tempo complessivo pari a 5 min. La valutazione dell'effetto matrice sull'immunosaggio FP è stata eseguita effettuando un confronto mediante i test statistici di parallelismo e posizione tra la retta di regressione lineare ottenuta con soluzioni standard di tossine T-2 ed HT-2 nell'intervallo di 0,5-7,5 ng/mL e tre rette di regressione lineare ottenute aggiungendo estratti diluiti artificialmente contaminati a differenti livelli di T-2 e HT-2 (1,7-37,5 ng/mL per i fiocchi di avena, 2,1-75 ng/mL per segale e prodotti da forno a base di avena, 4,2-45 ng/mL per orzo e pasta e 4,7-45 ng/mL per avena; espressi come somma delle due tossine) di tutte le matrici analizzate e corrispondenti a diverse quantità di matrice (2,5, 3, 4 mg per avena, 5, 10 e 12 mg per orzo, segale, pasta e prodotti da forno a base di avena e 10, 12, 15 mg per fiocchi di avena). Successivamente sono state valutate l'accuratezza e la precisione dei metodi FP sviluppati e le performance ottenute per tali saggi sono state confrontate con quelle ottenute con il metodo UHPLC/PDA di riferimento, basato sulla purificazione degli estratti mediante colonnine ad immunoaffinità (3). A tal fine sono state svolte prove di recupero in triplicato contaminando artificialmente i campioni nell'intervallo 250-1000 µg/kg per l'avena e 100-400 µg/kg per orzo, segale, pasta, fiocchi di avena e prodotti da forno a base di avena e gli estratti sono stati analizzati mediante i due metodi analitici. Inoltre, lo studio comparativo tra gli immunosaggi FP e il metodo UHPLC/PDA è stato effettuato analizzando 25 campioni di orzo, di cui 9 naturalmente contaminati da T-2 e HT-2 nell'intervallo 26-135 µg/kg (somma delle due tossine), 16 artificialmente contaminati nell'intervallo 80-250 µg/kg, 47 campioni di avena di cui 34 naturalmente contaminati nell'intervallo 102-1598 µg/kg, 13 artificialmente contaminati nell'intervallo 423-1253 µg/kg e 20 campioni di segale, pasta, fiocchi di avena e prodotti da forno a base di avena artificialmente contaminati nell'intervallo di 50-700 µg/kg. Per queste ultime matrici non è stato possibile reperire campioni naturalmente contaminati. Per ciascuna matrice studiata sono stati inoltre analizzati 10 campioni risultati esenti da contaminazione da T-2 e HT-2 per valutare la percentuale di falsi positivi. Infine la robustezza degli immunosaggi FP è stata valutata analizzando in triplicato gli unici due materiali certificati disponibili in commercio, di cui uno di avena (FAPAS® T-2261) e uno di fiocchi di avena (ERM® BC720) aventi come valore assegnato di contaminazione rispettivamente 421 µg/kg e 163 µg/kg (somma delle due tossine) e come relativo intervallo di accettabilità 251-591 µg/kg e 155-171 µg/kg (somma delle due tossine).

## Risultati e discussione

I protocolli sviluppati per la determinazione quantitativa di T-2 e HT-2 non prevedono stadi di purificazione per tutte le matrici analizzate e richiedono tempi di analisi rispettivamente di 10 minuti per orzo e pasta e di 15 minuti per avena, segale, fiocchi di avena e prodotti da forno a base

di avena. Per quest'ultime quattro matrici, la differenza nel tempo di analisi è dovuta alla diluizione dell'estratto con soluzioni di NaCl a diverse percentuali (1% di NaCl per avena, fiocchi di avena e prodotti da forno a base di avena; 4% per segale) che sebbene incida sulla rapidità del saggio, essa consente la precipitazione di composti interferenti (es. proteine) e l'ottimizzazione della sensibilità di tali saggi. Dalla valutazione dell'effetto matrice mediante i test di parallelismo e posizione non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa tra i coefficienti angolari ( $t_{\text{calc}} < 2,306$ ;  $p < 0,05$ ) e le posizioni ( $t_{\text{calc}} < 2,262$ ;  $p < 0,05$ ) della retta di regressione condotta con soluzioni standard di tossine T-2 e HT-2 e le rette di regressione ottenute fino ad un massimo di 3 mg di matrice analizzata per avena, 10 mg di matrice analizzata per orzo, segale, pasta e prodotti da forno a base di avena e 12 mg per fiocchi di avena. Tenendo conto delle quantità di matrice analizzata in ciascun saggio, sono stati calcolati i diversi limiti di determinazione (*Limit of Detection*, LOD) che risultano essere pari a 0,20 ng/mL (equivalente a 70 µg/kg) per avena, 0,40 ng/mL (equivalente a 40 µg/kg) per orzo, 0,20 ng/mL (equivalente a 20 µg/kg) per segale e prodotti da forno a base di avena, 0,25 ng/mL (equivalente a 25 µg/kg) per pasta e 0,45 ng/mL (equivalente a 40 µg/kg) per i fiocchi di avena. Tali valori di LOD, per le diverse matrici analizzate, risultano prossimi ai livelli indicativi recentemente riportati dalla Commissione Europea (2). I valori dei recuperi medi ottenuti con il metodo FP da campioni artificialmente contaminati nell'intervallo 250-1000 µg/kg per l'avena e 100-400 µg/kg per orzo, segale, pasta, fiocchi di avena e prodotti da forno a base di avena sono risultati del 101, 103, 104, 104, 105 e 107% rispettivamente per i fiocchi di avena, orzo, avena, pasta, segale e prodotti da forno a base di avena, con deviazioni standard minori del 6%. Mentre i recuperi ottenuti mediante il metodo UHPLC/PDA sono risultati essere compresi tra l'85 e il 99%, con deviazioni standard relative minori dell'8%. Pertanto i valori di precisione e accuratezza ottenuti per gli immunosaggi FP sviluppati soddisfano i criteri stabiliti dalla Commissione Europea per l'accettabilità di metodi analitici per la determinazione delle tossine T-2 e HT-2 in matrici agroalimentari (6). Inoltre dalla validazione intralaboratorio condotta è emersa una buona correlazione (coefficiente di correlazione,  $r = 0,953$  per orzo;  $r = 0,980$  per avena;  $r = 0,991$  per fiocchi di avena;  $r = 0,994$  per prodotti da forno a base di avena;  $r = 0,995$  per la pasta;  $r = 0,998$  per segale) tra le concentrazioni di T-2 e HT-2 (esprese come somma) determinate mediante gli immunosaggio FP e il metodo di riferimento UHPLC/PDA. A titolo di esempio, in Figura 1 sono riportate le rette di correlazione ottenute con le due metodiche messe a confronto per i campioni di orzo e avena. Infine, dall'analisi FP di 10 campioni non contaminati, per ciascuna matrice testata, non sono stati osservati risultati falsi positivi. Infine la robustezza degli immunosaggi FP è stata confermata analizzando due materiali certificati, di cui uno di avena (FAPAS<sup>®</sup> T-2261) e uno di fiocchi di avena (ERM<sup>®</sup> BC720). I valori determinati (corretti per il recupero medio ottenuto) sono stati  $387 \pm 41$  µg/kg e  $168 \pm 2$  µg/kg ( $n = 3$  repliche) rispettivamente per i campioni di avena e fiocchi di avena. Tali valori risultano prossimi al valore assegnato per ciascun materiale e rientrano nell'intervallo di accettabilità previsto, ovvero 251-591 µg/kg (somma delle due tossine) per il campione FAPAS<sup>®</sup> T-2261 e 155-171 µg/kg (somma delle due tossine) per il campione ERM<sup>®</sup> BC720. Pertanto tali risultati confermano la buona precisione e accuratezza dei metodi FP sviluppati. Tale studio non è stato condotto per le restanti matrici a causa dell'assenza di materiali certificati commercialmente disponibili.

## Conclusioni

Sono stati messi a punto immunosaggi FP per la determinazione del contenuto di tossine T-2 e HT-2 (espressi come somma delle due tossine) in cereali non trasformati quali orzo, avena e segale e prodotti a base di cereali come pasta, fiocchi d'avena e prodotti da forno a base di

avena. I protocolli ottimizzati richiedono tempi brevi di analisi, ovvero 10 minuti per orzo e pasta e 15 minuti per avena, segale, fiocchi d'avena e prodotti da forno a base di avena. I LOD calcolati (20-70 µg/kg) risultano prossimi ai livelli indicativi riportati dalla Commissione Europea per la quantificazione del contenuto totale di T-2 e HT-2 in cereali non trasformati e in prodotti derivati (2). Le prestazioni analitiche ottenute in termini di accuratezza (101-107%) e precisione ( $\leq 6$ ) soddisfano i criteri stabiliti dalla Commissione Europea (6). Inoltre la robustezza del metodo è stata confermata dall'analisi di due campioni certificati commercialmente disponibili di avena e fiocchi di avena. I valori determinati rientrano negli intervalli di accettabilità previsti e risultano prossimi al valor assegnato per entrambi i campioni. Infine dalla validazione intralaboratorio condotta è emersa una buona correlazione tra gli immunosaggi FP e il metodo UHPLC/PDA di riferimento ( $r > 0,953$ ). Quindi i risultati ottenuti dimostrano che gli immunosaggi FP sviluppati possono essere utilizzati come valida alternativa al metodo UHPLC/PDA di riferimento, basato sulla purificazione degli estratti con colonnine ad immunoaffinità. Inoltre la rapidità, il basso costo e la semplicità di realizzazione dimostrano come i saggi FP messi a punto siano adatti per analisi di screening, finalizzate alla determinazione quantitativa delle tossine T-2 e HT-2 in cereali non trasformati e in prodotti derivati, al fine di implementare la valutazione del rischio, così come richiesto dalla Commissione Europea (2).

## Ringraziamenti

Le attività di ricerca sono state finanziate dal MIUR, nell'ambito dei progetti S.I.Mi.S.A. "Strumenti Innovativi per il Miglioramento della Sicurezza Alimentare: Prevenzione, Controllo, Correzione" (Codice progetto: PON02\_00186\_3417512) e SAFE&SMART "Nuove tecnologie abilitanti per la food safety e l'integrità delle filiere agro-alimentari in uno scenario globale" (Codice progetto: CTN01\_00230\_248064).

## Bibliografia

1. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed. *EFSA Journal* 2011;9(12):2481-668.
2. Europa. Raccomandazione della Commissione (UE) n. 165/2013 del 27 marzo 2013 relativa alla presenza di tossine T-2 e HT-2 in cereali e nei prodotti derivati a base di cereali. *Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea* L 91/12.
3. Pascale M, Panzarini G, Visconti A. Determination of HT-2 and T-2 toxins in oats and wheat by ultra-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Talanta* 2012;89:231-6.
4. Lattanzio VMT, Pascale M, Visconti A. Current analytical methods for trichothecenes mycotoxins in cereals. *Trends in Analytical Chemistry* 2009;28:758-68.
5. Lippolis V, Pascale M, Valenzano S, Pluchinotta V, Baumgartner S, Krska R, Visconti A. A rapid fluorescence polarization immunoassay for the determination of T-2 and HT-2 toxins in wheat. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2011;401:2561-71.
6. Europa. Regolamento (CE) n. 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 70/12, del 9 marzo 2006.

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

Vincenzo Lippolis, Salvatore Cervellieri, Anna Damascelli, Nastasia Bernardi,  
Annalisa De Girolamo, Michelangelo Pascale  
*Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari, Italia*

## Introduzione

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 specie fungine del genere *Fusarium*, principalmente *F. culmorum* e *F. graminearum*, con documentata tossicità per l'uomo e gli animali (1).

Al fine di proteggere la salute del consumatore dall'esposizione a tale micotossina, la Commissione Europea ha fissato i limiti massimi ammissibili di DON in cereali e prodotti derivati, tra cui la crusca destinata al consumo umano diretto (2). La determinazione di DON in tali matrici viene comunemente condotta mediante metodi cromatografici, basati sulle tecniche GC/ECD (*Gas Chromatography/ Electron Capture Detector*, gascromatografia con rivelatore a cattura di elettroni) o MS (*Mass Spectrometry*) e HPLC/UV (*High-Performance Liquid Chromatography/UltraViolet*) o MS (3). Tali metodi, sebbene permettano un'accurata e precisa quantificazione del DON, richiedono la purificazione dell'estratto e lunghi tempi di analisi, sono costosi e non adatti per lo screening rapido della contaminazione. Per tale ragione negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi metodi rapidi per la determinazione di tale micotossina in prodotti alimentari che si basano principalmente sull'immunocromatografia (*dipstick* e *lateral flow device*), polarizzazione di fluorescenza (*Fluorescence Polarization*, FP) e spettroscopia infrarossa (4). Recentemente un metodo basato sull'impiego del naso elettronico (*e-nose*) è stato utilizzato per discriminare campioni di frumento naturalmente contaminati in relazione al contenuto di DON (5). Inoltre, numerosi studi hanno evidenziato come le analisi dei composti volatili e in particolare dei metaboliti fungini primari e secondari consentano la classificazione tassonomica dei funghi che infestano i cereali o indirettamente la determinazione della contaminazione da micotossine (6).

Per tale motivo, l'obiettivo del presente lavoro è stato quello di sviluppare e validare un metodo rapido, di facile realizzazione e non-distruttivo basato sull'impiego di un naso elettronico con sensori a tecnologia MOS (*Metal Oxide Semiconductors*) per distinguere campioni di crusca di frumento duro sulla base del contenuto di DON. Inoltre, è stato ottimizzato un metodo basato sulla microestrazione in fase solida dello spazio di testa (HS-SPME) (*HeadSpace-Solid Phase MicroExtraction*) e analisi GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) per caratterizzare il *pattern* di composti volatili di tali campioni di crusca aventi una correlazione positiva o negativa con il contenuto di DON.

## Materiali e metodi

Per lo sviluppo e la validazione del metodo *e-nose* sono stati raccolti e selezionati 82 campioni di crusca di frumento duro naturalmente contaminati da DON. I campioni sono stati macinati mediante molino Retsch ZM 200 equipaggiato con vaglio da 500 µm e successivamente sono stati analizzati mediante metodo HPLC-UV di riferimento (7). Lo stesso set di campioni è stato analizzato mediante Sistema Olfattivo Artificiale a sensori MOS (*Metal Oxide Semiconductors*) ISENose 2000 (SoaTec srl, Parma, Italia). In particolare, 1 grammo di ciascun campione è stato posto in un *vial* per spazio di testa da 10 mL chiuso ermeticamente ed è stato termostato per 10 minuti a 40°C per consentire lo sviluppo della componente volatile. Per ogni campione sono state effettuate 5 repliche per un totale di 410 analisi (tempo totale di analisi 3 minuti). Le condizioni sperimentali ottimizzate per il naso elettronico ISENose 2000 sono: gas *carrier* aria cromatografica (80% N<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub>); flusso di gas 300 mL/min; temperatura 40 °C; umidità del gas stabilizzata a 12 g/m<sup>3</sup> (mediante utilizzo di acqua ultrapura); tempo di generazione dello spazio di testa 600 s; tempo di acquisizione della linea di base 5 s; tempo di iniezione 15 s; tempo totale di acquisizione dati 180 s; tempo di ritardo tra due campioni successivi 180 s. Inoltre, 60 degli 82 campioni di crusca selezionati, sono stati analizzati mediante un metodo HS-SPME/GC-MS (*HeadSpace-Solid Phase MicroExtraction/Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) appositamente ottimizzato per caratterizzare la loro componente volatile (analisi condotte in duplicato). In particolare, i campioni addizionati con trans-3-esen-1-olo, adoperato come standard interno (2 µg/g), sono stati sottoposti alla stessa procedura utilizzata nell'analisi *e-nose* per lo sviluppo della componente volatile. L'estrazione degli analiti è stata condotta esponendo una fibra di divinilbenzene/carboxen/polidimetilsilossano (DVB/CAR/PDMS), preventivamente condizionata, nello spazio di testa per 30 minuti. Il successivo desorbimento termico della componente volatile è stato effettuato direttamente nell'iniettore del gascromatografo ad una temperatura di 250 °C per 5 minuti. L'analisi della componente volatile è stata quindi eseguita con un gascromatografo Agilent 6890 series GC System interfacciato ad uno spettrometro di massa a quadruplo Agilent 5973 Network Mass Selective Detector. L'iniettore *split/splitless* del gascromatografo è stato posto in modalità *splitless* ad una temperatura di 250 °C. Per l'analisi è stata usata una colonna capillare di silice fusa DB-5MS (30 m x 0,25 mm id, 0,25 µm film thickness) ed è stato impostato il seguente programma di temperatura: 40 °C per 5 min, gradiente lineare di 3°C/min sino a 150 °C e successivamente un secondo gradiente di 25°C/min sino a 280°C, isoterma a 280°C per 5 min. Come gas di trasporto è stato adoperato elio puro alla velocità di 1 mL/min. I cromatogrammi sono stati acquisiti in modalità *Total Ion Current* (TIC) e gli spettri di massa nel *range* 40÷350 amu.

