



# Rapporti

## ISTISAN

13/18



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



Istituto Superiore di Sanità  
Roma, 11-13 giugno 2012



ISSN 1123-3117

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

www.iss.it



**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

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

**Istituto Superiore di Sanità  
Roma, 11-13 giugno 2012**

**ATTI**

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

ISSN 1123-3117  
**Rapporti ISTISAN**  
**13/18**

Istituto Superiore di Sanità

**IV Congresso Nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 11-13 giugno 2012. Atti.**

A cura di Carlo Brera, Barbara De Santis, Francesca Debegnach, Emanuela Gregori, Elena Pannunzi e Maria Cristina Barea Toscan

2013, vi, 172 p. Rapporti ISTISAN 13/18

La quarta edizione del Congresso ha come principale finalità quella di portare all'attenzione dei colleghi appartenenti alle varie realtà della filiera agro-alimentare tre aspetti di assoluta rilevanza: il ruolo delle micotossine nella insorgenza di specifiche patologie nell'uomo e negli animali, aspetto questo fortemente sottostimato soprattutto per la dimensione umana; la presentazione delle attività preventive e di controllo che sono state nel tempo acquisite e poi affinate per una corretta valutazione e gestione del rischio agronomico e tossicologico; e la presentazione di un quadro aggiornato delle più recenti innovazioni nel campo della diagnostica, a cui in ultima analisi sono demandate le verifiche dell'efficacia delle azioni di autocontrollo e controllo ufficiale. Dal 2004 il Congresso Nazionale si è svolto presso l'Istituto Superiore di Sanità e costituisce ormai un evento di riferimento per i ricercatori e gli operatori della filiera agro-alimentare in cui poter scambiare le proprie esperienze su temi di grande interesse a cui le micotossine sono fortemente legate, come quelli di carattere economico, agricolo, di trasformazione industriale, di sicurezza d'uso, normativo e infine di comunicazione corretta al consumatore.

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

Istituto Superiore di Sanità

**4th National Congress. Mycotoxins in agri-food chain. Istituto Superiore di Sanità. Rome, June 11-13 2012. Proceedings.**

Edited by Carlo Brera, Barbara De Santis, Francesca Debegnach, Emanuela Gregori, Elena Pannunzi and Maria Cristina Barea Toscan

2013, vi, 172 p. Rapporti ISTISAN 13/18 (in Italian)

The 4th edition of the National Congress on Mycotoxins in Food Chain aims to deal with three main issues related to the impact of these toxic compounds in animal and human health. The first issue regards a topic still deeply underestimated and related to the relationship between human and animal pathologies and mycotoxin intake with diet. The second issue is mainly focused on the risk management of the mycotoxin threat along the whole agri-food chain through a detailed analysis of agronomic risks and preventive and corrective actions to be undertaken to minimize the presence of mycotoxins in crops. 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 a faster and faster and reliable analytical response to be used both in official control and in own-check activities. Since 2004 the National Congress has been held at the Istituto Superiore di Sanità (the Italian National Institute of Health) with a two-year frequency. 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, 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).

---

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Fabrizio Oleari*  
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988 (serie: *Rapporti e congressi ISTISAN*)

Redazione: *Paola De Castro e Sandra Salinetti*  
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.



# INDICE

<b>Premessa</b> .....	v
<b>Progetto MICOPRINCEM (MICOtossine PRINcipali ed EMergenti nei cereali): risultati preliminari</b> <i>Nicola Berardo, Sabrina Locatelli, Chiara LanzaNova, Alessio Torri, Fabrizio Facchinetti, Stefania Mascheroni, Carlotta Balconi</i> .....	1
<b>Tecniche di screening e conferma: il caso aflatossina M1</b> <i>Alberto Biancardi, Cristina Aimò, Pierluigi Piazza, Roberto Piro</i> .....	8
<b>Rischi emergenti: presenza di ocratossina A in alimenti “non convenzionali”</b> <i>Alberto Biancardi, Cristina Aimò, Pierluigi Piazza, Roberto Piro</i> .....	16
<b>Aspetti pratici legati ad una corretta esecuzione delle procedure di campionamento</b> <i>Carlo Brera, Francesca Debegnach, Emanuela Gregori, Elena Pannunzi, Barbara De Santis</i> .....	24
<b>Micotossine negli alimenti: controlli ufficiali in Piemonte 2002-2011</b> <i>Sara Jenifer Coluccia, Francesca Alesso, Marisa Bodda, Sara Ciacciarelli, Andreina Delaini, Sara Pelligra, Francesco Ricci</i> .....	31
<b>Utilizzo di un sistema automatizzato per l'estrazione di aflatossine B1, B2, G1, G2 e ocratossina A in varie matrici alimentari</b> <i>Sara Jenifer Coluccia, Francesca Alesso, Marisa Bodda, Sara Ciacciarelli, Andreina Delaini, Sara Pelligra, Francesco Ricci</i> .....	36
<b>Fusarium-tossine negli alimenti zootecnici: applicazione della spettroscopia NIR-AOTF per l'analisi di screening dei sottoprodotti della molitura del frumento</b> <i>Pier Paolo Danieli, Andrea Bellincontro, Alfio Chiavaioli, Amedeo Pietri, Terenzio Bertuzzi, Fabio Mencarelli, Umberto Bernabucci, Bruno Ronchi</i> .....	39
<b>Determinazione di ocratossina A nel frumento mediante l'uso di aptameri a DNA</b> <i>Annalisa De Girolamo, Roberto Schena, Angelo Visconti</i> .....	49
<b>Controlli ufficiali di micotossine nel grano di provenienza comunitaria ed extracomunitaria in entrata nei porti pugliesi</b> <i>Rita De Pace, Cinzia Franchino, Valeria Vita</i> .....	54
<b>Sviluppo e applicazione di un metodo ELISA per l'analisi di ocratossina A in campioni di mangime</b> <i>Rita De Pace, Cinzia Franchino C, Valeria Vita</i> .....	59

<b>Livelli accresciuti dei controlli ufficiali sui prodotti di importazione</b>	
<i>Carlo Donati</i> .....	63
<b>Monitoraggio della contaminazione da micotossine in prodotti alimentari: attività 2008-2010 del Polo Alimenti ARPA Puglia-Bari</b>	
<i>Francesca Ferrieri, Carmela Amenduni, Nicola Battista, Angela Brunetti, Giovanni Corte, Egidio Leonetti, Francesco Lo Greco, Mariangela Palma, Tiziana Santoro, Francesco Fiume</i> .....	69
<b>Determinazione della patulina in succo di mela</b>	
<i>Fausta Giuffrè, Maria Claudia Torresani</i> .....	75
<b>Determinazione di zearalenone e suoi metaboliti in urine bovine</b>	
<i>Carlo Brera, Emanuela Gregori, Augusto Alberto Pastorelli, Maurizio Fiori, Paolo Stacchini, Barbara De Santis, Francesca Debegnach</i> .....	80
<b>Determinazione simultanea di aflatossine, ocratossina A e tossine di <i>Fusarium</i> in cereali mediante purificazione su colonnine ad immunoaffinità multianticorpo e LC-MS/MS</b>	
<i>Veronica M.T. Lattanzio, Michele Solfrizzo, Stefania Della Gatta, Stephen P. Powers, Angelo Visconti</i> .....	87
<b>Sviluppi diagnostici nell'analisi delle micotossine</b>	
<i>Vincenzo Lippolis, Michelangelo Pascale, Angelo Visconti</i> .....	92
<b>Applicazione dei principi HACCP nel controllo delle micotossine nelle produzioni alimentari</b>	
<i>Daniela Maurizi</i> .....	99
<b>Confronto tra molitura a secco e ad umido per il trattamento del campione di laboratorio nell'analisi di ocratossina A e deossinivalenolo in frumento</b>	
<i>Stefania Valenzano, Michelangelo Pascale, Vincenzo Lippolis, Angelo Visconti</i> .....	106
<b>Messa a punto di un immunosaggio basato sulla polarizzazione di fluorescenza per la determinazione delle tossine T-2 e HT-2 nel frumento</b>	
<i>Stefania Valenzano, Vincenzo Lippolis, Michelangelo Pascale, Angelo Visconti</i> .....	112
<b>Confronto tra performance di metodi di screening e di conferma per l'analisi di aflatossina M1 in latte naturalmente contaminato nell'ambito di proficiency test</b>	
<i>Barbara Cini, Eva Perez</i> .....	118
<b>Sviluppo di un <i>dipstick multiplex</i> per la determinazione delle tossine di <i>Fusarium</i> in cereali</b>	
<i>Noan Nivarlet, Veronica M.T. Lattanzio, Anne-Catherine Huet, Angelo Visconti, Vincenzo Lippolis, Stefania Della Gatta, Philippe Delahaut, Benoit Granier</i> .....	122