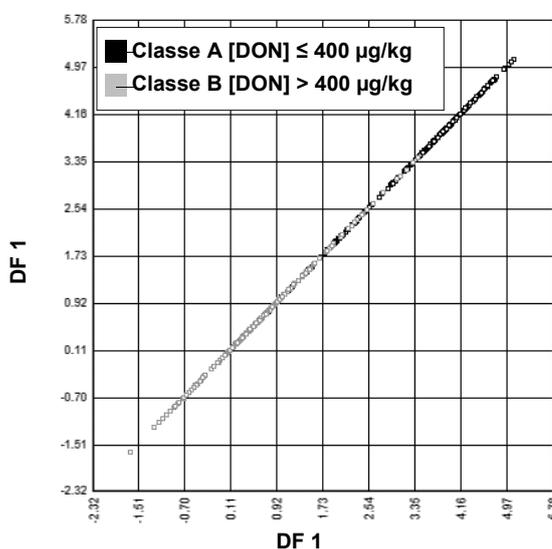
## Risultati e discussione

Un metodo *e-nose* con tecnologia MOS è stato sviluppato e validato per la classificazione di campioni di crusca di frumento duro a differente contenuto di DON. Il contenuto di tale tossina, determinato mediante il metodo HPLC-UV di riferimento (7), era compreso tra meno di 100 µg/kg (limite di quantificazione) e 1620 µg/kg.

I campioni di crusca di frumento duro è stato analizzato mediante naso elettronico nelle condizioni sperimentali ottimizzate.

I dati acquisiti sono stati trattati mediante analisi discriminante (DFA, *Discriminant Function Analysis*) per la quale, in seguito all'ottimizzazione eseguita sulla base dell'intero set di misure, sono stati considerati 9 dei 12 sensori utilizzati e 4 caratteristiche dei segnali (*features*).

Di conseguenza il rapporto tra il numero di campioni e le variabili è risultato pari a 5,7. Questo fattore deve essere un numero compreso tra 3 e 6 per evitare erronee classificazioni derivate dalla stretta dipendenza del modello dai campioni, l'*overfitting* (8). In base al numero di campioni e al loro livello di contaminazione i campioni di crusca sono stati dunque classificati nelle due classi A e B stabilite applicando un livello di *cut-off* pari a 400 µg/kg. In particolare, i campioni con una concentrazione di DON inferiore od uguale a 400 µg/kg sono stati inclusi nella classe A mentre i campioni con una concentrazione superiore a tale limite sono stati inclusi nella classe B. La DFA in calibrazione ha fornito tassi di riconoscimento percentuale per la classe A e B rispettivamente dell'88,1 e 90,5%, con tasso di riconoscimento complessivo pari a 89,3%. Nell'ambito delle erronee classificazioni (10,7%) i falsi positivi rappresentavano il 6,1% mentre i falsi negativi il 4,6%. In Figura 1 è riportato graficamente il risultato ottenuto dalla DFA in calibrazione.

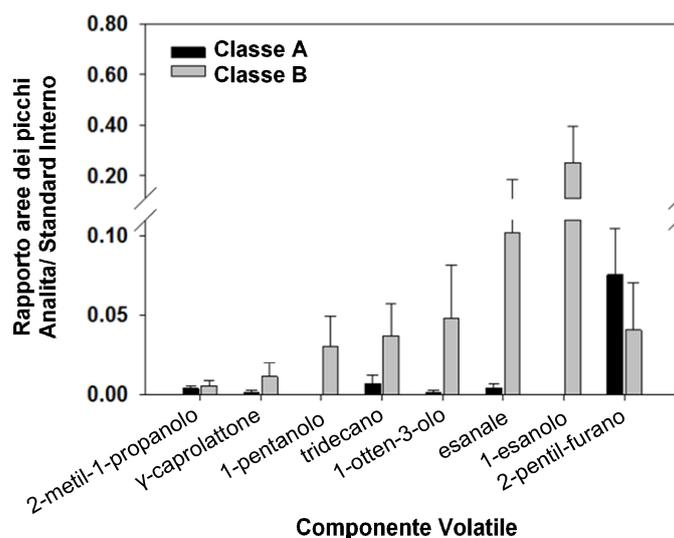


**Figura 1. Analisi discriminante (DFA) ottenuta per i campioni di crusca delle classi A e B: [DON] ≤ 400 µg/kg; B: [DON] > 400 µg/kg**

Successivamente il metodo sviluppato è stato sottoposto a validazione mediante cross-validazione "leave-more-out" rimuovendo in modo random il 30% dei campioni dal set di dati. È stato ottenuto un tasso di riconoscimento complessivo pari a 86,9% (con tassi di riconoscimento percentuale per la classe A e B rispettivamente dell'86,8 e 87,0%).

Inoltre è stato ottimizzato un metodo HS-SPME/GC-MS per caratterizzare la componente volatile dei campioni di crusca di frumento duro.

La componente volatile è risultata composta da idrocarburi alifatici e aromatici, acidi, esteri, alcoli, aldeidi, chetoni, terpeni e composti furanici. È stato 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-ottene-3-olo, esanale, 1-esanololo e tridecano o negativa come il 2-pentil-furano (Figura 2).



**Figura 2. Pattern di molecole selezionate dalla frazione volatile e correlate con il contenuto di DON in campioni di crusca attribuiti alle classi A: [DON] ≤ 400 µg/kg; B: [DON] > 400 µg/kg**

## Conclusioni

Il metodo *e-nose* sviluppato basato sull'utilizzo del naso elettronico con tecnologia MOS consente di ottenere in maniera rapida e poco costosa la stima della concentrazione di DON in campioni di crusca di frumento duro con l'obiettivo di ridurre il numero di campioni da sottoporre ad analisi HPLC di conferma. Inoltre, la semplicità di utilizzo, il bassissimo impatto ambientale e la non distruttività di tale metodologia favoriscono l'applicabilità della stessa al monitoraggio della contaminazione da DON in crusca di frumento duro.

## Ringraziamenti

L'attività di ricerca è stata finanziata dal MIUR, nell'ambito del progetto S.I.Mi.S.A. "Strumenti Innovativi per il Miglioramento della Sicurezza Alimentare: Prevenzione, Controllo, Correzione" (Codice progetto: PON02\_00186\_3417512).

## Bibliografia

1. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). *Safety evaluation of certain mycotoxins in food*. Geneva: WHO; 2001. (WHO Food Additives Series 47/FAO Food and Nutrition Paper 74).
2. Europa. Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea*, L364/5, 20 dicembre 2006.
3. Ran R, Wang W, Han Z, Wu A, Zhang D, Shi J. Determination of deoxynivalenol (DON) and its derivatives: Current status of analytical methods. *Food Control* 2013;34:138-48.

4. Maragos CM, Busman M Rapid and advanced tools for mycotoxin analysis: a review. *Food Additives and Contaminants* 2010;27:688-700.
5. Lippolis V, Pascale M, Cervellieri S, Damascelli A, Visconti A. Screening of deoxynivalenol contamination in durum wheat by MOS-based electronic nose and identification of the relevant pattern of volatile compounds. *Food Control* 2014;37:263-71.
6. Jeleń H, Wąsowicz E. Volatile fungal metabolites and their relation to the spoilage of agricultural commodities. *Food Rev Int* 1998;14:191-426.
7. UNI EN 15891:2010. *Foodstuffs - Determination of deoxynivalenol in cereals, cereal products and cereal based foods for infants and young children: HPLC method with immunoaffinity column clean-up and UV detection*. Milano: Ente Italiano di Unificazione; 2010.
8. Massart DL, Vandeginste BGM, Deming SN, Michotte Y, Kaufman L (Ed.). *Chemometrics: a textbook*. Amsterdam: Elsevier; 1988.

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

Francesca Lupi (a), Carmen Palermo (a,b), Maurizio Quinto (a,b), Donatella Nardiello (a,b), Annalisa Mentana (a), Antonio Moretti (c), Salvatore Frisullo (a,b), Diego Centonze (a,b)

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

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

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

### **Introduzione**

La fusariosi della spiga, nota come *Fusarium* Head Blight (FHB) è una malattia del grano diffusa a livello mondiale e causata da un complesso di specie di *Fusarium*. I principali agenti della malattia sono *Fusarium graminearum sensu stricto* Schwabe e *Fusarium culmorum* (WG Smith) Saccardo. Entrambe le specie possono produrre deossinivalenolo (DON) e le sue forme acetilate. Il DON è una micotossina pericolosa appartenente alla famiglia dei tricoteceni, in grado di inibire la sintesi proteica, con un rischio per la salute maggiore di quello rappresentato da altre categorie di sostanze come pesticidi, conservanti e additivi (1).

Numerosi Paesi hanno stabilito dei livelli massimi di DON in alimenti e mangimi come ad esempio quelli regolati dalla legislazione dell'Unione Europea (Direttiva 2002/32/CE Del Parlamento Europeo e del Consiglio, Raccomandazione della Commissione del 17 agosto 2006, 2006/576/CE e Direttiva 2010/165/CE Del Parlamento Europeo e del Consiglio). Se il contenuto è superiore al limite legale è necessaria una distruzione completa delle derrate contaminate, con conseguenti enormi danni economici a tutta la filiera.

Si è scelto di studiare le micotossine nel grano, perché questa materia prima è la più suscettibile all'attacco da parte di *Fusarium* e allo sviluppo di tali metaboliti, e anche perché i prodotti derivanti dal grano sono alla base della dieta quotidiana in tutto il mondo. Il successo nella produzione di cereali è fortemente legato alla valutazione qualitativa sia in fase pre-raccolta, sia nella fase di gestione post-raccolta e di stoccaggio. Per quanto riguarda la contaminazione di funghi nella fase pre-raccolta, è di fondamentale importanza lo sviluppo di strumenti per la diagnosi precoce, al fine di aiutare a prevenire e/o ridurre la contaminazione della catena alimentare (2).

Le piante possono produrre più di 100000 sostanze, 1700 delle quali sono note per essere volatili. I Composti Organici Volatili (COV) sono in genere classificati sulla base della loro origine. Quelli biotici (COVB) sono metaboliti terminali biologici con forte volatilità, contenenti informazioni bio-importanti collegate al metabolismo biologico (3). Un gran numero di BVOCs sono sintetizzati attraverso alcune vie biosintetiche comuni. Una vasta gamma di composti volatili sono coinvolti nella risposta stress-dipendente all'interno della pianta, nonché nella comunicazione tra le piante e tra le piante e gli insetti. Tuttavia, la pianta infetta può cambiare la sua emissione di volatili a causa sia di stress biotici che abiotici, come risultato di meccanismi di difesa indiretti (4). I COV possono essere, quindi, utilizzati sia come indicatori di attività fungina, sia come marcatori tassonomici per distinguere tra specie fungine e tra i ceppi fungini tossigeni e non tossigeni (5).

Lo scopo di questo studio è stato quello di sviluppare e ottimizzare metodi analitici, sulla base di tecniche analitiche combinate, al fine di identificare i COV prodotti dall'interazione tra le due specie fungine selezionate, *F. graminearum* o *F. culmorum*, e piante di frumento, con l'obiettivo di identificare marcatori di infezione precoce.

## Materiali e metodi

### Ceppi fungini e inoculazione delle piante

L'inoculazione fungina, in condizioni controllate, è stata effettuata su grano duro (*Triticum durum* Desf.) della cultivar Saragolla, poiché suscettibile nei confronti del *Fusarium*. Un campione di cariossidi è stato analizzato per verificare eventuali precedenti contaminazioni. Le cariossidi sono state piantate in vasi utilizzando terreno sterile. Sono stati utilizzati ceppi di *F. graminearum* ITEM 126 e *F. culmorum* ITEM 11007 della collezione fungina dell'Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA) di Bari, per inoculare terreno, semi e, successivamente, le piante, in diversi stadi di crescita, secondo la scala BBCH (*Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt* and Chemical industry): 12, seconda foglia aperta (1: Sviluppo fogliare); 29, fine accestimento (2: Accestimento); 45, rigonfiamento molto ben individuabile nella zona attorno alla guaina della foglia a bandiera (4: Botticella); 61, inizio fioritura: prime antere visibili (6: Fioritura). Le piante sono state coltivate in una camera climatica, in condizioni controllate di temperatura, umidità, ventilazione e illuminazione.

Le sospensioni dei due funghi selezionati, *F. graminearum* e *F. culmorum*, utilizzate per l'inoculo, sono state preparate come segue: colture fungine in substrato liquido (SNA) sono state incubate a 25°C sotto agitazione costante (200 rpm) per 10 giorni. Dopo il periodo di incubazione, i macroconidi sono stati raccolti mediante filtrazione, attraverso due strati di garza sottile sterile. Le spore sono state ri-sospese in acqua distillata sterile ad una concentrazione finale di 5000 spore/mL, e le colture liquide finali sono state conservate in frigorifero alla temperatura di 4°C. Per conservare e mantenere vivi i funghi, essi sono stati trasferiti su piastre Petri, contenenti PDA (Patata/Destrosio/Agar) come terreno di coltura; le piastre sono state conservate a 23°C e periodicamente rinfrescate.

### Analisi chimiche

È stato utilizzato un metodo analitico basato su microestrazione in fase solida nello spazio di testa (HS-SPME) e gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS). Sono state testate tre fibre SPME: polidimetilsilossano (PDMS) 7 µm, polidimetilsilossano (PDMS) 100 µm e poliacrilato (PA) 85 µm. Le fibre sono state pre-condizionate in base alle istruzioni del fabbricante, e ricondizionate prima di ogni analisi. In definitiva, per questo studio, si è scelto di utilizzare fibre SPME con rivestimento di polidimetilsilossano (PDMS), di spessore 100 µm e 23 gauge. I campioni e i controlli, sono stati trasferiti in una vial di vetro da 20 mL e riscaldati a 40°C per 10 min prima dell'esposizione della fibra SPME nello spazio di testa. Sono stati applicati tempi di campionamento/estrazione di 30 min. Il sistema GC-MS consisteva in un gascromatografo munito di autocampionatore Multi Purpose Sampler (MPS), accoppiato con un selettore di massa a quadrupolo (MSD). Le iniezioni sono state effettuate in modalità splitless utilizzando un iniettore *Solid Phase Micro Extraction* (SPME), (ID 0,75 mm) a 250°C per 660 s. Gli analiti desorbiti termicamente dalla fibra sono stati separati con una colonna HP-INNOWax (60 m × 0,25 mm ID e 0,25 µm di spessore del film). Come gas di trasporto è stato

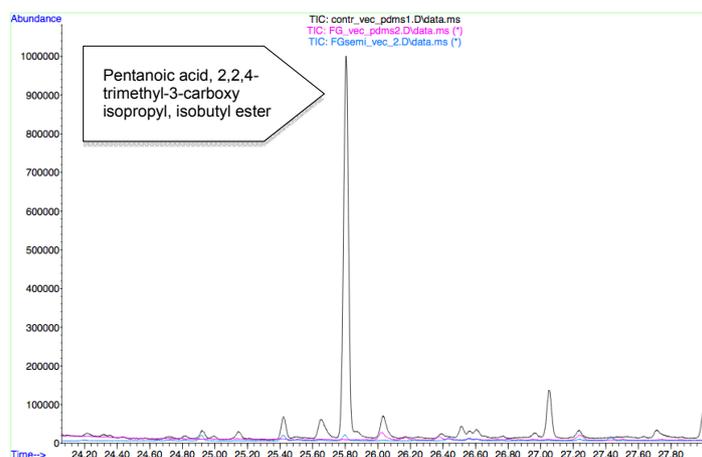
utilizzato elio con un flusso totale di 1,2 mL/min. I parametri del forno sono stati i seguenti: temperatura iniziale, 40°C per 1,0 min, poi programmato per aumentare fino a 230°C ad una velocità di 6°C/min e mantenuta a 230°C per 15 min prima di ritornare al valore iniziale di 40°C. Il tempo di ciclo totale è stato di 47,67 min. Il rivelatore MS è stato impostato in modalità di impatto elettronico a 70 eV e gestito in modalità di scansione (intervallo di massa 46-350 amu); la linea di trasferimento al sistema MS è stata mantenuta a 250°C.

Per monitorare la diffusione del fungo, sono state analizzate differenti parti di pianta, a seconda della fase fenologica di campionamento. Le foglie: 1: Sviluppo fogliare; 2: Accestimento; 4: Botticella; 6: Fioritura; 7: Sviluppo della spiga; 8: Riempimento granella; 9: Senescenza. Le spighe: 6: Fioritura; 7: Sviluppo della spiga; 8: Riempimento granella; 9: Senescenza.

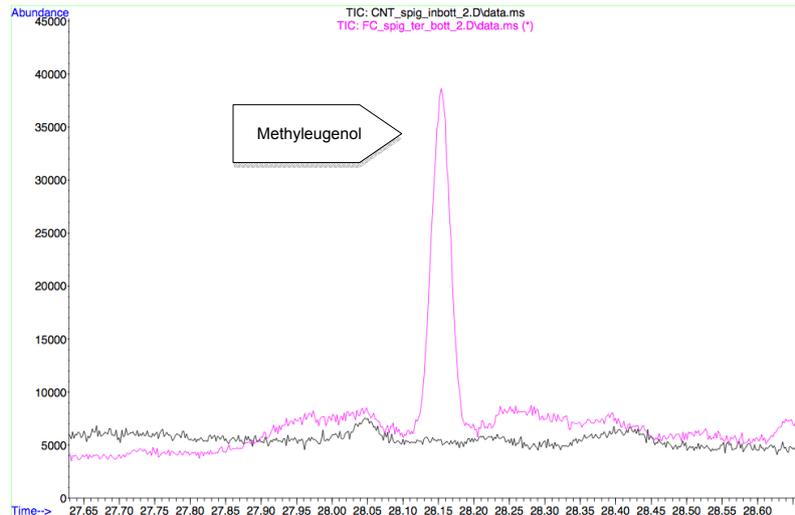
L'identificazione dei picchi è stata effettuata utilizzando la libreria NIST 11. Piante sane e infette sono state confrontate in termini di produzione di COV. Oltre all'analisi dei COV, è stato valutato il grado di contaminazione fungina re-isolando i ceppi fungini dalle piante di frumento.

## Risultati e discussione

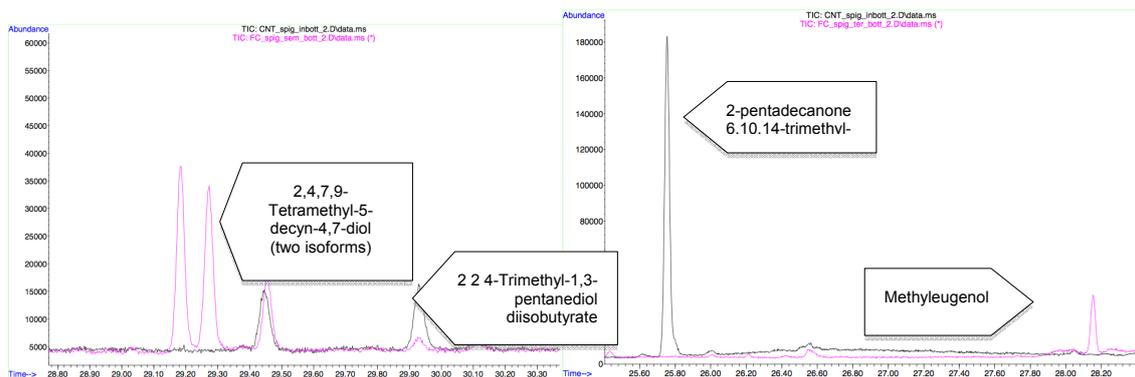
L'elaborazione dei cromatogrammi e degli spettri di massa, ottenuti dalle analisi, ha mostrato differenze significative nella componente volatile delle piante in diverse fasi di crescita. A seconda della specie fungina impiegata per l'infezione, sono state osservate altre differenze, non solo in termini di presenza/assenza di determinati COV, ma anche in termini di sostanze diversamente espresse. In particolare, la presenza/assenza di alcuni composti dipende dallo stadio di inoculo e risulta essere specie-specifica nell'interazione tra piante di frumento e *F. graminearum* (Figura 1) o *F. culmorum* (Figure 2-3).



**Figura 1. Dettaglio di un profilo gas-cromatografico da microestrazione in fase solida nello spazio di testa di volatili rilasciati da frumento non inoculato (nero) e inoculato con *F. graminearum*. Sono riportati due diversi tipi di inoculazione: sui semi (blu) e sulle foglie nella fase fenologica di accestimento (rosa)**

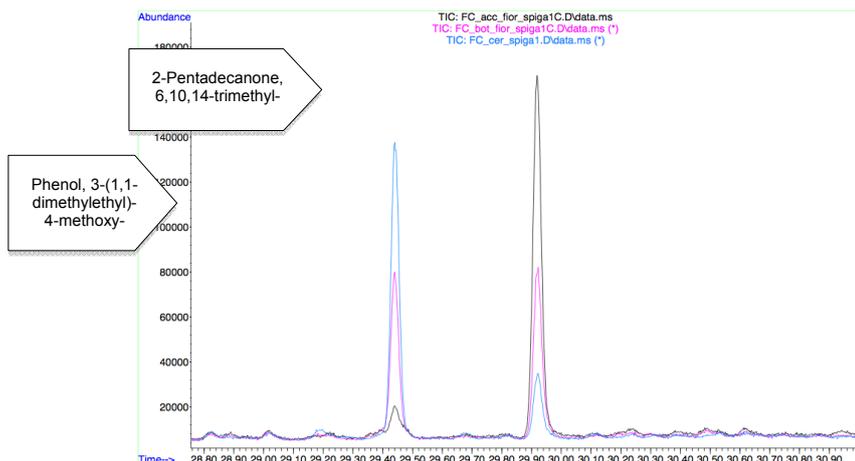


**Figura 2. Dettaglio di un profilo gas-cromatografico da microestrazione in fase solida nello spazio di testa di volatili rilasciati da spighe di grano non inoculate (nero) e inoculate (rosa) con *F. culmorum* nella fase fenologica di botticella**



**Figura 3. Dettaglio di due profili gas-cromatografici da microestrazione in fase solida nello spazio di testa di volatili rilasciati da spighe di grano non inoculate (nero) e inoculate (rosa) con *F. culmorum* nella fase fenologica di botticella**

L'aumento o diminuzione della produzione di alcuni composti da parte delle piante, infettate in diverse fasi fenologiche di crescita, è mostrato in Figura 4, dove è evidente la variazione della concentrazione di specifici COV.



**Figura 4. Dettaglio di un profilo gas-cromatografico da microestrazione in fase solida nello spazio di testa di volatili rilasciati da spighe di grano inoculate con *F. culmorum* in tre differenti fasi fenologiche: accestimento (nero), botticella (rosa) e fioritura (blu)**

## Conclusioni

Per l'elaborazione dei dati saranno impiegati approcci statistici convenzionali e avanzati (es. ANOVA, *Analysis of VAriance*; PCA, *Principal Component Analysis*; LDA, *Linear Discriminant Analysis*), al fine di ottenere informazioni sui potenziali biomarcatori di contaminazione fungina precoce, prima dell'effettivo verificarsi di livelli rivelabili di micotossine. L'approccio sviluppato in questo studio ha fornito risultati promettenti, dimostrandosi un buono strumento per prevedere il potenziale di accumulazione di DON, rilevando composti organici volatili prodotti nell'interazione tra piante di frumento e le due specie fungine *F. graminearum* e *F. culmorum*, anche nelle fasi iniziali di infezione.

## Bibliografia

1. Mattsson JL. Mixtures in the real world: the importance of plant self-defense toxicants, mycotoxins and the human diet. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2007;223:125-32.
2. Girotti JR, Malbrán I, Lori GA, Juárez MP. Early detection of toxigenic *Fusarium graminearum* in wheat. *World Mycotoxin Journal* 2012;5(2):143-52.
3. Zhang Z, Ma Y, Li G. Progress on the analytical methodology for biological volatile organic compounds. *Analytical Methods* 2013;5:20-9.
4. Holopainen JK. Multiple functions of inducible plant volatiles. *Trends in Plant Science* 2004;9:529-33.
5. Magan N, Evans P. Volatiles as an indicator of fungal activity and differentiation between species, and the potential use of electronic nose technology for early detection of grain spoilage. *Journal of Stored Products Research* 2000;36:319-40.

# EFFETTO DEL TRATTAMENTO CON OZONO SULLA CONTAMINAZIONE DA FUNGHI E MICOTOSSINE IN CARIOSIDI DI FRUMENTO

Michelangelo Pascale (a), Giuseppe Panzarini (a), Salvatore Cervellieri (a), Cristina Prisciantelli (a), Vincenzo Lippolis (a), Vanda Ventura (b), Filomena Epifani (a), Giancarlo Perrone (a)  
(a) Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari, Italia  
(b) CDP srl, Altamura, Bari, Italia

## Introduzione

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' (1). 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*) e il suo utilizzo come additivo antimicrobico per il contatto diretto con gli alimenti è stato recentemente approvato dalla *Food and Drug Administration* (2). Recenti studi hanno mostrato come l'ozono sia un efficace agente per il controllo di insetti batteri e funghi filamentosi anche nelle granaglie o per degradare molecole tossiche che possono contaminare i cereali (3-6). In particolare, è stata recentemente dimostrata l'attività fungicida dell'ozono gassoso per ridurre/inibire la crescita di funghi tossigeni del genere *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* e per degradare in soluzione acquosa le principali micotossine che possono contaminare i cereali quali aflatossine, deossinivalenolo (DON), zearalenone e ocratossina A (6-7). Pochi sono gli studi riportati in letteratura che valutano l'effetto dei trattamenti con ozono di cariosidi di frumento naturalmente contaminato da DON (8, 9). Inoltre, sono state evidenziate varie discrepanze riguardo l'efficacia dell'ozono sul controllo di insetti, microrganismi e micotossine e che ulteriori studi sono necessari soprattutto per quanto riguarda la standardizzazione delle condizioni sperimentali (durata del trattamento, umidità del prodotto, concentrazione di ozono, temperatura di trattamento) e le tecniche di applicazione.

Scopo del presente studio è stato quello di valutare l'effetto dei trattamenti con ozono gassoso a diverse concentrazioni e tempi di contatto sulla contaminazione da funghi filamentosi, lieviti e micotossine (in particolare DON 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 cariosidi.

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.

## Materiali e metodi

### Analisi del deossinivalenolo e delle tossine T-2 e HT-2

La determinazione del deossinivalenolo (DON) e delle tossine T-2 e HT-2 sono state effettuate mediante UHPLC (*Ultra-High Performance Liquid Chromatography*) previa purificazione degli estratti con colonnine ad immunoaffinità (10, 11).

## Analisi della contaminazione microbiologica da funghi e lieviti

L'analisi della contaminazione microbiologica (funghi filamentosi e lieviti) è stata effettuata mediante piastramento di un'aliquota della sospensione acquosa opportunamente diluita del campione sfarinato su Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol agar (DRBC) e incubazione per 4-5 giorni a 25°C. La carica fungina è stata espressa in Unità Formanti Colonia (UFC) per grammo di campione.

## Analisi dei parametri di qualità del frumento

Tutti i campioni sono stati analizzati per la determinazione dei seguenti parametri: umidità, contenuto in ceneri, glutine, proteine, amido e fibra, mediante spettroscopia NIR e indice di giallo, mediante colorimetria.

## Prototipo di generatore di ozono

Il prototipo utilizzato per la sperimentazione è costituito da un generatore di ozono gassoso e una camera di miscelazione/contatto dell'ozono gassoso con la matrice da trattare (Figura 1). Il generatore è in grado di produrre 55 g O<sub>3</sub>/h (29 g/m<sup>3</sup>). La camera di miscelazione/contatto dell'ozono gassoso con i prodotti da trattare è dotato di un sistema motorizzato che consente di movimentare i prodotti.



Figura 1. Generatore di ozono in grado di produrre 55 g O<sub>3</sub>/h e camera di miscelazione/contatto motorizzata

## Trattamento dei campioni con ozono

Le cariossidi di frumento (500 g) sono state poste nella camera di miscelazione/contatto e sottoposte al trattamento con ozono a diverse concentrazioni (9,0, 15,4 e 26,1 g/m<sup>3</sup>) per diversi tempi di contatto (2, 8, 12, 24 h). Tutte le prove sperimentali con ozono sono state effettuate in triplicato e i risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti in assenza di trattamento con ozono (controllo).

## Risultati e discussione

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, già a partire dalle 8 ore di contatto, è stata osservata una piccola riduzione del contenuto di DON (fino al 19%), rispetto al controllo non trattato. I trattamenti con ozono a concentrazioni maggiori (26,1 g/m<sup>3</sup>) hanno determinato sia una riduzione significativa della carica microbica a partire dalle 8 ore (da 10<sup>3</sup> a 10<sup>2</sup> per i funghi e da 10<sup>4</sup> a 10<sup>2</sup> per i lieviti), sia una maggiore riduzione del contenuto di DON, fino al 32%, a partire dalle 12 ore di trattamento. In tutti i trattamenti analizzati non è stata invece osservata alcuna variazione significativa del contenuto di tossine T-2 e HT-2. Nelle diverse condizioni sperimentali non sono state osservate variazioni significative dei parametri qualitativi del frumento, in accordo a quanto già riportato in letteratura (12-13). In Tabella 1 sono riportati i risultati dell'effetto dei trattamenti con ozono gassoso a diverse concentrazioni e tempi di contatto sul contenuto di DON in cariossidi di frumento naturalmente contaminato.

**Tabella 1. Riduzione del contenuto di deossinivalenolo (DON) in frumento sottoposto a trattamento con ozono gassoso.**

Concentrazione di ozono (g/m <sup>3</sup> )	Tempi di trattamento (h)	DON in campioni (µg/kg)		Riduzione (%)
		non trattati	trattati	
9,0	2	3615	3680	0
	8	3790	3085	19
	12	4300	3510	18
	24	4150	3595	13
15,4	2	2960	2890	3
	8	3090	2710	12
	12	3050	2660	13
	24	3065	2600	15
26,1	2	3790	3080	19
	8	3415	2740	20
	12	3930	2660	32
	24	3830	2605	32

Il confronto tra i dati riportati in letteratura e i risultati ottenuti in questo studio risulta alquanto difficile a causa del diverso modo di esprimere le concentrazioni di ozono utilizzate nelle varie sperimentazioni. Tutti i risultati evidenziano tuttavia l'efficacia dei trattamenti con ozono nel ridurre/inibire la crescita fungina, mentre l'effetto sulla riduzione del DON dipende principalmente dalla concentrazione dell'ozono e dai tempi di trattamento. Dal confronto con i risultati ottenuti da Li *et al.* (9) si evince come la camera di miscelazione/contatto utilizzata e la rotazione continua della stessa determina un miglioramento dell'efficienza del processo di ozonizzazione nel ridurre il contenuto di DON a causa di un miglior contatto tra ozono e cariossidi di frumento.

## Conclusioni

I risultati ottenuti confermano che i trattamenti con ozono gassoso del frumento duro riducono sia la contaminazione microbica che il contenuto di DON, una micotossina frequentemente ritrovata nel frumento. L'efficacia dei trattamenti è funzione della concentrazione dell'ozono e dei tempi di contatto, con risultati migliori all'aumentare dei valori di questi due parametri.

## Ringraziamenti

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).

## Bibliografia

1. O'Donnell C, Tiwari BK, Cullen PJ, Rice RG (Ed.). *Ozone in food processing*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2012.
2. Secondary direct food additives permitted in food for human consumption. *FDA Federal Register* 2001;66(123):33829-30.
3. Magan N, Aldred D. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology* 2007;119:131-9.
4. Jian F, Jayas DS, White NDG. Can ozone be a new control strategy for pest of stored grain? *Agricultural Research* 2013; 2(1):1-8.
5. Savi GD, Scussel VM. Effects of ozone gas exposure on toxigenic fungi species from *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium* genera. *Ozone, Science & Engineering* 2014;36:144-52.
6. McKenzie KS, Sarr AB, Mayura K, Bailey RH, Miller DR, Rogers TD, Norred WP, Voss KA, Plattner RD, Kubena LF, Philipps TD. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food Chemical Toxicology* 1997; 35:807-20.
7. Young JC, Zhu H, Zhou T. Degradation of trichothecene mycotoxins by aqueous ozone. *Food and Chemical Toxicology* 2006; 44:417-424.
8. Savi GD, Piacentini KC, Bittencourt KO, Scussel VM. Ozone treatment efficiency on *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol degradation and its affect on whole wheat grains (*Triticum aestivum* L.) quality and germination. *Journal of Stored Products Research* 2014;59:245-53.
9. Li MM, Guan EQ, Bian K. Effect of ozone treatment on deoxynivalenol and quality evaluation of ozonised wheat. *Food Additives & Contaminants* 2014;14:1-10.
10. Pascale M, Panzarini G, Powers S, Visconti A. Determination of deoxynivalenol and nivalenol in wheat by ultra-performance liquid chromatography/photodiode-array detector and immunoaffinity column cleanup. *Food and Analytical Methods* 2014; 7:555-62.
11. Pascale M, Panzarini G, Visconti A. Determination of HT-2 and T-2 toxins in oats and wheat by ultra-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Talanta* 2012;89:231-6.
12. Dubois M, Coste C, Despres AG, Efstathiou T, Nio C, Dumont E, Parent-Massin D. Safety of Oxygreen, an ozone treatment on wheat grains. Part 2. Is there a substantial equivalence between Oxygreen-treated wheat grains and untreated wheat grains? *Food Additives and Contaminants* 2006;23:1-15.
13. Sandhu HPS, Manthey FA, Simsek S. Ozone gas affects physical and chemical properties of wheat (*Triticum aestivum* L.) starch. *Carbohydrate Polymers* 2012;87:1261-8.