<b>Autocontrollo nelle imprese alimentari: quale livello di interazione con il controllo ufficiale?</b>	
<i>Mario Piccialuti</i> .....	128
<b>Grano duro biologico e contaminazione da deossinivalenolo: risultati di un triennio di prove in diversi ambienti italiani</b>	
<i>Fabrizio Quaranta, Gabriella Aureli, Andreina Belocchi, Mauro Fornara, Sahara Melloni, Pasquale Codianni, Giuliano Mazzieri, Antonella Petrini, Cristina Piazza, Luigi Tedone, Maria Grazia D'Egidio</i> .....	133
<b>Valutazione dei rischi agronomici derivanti dalla contaminazione da micotossine nel comparto cerealicolo</b>	
<i>Amedeo Reyneri, Massimo Blandino, Francesca Vanara</i> .....	140
<b>Sviluppo di un nuovo saggio ELISA per la determinazione della tossina T-2 avente elevata cross-reattività per HT-2</b>	
<i>Giulia Rosar, Francesco Gon, Francesca Diana</i> .....	144
<b>Monitoraggio delle contaminazioni di deossinivalenolo nel frumento mediante un nuovo test rapido quantitativo</b>	
<i>Elena Bianco, Francesca Diana, Elisa Paoluzzi, Giulia Rosar, Roberto Marzari</i> .....	151
<b>Moniliformina nel mais: sviluppo di una metodica HPLC-ESI-MS/MS e prime indagini sulla diffusione nel quadriennio 2008-2011 in Piemonte</b>	
<i>Valentina Scarpino, Massimo Blandino, Amedeo Reyneri, Francesca Vanara</i> .....	157
<b>Contaminazione da moniliformina e fumonisine nel mais: il ruolo della piralide</b>	
<i>Valentina Scarpino, Massimo Blandino, Amedeo Reyneri, Valentina Sovrani, Francesca Vanara</i> .....	161
<b>Contaminazione da deossinivalenolo delle frazioni della decorticatura di grano tenero</b>	
<i>Valentina Sovrani, Massimo Blandino, Amedeo Reyneri, Valentina Scarpino, Francesca Vanara</i> .....	164
<b>Validazione di un metodo per la determinazione contemporanea di micotossine negli alimenti per l'uomo e per gli animali</b>	
<i>Fabio Busico, Tabita Mauti, Sesto Berretta, Bruno Neri, Alessandro Ubaldi</i> .....	167



## PREMESSA

Nell'individuare i principali obiettivi che il IV Congresso Nazionale sulle micotossine si doveva prefiggere di raggiungere, si è ritenuto di estrema importanza fornire informazioni sulle evidenze epidemiologiche alla base delle implicazioni di carattere sanitario che nel panorama mondiale sono state messe in luce da studi condotti sulla popolazione, con particolare enfasi per determinate categorie di consumatori particolarmente a rischio come le donne in gravidanza, i neonati e i bambini in età post-infantile. Tale obiettivo è stato ampiamente raggiunto in quanto sono state fornite sull'argomento numerose informazioni su casi di patologie umane ascrivibili alla presenza delle micotossine nella dieta, fornendo come elemento innovativo indicazioni riguardo la possibilità che tali effetti patologici possono intercorrere anche a bassi livelli di contaminazione, come nel caso della presenza di deossinivalenolo nei prodotti cerealicoli a cui sono stati associati alcuni possibili effetti tossici come un effetto immunosoppressivo sul feto con conseguente inibizione della crescita, un attraversamento placentare relativamente lento con un trasferimento al feto pari al 21% della tossina inizialmente incubata e un meccanismo di detossificazione da parte del feto generalmente poco sviluppato. Uno studio norvegese condotto per circa 25 anni, ha, inoltre, portato a concludere che sussistono le condizioni per una correlazione tra aborti in gravidanza avanzata e possibili fattori eziologici come i pesticidi e micotossine come il deossinivalenolo, condizione questa maggiormente rilevata nelle annate caratterizzate da scarsa qualità cerealicola.

Stesse conclusioni sono state raggiunte per l'esposizione del feto a livelli di concentrazione di aflatoossina B1 comunemente riscontrati nei prodotti alimentari commercializzati nei paesi industrializzati, con diretta evidenza di un rapido attraversamento placentare e conversione totale dell'aflatoossina B1 nel feto ad aflatossicolo.

Un secondo obiettivo è stato quello di presentare un quadro conoscitivo esaustivo delle azioni preventive messe in atto per una gestione sistematica del problema micotossine da parte delle aziende dell'agro-alimentare.

La risposta ha solo in parte contribuito a ottenere il raggiungimento di questo obiettivo e questo in relazione al fatto che la realtà produttiva risente ancora di una certa lentezza nell'adottare in modo strutturato le azioni preventive, ciò in relazione sia ad un fatto culturale generalizzato sia alla necessità di impiegare forti investimenti nei percorsi produttivi a cui non corrisponde un adeguato riconoscimento economico seppur legato ad un più alto livello di qualità sanitaria; altra condizione penalizzante è la scarsa conoscenza da parte del consumatore di questa possibile presenza nei prodotti alimentari che non alimenta pertanto una adeguata richiesta al mondo della produzione. Per questo motivo è stato espressamente richiesto l'intervento di una associazione dei consumatori che ha portato interessanti spunti di riflessione.

La consueta rassegna delle più innovative tecniche diagnostiche, tra le quali quelle basate sui metodi biomolecolari e biochimici, ha chiuso questa edizione portando all'attenzione dei partecipanti la necessità di avvalersi sempre più di metodi di analisi rapidi e di screening caratterizzati da elevati standard di affidabilità.

Particolarmente stimolanti sono stati gli interventi delle Autorità governative nazionali e comunitarie che hanno illustrato e prospettato il loro rilevante impegno su questo delicato tema di salute pubblica.

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 un sincero "buon lavoro", vi invito fin d'ora alla quinta edizione che presenterà delle forti innovazioni nell'organizzazione delle sessioni scientifiche volendo sempre più coinvolgere in un "insieme" sia chi sarà chiamato ad esporre le varie sfaccettature del problema sia chi assisterà come partecipante.

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

# PROGETTO MICOPRINCEM (MICOTOSSINE PRINCIPALI ED EMERGENTI NEI CEREALI): RISULTATI PRELIMINARI

Nicola Berardo, Sabrina Locatelli, Chiara Lanza, Alessio Torri, Fabrizio Facchinetti,  
Stefania Mascheroni, Carlotta Balconi  
*Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, Unità di Ricerca per la Maiscoltura,  
Bergamo*

## 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. È noto che la granella di mais è soggetta ad infezione da parte di diverse specie fungine che provocano un accumulo di micotossine, prodotti del loro metabolismo secondario. Le micotossine che si riscontrano con maggiore frequenza nella granella di mais sono: aflatossine prodotte da *Aspergillus flavus* e *parasiticus* (1) e fumonisine prodotte da *Fusarium verticillioides* (2); tali tossine possono accumularsi sia in pre- che in post-raccolta. La preoccupazione riguardo alla contaminazione delle micotossine è dovuta al fatto che queste sono tossiche oltre che per gli animali, anche per l'uomo. I rischi potenziali per la salute umana derivati dal consumo di alimenti contaminati dalla presenza di fumonisine, hanno indotto le istituzioni nazionali e internazionali a stabilire i valori limite del loro contenuto in granella di mais e prodotti da essa derivati. Per i paesi appartenenti alla UE, è stato stabilito un livello massimo di 4000 µg/kg di fumonisine per il mais non trasformato (3).

Il Progetto MICOPRINCEM, "Micotossine principali ed emergenti nei cereali" (finanziato dal MiPAAF, 2010-2013), si ricollega al precedente Progetto MICOCER, "Valutazione e controllo della contaminazione da micotossine nelle produzioni cerealicole italiane" (finanziato dalla Regione Lombardia, 2006-2008), e intende continuare a studiare strategie utili alla prevenzione e al contenimento dello sviluppo delle micotossine. Obiettivi del progetto sono: (i) definire e validare metodiche analitiche utili per la determinazione di micotossine nei cereali; (ii) individuare strategie utili alla prevenzione e al contenimento dello sviluppo di micotossine; (iii) valutare l'incidenza delle principali micotossine per la costituzione di un sistema nazionale di valutazione del rischio; (iv) valutare la contaminazione delle principali micotossine nelle fasi di stoccaggio e conservazione.