# PROPOSTE DI LINEE GUIDA PER IL CONTROLLO DELLE MICOTOSSINE NEI CEREALI

Amedeo Reyneri (a), Giampaolo Bruno (a), Carlotta Balconi (b), Maria Grazia D'Egidio (c), Sabrina Locatelli (b)

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

(b) *Unità di ricerca per la maiscoltura, Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Bergamo*

(c) *Unità di ricerca per la valorizzazione qualitativa dei cereali, Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Roma*

## Introduzione

Negli ultimi anni le granelle di frumento e mais sono state oggetto di una serie di stagioni produttive caratterizzate da elevate contaminazioni da micotossine. Tali contaminazioni sono causa di significative difficoltà commerciali che determinano una riduzione apprezzabile della redditività di tutte le componenti della filiera. Infatti, recentemente le borse merci principali nazionali hanno inserito nei listini voci che evidenziano limiti commerciali di impiego (food, feed ed energia) in relazione al contenuto in micotossine.

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 l'importante 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, che ovviamente non possono essere controllati, tali pratiche possono essere impostate in modo da ridurre, se non ostacolare la proliferazione delle muffe tossigene (1, 2). In tal senso sono proposte le Linee Guida (LG) per mais e frumento duro e tenero con lo scopo di indicare i percorsi colturali che possono ridurre la probabilità di incorrere in elevate contaminazioni. Tali LG sono state impostate considerando che queste possono essere impiegate come base per costruire mirati Disciplinari di Produzione sia a livello locale sia a supporto di contratti di fornitura per le filiere integrate di produzione. Nel presente articolo è descritta l'impostazione delle LG e ne vengono presentati alcuni esempi, rimandando alla stesura più completa delle LG stesse (3).

## Impostazione

Con lo scopo di rendere più chiare e ampliare il contesto della loro applicazione, le LG sono organizzate in 4 parti distinte per il mais e quindi per il frumento (tenero e duro):

– *Misure*

È l'elenco ragionato delle misure per la gestione e il controllo delle micotossine. In questo sono evidenziate la motivazione del rischio e le condizioni di criticità, l'efficacia e, infine, le strategie e le azioni di controllo;

- *Percorsi produttivi*  
Sono descritti cronologicamente la sequenza delle misure da porre in atto durante il ciclo colturale, le strategie e le azioni di controllo, evidenziando le interazioni tra le diverse misure;
- *Livello di rischio*  
È la valutazione del potenziale grado di contaminazione a seguito di definite condizioni agronomiche di applicazione di una sequenza di misure;
- *Applicativo*  
“Valutazione rischio micotox” è la guida all’utilizzo di un applicativo per computer, tablet e smartphone appositamente messo a punto per prevedere il rischio di contaminazione da micotossine su mais e frumento.

Nella versione attuale le LG riguardano le seguenti micotossine: su frumento il deossinivalenolo (DON); su mais le aflatossine, le fumonisine, il DON e lo zearalenone.

## Risultati e discussione

La rilevanza delle diverse misure è riassunta in Tabella 1. Queste sono classificate come molto rilevanti se di natura sistemica, elevata se di frequente efficacia, significativa se svolge un certo ruolo quando accompagna altre misure e, infine, bassa quando è in genere ininfluente.

**Tabella 1. Livello atteso di efficacia della misura e commento che ne spiega la rilevanza**

<b>Efficacia della misura</b>	<b>Commento</b>
Molto elevata	Misura della massima importanza per la sistematicità degli effetti anche se non è accompagnata da altre misure
Elevata	Misura frequentemente efficace e in grado di ridurre in modo rilevante la contaminazione
Significativa	Misura sovente efficace quando è accompagnata da altre misure di efficacia elevata
Bassa	Misura talvolta influente, ma comunque di effetto ridotto sulla contaminazione

Nella Tabella 2 è riportata a titolo di esempio uno schema di percorso produttivo riguardante la contaminazione da DON nel frumento tenero e duro.

Lo schema segue l’evoluzione dello sviluppo della coltura evidenziando la sequenza delle fasi colturali più critiche nei riguardi dell’attacco delle muffe tossigene e quindi dell’accumulo delle micotossine. Per ogni coltura citata e per le diverse tossine sono quindi proposti i diversi percorsi produttivi.

Un esempio dell’esposizione al rischio è riassunto nella Tabella 3 dove è riportato il livello atteso in relazione all’andamento meteorologico per la contaminazione da DON nel frumento duro e tenero. Da questa “griglia” è possibile notare che, a seconda della combinazione delle pratiche poste in atto nel corso del percorso produttivo, i livelli di rischio individuati sono complessivamente 8: dal valore 1 (trascurabile) che si presenta solo sporadicamente in casi di eventi calamitosi, al valore 8 (molto grave) che si manifesta in tutte le annate fino ad ora osservate nei nostri ambienti nazionali di coltivazione.

**Tabella 2. Esempio di percorso produttivo: il caso del frumento duro e tenero e l'accumulo di DON**

Agrotecnica e stadio culturale	Strategie e azioni per il controllo
Scelta varietà, avvicendamento, lavorazione del suolo	Privilegiare gli avvicendamenti che fanno seguire il frumento a colture che lasciano pochi residui. Curare la sistemazione del terreno per evitare ristagni che inducono stress e sviluppo di <i>Fusarium</i> nelle parti vegetative. Interrare completamente i residui culturali con le lavorazioni. Scegliere varietà tolleranti o mediamente tolleranti alla fusariosi della spiga. Impiegare esclusivamente seme conciato con fungicida.
Accestimento	Eseguire una tempestiva lotta alle erbe infestanti. Intervenire tempestivamente con le concimazioni azotate in copertura al fine di favorire un accestimento adeguato.
Fioritura	Eseguire il trattamento fungicida per la difesa dalla fusariosi (fra gli stati di inizio fioritura e lo stadio di 30% di antere emesse). Applicare il fungicida con levati volumi d'acqua (400 l/ha) ad almeno 12h dalla pioggia.
Maturazione	Eseguire la raccolta appena completata la maturazione.

**Tabella 3. Griglia di esposizione probabile al rischio di incorrere in contaminazioni in relazione al percorso produttivo seguito (è riassunta una parte della griglia relativa alla contaminazione da DON nel frumento duro e tenero)**

Gestione dei residui		Sensibilità varietale	Trattamento fusaricida	Livello di rischio	
Precessione	Lavorazioni			Condizioni meteo asciutte	Condizioni meteo piovose
Cereali a paglia e altre colture dicotiledoni	Aratura	MT	Specifico	1	1
			Ampio spettro	1	2
			No	1	3
		S	Specifico	2	3
			Ampio spettro	2	3
			No	3	4
	Minima lavorazione e semina su sodo	MT	Specifico	1	4
			Ampio spettro	1	5
			No	2	6
			Specifico	3	5
			Ampio spettro	3	6
			No	4	7

Nelle LG (3) sono distintamente riportate 4 “griglie” di esposizione al rischio: DON per frumento duro e tenero; aflatossine, fumonisine e DON assieme allo zearalenone per il mais da granella.

Come appare probabile, le LG riassunte possono esercitare un probabile controllo anche sulle micotossine nuove o emergenti nel caso in cui i funghi tossigeni presentino un comportamento ecologico simile a quello delle muffe che producono le tossine citate (4).

## Conclusioni

La frequenza con cui nei cereali, e in particolare nei lotti nazionali si presentano elevate contaminazioni da micotossine rende quindi urgente e necessario estendere al più ampio numero di realtà produttive, le corrette pratiche colturali che possono contribuire a contenere tali contaminazioni. Le 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 (Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali) nel quadro del Piano Cerealicolo Nazionale.

Data la complessità dei fattori che influenzano le contaminazioni, le LG presentano un approccio necessariamente sistemico attraverso percorsi produttivi basati sull’applicazione di una serie di misure nel corso di tutte le fasi del ciclo colturale. D’altra parte, le muffe tossigene che colpiscono l’organo fiorale 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. La complessità rende particolarmente utile lo sviluppo di un’applicazione per telefoni cellulari e computer per fornire in ogni luogo una pronta risposta alla domanda di impostazione di un percorso che garantisca una migliore sanità della granella.

## Bibliografia

1. Blandino M, Reyneri A, Colombari G, Pietri A. Comparison of integrated field programmes for the reduction of fumonisin contamination in maize kernels. *Field Crop Res* 2009;111:284-9.
2. Blandino M, Haidukowski M, Pascale M, Plizzari L, Scudellari D, Reyneri A. Integrated strategies for the control of Fusarium head blight and deoxynivalenol contamination in winter wheat. *Field Crop Res* 2012;133:139-49.
3. Reyneri A, Bruno G, D’Egidio MG, Balconi C. (Ed.). *Linee guida per il controllo delle micotossine nella granella di mais e frumento*. Roma: Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali; 2015.
4. Scarpino V, Reyneri A, Sulyok M, Krska R, Blandino M. Effect of fungicide application to control Fusarium head blight and 20 Fusarium and Alternaria mycotoxins in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *World Mycotoxin Journal* 2015;8(4):499-510.

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

Lorella Rossi (a), Mariangela Soldano (a), Sergio Piccinini (a), Amedeo Pietri (b)

(a) *Centro Ricerche Produzioni Animali, Reggio Emilia, Italia*

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

## Introduzione

Gli esperti del settore stimano che i cambiamenti climatici porteranno a variazioni anche rilevanti nella presenza di funghi tossigeni nei cereali; le misure preventive messe in atto negli ultimi anni, anche se costantemente aggiornate (linee guida, modelli previsionali, biocontrollo) potrebbero non essere sufficienti per ottenere un prodotto a norma di legge. In Emilia-Romagna la campagna 2012, a causa delle condizioni climatiche estreme, è stata di esempio in questo senso; quote rilevanti di mais sono risultate non conformi per il contenuto dell'aflatossina AFB<sub>1</sub>, con grosse difficoltà degli operatori del settore. L'individuazione di una strada alternativa di impiego per le partite di farine "non conformi" per l'uso zootecnico è stata ritenuta prioritaria dalla Regione Emilia-Romagna, per dare risposte concrete ai produttori agricoli da un lato e dall'altro evitare comportamenti non corretti con ritorno nel circuito mangimistico di tali flussi. Per tale motivo la Regione Emilia-Romagna ha finanziato con Deliberazione della Giunta Regionale 21 maggio 2013, n. 645 Legge Regionale 28/1998 il progetto di ricerca "Biogas, micotossine e clostridi", di cui si espongono i risultati.

## Materiali e metodi

Lo studio del comportamento delle aflatossine durante il processo di digestione anaerobica e il loro eventuale accumulo è stato condotto utilizzando l'impianto di digestione anaerobica sperimentale realizzato da CRPA Lab (Centro Ricerche Produzioni Animali), che consente di simulare in scala di laboratorio il processo biologico messo in atto in scala reale e valutare i rendimenti energetici effettivamente ottenibili, grazie allo stretto controllo di tutti i parametri di processo.

La metodologia applicata presso il laboratorio di CRPA Lab utilizza mini-digestori alimentati in continuo, del volume di 24 dm<sup>3</sup>, miscelati e riscaldati, con misura della quantità di biogas prodotto tramite sistema manometrico e misura della qualità del biogas tramite un analizzatore a cella infrarosso (NDIR). Giornalmente si esegue il carico delle biomasse (adeguatamente caratterizzate) e lo scarico di digestato e, attraverso specifiche analisi di quest'ultimo, si tiene sotto controllo l'andamento del processo biologico.

Sono stati effettuati 3 cicli di prova, della durata di oltre 55 giorni, utilizzando in contemporanea 3 reattori per testare le 3 tesi (9 miscele in totale) di seguito illustrate:

1. Liguame bovino + silomais + farina mais esente (testimone);
2. Liguame bovino + silomais + farina mais AFLA 1 (AFB<sub>1</sub>: 68 µg/kg)

3. Liquame bovino + silomais + farina mais AFLA 2 (AFB<sub>1</sub>: 296 µg/kg).

I rapporti di miscelazione in termini di peso tal quale (tq) e di apporto di solidi volatili (SV) sono riportati in Tabella 1.

**Tabella 1. Rapporti di miscelazione in peso e in solidi volatili**

Matrici di carico	LB-SM + F_esente		LB-SM + F_AFLA 1		LB-SM + F_AFLA 2	
	[% tq]	[% SV]	[% tq]	[% SV]	[% tq]	[% SV]
Liquame bovino (LB)	45	10	45	10	45	10
Silomais (SM)	45	59	45	59	45	58
Farina mais (F)	10	31	10	31	10	32

La prova è stata avviata introducendo in ciascun reattore 16 kg di digestato provenienti da un impianto di biogas che tratta una miscela di biomasse analoghe, allo scopo di ridurre il periodo di avviamento grazie alla disponibilità di una flora batterica già in parte adattata. I tempi di ritenzione idraulica (HRT) pari a 50 giorni e il carico organico volumetrico compreso tra 3,8-4,0 kg SV/giorno per m<sup>3</sup> di reattore, sono stati definiti tenendo in considerazione le caratteristiche delle matrici e la relativa composizione chimica. Il liquame bovino è la tipologia di effluente zootecnico più comunemente impiegata in co-digestione con biomasse vegetali, in quanto, essendo ricco di micronutrienti, favorisce il giusto equilibrio del processo di digestione anaerobica.

Oltre ai parametri funzionali alla gestione del processo biologico, il piano di monitoraggio ha previsto la determinazione di aflatossine (AFB<sub>1</sub>+AFB<sub>2</sub>) su ripetuti campioni di matrici in ingresso (Tabella 2); la micotossina AFB<sub>2</sub> è risultata presente solo in tracce anche nella farina AFLA<sub>2</sub> (< 6-7 µg/kg). Il contenuto di aflatossine 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).

**Tabella 2. Concentrazioni medie di AFB<sub>1</sub> espresse sulla sostanza secca o solidi totali (ST) nelle matrici al carico**

Matrici di carico	Media (µg/kg ST)	Deviazione standard (µg/kg ST)
Liquame bovino (n=9)	1,95	2,93
Silomais (n=9)	0,08	0,23
Farina esente (n=9)	1,54	1,75
Farina AFLA 1 (n=6)	67,58	10,36
Farina AFLA 2 (n=6)	296,26	73,91

## Risultati

È stato monitorato l'andamento nel tempo del processo biologico e sono state verificate le rese specifiche in biogas e in metano delle tre tesi per oltre 9 settimane. La producibilità in metano è stata regolare ed ha raggiunto valori attesi per le tipologie di matrici impiegate; le farine di mais hanno generato rese in biogas del tutto analoghe, sia quella conforme, sia le due con livelli crescenti di contaminazione in AFB<sub>1</sub> (Figura 1).

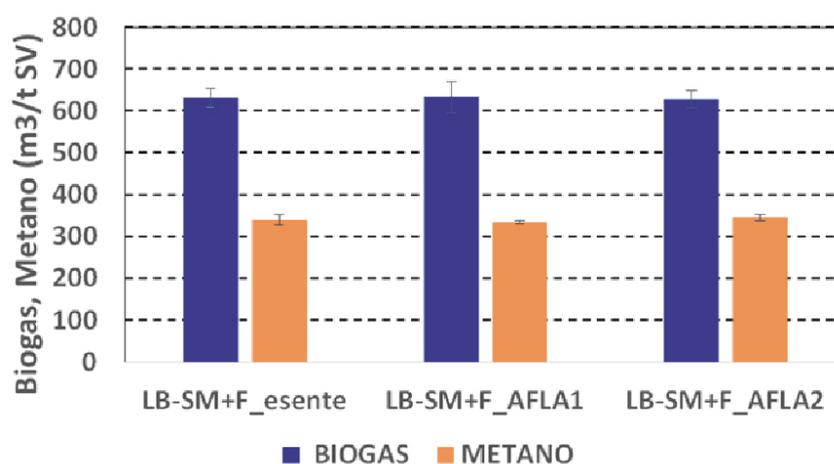


Figura 1. Rese medie specifiche in biogas/metano delle tre tesi

Grazie alla completezza dei dati quali-quantitativi disponibili è stato possibile sia seguire il potenziale accumulo di aflatossine nel tempo, confrontando la concentrazione attesa di aflatossine con quella effettivamente misurata nei digestati, sia eseguire il bilancio di massa complessivo. I risultati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica (procedura ANOVA - misure ripetute-  $p=0,5\%$ ) e il quadro emerso è il seguente. All'interno di ciascuna delle 3 tesi la concentrazione misurata di AFB<sub>1</sub> nei digestati dalla sesta settimana in poi non presenta differenze significative. Sempre dalla sesta settimana le concentrazioni di AFB<sub>1</sub> misurate sono inferiori a quelle attese e le differenze non sono significative nella tesi testimone e in quella AFLA 1, mentre sono significative nella tesi AFLA 2. Le concentrazioni di AFB<sub>1</sub> misurate nei digestati al termine delle prove, protratte per oltre un tempo di ritenzione, sono risultate pari a  $2,9\pm 2,8$  µg/kg ST nella tesi F\_esente, a  $12,3\pm 9,0$  µg/kg ST nella tesi AFLA 1 e a  $7,8\pm 3,0$  µg/kg ST nella tesi AFLA 2. Il bilancio di massa complessivo (Tabella 3) ha evidenziato un chiaro abbattimento in peso di AFB<sub>1</sub> in entrambe le tesi con farina contaminata, compreso tra il 62 e il 98% del peso totale avviato a digestione anaerobica.

Tabella 3. Abbattimento ponderale di AFB<sub>1</sub>, espresso in percentuale, durante il test di digestione anaerobica in mesofilia

Tesi	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Media	Deviazione standard
F_esente	36,2%	0,0%	0,0%	<b>12,1%</b>	20,9%
F_AFLA 1	96,2%	67,7%	62,0%	<b>75,3%</b>	18,3%
F_AFLA 2	98,4%	92,4%	93,4%	<b>94,7%</b>	3,2%

## Conclusioni

L'attività sperimentale ha permesso di verificare che il comportamento in digestione anaerobica di farine contaminate con AFB<sub>1</sub> (sino a 10-20 volte il limite ammesso per uso zootecnico) è del tutto analogo a quello delle farine esenti.

Non sono stati misurati effetti di accumulo; al contrario le concentrazioni di AFB<sub>1</sub> misurate nei digestati sono chiaramente inferiori a quelle attese e, nelle condizioni di prova precisate (farina pari al 10% in peso tal quale della dieta giornaliera), si aggirano su valori inferiori a 10 µg/kg ST anche nella tesi a maggiore contaminazione. La degradazione biologica di AFB<sub>1</sub> risulta evidente dal bilancio di massa complessivo, variabile dal 62 al 98% della quantità totale caricata. I risultati ottenuti confermano quanto emerso da una prima verifica sperimentale condotta presso l'Università di Milano (Salati *et al.*, 2014).

## Bibliografia

- Battilani P, Logrieco A. Global risk maps for mycotoxins in wheat and maize. In: *Mycotoxin reduction in grain chains: a practical guide*. Wiley Blackwell Ed 18 (2014): 309 – 326. Leslie J, Logrieco A (Ed.). *Mycotoxin reduction in grain chains: a practical guide*. Ames, IA: Wiley Blackwell; 2014: p. 309- 326
- Salati S, D'Imporzano G, Panseri S, Pasquale E, Adani F. Degradation of aflatoxin B1 during anaerobic digestion and its effect on process stability. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2014;94(2014): 19-23.
- Vismara R, Canziani R, Malpei F, Piccinini S. Biogas da agrozootecnica e agroindustria. Pubblicato da Dario Flaccovio. 2011. <http://hdl.handle.net/11311/575464>

# BIODEGRADAZIONE DI OCRATOSSINA A DA PARTE DI *TRICHODERMA REESEI*

Priscila Tessmer Scaglioni, Larine Kupski, Eliana Badiale Furlong  
Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Escola de Química e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande, Brasil

## Introduzione

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. Nonostante la prevenzione della produzione di micotossine in piante e alimenti è generalmente considerata come l'approccio migliore per prevenire gli effetti nocivi di micotossine nella salute animale e umana, la decontaminazione dei prodotti agricoli contaminati è anche fondamentale (1). Diverse strategie per questa finalità sono già state studiate, e sono classificate come metodiche fisiche, chimiche e biologiche (2).

Tra questi metodi, nell'ultima decade si è avuto un crescente interesse per i 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 (3). 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, con la conseguente produzione di OT $\alpha$ .

## Materiali e metodi

### Prova di biodegradabilità

Per questa prova, la OTA è stata aggiunta su un mezzo Potato Dextrose Agar (PDA) (concentrazione iniziale uguale a 1,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) ed è stata incubata con una soluzione di spore da *T. reesei* QM 914 contenente 4,10<sup>6</sup> spore mL<sub>mezzo</sub><sup>-1</sup>, a 30°C per 120 h. Nel gruppo di controllo il solvente è stato aggiunto al mezzo, in assenza di micotossina.

La micotossina e i suoi metaboliti sono stati estratti con HCl e cloroformio su agitazione in vortice per 1 minuto. La partizione è stata ripetute tre volte e dopo centrifugazione (3220 x g per 10 min) la frazione con cloroformio è stata evaporata sotto N<sub>2</sub> e i metaboliti sono stati quantificati mediante cromatografia liquida ad alta efficienza con rivelatore a fluorescenza (HPLC-FL, *High Performance Liquid Chromatography with fluorescence*).

## Validazione del metodo di determinazione di OTA e OT $\alpha$

La corsa cromatografica (colonna Kromasil C18 5 $\mu$ m 150 x 4,6 mm) è stata realizzata a 35°C, con un flusso di 0,6 mL min<sup>-1</sup> di fase mobile (50% acetonitrile e 50% acqua milli-Q acidificata 1% con acido acetico), con rivelatore a fluorescenza usando le lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione uguale a 333 nm e 460 nm, rispettivamente. La separazione di OTA e OT $\alpha$  è stata valutata utilizzando il fattore di ritenzione (k) e il fattore di separazione ( $\alpha$ ). Il fattore di ritenzione (k) è stato calcolato attraverso il rapporto tra tempo di ritenzione corretto di ciascuna delle micotossine e il tempo morto. Mentre il fattore di separazione ( $\alpha$ ) è stato determinato dal rapporto  $k_A / k_B$ , sapendo che il soluto B viene più mantenuto nella colonna che il soluto A (4).

Il metodo è stato validato secondo i seguenti parametri analitici: linearità, limite di quantificazione (*Limit of Quantification*, LOQ), limite di rivelabilità (LOD dall'inglese *Limit of Detection*) e recupero (5).

La curva analitica è stata costruita mediante soluzione degli standard di OTA e OT $\alpha$ , che sono state diluite nella miscela di solventi della fase mobile, in concentrazione crescente (0,05 - 20 ng mL<sup>-1</sup>) in triplicato. Sono quindi stati determinati l'intervallo di linearità e i coefficienti di determinazione e correlazione, nella determinazione del LOD e LOQ sono state fatte iniezioni di soluzioni di OTA e OT $\alpha$  diluite nella miscela di solvente della fase mobile in concentrazione decrescente fino a ottenersi una relazione 3:1 e 10:1 rispettivamente per il picco del composto e il rumore della linea di base (6).

## Risultati e discussione

I parametri di validazione per i composti sono riassunti nella Tabella 1. Per l'OTA, il limite di rilevazione è stato 0,05 ng mL<sup>-1</sup> e il limite di quantificazione è stato 0,10 ng mL<sup>-1</sup>. Attraverso l'analisi di regressione lineare è stata determinata la linearità (R = 1,000) nell'intervallo 0,1-10 ng mL<sup>-1</sup>. Per quanto riguarda la OT $\alpha$ , il LOD era 0,025 ng mL<sup>-1</sup>, il LOQ 0,05 ng mL<sup>-1</sup> e la linearità variava da 0,05 a 20 ng mL<sup>-1</sup> (R = 1,000).

Con le condizioni di temperatura e flusso stabiliti in questo studio è stato ottenuto un fattore di ritenzione di 2,1 e 6,8 per l'OT $\alpha$  e l'OTA, rispettivamente, e un fattore di separazione uguale a 3,2. Inoltre, il recupero ha mostrato valori all'interno della gamma ideali per i composti trovati in bassa concentrazione (7).

**Tabella 1. Parametri della validazione del metodo cromatografico**

Parametri	OTA	OT $\alpha$
Equazione della curva	y=11874,62x+1208,54	y=24435,41x+2762,62
Linearità	0,1-10 ng mL <sup>-1</sup>	0,05-20 ng mL <sup>-1</sup>
Coefficiente di correlazione	1,000	1,000
Coefficiente di determinazione	0,998	0,998
Limite di rivelabilità	0,05 ng mL <sup>-1</sup>	0,025 ng mL <sup>-1</sup>
Limite di quantificazione	0,10 ng mL <sup>-1</sup>	0,05 ng mL <sup>-1</sup>
Recupero	78%	102%

Il metodo è stato utilizzato per monitorare il processo di degradazione in vitro di OTA (Figura 1). La massima riduzione della concentrazione di OTA è stata del 58% dopo 72 ore,

rimanendo praticamente costante dopo questo periodo. La presenza di OT $\alpha$  è stata osservata dopo 48 ore di cultura, con la concentrazione massima di 179,6 ng/g 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.

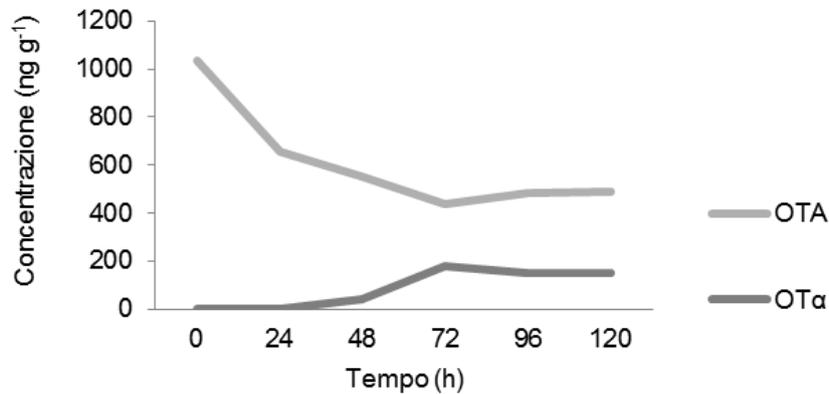


Figura 1. Degradazione di OTA e rilascio di OT $\alpha$

## Conclusioni

Il *Trichoderma reisei* 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 inferiori. Sarà necessario valutare le condizioni operative migliori per ottimizzare la trasformazione di OTA in OT $\alpha$  nei diversi alimenti.

## Bibliografia

1. Varga J, Rigó K, Téren J. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *Int J Food Microbiol* 2000;59:1-7.
2. Varga J, Péteri Z, Tábori K, Téren J, Vágvölgyi C. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. *Int J Food Microbiol* 2005;99:321-8.
3. Abrunhosa L, Venâncio A, Teixeira JA. Optimization of process parameters for the production of an OTA-hydrolyzing enzyme from *Aspergillus niger* under solid state fermentation. *J Biosci Bioeng* 2011;112:351-5.
4. Soares LV. *Curso básico de instrumentação para analistas de alimentos e fármacos*. Baurer (São Paulo): Ed. Manole Ltda; 2006.
5. Kupski L, Badiale-Furlong E. Principal components analysis: An innovative approach to establish interferences in ochratoxin A detection. *Food Chem* 2015;177:354-60.
6. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. *Quím Nova* 2004;27:771-80.
7. European Commission. EC-SANCO/12495/2011. *Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed*. Sweden: European Commission; 2011.

# INIBIZIONE DELLA PRODUZIONE DI TRICOTECENI USANDO COMPOSTI FENOLICI DI *SPIRULINA* SP

Priscila Tessmer Scaglioni (a), Fernanda Arnhold Pagnussatt (b), Eliana Badiale-Furlong (a)  
(a) *Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande, Brasil*  
(b) *Universidade Federal do Rio Grande, Câmpus Santo Antônio da Patrulha, Universidade Federal do Rio Grande, Santo Antônio da Patrulha, Brasil*

## Introduzione

La contaminazione fungina negli alimenti cambia la qualità del prodotto e può anche determinare danni alla salute dei consumatori se sono presenti funghi in grado di accumulare micotossine. I funghi tossigeni più studiati nei cereali sono quelli del genere *Fusarium*, produttori di sostanze teratogeniche, neurotossiche e immunosoppressive, in particolare *F. graminearum*, *F. culmorum* e *F. meridionale* (1). I tricoteceni sono uno dei principali gruppi di micotossine prodotti da *F. graminearum* e *F. culmorum*, tra i quali sono compresi il nivalenolo (NIV) e deossinivalenolo (DON). La produzione di NIV e DON permette la differenziazione degli isolati da *F. graminearum* tra due grandi gruppi chemiotassonomici (2).

Come strategie nel controllo della contaminazione fungina e della presenza di micotossine vengono comunemente applicati fungicidi sintetici, che presentano un rischio di tossicità residuale nelle raccolte e possono produrre dei derivati, causando anche danni cronici del consumatore. Inoltre, il loro impiego può dare luogo allo sviluppo di resistenze con la selezione di individui resistenti (3).

I composti fenolici estratti da piante e fonti microbiche hanno dimostrato la capacità di inibire la crescita di funghi e la produzione di micotossine, inibendo reazioni del metabolismo primario, legato all'ottenimento di nutrienti, produzione di membrane o pareti cellulari, attività respiratoria e differenziazione cellulare (4-6). Questa inibizione della crescita può innescare percorsi metabolici alternativi di difesa dell'ospite contro lo stress del mezzo. Informazioni sulla modifica di queste vie metaboliche sono essenziali prima della purificazione di estratti fenolici, per stabilire una concentrazione per un utilizzo sicuro come misura preventiva o inibitoria della contaminazione micotossicologica in diverse parti della catena alimentare e per consentire il suo utilizzo su larga scala.

Il cianobatterio *Spirulina platensis* è stato classificato come GRAS (*Generally Recognized As Safe*) che assegna ad esso un'attività antifungina dovuta alla presenza di composti fenolici. 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 *F. graminearum* isolati da frumento.

## Materiali e metodi

### Microrganismi e condizioni di crescita per le *Fusarium* spp.

Gli isolati da *Fusarium* usati in questo studio (*F. graminearum* sensu stricto (Fg) 08Tr022 e 08Tr044 e *F. meridionale* (Fm) 07Cv022 e 07tr2010) sono stati ottenuti dalla collezione del

complesso *Fusarium graminearum* del “Laboratório de Epidemiologia de Plantas” UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande). Sono stati selezionati quattro isolati purificati, questi sono stati identificati al livello di specie del complesso e dei tricoteceni prodotti (genotipi 15AcDON o NIV) (7). Le analisi molecolari hanno classificato i due ceppi da Fg come genotipi 15AcDON e da Fm come genotipi NIV.

Le colture sono state inoculate in Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) a 25°C per indurre sporulazione e conservate a 4°C in una provetta inclinata.

La coltivazione dei funghi è stata effettuata su Potato Dextrose Agar (PDA) a 35 °C con un fotoperiodo di 12 ore per 7 giorni per ottenere i dischi di micelio.

## Attività antifungina

L'attività antifungina è stata valutata con l'aggiunta di due concentrazioni predeterminate di 3% (v/v) e 8% (v/v) dell'estratto fenolico, basate sulla concentrazione necessaria per ridurre del 50% la crescita miceliare su terreno PDA (6). Per questo motivo, in piastra di Petri (diametro 10 cm) l'estratto fenolico è stato aggiunto 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.

## Determinazione dei tricoteceni

L'estrazione dei tricoteceni è stata eseguita secondo il metodo QuEChERS (8). Innanzitutto, 4 g di un campione rappresentativo sono stati omogeneizzati con 7,5 mL di acido formico 0,1% (v/v) e 10 mL di acetonitrile, e la miscela è stata agitata vigorosamente per 3 min. Dopo aver aggiunto 1 g di NaCl e 4 g di MgSO<sub>4</sub>, la miscela è stata agitata e centrifugata (5 min, 3220 x g), 1 mL di surnatante è stato evaporato sotto N<sub>2</sub> e risospeso in 1 mL di acetonitrile grado HPLC (JTBaker) per l'analisi cromatografica.