Allo scopo di valutare l'incidenza delle fumonisine nel mais, è stato compiuto un monitoraggio su campioni aziendali inseriti nella "rete di sperimentazione on farm", coordinata da CRA-MAC, estesa a livello nazionale con 70 siti seminati con gli ibridi commerciali più diffusi. In aggiunta, sono state monitorate partite commerciali provenienti da numerosi impianti di essiccazione-stoccaggio dove l'accumulo di tossine in post-raccolta può essere importante.

Al fine di valutare la variabilità genetica disponibile e individuare materiali resistenti all'attacco fungino e con ridotto accumulo di tossine, sono in corso esperimenti di inoculo artificiale con ceppi di *F. verticillioides* su genotipi italiani risultati interessanti da indagini precedenti (linee inbred e varietà) utilizzando la tecnica di inoculo KIA (*Kernel Inoculation Assay*).

Nell'ambito di questo lavoro, verranno presentati i risultati preliminari relativi alle indagini condotte nel corso della campagna maicicola 2011.

## Metodi

### Raccolta e campionamento materiali

L'origine dei campioni aziendali è rappresentata dalla “rete di sperimentazione on farm” costituita da 13 tra gli ibridi commerciali più diffusi suddivisi nelle tre classi FAO (500 – 600 - 700) e 2 ibridi ponte (PR32G44 e NK Famoso), come riportato in Tabella 1. Per l'annata maidicola 2011, i campioni oggetto di analisi (394 campioni totali), provengono da due delle regioni vocate alla coltivazione del mais: Lombardia (19 località) e Piemonte (9 località).

**Tabella 1. Elenco degli ibridi coltivati nelle località di prova nell'annata maidicola, 2011**

Ibrido	Classe FAO	Ditta sementiera
SY Sincero	500	NK Singenta Seeds
NK Famoso	500	NK Singenta Seeds
Consuelo	500	ISTA Veneto Semenyo
SNH8605	600	Coopsementi
LG 30.681	600	Limagrain
DKC 6815	600	Dekalb
Kalipso	600	KWS
PR32F73	600	Pioneer
PR32G44	600	Pioneer
Carella	600	Semillas Fitò Italia
MAS 70.F	600	Maisadour
Karolas	600	SIS
P1758	700	Pioneer
PR31D24	700	Pioneer
GDM757	700	FMB

I campioni provenienti dai centri di stoccaggio-essiccazione provengono da una rete stabile di 48 impianti, individuati sulla base di: (i) posizione geografica, per ottenere una distribuzione omogenea dei bacini di raccolta entro gli areali di produzione di Piemonte, Lombardia, Veneto, Friuli-Venezia Giulia, Emilia Romagna; (ii) dimensione, per includere nell'indagine impianti con diversa capacità di essiccazione giornaliera e di stoccaggio finale; (iii) caratteristiche tecniche degli equipaggiamenti di ricevimento, condizionamento, movimentazione, screening e conservazione; (iv) interesse all'indagine e capacità di collaborazione. L'elenco delle regioni con il numero di centri di stoccaggio e il numero di campioni provenienti da ognuna, è riportato in Tabella 2.

**Tabella 2. Impianti di stoccaggio-essiccazione e di campioni analizzati per singole Regioni, 2011**

Regione	Numero impianti	Numero campioni
Lombardia	13	137
Emilia Romagna	12	100
Veneto	12	95
Piemonte	8	103
Friuli-Venezia Giulia	3	27
<b>Totale</b>	<b>48</b>	<b>462</b>

Le produzioni di ogni impianto vengono virtualmente ripartite in lotti, che generalmente coincidono con le unità di contenimento (silos e platee) e, in aggiunta, con partite variamente differenziabili attraverso i flussi produttivi (raccolte di inizio-fine stagione, rilocazione da altri impianti), con prodotti volontariamente segregati per caratteristiche “native” o con prodotti a destinazione predefinita. Dai lotti così individuati vengono ricavati i campioni per le analisi utilizzando metodi di campionamento dinamico: da prodotto in movimento, durante le operazioni di carico degli autotreni in uscita o in occasione delle movimentazioni interne (dall’essiccatoio ai silos, dai silos alle platee), viene derivato un campione globale di 8-20 kg da cui, con metodi di *sample sorting*, viene ottenuto un campione di 1,5-2 kg. Al fine di avere un campione il più omogeneo possibile, il materiale viene quartato e suddiviso in sub-campioni per analisi di laboratorio. Da ciascun centro di stoccaggio vengono prelevati mediamente 8-12 campioni contrassegnati da un codice identificativo anche dell’anno e della zona agraria di provenienza.

### **Estrazione e dosaggio fumonisine**

Le fumonisine sono state estratte da 5 g di farina con 25 mL di metanolo 70% per 3 minuti in agitazione a T ambiente. L’estratto è stato filtrato con carta Whatman n. 1 e diluito 1:14 con acqua distillata. Il dosaggio delle fumonisine è stato effettuato utilizzando il kit Ridascreen® Fumonisin (R-3401 R-Biopharm) mediante sistema automatizzato Chemwell (Awareness Technology, inc.).

### **Inoculo del materiale in campo**

Sono state selezionate 13 linee inbred (12 Lo e la linea commerciale B73) sulla base di precedenti indagini (2009-2010) relative all’accumulo differenziale di fumonisine dopo inoculo artificiale, in aggiunta alla Lo 863. Le 14 linee, nel 2011, sono state coltivate in due diverse località: Bergamo-BG e Sant’Angelo Lodigiano-SAL (LO); sono state inoculate con un mix di spore di due ceppi di *F. verticillioides* (#289 e #294) attraverso il metodo KIA descritto da Ferrari e Balconi (4), che consiste nell’incidere le cariossidi attraverso le brattee, allo stadio di 15 DAS (*Days After Silking*) tramite una forchetta, dopo averla immersa in una sospensione di spore fungine ( $10^6$  spore/mL). Come controllo si utilizzano spighe inoculate con acqua sterile e spighe non inoculate (open).

### **Valutazione visiva del materiale**

Alla maturazione fisiologica, le spighe sono state raccolte, ne sono state rimosse le brattee ed è stato contato il numero di cariossidi con contaminazione visibile al punto di inoculo (NCC) sia nei materiali inoculati con acqua che in quelli con spore fungine. Il grado di infezione ambientale dei controlli open-non inoculati è stato valutato secondo la scala proposta da Reid *et al.* (5), tramite un punteggio legato alla percentuale della spiga ricoperta da micelio visibile (1=0%; 2=1-3%; 3=4-10%; 4=11-25%; 5=26-50%; 6=51-75%; 7=76-100%).

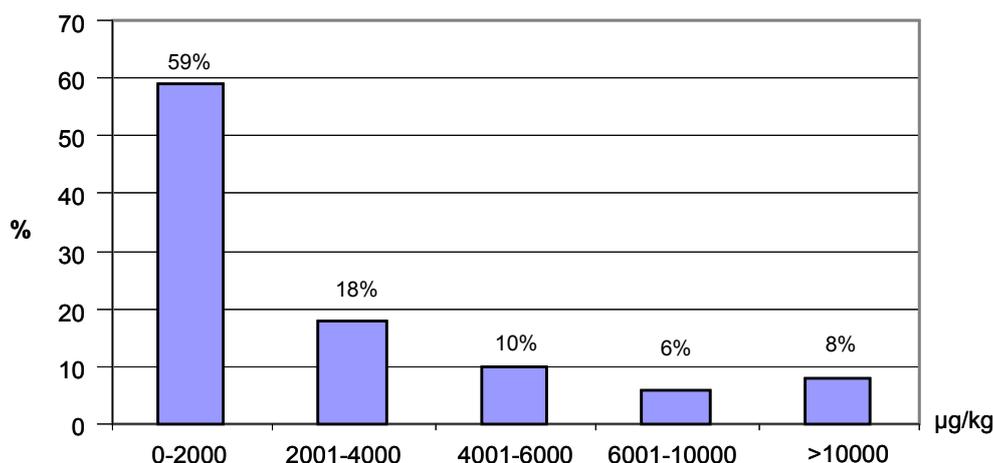
### **Valutazione della contaminazione interna**

I campioni sono stati sgranati, quartati e ne stata valutata la contaminazione interna come riportato in Balconi *et al.* (1). Le cariossidi sono state poste su terreno selettivo per *Fusarium* DRBC (6). Dopo 7 giorni in camera di coltura è stato valutato il numero di cariossidi contaminate.