La quantificazione di NIV, DON, 3-ADON e 15-ADON è stata effettuata utilizzando il metodo dello standard esterno. Gli standard acquisiti da Sigma Chemicals Co® sono stati diluiti a 20 µg mL<sup>-1</sup> per costruire la curva di calibrazione. È stato utilizzato un HPLC con rivelatore UV-visibile e colonna Discovery® Bio Wide Pore (C18, 25 cm x 4,6 mm, 10 µm, Supelco). La lunghezza d'onda utilizzata era di 219 nm. La fase mobile era acqua (A): metanolo (B), in modalità di gradiente, partendo da 88% A e 12% B per 8 min. Da 9 min a 18 min, la concentrazione di B è stata aumentata al 100%. In 19 minuti il gradiente è ritornato al 88% A e 12% di B fino a 27 min. Il flusso era di 1 mL min<sup>-1</sup> con volume di iniezione di 20 µL.

## Risultati e discussione

Il recupero del metodo impiegato per la determinazione dei tricoteceni è stato del 122% ± 2% e del 106% ± 13% per NIV e DON e acetilati rispettivamente. Data l'esistenza dell'effetto matrice, sono stati fissati i livelli di alcune micotossine.

Gli acidi fenolici presenti in *Spirulina* hanno alterato la via di sintesi di alcuni tricoteceni; nel testimone, l'isolato Fm 07Tr210 ha prodotto 30,2 µg/g di NIV, mentre con la più alta concentrazione di estratto fenolico, la produzione è stata ridotta a 0,6 µg/g, evidenziando una riduzione del 98% (Tabella 1). In media, gli isolati di *F. graminearum* hanno prodotto 31 µg/g

di 15-ADON nel testimone, mentre con l'estratto fenolico la produzione è stata ridotta a 7 µg/g, con una attività inibitoria media del 77% (Tabella 2).

**Tabella 1. Produzione di NIV da parte degli isolati *F. meridionale* 07Tr210 e *F. meridionale* 07Cv022**

Esperimento	NIV (µg/g)*	
	07Tr210	07Cv022
Testimone	30,2 (±3,0) <sup>a</sup>	59,8 (±14,2) <sup>a</sup>
Estratto fenolico 3%	1,0 (±0,5) <sup>b</sup>	7,6 (±0,3) <sup>b</sup>
Estratto fenolico 8%	0,6 (±0,3) <sup>b</sup>	14,6 (±3,5) <sup>b</sup>

\*Valori medi del test eseguito in triplicato ± deviazione standard.

<sup>a,b</sup> Stesse lettere nella stessa colonna indicano che non vi era alcuna differenza statistica ( $p > 0,05$ ).

**Tabella 2. Produzione di DON e forme acetilate (15ADON e 3ADON) (µg/g)\* da parte degli isolati *F. graminearum* 08Tr022 e *F. graminearum* 08Tr044**

Esperimento	08Tr022			08Tr044		
	DON	15ADON	3ADON	DON	15ADON	3ADON
Testimone	1,9 (±0,1) <sup>ab</sup>	28,6 (±0,1) <sup>a</sup>	8,1 (±0,9) <sup>a</sup>	1,3 (±0,3) <sup>a</sup>	34,5 (±3,0) <sup>a</sup>	1,6 (±0,3) <sup>b</sup>
Estratto fenolico 3%	1,6 (±0,1) <sup>b</sup>	6,4 (±0,2) <sup>b</sup>	1,4 (±0,1) <sup>b</sup>	1,7 (±0,3) <sup>a</sup>	6,8 (±1,0) <sup>b</sup>	1,7 (±0,4) <sup>b</sup>
Estratto fenolico 8%	2,1 (±0,1) <sup>a</sup>	6,1 (±0,1) <sup>b</sup>	1,4 (±0,01) <sup>b</sup>	1,3 (±0,2) <sup>a</sup>	7,4 (±1,9) <sup>b</sup>	6,8 (±1,0) <sup>a</sup>

\*Valori medi del test eseguito in triplicato ± deviazione standard.

<sup>a,b</sup> Stesse lettere nella stessa colonna indicano che non vi era alcuna differenza statistica ( $p > 0,05$ ).

L'applicazione dell'estratto fenolico è stata meno efficace per inibire la produzione di 3-ADON. Per entrambi gli isolati fungini, l'efficacia è risultata essere simile anche quando è stata utilizzata una minore concentrazione di estratto fenolico. Al contrario l'effetto sul contenuto in DON è risultato meno evidente.

Ogni percorso metabolico richiede l'espressione di una proteina carrier e una rete di geni regolatori e ogni chemotipo codifica proteine specifiche. La sintesi dei tricoteceni comprende la ciclizzazione dell'anello sesquiterpene, catalizzata dall'enzima tricodieno sintasi, seguita da otto ossigenazioni e quattro esterificazioni. Questa sequenza porta alla formazione delle strutture di base come DON, NIV e i suoi acetilati (9). Gli isolati utilizzati in questo studio sono stati classificati come chemotipo NIV o 15AcDON ed erano sensibili agli effetti inibitori ad un certo punto di questa via, probabilmente a causa della complessazione della proteina carrier con il composto fenolico.

## Conclusioni

Questi risultati supportano l'idea che la miscela di acidi fenolici presenti nell'estratto da *Spirulina* eserciti un effetto sul metabolismo microbico, soprattutto in relazione alla sintesi del NIV (inibizione media di 93%), 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 prodotti da specie di *Fusarium* che comunemente attaccano i cereali.

## Bibliografia

1. Sampietro DE, Ficooseco MEA, Jimenez CM, Vattuone MA, Catalán CA. Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* complex strains isolated from maize fields of northwest Argentina. *Int J Food Microbiol* 2012;153:229-33.
2. Lee T, Han Y, Kim K, Yun S, Lee Y. Tri13 and tri7 determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:2148-54.
3. Dors GC, Bierhals VS, Badiale-Furlong E. Parboiled rice: chemical composition and the occurrence of mycotoxins. *Ciênc Tecnol Aliment* 2011;31(1):172-7.
4. Souza MM, Prieto L, Ribeiro AC, Souza TD, Badiale-Furlong E. Assesment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. *Ciênc Agrotec* 2011;35:1050-8.
5. Dambolena JS, López AG, Meriles JM, Rubinstein HR, Zygadlo JA. Inhibitory effect of 10 natural phenolic compounds on *Fusarium verticillioides*. A structure property activity relationship study. *Food Control* 2012;28:163-70.
6. Pagnussatt FA, Kupski L, Darley FT, Filoda PF, Del-Ponte EM, Garda-Bufferon J, Badiale-Furlong E. *Fusarium graminearum* growth inhibition mechanism using phenolic compounds from *Spirulina* sp. *Ciênc Tecnol Alimen* 2012;32(1):1-6.
7. Astolfi P, Santos J, Schneider L, Gomes LB, Silva CN, Tessmann DJ, Del-Ponte EM. Molecular survey of trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* species complex from barley in Southern Brazil. *Int J Food Microbiol* 2011;148:197-201.
8. Zachariasova M, Lacina O, Malachova A, Kostelanska M, Poustka P, Godula M, Hajslova J. Novel approaches in analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals employing ultra-performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2010;662:51-61.
9. Garda J, Baraj E, Badiale-Furlong E. Effect of the trichothecenes DON and T-2 toxin in malt aminolytic enzymes activity. *Braz Arch Biol Technol* 2010;53:505-11.

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

Valentina Scarpino (a), Massimo Blandino (a), Federico Marinaccio (a), Amedeo Reyneri (a), Michael Sulyok (b)

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

(b) Centre for Analytical Chemistry, Department for Agrobiotechnology (IFA-Tulln), Tulln, Austria

### Introduzione

La *Fusarium head blight* (FHB) è una delle principali malattie che colpiscono il frumento causando la contaminazione delle *Fusarium*-tossine, come il deossinivalenolo (DON).

Sebbene oggi solo poche tossine, tra cui il DON, siano soggette a limiti legislativi e a regolare monitoraggio nell'ambito delle filiere produttive, queste rappresentano solo una parte delle circa 400 micotossine conosciute e identificate finora. Per questa ragione, le micotossine che non hanno ancora ricevuto una dettagliata attenzione scientifica sono comunemente indicate come "nuove" o "emergenti" (1).

Oggi, sono carenti informazioni sul ruolo della FHB nei riguardi di tali contaminanti, verso i quali è crescente l'attenzione dell'European Food Safety Agency (EFSA) in relazione al loro impatto sulla salute umana e animale.

L'obiettivo di questo studio è quello di valutare l'effetto dell'agroecologia e in particolare dell'applicazione fungicida all'antesi per il controllo della FHB, delle lavorazioni del terreno e della suscettibilità varietale sulla contaminazione da micotossine emergenti nel frumento (Figura 1).

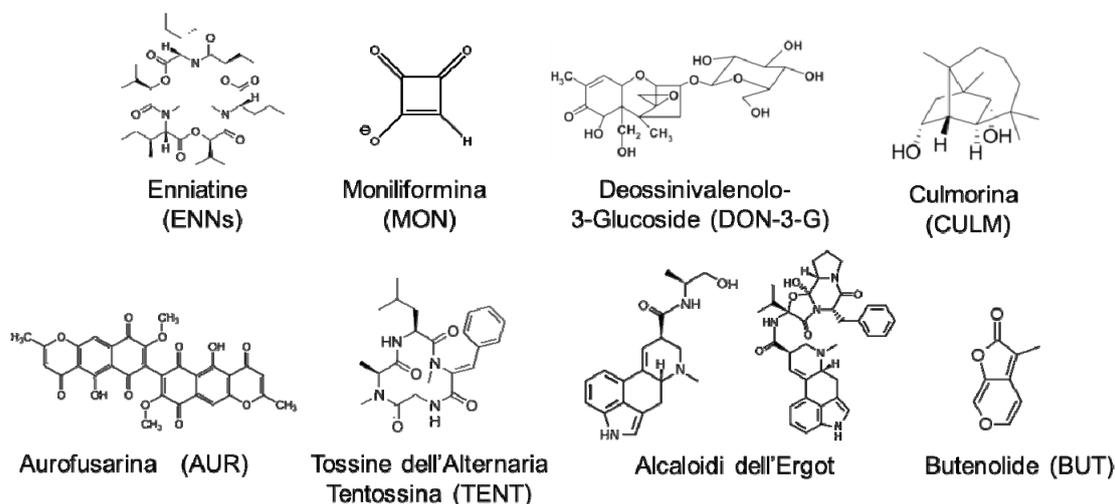


Figura 1. Micotossine emergenti nel frumento piemontese

## Materiali e metodi

A questo scopo 4 esperimenti (A, B, C e D) 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. 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) nel triennio 2011-2013. Infine, è stata esaminata nel corso del biennio 2012-2013 l'influenza della lavorazione del terreno, confrontando la semina su sodo con pratiche di minima lavorazione e di semina su terreno arato.

### Estrazione e *clean-up*

Durante la fase estrattiva 5 g di sfarinato di frumento sono stati estratti con 20 mL di CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH 79:20:1 (v/v/v) e posti in agitazione in un agitatore orbitale per 90 min. Il surnatante è stato successivamente diluito 1:1 con una soluzione di CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH 20:79:1 (v/v/v) e sottoposto ad analisi UPLC-MS/MS (*Ultra Performance Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrography*) multi-micotossina.

### Analisi UPLC-MS/MS Multi-micotossina

I campioni estratti sono stati analizzati con un metodo multitossina mediante l'impiego di un sistema LC-MS/MS (*Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrography*) ibrido Qtrap 5500 equipaggiato con una sorgente di ionizzazione ESI (*Electrospray ionization*) e un Sistema UPLC, in grado di quantificare simultaneamente 295 diversi metaboliti batterici e fungini, tra cui le micotossine emergenti (2).

## Risultati e discussione

In seguito all'applicazione del metodo UPLC-MS/MS multi-micotossina sono state rilevate circa 15 micotossine, tra cui: enniatine (ENN), aurofusarina (AUR), moniliformina (MON), tentossina (TENT), deossinivalenolo (DON), deossinivalenolo-3-glucoside (DON-3-G), culmorina (CULM), zearalenone (ZEA) e nivalenolo (NIV).

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 (Figura 2) (3). Il trattamento fungicida ha ridotto significativamente il contenuto di DON, DON-3-G, CULM, ENNs, AUR, MON, TENT e EQU del 72%, 67%, 70%, 64%, 66%, 50%, 51% e 92%, rispettivamente, rispetto al controllo non trattato.

In tutti gli anni di sperimentazione, prendendo in considerazione tutte le micotossine rilevate, la varietà di frumento duro è risultata significativamente più contaminata (Figura 3). In media per ENN, MON, AUR, DON, DON-3-G, CULM, ZEA, NIV, EQU e BUT la varietà di frumento duro è risultata più contaminata del 75%, 79%, 97%, 66%, 74%, 67%, 94%, 86%, 83% e 93%, rispettivamente, rispetto alla varietà di frumento tenero.

Per tutte le tossine rilevate, l'aratura è risultata la miglior lavorazione per la sicurezza sanitaria a causa dell'interramento dei residui e della riduzione dell'inoculo (Tabella 1).

Nella campagna cerealicola del 2013 sono stati rilevati gli alcaloidi dell'ergot a concentrazioni comprese tra 6 e 943 µg kg<sup>-1</sup>, tra cui i più abbondanti sono risultati ergocristina

ed ergometrina. L'applicazione fungicida è risultata efficace anche nel contenere gli alcaloidi dell'ergot con un abbattimento medio del loro contenuto pari al 86%.

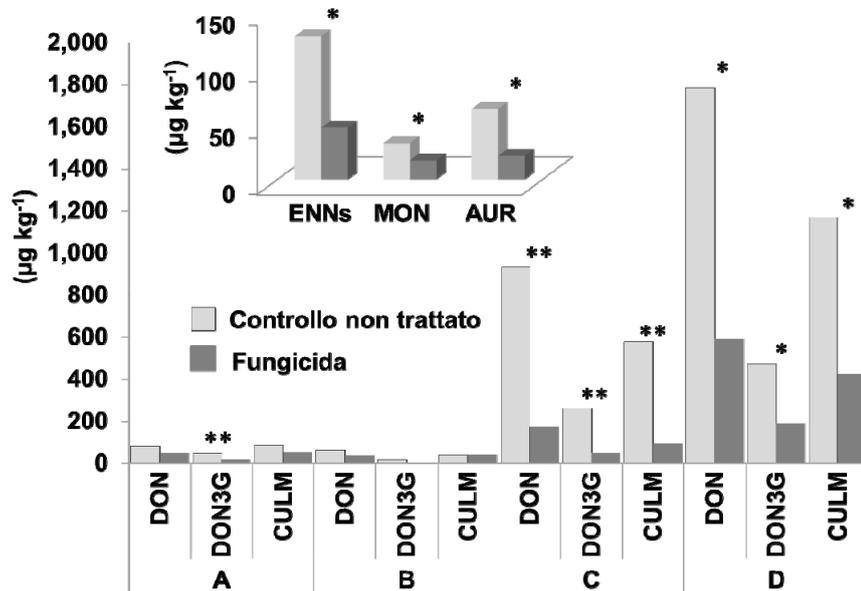


Figura 2. Effetto dell'applicazione fungicida sulla contaminazione da DON, DON-3-G, CULM, ENN, MON e AUR in 4 esperimenti (A, B, C, D)

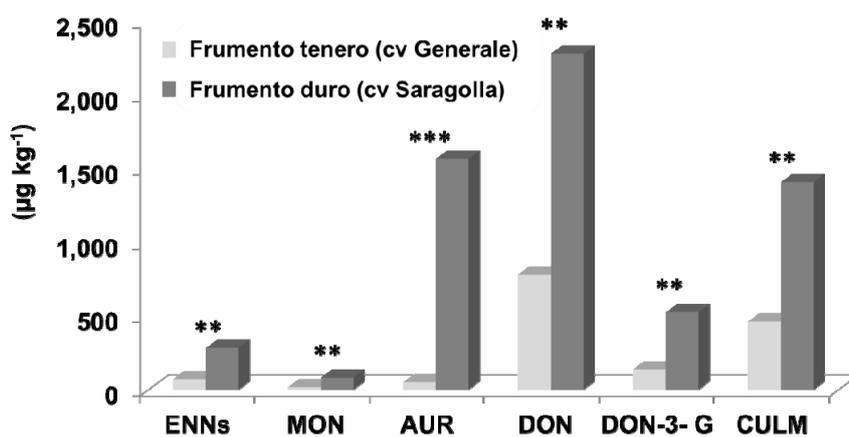


Figura 3. Effetto della suscettibilità della specie sulla contaminazione da DON, DON-3-G, CULM, ENN, MON e AUR

**Tabella 1. Effetto della lavorazione del terreno sulla contaminazione da micotossine nuove ed emergenti ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )**

Micotossina	2012			2013		
	Arato	Minima	Sodo	Arato	Minima	Sodo
ENN	198	419	505	16	25	16
MON	54	199	164	4,24	5,30	6,47
AUR	97	251	255	5,19	6,77	8,61
DON	1786	3609	3836	1024	1432	1339
DON-3-G	471	1008	1018	78	104	108
CULM	1172	2615	2521	664	879	929
ZEA	4,38	7,97	3,96	0,16	0,10	0,23
NIV	1,13	4,60	2,72	1,41	1,69	4,13
BUT	6	24	33	0,50	0,50	0,50
Alcaloidi dell'Ergot	0,71	0,71	0,71	38	20	1747
Acido Secalonico D	0,09	0,09	0,09	5,30	2,20	270
Infectopyrone	0,13	0,13	0,13	127	132	272
TENT	11	12	14	3,50	3,77	6,31

## Conclusioni

I risultati confermano la maggiore suscettibilità del frumento duro rispetto al tenero anche nei confronti delle principali micotossine nuove ed emergenti; riguardo l'agrotecnica l'aratura e l'applicazione del fungicida alla fioritura, comunemente impiegati per controllare la FHB e ridurre la contaminazione da DON, rappresentano la miglior soluzione per la sicurezza sanitaria del frumento anche sulla contaminazione di tali micotossine. Pertanto le buone pratiche per prevenire il DON (4), che prevedono strategie agronomiche integrate di mezzi preventivi e di controllo diretto, possono essere estese anche ad altre micotossine.

## Bibliografia

1. Streit E, Schwab C, Sulyok M, Naehrer K, Krska R, Schatzmayr G. Multi-mycotoxin screening reveals the occurrence of 139 different secondary metabolites in feed and feed ingredients. *Toxins* 2013; 5(3):504-23.
2. Malachova A, Sulyok M, Beltran E, Berthiller F, Krska R. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography - tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all relevant mycotoxins in four model food matrices. *J Chromatogr A* 2014; 1362:145-56.
3. Scarpino V, Reyneri A, Sulyok M, Krska R, Blandino M. Effect of fungicide application to control *Fusarium* head blight and 20 *Fusarium* and *Alternaria* mycotoxins in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *World Mycotoxin Journal* 2015;8(4):499-510.
4. Blandino M, Haidukowski M, Pascale M, Plizzari L, Scudellari D, Reyneri A. Integrated strategies for the control of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol contamination in winter wheat. *Field Crop Res* 2012;133:139-49.

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

Valentina Scarpino (a), Massimo Blandino (a), Amedeo Reyneri (a), Giulio Testa (a), Michael Sulyok (b)  
(a) Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino, Grugliasco, Italia  
(b) Center for Analytical Chemistry, Department for Agrobiotechnology (IFA-Tulln), Tulln, Austria

### Introduzione

Recentemente è stata rivolta una crescente attenzione alle micotossine cosiddette nuove ed emergenti; queste 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.

Oggi, non sono ancora note informazioni circa il ruolo dell'ambiente e delle pratiche colturali sui tali micotossine.

La piralide del mais (*Ostrinia nubilalis*), svolge un ruolo molto importante nel promuovere le infezioni da *Fusarium verticillioides* e *F. proliferatum* (1). Tra le pratiche colturali comunemente adottate per ridurre la contaminazione dalle principali micotossine su mais, il controllo della piralide è una delle più importanti nel contenere le infezioni da *Fusarium verticillioides* e *F. proliferatum* (sezione *Liseola*), e la conseguente contaminazione da fumonisine (FUM) della granella di mais.

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.

### Materiali e metodi

A tale scopo sono state condotte due sperimentazioni nel corso del quinquennio 2008-2012 in cui sono state confrontate l'infestazione naturale della piralide rispetto alla protezione dall'infestazione, ottenuta rispettivamente con una rete entomologica o con l'applicazione di un insetticida piretroide sulle micotossine emergenti. Inoltre, nel corso del triennio 2011-2013 è stato valutato l'effetto della densità colturale su tali micotossine ponendo a confronto 2 investimenti. Infine, nel biennio 2012-2013 è stato esaminato l'effetto della concimazione azotata confrontando livelli di azoto crescenti: 0, 100, 200, 300 e 400 kg di azoto/ha.

### Estrazione e *clean-up*

Durante la fase estrattiva 5 g di sfarinato di mais sono stati estratti con 20 mL di CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH 79:20:1 (v/v/v) e posti in agitazione in un agitatore orbitale per 90 min. Il surnatante è stato successivamente diluito 1:1 con una soluzione di CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH 20:79:1 (v/v/v) e sottoposto ad analisi UPLC-MS/MS (*Ultra Performance Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometer*) multi-micotossina.

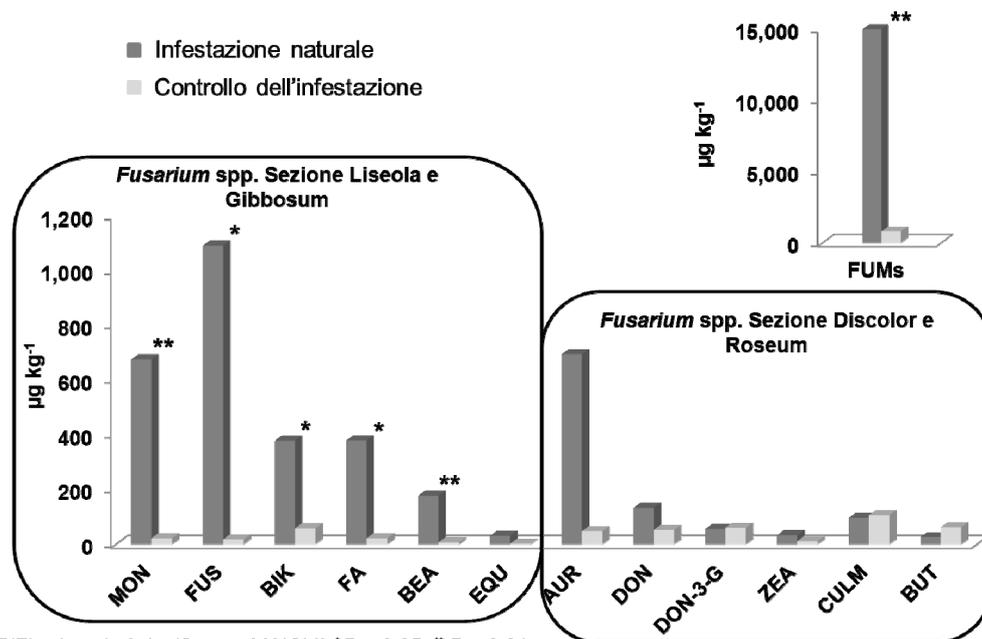
## Analisi UPLC-MS/MS Multi-micotossina

I campioni estratti sono stati analizzati con un metodo multitossina mediante l'impiego di un sistema LC-MS/MS (*Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrography*) ibrido Qtrap 5500 equipaggiato con una sorgente di ionizzazione *Electrospray ionization* (ESI) e un sistema UPLC, in grado di quantificare simultaneamente 295 diversi metaboliti batterici e fungini, tra cui le micotossine emergenti (2).

## Risultati e discussione

Il controllo dell'infestazione da piralide condotto nella prima sperimentazione nel corso del triennio 2008-2010 ha ridotto significativamente gli attacchi di piralide nonché la conseguente presenza di ammuffimenti sulle spighe, sia come numero di spighe colpite sia come estensione.

In seguito all'analisi con il metodo UPLC-MS/MS multi-micotossina, 13 delle micotossine più abbondanti sono state rilevate, tra cui: fumonisine (FUMs), moniliformina (MON), fusaproliferina (FUS), bikaverina (BIK), acido fusarico (FA), beauvericina (BEA), equisetina (EQU), aurofusarina (AUR), deossinivalenolo (DON), deossinivalenolo-3-glucoside (DON-3-G), zearalenone (ZEA), culmorina (CULM) e butenolide (BUT). I risultati ottenuti dalla prima sperimentazione hanno mostrato che in tutti gli anni presi in considerazione, l'attività trofica della piralide ha favorito significativamente la contaminazione da micotossine prodotte da *Fusarium* spp. della sezione *Liseola* ma non da quelle prodotte da *Fusarium* spp. della sezione *Discolor* e *Roseum* (Figura 1) (3).



P(F) = Level of significant of ANOVA \* P < 0.05, \*\* P < 0.01

FUMs = Fumonisine; MON = Moniliformina; FUS = Fusaproliferina; BIK = Bikaverina; FA = Acido Fusarico; BEA = Beauvericina; EQU = Equisetina; AUR = Aurofusarina; DON = Deossinivalenolo; DON-3-G = Deossinivalenolo-3-Glucoside; ZEA = Zearalenone; CULM = Culmorina; BUT = Butenolide

Figura 1. Effetto del controllo dell'infestazione da piralide sulla contaminazione da micotossine emergenti nel triennio 2008-2010

A conferma di tali risultati la seconda sperimentazione, condotta nel quadriennio 2009-2012, ha dimostrato l'efficacia dell'applicazione insetticida nel ridurre significativamente la contaminazione da micotossine prodotte da *Fusarium* spp. della sezione *Liseola* (Tabella 1). Al contrario l'infezione da specie *Fusarium* della sezione *Discolor*, ha registrato un aumento in seguito all'applicazione insetticida (Tabella 1) in particolar modo nelle campagne agrarie che predispongono ad una maggiore infezione di queste specie fungine, a causa della "flora inversion" (4) dovuta alle alterate condizioni di crescita.

**Tabella 1. Effetto dei trattamenti di difesa contro la piralide sulla contaminazione da micotossine emergenti su mais nel periodo 2009-2012 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )**

Sezione	Micotossina	Controllo non trattato	Applicazione insetticida
Sezione <i>Liseola</i> e <i>Gibbosum</i>	Fumonisine (FUMs)	6054	742
	Moniliformina (MON)	297	160
	Bikaverina (BIK)	721	161
	Beauvericina (BEA)	142	33
	Acido Fusarico (FA)	722	212
	Fusaproliferina (FUS)	578	300
	Fusarina C	295	38
	Equisetina (EQU)	20	14
Sezione <i>Discolor</i> e <i>Roseum</i>	Aurofusarina (AUR)	679	1800
	Deossinivalenolo (DON)	863	1544
	Deossinivalenolo-3-glucoside (DON-3-G)	440	536
	3-Acetil-Deossinivalenolo (3-ADON)	28	51
	15-Acetil-Deossinivalenolo (15-ADON)	91	162
	Butenolide (BUT)	139	203
	Culmorina (CULM)	835	1014
	Zearalenone (ZEA)	65	214
	Zearalenone-4-solfato (ZEA-4-S)	11	50

Densità di semina elevate, sempre più frequentemente adottate nei sistemi colturali, non hanno presentato per nessuna delle micotossine rilevate un significativo aumento delle concentrazioni sebbene il processo ultimo di maturazione sia stato rallentato.

Per quanto riguarda invece l'ultima sperimentazione condotta nel biennio 2012-2013 per valutare l'effetto della concimazione azotata sulla contaminazione da micotossine emergenti, 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 (Figura 2).

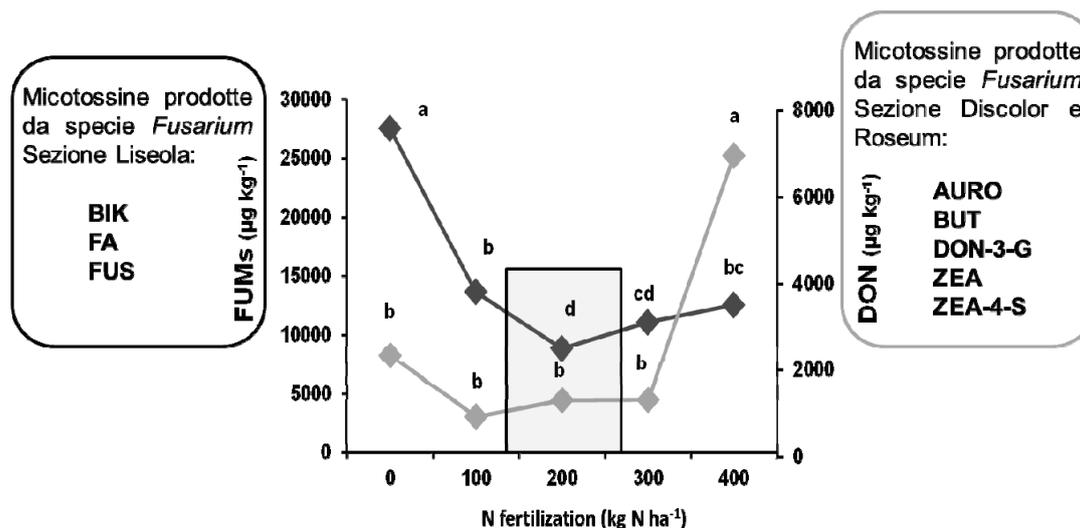


Figura 2. Effetto della concimazione azotata sulla contaminazione da micotossine emergenti su mais nel biennio 2012-2013

## Conclusioni

I risultati hanno mostrato che le comuni pratiche colturali adottate nelle zone temperate per controllare e ridurre il contenuto di FUMs sono risultate essere anche le più efficaci per il contenimento delle principali micotossine emergenti prodotte da *Fusarium* spp. della Sezione *Liseola*. Le condizioni metereologiche, purtroppo, data la complessità della popolazione fungina giocano un ruolo importante nel favorire specie fungine differenti a seconda dell'adattamento ecologiche delle diverse sezioni di appartenenza. Infatti, ad esempio, negli areali freschi e pedemontani è necessario prestare attenzione al rischio di accumulo del DON e di altre tossine prodotte da *Fusarium* della sezione *Discolor* e *Roseum*, che si è dimostrato essere ancora più favorito in seguito all'applicazione insetticida. In queste condizioni risulta pertanto importante prevedere altri interventi agronomici in grado di minimizzare la presenza di queste tossine quali l'impiego di semine tempestive, ibridi a ciclo medio-precoce ed evitare eccessivi apporti azotati con le concimazioni.

## Bibliografia

1. Sobek EA, Munkvold GP. European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) larvae as vectors of *Fusarium moniliforme*, causing kernel rot and symptomless infection of maize kernels. *J Econ Entomol* 1999;92:503-9.
2. Malachova A, Sulyok M, Beltran E, Berthiller F, Krska R. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography - tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all relevant mycotoxins in four model food matrices. *J Chromatogr A* 2014;1362:145-56.
3. Blandino M, Scarpino V, Vanara F, Sulyok M, Krska R, Reyneri A. The Role of the European Corn Borer (*Ostrinia Nubilalis*) on contamination of maize with thirteen *Fusarium* mycotoxins. *Food Addit Contam A* 2015;32(4):533-43.
4. Folcher L, Delos M, Marengue E, Jarry M, Weissenberger A, Eychenne N, Regnault-Roger C. Lower mycotoxin levels in Bt maize grain. *Agron Sustain Dev* 2010;30:711-9.

# VALUTAZIONE DELLA CONTAMINAZIONE DA AFLATOSSINA B<sub>1</sub> IN MANGIMI DELLA PUGLIA E BASILICATA DAL 2010 AL 2014

Valeria Vita, Maria Teresa Clausi, Cinzia Franchino, Rita De Pace  
*Dipartimento di Chimica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata, Foggia, Italia*

## Introduzione

La presenza di micotossine in diverse matrici di origine vegetale è una problematica oramai riconosciuta a livello mondiale e che ha talvolta ripercussioni negative anche sulla produzione di derrate di origine animale, rappresentando un complesso rischio per la salute del consumatore.

Tra le micotossine più note ci sono le aflatossine (AF), metaboliti secondari prodotti prevalentemente da muffe del genere *Aspergillus* in particolari condizioni ambientali e di substrato, differenti da quelle richieste da tali microorganismi per il loro sviluppo ottimale (1).

La persistenza delle tossine nelle matrici prescinde poi dalla presenza del fungo sulle stesse, essendo esse anche altamente stabili e resistenti ai processi di lavorazione.

Considerando tutto ciò, è facile intuire l'importanza della prevenzione come strategia per contrastare la presenza di tali inquinanti negli alimenti, ma vista l'ubiquitarità delle muffe coinvolte e la gestione non sempre adeguata delle derrate, grande rilevanza rivestono anche le attività di controllo e monitoraggio volte alla tutela della salute pubblica.

Dal punto di vista tossicologico, le AF sono riconosciute come potenti agenti cancerogeni (gruppo A) (2), e sono inoltre responsabili di effetti dannosi anche a carico di svariati altri organi e sistemi (es. epatotossicità, immunosoppressione, alterazioni della coagulazione, ecc.) (3).

Considerando la loro cinetica e la scarsa tossicità per i ruminanti, i legislatori hanno ritenuto opportuno diversificare le tipologie di controlli, soprattutto volti alla tutela del consumatore, prevedendo limiti per la AFB<sub>1</sub> nei mangimi, con valori differenziati a seconda della specie, dell'età e dell'impiego zootecnico dei soggetti a cui i mangimi sono destinati (4).