## Risultati e discussione

Il monitoraggio per la determinazione delle fumonisine nel mais ha previsto un programma di campionamento rappresentativo di diversi aspetti della realtà produttiva nazionale quali campioni aziendali e centri di stoccaggio.

In Figura 1 sono riportati gli intervalli di distribuzione percentuale relativi al contenuto in fumonisine dei campioni di mais (totale 384) provenienti dalla sperimentazione “On Farm” in Lombardia (291) e Piemonte (93) per l’annata 2011. Risulta evidente come la maggior parte dei campioni analizzati (77%) presenti un contenuto di fumonisine inferiore a 4000 µg/kg, valore limite stabilito dal Regolamento CE (3).

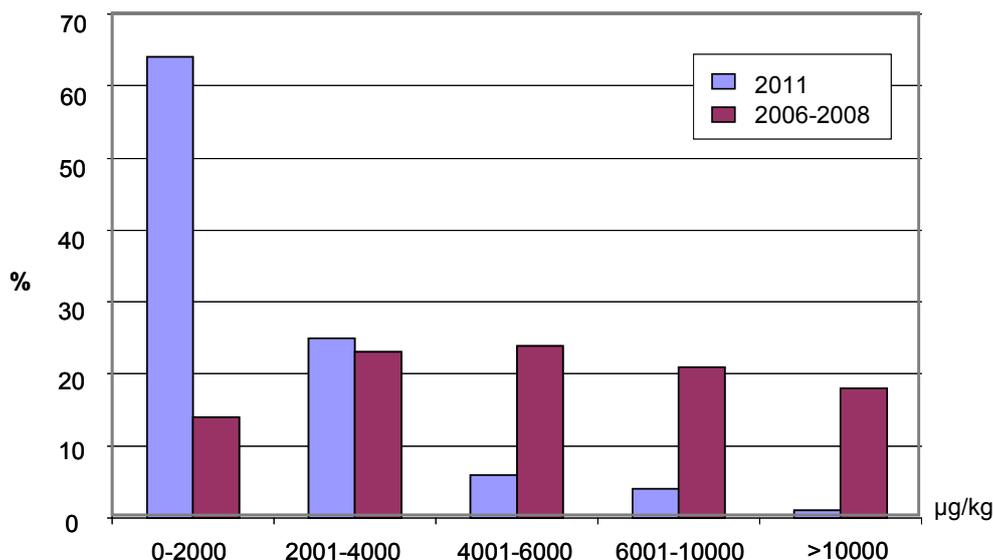


**Figura 1. Distribuzione percentuale del contenuto in fumonisine (µg/kg) nei campioni di mais provenienti dalle prove ON FARM della Lombardia e del Piemonte, 2011**

È noto da anni in letteratura che la metodologia di campionamento costituisce uno degli aspetti più critici in grado di influenzare la qualità delle partite di mais prodotte in Italia. In questo ambito, il monitoraggio di produzioni maidicole italiane, riguardo alla contaminazione da micotossine riveste quindi un ruolo di notevole importanza.

Al fine di ottenere risultati il più possibile aderenti alla realtà della produzione maidicola italiana si è scelto preliminarmente di utilizzare gli impianti di essiccazione-stoccaggio quale sorgente dei campioni da analizzare. Sui 462 campioni rappresentativi della campagna produttiva 2011 è stato determinato il contenuto di fumonisine utilizzando il metodo immunoenzimatico ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) (2).

I campioni di mais provenienti dagli essiccatoi della campagna maidicola 2011 hanno fatto registrare generalmente una riduzione del contenuto in fumonisine rispetto alla media del triennio 2006-2008 con la percentuale più rappresentativa pari all’89% collocata nell’intervallo 0-4000 µg/kg (Figura 2). I risultati relativi alle indagini riguardanti il monitoraggio di partite di mais provenienti dai centri di stoccaggio sembrano indicare che l’annata 2011, rispetto alle annate precedenti, sia risultata sfavorevole all’accumulo di fumonisine. Quasi il 90% dei campioni è risultato infatti rientrare nei limiti di norma previsti dal Regolamento CE (3).



**Figura 2. Distribuzione percentuale del contenuto in fumonisine (µg/kg) in campioni di mais provenienti da centri di stoccaggio di Lombardia, Piemonte, Veneto, Friuli-Venezia Giulia ed Emilia Romagna nella campagna maidicola 2011 (numero campioni 462) e nel triennio 2006-2008 (numero campioni 2258)**

Al fine di individuare materiali resistenti alla fusariosi della spiga e con ridotto accumulo di fumonisine, sono state utilizzate tecniche di inoculo artificiale con mix di ceppi tossigeni di *F. verticillioides* per la valutazione della variabilità genetica disponibile. Gli esperimenti sono stati condotti su 13 linee ibred selezionate in base al contenuto di fumonisine accumulate mediante inoculo artificiale, nelle annate maidicole 2009 e 2010 (Tabella 3). In aggiunta, è stata sottoposta all'esperimento la linea ibred Lo 863, interessante dal punto di vista agronomico.

I genotipi di mais selezionati per ricerca MICOPRINCEM, sulla base del contenuto di fumonisine rilevato durante le sperimentazioni condotte negli anni 2009-2010, in seguito ad inoculo artificiale sono:

- Genotipi a basso contenuto fumonisine (< 10000 µg/kg):

Lo 018  
Lo 021  
Lo 295  
Lo 309  
Lo 387  
Lo 435  
Lo 577  
Lo 578

- Genotipi ad alto contenuto fumonisine (> 30000 µg/kg)

Lo 043  
Lo 051w  
Lo 186  
Lo 241  
B73.

In Figura 3 sono rappresentati i tre passaggi fondamentali dello screening per valutare la risposta all'infezione fungina: (i) inoculo artificiale mediante metodo KIA; (ii) valutazione visiva del grado di infezione mediante conta del Numero di Cariossidi Contaminate (NCC) al punto di inoculo; (iii) valutazione della contaminazione interna mediante piastratura delle cariossidi su terreno selettivo per *Fusarium* DRBC (6).

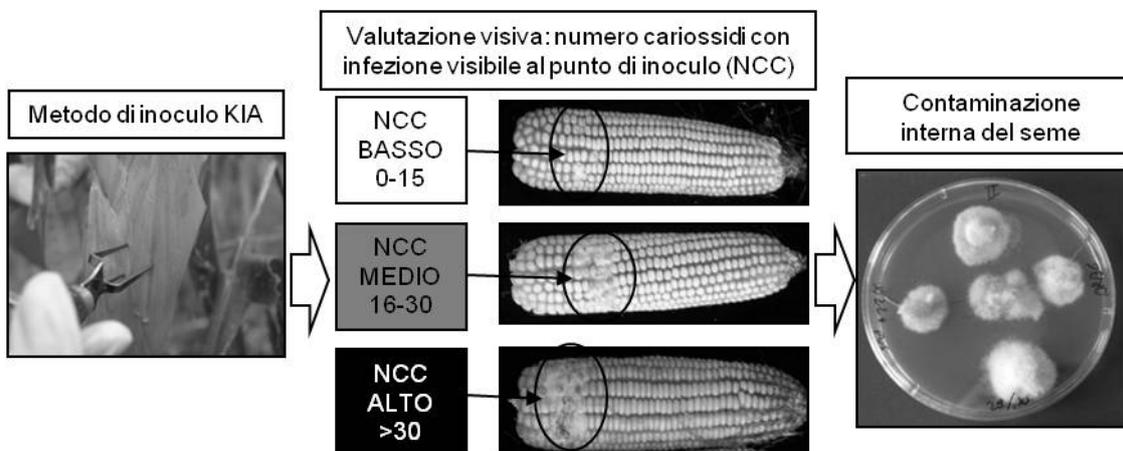


Figura 3. Fasi dello screening per valutare la risposta all'infezione fungina

Come indicato in Figura 4, i dati NCC relativi alla sperimentazione 2011 mostrano che l'inoculo artificiale applicato alle linee in studio presso la località di Bergamo, ha indotto una maggiore estensione del micelio a partire dal punto di inoculo, rispetto alla località di Sant'Angelo Lodigiano. La valutazione della contaminazione interna del seme mostra che le linee oggetto di questo studio hanno una percentuale di cariossidi contaminate internamente superiore all'84%. Sono in corso le analisi relative alle possibili correlazioni tra contaminazione interna del seme, contenuto di fumonisine e NCC.