L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) di Puglia e Basilicata, tramite i suoi laboratori accreditati, provvede ad analizzare campioni di diversa natura nell'ambito del PNI (Piano Nazionale Integrato) per la valutazione della presenza di residui sia in alimenti che in mangimi e tra i contaminanti previsti rientrano appunto le aflatossine.

Durante il quinquennio 2010-2014 presso la struttura Micotossine e Tecniche Immunoenzimatiche del suddetto istituto sono stati esaminati numerosi mangimi e materie prime nell'ambito dei controlli ufficiali, e i dati ottenuti sono stati in questa sede analizzati alla luce del periodo e dell'area di prelievo al fine di delineare un quadro esaustivo della contaminazione da AFB<sub>1</sub> nell'areale di competenza.

## Materiali e metodi

### Prelievo e macinazione dei campioni

I campioni di mangimi e materie prime destinate alla produzione degli stessi sono stati prelevati dal personale dell'Azienda Sanitaria preposto nell'ambito del PNAA (Piano Nazionale Alimentazione Animale) secondo le procedure previste dalla normativa vigente (5). Il prelievo, attuato preferibilmente in forma dinamica, deve garantire un'adeguata rappresentatività del campione e assicurare, per quanto possibile, una certa omogeneità di distribuzione della tossina, data la tendenza di questo contaminante a distribuirsi a macchia di leopardo. Un adeguato campionamento è infatti fondamentale per ottenere risultati attendibili. I campioni, sigillati e accompagnati da verbale di prelievo, sono stati consegnati presso la sede dell'IZS di Foggia ove si è provveduto alla macinazione e omogeneizzazione mediante mulino. Il numero complessivo di campioni analizzati durante il periodo in esame è stato di 919 tra materie prime, mangimi semplici e complessi o complementari; la relativa provenienza è presentata nel dettaglio nella Tabella 1.

**Tabella 1. Campioni (n.) prelevati nelle diverse province e analizzati negli anni in esame (in parentesi i livelli medi riscontrati nei campioni conformi, espressi in mg/kg, e le relative DS)**

Anno Provincia	2010	2011	2012	2013	2014
Foggia (FG)	51 (0,0021±0,0011)	42 (0,0021±0,0012)	37 (0,0022±0,0015)	26 (0,0032±0,0043)	18 (0,0011±0,0002)
Bari (BA)	38 (0,0019±0,0012)	35 (0,0020±0,0031)	36 (0,0024±0,0011)	36 (0,0018±0,0011)	22 (0,0020±0,0023)
Barletta- Andria-Trani (BAT)	9 (0,0018±0,0009)	10 (0,0014±0,0013)	12 (0,0021±0,0020)	10 (0,0013±0,0007)	10 (0,0012±0,0002)
Brindisi (BR)	9 (0,0021±0,0013)	6 (0,0020±0,0014)	7 (0,0030±0,0008)	8 (0,0015±0,001)	10 (0,0011±0,0002)
Taranto (TA)	10 (0,0019±0,0009)	6 (0,0015±0,0011)	9 (0,0018±0,0013)	10 (0,0016±0,0006)	19 (0,0011±0,0003)
Lecce (LE)	18 (0,0025±0,0018)	21 (0,0019±0,0013)	10 (0,0017±0,0011)	23 (0,0024±0,0014)	14 (0,0014±0,0010)
Potenza (PZ)	35 (0,0021±0,0014)	40 (0,0021±0,0015)	59 (0,0024±0,0019)	21 (0,0017±0,0009)	33 (0,0016±0,0009)
Matera (MT)	36 (0,0020±0,0011)	44 (0,0018±0,0015)	40 (0,0020±0,0023)	19 (0,0013±0,0006)	20 (0,0012±0,0004)
Numero campioni totali	206	204	210	153	146

### Estrazione e quantificazione della tossina

Per l'estrazione della micotossina dalle matrici indagate si sono seguite le indicazioni fornite dalla casa produttrice del kit immunoenzimatico impiegato, procedendo ad un'estrazione con metanolo al 70% e filtraggio su carta prima dell'identificazione/quantificazione tramite ELISA

(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Per il metodo impiegato i valori di recupero sono stati del 89-107% e i valori inferiori al limite di rilevabilità di 1 µg/kg sono stati riportati come non rilevabili (NR). La metodica con tale kit immunoenzimatico è stata accreditata ai sensi della norma UNI CEI EN ISO/IEC/17025 (6), e la sua periodica valutazione, attuata per mezzo di carte di controllo e partecipazione a circuiti inter-laboratorio, ne garantisce l'efficienza.

## Analisi statistica

I parametri considerati per la validazione della metodica analitica sono: specificità, verifica dell'errore β, precisione, robustezza (7). I risultati sono stati valutati tramite test statistici del calcolo della varianza (test ANOVA), test di Fischer e test di Student. Poiché i metodi immunoenzimatici possono riportare una lieve sovrastima dei valori, i campioni risultati non conformi rispetto ai limiti previsti dalla legge sono stati rivalutati anche tramite analisi in HPLC (High Performance Liquid Chromatography). I risultati ottenuti col metodo di screening ELISA e quelli ricavati dall'analisi di conferma in cromatografia liquida sono risultati sovrapponibili, confermando l'affidabilità del dato immunoenzimatico.

## Risultati e discussione

La Figura 1 riporta le medie delle concentrazioni di AFB<sub>1</sub> riscontrate nel quinquennio in esame nelle province di provenienza dei campioni e gli eventuali livelli dei campioni risultati non conformi ai limiti vigenti. I valori medi di AFB<sub>1</sub> osservati sono presentati più in dettaglio nella Tabella 1.

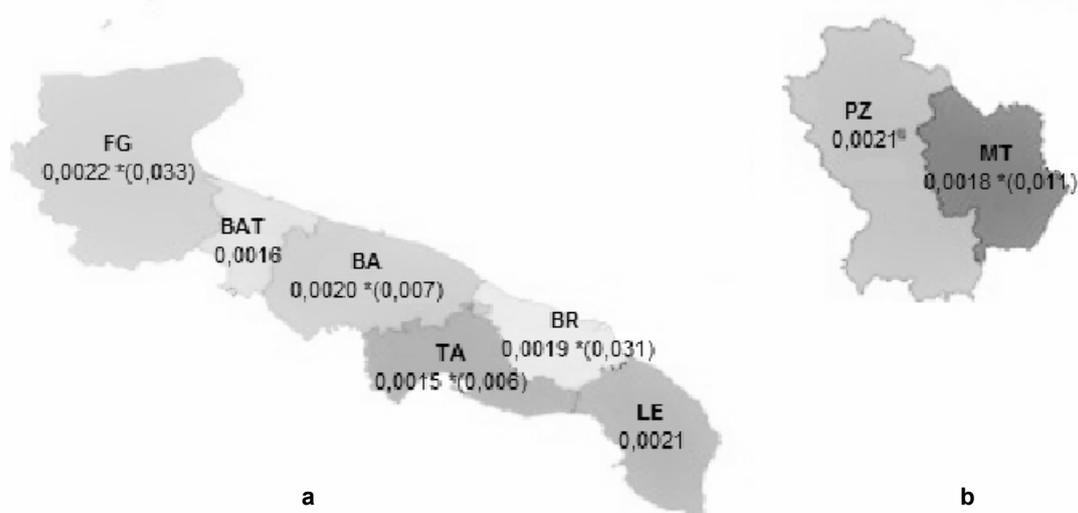
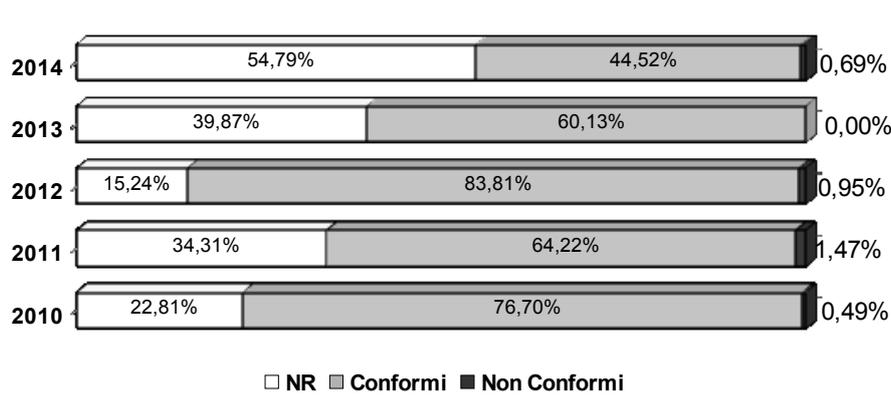


Figura 1. Livelli medi di AFB<sub>1</sub> in mg/kg riscontrati nel quinquennio 2010-2014 nelle diverse province di Puglia (a) e Basilicata (b). L'asterisco indica la presenza di campioni non conformi ai limiti di legge con relativi livelli medi riportati in parentesi

Il numero di campioni non conformi è stato in percentuale molto basso (0,76%) e i riscontri hanno riguardato soprattutto la provincia di Bari (n 3 campioni di mangimi per vacche da latte, con livelli medi di 0,007 mg/kg), ma i valori più elevati sono stati osservati in campioni prelevati nelle province di Foggia e Brindisi (rispettivamente  $0,033 \pm 0,0036$  e  $0,031 \pm 0,004$  mg/kg). Per i campioni invece risultati conformi ma con valori di tossina inferiori ai limiti previsti dalla normativa, le medie complessive sono oscillate in un range di 0,0013-0,0022 mg/kg, con valori secondo il seguente ordine: 2012>2010>2011>2013>2014. I maggiori livelli medi sono quindi emersi negli anni 2012 e 2010, durante i quali sono state più elevate anche le percentuali di campioni contaminati tra conformi e non (Figura 2).



**Figura 2. Campioni (%) con livelli < LOD, rilevabili ma < Limiti di legge (conformi) e rilevabili e > Limiti di legge (non conformi), riportati per ciascun anno valutato**

È possibile osservare dalla Figura 1 come nel complesso i livelli più alti di tossina per i campioni risultati conformi, ma anche per quelli non conformi, sono stati osservati nella provincia di Foggia (media del quinquennio per i conformi 0,0022 mg/kg e 0,033 mg/kg per il campione non conforme), mentre i livelli più bassi in quelle di Taranto e Barletta-Andria-Trani (medie del quinquennio per i conformi rispettivamente 0,0015 mg/kg e 0,0016 mg/kg).

Dai dati presentati in Figura 1 si deduce che la maggioranza dei campioni, benché risultata contaminata da aflatossina, ne presenti livelli al di sotto dei limiti di legge, e i risultati ottenuti dalle analisi sono stati valutati alla luce delle condizioni climatiche del periodo di prelievo riportate da rapporti ufficiali (8, 9, 10, 11, 12). In percentuale un maggior numero di mangimi non conformi è stato rilevato negli anni 2011 e 2012, durante i quali i dati climatici hanno mostrato temperature medie superiori rispetto agli altri anni, nonostante il trend generalmente positivo osservabile in tutto il periodo in esame, e umidità abbastanza pronunciata. Assenti invece campioni non conformi relativi al 2013, anno in cui è risultata anche tra le più alte la percentuale dei campioni con livelli di aflatossine inferiori al limite di rilevabilità del metodo analitico. Durante questo anno, nonostante l'umidità maggiore rispetto ai due precedenti anni, la temperatura media è stata meno alta (circa 16,5°C per la Puglia e circa 12,3°C per la Basilicata) non creando probabilmente condizioni idonee alla tossinogenesi.

Valutando le variazioni stagionali nei livelli di contaminazione si è osservato che dal 2011 al 2013 valori medi leggermente più alti sono stati rilevati nelle stagioni fredde, mentre una minore contaminazione ha riguardato i campioni prelevati in estate. Diversamente per i campioni relativi agli anni 2010 e 2014 i livelli di contaminazione emersi in inverno sono

risultati più bassi rispetto a quelli delle altre stagioni. A supporto delle osservazioni relative al periodo 2011-2013 c'è il rilievo al sud Italia in quegli anni di temperature invernali-primaverili superiori alla norma interrotte però da un clima più rigido riscontrato nel mese di febbraio. Tali sbalzi termici, accompagnati dalle precipitazioni dei primi mesi dell'anno, possono infatti aver favorito la produzione di AF. Diversamente, nel 2010 è stato osservato un clima uniformemente più rigido nella stagione fredda e precipitazioni nelle regioni meridionali della penisola superiori rispetto agli anni successivi, durante i quali sono state invece meno intense e con un trend negativo nelle stagioni fredde. Riguardo il 2014 l'aumento della temperatura media è stato decisamente più pronunciato rispetto al passato, con un maggiore scostamento rispetto alla media stagionale invernale, ma il tasso di umidità è stato meno elevato, fornendo probabilmente un ambiente meno favorevole alla sintesi di tossine (% di campioni NR superiori agli altri anni). Infatti, nel periodo freddo l'umidità è stata molto prossima al valore limite per la produzione delle tossine (medie nelle regioni d'interesse ca. 78-79%), tornando ad un livello più favorevole nella stagione primaverile/estiva, il che giustificherebbe la minore contaminazione dei campioni prelevati in inverno.

## Conclusioni

Il riscontro di un numero basso di campioni non conformi e un graduale calo nei livelli di contaminazione degli ultimi anni potrebbe essere rapportato alla sempre crescente consapevolezza della necessità di mantenere costante l'attenzione sul problema per prevenire i rischi sanitari connessi. Infatti, la diffusione delle informazioni e della conoscenza delle correlazioni tra contaminazione dei mangimi, condizioni ambientali e buone pratiche agricole, di lavorazione e di stoccaggio anche agli operatori dei settori agro-zootecnico e mangimistico contribuisce sicuramente a limitare il problema, comportando di conseguenza vantaggi anche per le attività produttive. I rilievi emersi dalle analisi sono stati anche messi in correlazione con le condizioni climatiche italiane degli ultimi anni, confermando come l'interazione e la comunicazione tra settori anche apparentemente distanti sia utile e vada anzi stimolata per una programmazione ottimale dei controlli preventivi.

## Bibliografia

1. Wilson DM, Payne GA. Factor affecting aspergillus flavus group infection and aflatoxin contamination of crops. In: Eaton DL, Groopman JD (Ed.) *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary and agricultural significance*. San Diego: Academic Press; 1994. p. 309-26.
2. International Agency for Research on Cancer. *Chemical agents and related occupations - A review of human carcinogens*. Lyon: IARC; 2012. (IARC Monographs100F). p. 225-48.
3. Bryden, WL. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implication for animal productivity and feed security. *Anim Feed Sci Technol* 2012; 173:134-58.
4. Europa. Regolamento (UE) della commissione del 16 giugno 2011, n.574. Modifica l'allegato I della direttiva 2002/32/CE del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda i livelli massimi di nitrito, melamina, *Ambrosia* spp. e carry-over di alcuni coccidiostatici e istomonostatici e consolida degli allegati I e II. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea - Serie L* 159/7, 17 giugno 2011.
5. Europa. Regolamento (UE) della commissione del 27 gennaio 2009, n.152. Fissa i metodi di campionamento e d'analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea - Serie L* 54/1, 26 febbraio 2009.

6. UNI CEI EN ISO/IEC/17025. *Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2005.
7. Europa. Decisione della commissione del 12 agosto 2002, n.657. Attua la direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea - Serie L 221/8*, 17 agosto 2002.
8. Desiato F, Fioravanti G, Frascchetti P, Perconti W, Toreti A, Pavan V. *Gli indicatori del clima in Italia nel 2010*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2011. (Rapporto ISPRA, Stato dell'Ambiente 24/2011).
9. Desiato F, Fioravanti G, Frascchetti P, Perconti W, Piervitali E, Pavan V. *Gli indicatori del clima in Italia nel 2011*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2012. (Rapporto ISPRA, Stato dell'Ambiente 35/2012).
10. Desiato F, Fioravanti G, Frascchetti P, Perconti W, Piervitali E, Pavan V. *Gli indicatori del clima in Italia nel 2012*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2013. (Rapporto ISPRA, Stato dell'Ambiente 36/2013).
11. Desiato F, Fioravanti G, Frascchetti P, Perconti W, Piervitali E, Pavan V. *Gli indicatori del clima in Italia nel 2013*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2014. (Rapporto ISPRA, Stato dell'Ambiente 50/2014).
12. Desiato F, Fioravanti G, Frascchetti P, Perconti W, Piervitali E, Pavan V. *Gli indicatori del clima in Italia nel 2014*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2015. (Rapporto ISPRA, Stato dell'Ambiente 57/2015).



*Serie Rapporti ISTISAN  
numero di novembre, 2° Suppl.*

*Stampato in proprio  
Settore Attività Editoriali – Istituto Superiore di Sanità*

*Roma, novembre 2016*