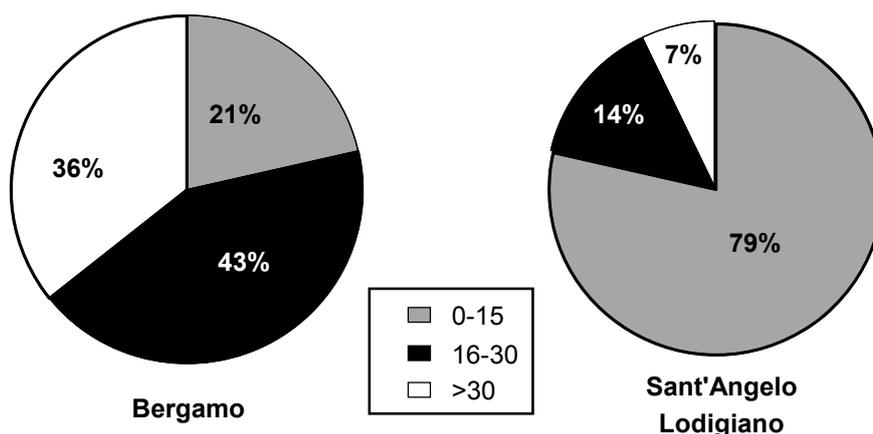


Figura 4. Distribuzione percentuale delle 14 linee inbred inoculate con Numero di Cariossidi Contaminate (NCC), 2011

## Conclusioni e prospettive

Uno degli obiettivi della ricerca svolta nell'ambito del progetto Micoprincem consiste nel fornire a tutti gli operatori della filiera dati complessivi circa i reali livelli di contaminazione delle scorte di prossima immissione nel mercato. I risultati, messi "in serie" con i dati omogenei degli anni precedenti e correlati con l'andamento climatico, i bacini di raccolta, le aree di produzione, le caratteristiche fisico-meccaniche delle partite, le specifiche dei processi di post raccolta e gli aspetti più rilevanti della produzione di campo (fasi fenologiche, umidità di raccolta, management e livelli di stress, ecc.), costituiranno elementi di un database utilizzabile per le attività di previsione-prevenzione e gestione del rischio micotossine.

I risultati preliminari relativi alle indagini riguardanti il monitoraggio di partite di mais provenienti dalla sperimentazione ON FARM e dai centri di stoccaggio sembrano indicare che l'annata 2011, rispetto alle annate precedenti, sia risultata sfavorevole all'accumulo di fumonisine. Oltre l'80% dei campioni, in entrambe le sperimentazioni, è risultato infatti rientrare nei limiti di norma previsti dal Regolamento CE (3).

## Ringraziamenti

Ricerca eseguita nell'ambito del progetto MICOPRINCEM, "Micotossine principali ed emergenti nei cereali", finanziato MiPAAF, DM 27009/7643/10 del 30/11/2010. Si ringrazia la Prof.ssa Battilani dell'Università di Piacenza per aver fornito i ceppi fungini tossigeni di *F. verticillioides* utilizzati per la sperimentazione.

## Bibliografia

1. Balconi C, Motto M, Mazzinelli G, Berardo N. Ear secondary traits related to aflatoxin accumulation in commercial maize hybrids under artificial field inoculation. *World Mycotoxin Journal*, 2010;3:239-50
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, 29 settembre 2007.
4. Ferrari A, Balconi C Tecniche di inoculo fungino per valutazione di genotipi di mais. *Dal Seme* 2008;1:38-40.
5. Reid LM, Hamilton RI, Mather DE. Screening maize for resistance to gibberella ear rot. *Agriculture and Agri-Food Canada*. Ottawa, ON: Technical Bulletin; 1996.
6. King DA, Hocking AD, Pitt JI. Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 1979;37:959-64.

# TECNICHE DI SCREENING E CONFERMA: IL CASO AFLATOSSINA M1

Alberto Biancardi, Cristina Aimò, Pierluigi Piazza, Roberto Piro  
*Dipartimento di Alimenti e Sicurezza Alimentare, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia*

## Introduzione

Per il controllo della presenza di residui di aflatossina M1 nel latte, il Regolamento (CE) n. 1831/2003 (1) richiede metodologie analitiche sensibili, precise e accurate. Le più diffuse sono basate su metodi normati: ISO 14675-2003 (2), metodo ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) solitamente usato per analisi di screening e ISO 14501-2007 (3), metodo IAC-HPLC (*Immuno-Affinity Chromatography-High Performance Liquid Chromatography*) impiegato per conferme e generalmente considerato la tecnica di elezione. Esistono altri importanti riferimenti relativi sia alla validazione che alla stima dell'incertezza di misura. Quanto alla validazione dei metodi di screening, è opportuno citare un'importante linea guida degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS) in accordo con la Decisione 657/2002 (4). All'interno dell'IZS della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) esiste inoltre una Procedura Generale direttamente desunta dall'allegato III del Regolamento 853/2004 (5). Quanto alla stima dell'incertezza di misura, la Procedura Generale utilizzata presso IZSLER trae direttamente ispirazione dalla guida EURACHEM/CITAC (6). Il problema dell'aflatossina M1 nel latte è stato da anni affrontato dal punto di vista analitico con un approccio di screening ELISA e uno di conferma HPLC. Il confronto delle due tecniche è ben documentato in letteratura; risale al lontano 1997 uno dei primi lavori al riguardo (7). Ne seguirono altri (8,9). Tutti accomunati da una sorta di preconcetto, ovvero che la tecnica ELISA è sempre inferiore in termini di prestazioni analitiche. Lo scopo di questo lavoro è dimostrare sperimentalmente l'esatto contrario, utilizzando i dati di controllo di qualità generati dall'attività routinaria del laboratorio in un intervallo di tempo molto ampio (4 anni).

## Materiali e metodi

### Reagenti

I reagenti utilizzati nelle diverse tecniche analitiche sono:

– *ELISA*

Il kit ELISA utilizzato per la determinazione quantitativa dell'aflatossina M1 è stato fornito da TECNA (I'screen AFLA M1) e contiene: micropiastra a 96 pozzetti adsorbiti con anticorpi anti-aflatossina M1, soluzioni standard di aflatossina M1 pronte per l'uso (1,5 mL) a 0, 5, 10, 25, 50, 100, 250 ng/L di aflatossina M1, coniugato enzimatico concentrato 100X (0,25 mL), diluente del coniugato enzimatico (20 mL), tampone di lavaggio concentrato 20X (50 mL), tampone di estrazione (60 mL), diluente del campione ovvero tampone latte (12 mL), soluzione di sviluppo (15 mL), soluzione d'arresto (9 mL) contenente acido solforico 2 M.

L'acqua bidistillata, deionizzata e filtrata su 0,2 µm è stata prodotta mediante apparecchiatura Milli-Q (Millipore). Le matrici di riferimento certificate (MRC) sono state fornite da FAPAS.

– *IAC-HPLC*

L'acqua bidistillata, deionizzata e filtrata su 0,2 µm è stata prodotta mediante apparecchiatura Milli-Q (Millipore). Il metanolo e l'acetonitrile hanno entrambi grado di purezza HPLC e sono stati forniti rispettivamente da Panreac e da Carlo Erba. La soluzione standard concentrata di aflatoxina M1 è stata fornita dalla ditta Supelco (Sigma-Aldrich): si tratta di una soluzione certificata a 10 µg/mL in acetonitrile, con purezza, concentrazione e stabilità dichiarate. A partire dalla soluzione concentrata è stata preparata una soluzione intermedia a 0,5 µg/mL in acqua:acetonitrile = 90:10 (v/v). Da quest'ultima sono state preparate nella stessa miscela sei soluzioni di lavoro per la determinazione quantitativa in HPLC-FL (Fluorescence) aventi le seguenti concentrazioni: 1; 2,5; 5; 10; 20; 40 ng/mL. Le colonnine di immunoaffinità (IAC) sono state fornite da R-Biopharm (Easy-Extract). Le matrici di riferimento certificate (MRC) sono state fornite da FAPAS.

## Preparazione del campione per analisi ELISA

Trasferire 10 mL in provetta da centrifuga; centrifugare per 10 min a 3000 rpm; asportare il tappo di grasso mediante aspirazione col vuoto; usare la parte sgrassata direttamente nel saggio.

## Analisi ELISA

Deporre nei rispettivi pozzetti 100 µL di ogni standard e di ogni campione, compreso un campione di riferimento a titolo noto. Mescolare manualmente con cauto movimento rotatorio su superficie piana. Coprire e incubare per 45 minuti a temperatura ambiente (18÷25°C). Svuotare il contenuto dei pozzetti e aggiungere in ciascuno 260 µL della soluzione di lavaggio; svuotare e rimuovere ogni residuo della soluzione di lavaggio capovolgendo la micropiastra più volte su un foglio di carta assorbente. Ripetere l'operazione di lavaggio altre tre volte. Aggiungere 100 µL del coniugato enzimatico per pozzetto. Mescolare manualmente con cauto movimento rotatorio su superficie piana. Coprire e incubare per 15 minuti a temperatura ambiente (18÷25°C). Procedere con i quattro lavaggi come indicato sopra. Aggiungere poi 100 µL della soluzione di sviluppo per pozzetto. Mescolare manualmente con cauto movimento rotatorio su superficie piana. Coprire e incubare per 15 min a temperatura ambiente (18÷25°C). Bloccare la reazione enzimatica aggiungendo 50 µL di soluzione d'arresto per pozzetto (usare micropipetta multicanale). Dopo un cauto miscelamento, misurare l'assorbanza a 450 nm (effettuare la lettura entro 60 minuti dallo spegnimento della reazione).

## Modalità di calcolo

Riportando l'assorbanza in funzione delle concentrazioni 0, 5, 10, 25, 50, 100, 250 ng/L delle soluzioni standard, generare la curva di taratura mediante apposito programma informatico (Foglio di calcolo I'screen M1 TECNA o equivalente). Per interpolazione, si risale alla concentrazione incognita espressa in ng/L. Qualora il risultato sia superiore a 40 ng/L, si procede ad una seconda determinazione ELISA. Utilizzando il tampone latte fornito nel kit, il campione viene diluito opportunamente in modo che la sua concentrazione rientri nell'intervallo di massima linearità di risposta (0,020÷0,030 µg/L). A diluizione avvenuta, il campione è

rianalizzato in doppio assieme al tal quale (ovvero il non diluito). Il risultato ottenuto, moltiplicato per il fattore di diluizione, rappresenta la concentrazione incognita.

## Preparazione del campione per analisi IAC-HPLC

Centrifugare almeno 100 mL di latte in barattolo da centrifuga per 15 min a 3000 rpm; eliminare il tappo di grasso mediante aspirazione col vuoto; filtrare su carta. Pesare 10 g di latte scremato da caricare su IAC. Riportare le colonnine IAC a temperatura ambiente prima dell'uso (almeno 30 minuti). Alloggiarle sull'apposito supporto per colonnine SPE e innestarvi sopra le siringhe da 10 mL. Percolare il campione lentamente per gravità. In questa fase la colonnina IAC non deve assolutamente andare a secco. Rimuovere gli interferenti mediante lavaggio con 10 mL di acqua. Eliminare ogni traccia di acqua dalla colonnina, mediante passaggio di aria; in questa fase la colonnina IAC deve andare a secco. Eluire lentamente con 4 mL di acetonitrile e raccogliere l'eluato in provetta conica in polipropilene da 15 mL munita di tappo a vite. Agitare su vortex a bassa velocità in modo da rendere perfettamente omogenea la soluzione di eluato. Tirare a secco l'eluato in corrente di azoto a  $40\pm 5^\circ\text{C}$ . Riprendere il residuo con 200  $\mu\text{L}$  di soluzione acqua:acetonitrile = 90:10 (v/v) utilizzando una microsiringa da 250  $\mu\text{L}$ .

## Analisi HPLC-FL

È stata utilizzata la strumentazione HPLC Agilent Technologies 1100 composta da: pompa binaria, autocampionatore, rivelatore a fluorescenza, sistema computerizzato di acquisizione e calcolo del dato cromatografico. Le condizioni cromatografiche sono le seguenti: colonna cromatografica a fase inversa Supelcosil LC18 (lunghezza 25 cm, diametro interno 4,6 mm, diametro medio delle particelle 5  $\mu\text{m}$ ), dotata di precolonna Supelcosil LC18 (lunghezza 2 cm, diametro interno 4,6 mm); eluizione isocratica con fase mobile composta da acqua: metanolo = 52:48 (v/v); flusso 1 mL/min; lunghezza d'onda di eccitazione 360 nm; lunghezza d'onda di emissione 435 nm; volume di iniezione 50  $\mu\text{L}$ .

La modalità di calcolo ha previsto la costruzione della retta di calibrazione riportando, per ogni standard, l'altezza del picco registrato in funzione delle quantità assolute di aflatoxina M1 iniettata. Dall'altezza del picco relativo al campione si risale per interpolazione mediante la retta di taratura alla quantità, espressa in ng di aflatoxina M1 presente nel volume di campione iniettato. Procedere al calcolo quantitativo della concentrazione C mediante la formula:

$$C \text{ (ng/kg)} = ng_{inj} \times 400$$

dove  $ng_{inj}$  rappresenta la quantità assoluta di aflatoxina relativamente al volume iniettato espresso in  $\mu\text{L}$ .

## Risultati e discussione

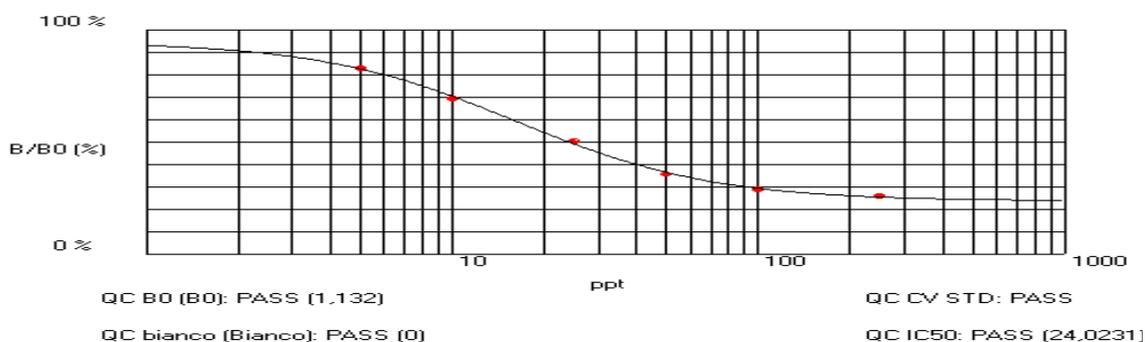
Presso l'IZSLER sono utilizzati sia lo screening ELISA che la conferma HPLC. Entrambi sono validati e accreditati ACCREDIA. Il metodo HPLC è considerato la tecnica di elezione per le analisi di conferma di positività. È un metodo sensibile, specifico, preciso e accurato. Presenta però alcuni limiti, essenzialmente correlati alla significativa manipolazione del campione. Le colonnine IAC sono un importante punto critico quanto alla conservazione, al corretto uso (non possono essere riutilizzate) e alla riproducibilità *batch-to-batch*. Complessivamente il metodo ha tempi medio-lunghi e costi medio-alti. Ciò comporta una bassa

produttività. Il sistema non è in grado di affrontare e sostenere i ritmi in una situazione di emergenza. Quelli che sono i limiti per l'HPLC rappresentano invece i punti di forza della tecnica ELISA, considerata tecnica di elezione per l'analisi di screening. A differenza del metodo HPLC, la manipolazione del campione è praticamente nulla, i tempi di analisi ridotti e così pure i costi. Presenta un'ottima produttività e in tal senso ben si presta ad affrontare situazioni di emergenza. In Tabella 1 sono riportati i risultati di alcuni *Proficiency Test* (PT) a cui il laboratorio ha partecipato direttamente con il metodo ELISA; ottima l'accuratezza dei dati, come si può notare dai valori di *z-score*.

**Tabella 1. Risultati PT con metodo ELISA**

PT-FAPAS	Anno	Concentrazione assegnata (ppt)	$\sigma_p$ (ppt)	z-score
04125	2008	69,3	15,2	0,00
04137	2009	47,9	10,5	-0,18
04159	2010	31,9	7,0	0,10
04163	2010	34,1	7,5	-0,28
04175	2011	37,1	8,2	0,70

Come evidenziato in Figura 1, l'unico importante accorgimento è quello di operare nel range di massima linearità di risposta del kit, centrato sul valore di IC50, ovvero B/B0 50%. Questo valore, calcolato dal software ad ogni seduta analitica, è mediamente sui 25-30 ppt. Oltre i 40 ppt, si perde progressivamente la linearità di risposta e perciò piccole variazioni del segnale (assorbanza) possono corrispondere a grandi variazioni di concentrazione. Quindi per valori superiori a 40 ppt, è necessario procedere ad un seconda seduta analitica previa opportuna diluizione del campione in modo da rientrare nel range di massima linearità di risposta.



**Figura 1. Tipica curva di calibrazione ELISA**

Per avere un dato oggettivo di affidabilità, sono stati considerati i dati di controllo di qualità (n. 338) prodotti dal laboratorio nell'arco di 4 anni di attività (periodo 2007-2010). Nella carta di controllo (Figura 2) è riportato l'andamento degli *z-score* su sette diverse MRC nel periodo considerato. È bene sottolineare che siamo in condizioni di massima riproducibilità: 4 anni, operatori diversi, lotti diversi a parità di tipologia di kit. Ogni punto rappresenta il controllo intermo di un batch di analisi di screening. La distribuzione degli *z-score* è centrata nella fascia  $\pm 1$ .

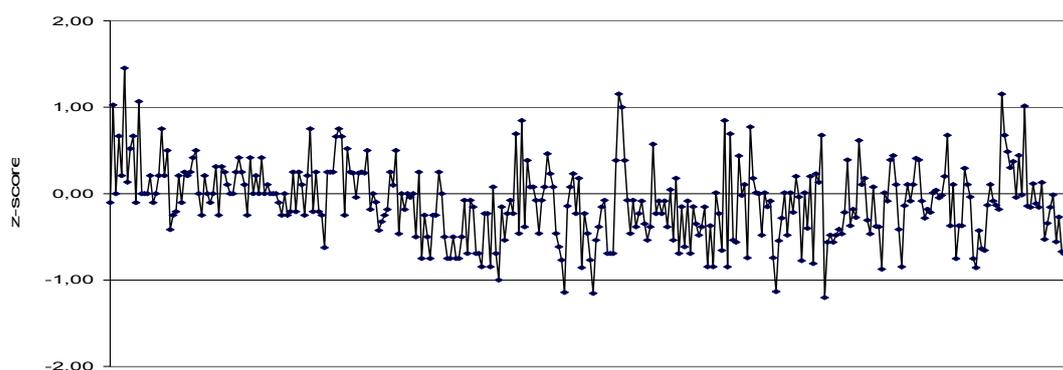


Figura 2. Carta di controllo degli z-score in ELISA (2007-2010; n. 338)

Dalla Tabella 2 si nota come l'intervallo di concentrazioni delle MRC si estenda da valori sia inferiori che superiori al limite normato di 50 ppt. Sono riportati le concentrazioni medie trovate (in funzione delle diverse numerosità campionarie), gli intervalli fiduciali IF (95%), gli *z-score* medi.

Tabella 2. Accuratezza e precisione ELISA (in condizioni di massima riproducibilità)

Concentrazione assegnata MRC (ppt)	$\sigma_p$ (ppt)	Concentrazione media trovata (ppt)	n.	$\pm$ IF (95%)	CV (%)	<i>z-score</i> medio
11	4,0	10,84	62	0,39	14,3	-0,04
31,9	7,0	31,25	22	1,22	8,8	-0,09
32,3	7,1	32,84	15	1,36	7,5	0,08
44	9,6	44,56	41	0,73	5,2	0,06
47,9	10,5	46,95	63	1,19	10,0	-0,09
59	13	56,10	79	1,39	11,0	-0,22
69,3	15,2	65,95	46	1,62	8,3	-0,22

L'accuratezza del metodo è evidente non solo in termini di campo di variazione, decisamente ristretto, degli *z-score* medi (da 0,08 a -0,22) ma anche in termini di retta di regressione lineare che correla la concentrazione media trovata (ppt) in funzione della concentrazione assegnata delle diverse MRC (ppt). L'equazione sperimentalmente ottenuta è  $y = 0,9383 x + 1,6163$  ( $r^2 = 0,9968$ ). Anche i dati di precisione (CV%) sono buoni considerando che siamo in condizioni di massima riproducibilità.

Analogamente per quanto riguarda l'HPLC. Nella carta di controllo (Figura 3) è riportato l'andamento degli *z-score* su sette diverse MRC nello stesso periodo 2007-2010 (n. 151). Siamo in condizioni di massima riproducibilità; 4 anni, operatori diversi, lotti di colonnine IAC diversi e diverse serie di soluzioni standard per la quantificazione. Ogni punto rappresenta il controllo intermo di un batch di analisi di conferma. La distribuzione degli *z-score* è sempre centrata nella fascia di  $\pm 1$ , seppure con una maggiore dispersione, almeno visivamente.

In Tabella 3 si nota come le sette MRC coprano un intervallo di contaminazione da 32 a 69 ppt, quindi da valori inferiori a valori superiori al limite normato di 50 ppt. Sono riportati le concentrazioni medie trovate (in funzione delle diverse numerosità campionarie), gli intervalli fiduciali IF (95%), gli *z-score* medi.

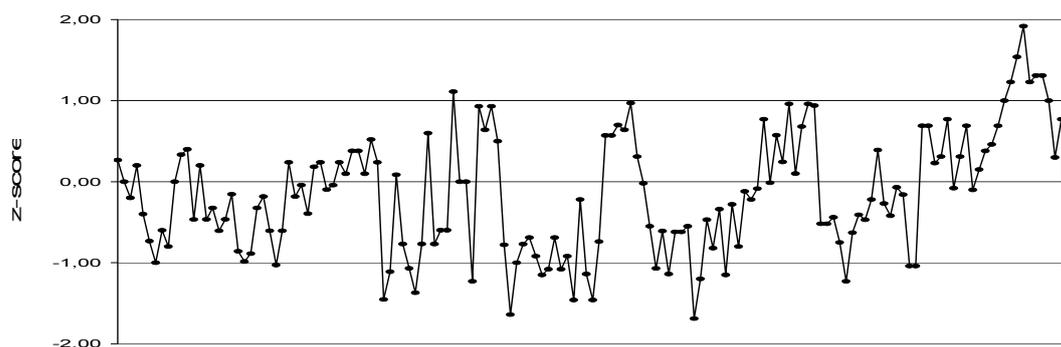


Figura 3. Carta di controllo degli z-score in HPLC (2007-2010; n. 151)

Tabella 3. Accuratezza e precisione HPLC (in condizioni di massima riproducibilità)

Concentrazione assegnata MRC (ppt)	$\sigma_p$ (ppt)	Concentrazione media trovata (ppt)	n.	$\pm$ IF (95%)	CV (%)	z-score medio
32,3	7,10	30,87	28	1,22	10,2	-0,20
47,9	10,5	45,40	23	2,91	14,8	-0,23
53	11,7	47,92	13	5,34	18,5	-0,43
59	13,0	60,16	34	4,53	21,6	0,09
63	14,0	59,98	8	12,50	24,9	-0,22
68	15,0	65,00	14	4,03	10,7	-0,20
69,3	15,2	66,88	27	3,97	15,0	0,16

L'accuratezza del metodo è evidente non solo in termini di campo di variazione, decisamente ristretto, degli *z-score* medi (da 0,16 a -0,43) ma anche in termini di retta di regressione lineare che correla la concentrazione media trovata (ppt) in funzione della concentrazione assegnata delle diverse MRC (ppt). L'equazione sperimentalmente ottenuta è:  $y = 0,9848 x - 1,4619$ . La retta di regressione calcolata presenta una correlazione lineare (0,9784), non buona quanto quella trovata per il metodo ELISA (0,9968). Quindi, la correlazione lineare, quale parametro di accuratezza, è migliore per il metodo ELISA. Nondimeno l'ANOVA tra le due rette non evidenzia alcuna differenza significativa ( $p = 0,16$ ).

In Tabella 4 sono riportate tutte le MRC impiegate; alcune sono state usate solo in ELISA, alcune solo in HPLC, altre sia in ELISA che in HPLC. Dall'ANOVA non esiste differenza significativa in termini di accuratezza dei 2 metodi ( $p = 0,42$ ). Quanto alla precisione, la varianza dei dati ELISA (0,0143) è minore di quella relativa ai dati HPLC (0,0414). Inoltre il campo di variazione degli *z-score* ottenuti in ELISA (0,30) è praticamente la metà di quello ottenuto con metodo HPLC (0,59).

Nella Figura 4 sono state prese in considerazione solo le quattro MRC analizzate sia in ELISA che in HPLC. Come si può osservare, la correlazione lineare tra le concentrazioni teoriche e le medie delle concentrazioni trovate è decisamente migliore per il metodo ELISA rispetto al metodo HPLC. Ad ogni modo l'ANOVA non evidenzia alcuna differenza significativa tra i due metodi ( $p = 0,97$ ). Analogo risultato è stato ottenuto dal confronto degli *z-score* medi. L'ANOVA non ha evidenziato una differenza significativa ( $p = 0,60$ ).

Tabella 4. z-score medi ottenuti in ELISA e in HPLC

Concentrazione assegnata MRC (ppt)	z-score medio ELISA	z-score medio HPLC
11	-0,04	
31,9	-0,08	
32,3	0,08	-0,20
44	0,06	
47,9	-0,09	-0,23
53		-0,43
59	-0,22	0,09
63		-0,22
68		-0,20
69,3	-0,22	0,16

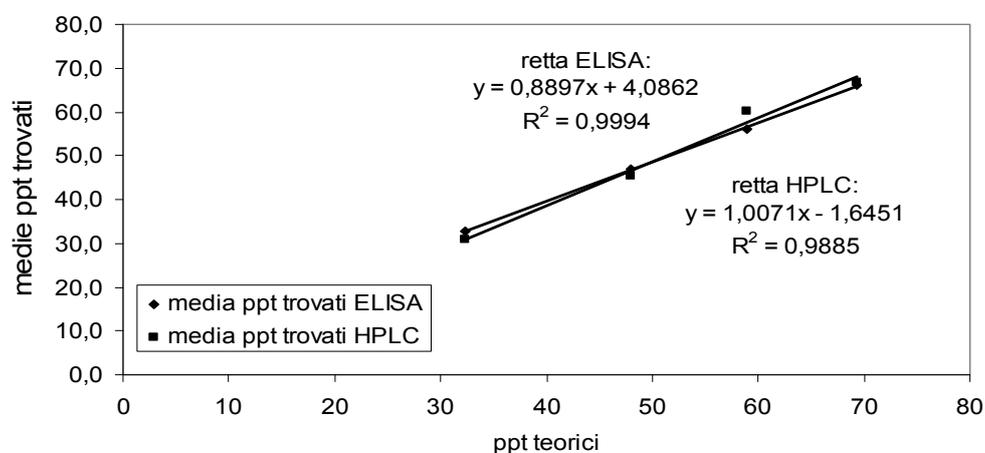


Figura 4. Sintesi grafica dell'accuratezza dei metodi ELISA e HPLC (in condizioni di massima riproducibilità)

## Conclusioni

Possiamo anzitutto concludere che il metodo ELISA ha prestazioni equivalenti al metodo HPLC. Da una valutazione più puntuale dei parametri prestazionali sia in termini di accuratezza (*z-score* e  $r^2$ ) che di precisione (*CV%*), possiamo andare oltre l'equivalenza e affermare che il metodo ELISA è migliore. Questa apparentemente "anomala" conclusione è dovuta al fatto che nel metodo ELISA la manipolazione del campione è praticamente nulla, mentre è consistente nel metodo HPLC. Ciò comporta importanti e innumerevoli vantaggi: anzitutto una minore probabilità di introdurre errori casuali e sistematici e quindi maggiore accuratezza e precisione. Altri vantaggi sono velocità e costi di analisi ridotti, ma anche un'elevata produttività. In tal senso il metodo ELISA potrebbe avere una duplice funzione ovvero di metodo di screening e di metodo di conferma. Tali risultanze possono essere particolarmente utili e vantaggiose per quei laboratori che, per scelta strategica o istituzionale o per mancanza di idonea strumentazione cromatografica e quindi di risorse, si limitano ad uno screening ELISA. Opportunamente condotta l'analisi mediante ELISA è in grado di dare risultati quantitativi precisi e accurati a qualsiasi livello di contaminazione, a patto di:

- operare in qualità (UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005);
- utilizzare un kit ELISA costantemente garantito e certificato dalla ditta produttrice, nonché validato e accreditato dal laboratorio utilizzatore;
- diluire opportunamente il campione risultato non conforme in prima istanza in modo da rientrare nel range di massima linearità di risposta e rianalizzato in seconda istanza.

## Bibliografia

1. 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, 20 dicembre 2006.
2. ISO 14675. *Milk and milk products- Guidelines for a standardized description of competitive enzyme immunoassays- Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> content*. Geneva: International Organization for Standardization; 2003.
3. ISO 14501. *Milk and milk powder- Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> content- Clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by high-performance liquid chromatography*. Geneva: International Organization for Standardization; 2007.
4. Gruppo di lavoro dei Laboratori di Chimica degli IZZSS. *Linea guida per la validazione intra-laboratorio di metodi di prova di screening in accordo con la Decisione 2002/657/CE*. 2008.
5. Europa. Regolamento 882/2004/CE del 29 aprile 2004. 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. Allegato III: Caratterizzazione dei metodi di analisi. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 165, 18 giugno 2004.
6. Ellison SLR, Rosslein M, Williams A (Ed.). *EURACHEM/CITAC Guide. Quantifying uncertainty in analytical measurement*. II edition. EURACHEM/CITAC; 2000.
7. Biancardi A. Determinazione di aflatoxina M<sub>1</sub> nel latte - Metodologie immunochimiche e cromatografiche a confronto. *Industrie Alimentari* 1997;16:870-6.
8. Rubio R, Berruga MI, Romàn M, Molina A. Evaluation of immunoenzymatic methods for the detection of aflatoxin M<sub>1</sub> in ewÈs milk. *Food Control* 2009;20:1049-52.
9. Rosi P, Borsari A, Lasi G, Lodi S, Galanti A, Fava A, Girotti S, Ferri E. Aflatoxin M<sub>1</sub> in milk: reliability of the immunoenzymatic assay. *International Dairy Journal* 2007;17:429-35.

## RISCHI EMERGENTI: PRESENZA DI OCRATOSSINA A IN ALIMENTI “NON CONVENZIONALI”

Alberto Biancardi, Cristina Aimò, Pierluigi Piazza, Roberto Piro  
*Dipartimento di Alimenti e Sicurezza Alimentare, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia*

### Introduzione

L'ocratossina A (OTA) è una micotossina prodotta da specie tossinogene dei generi *Aspergillus* e *Penicillium* (1). Presenta proprietà nefrotossiche, epatotossiche, genotossiche, teratogene, immunotossiche e cancerogene (2,3). Sebbene cereali e derivati siano considerati i principali substrati di contaminazione da OTA, anche il caffè, l'uva e i prodotti derivati (vino, aceto) costituiscono una secondaria ma rilevante (circa il 25%) fonte di esposizione per il consumatore (4-6). È stato condotto uno studio di monitoraggio per valutare la presenza di OTA in caffè, vino e aceto mediante metodo IAC-HPLC (*Immuno-Affinity Chromatography-High Performance Liquid Chromatography*). La concentrazione minima rilevabile è 0,02 mg/kg per vino e aceto, mentre è 1 mg/kg per il caffè. La normativa vigente ovvero il Regolamento (CE) 1881/2006 (7) stabilisce tenori massimi di OTA pari a 2 mg/kg per il vino, mg/kg per il caffè torrefatto e 10 mg/kg per il caffè solubile. Per la matrice aceto non è previsto alcun limite di legge.

### Materiali e metodi

#### Reagenti

L'acqua bidistillata, deionizzata e filtrata su 0,2 µm è stata prodotta mediante apparecchiatura Milli-Q (Millipore). Il metanolo e l'acetonitrile hanno entrambi grado di purezza HPLC e sono stati forniti rispettivamente da Panreac e da Carlo Erba. Il polietilenglicole 8000 (PEG) e l'acido acetico glaciale sono stati acquistati rispettivamente da Sigma-Aldrich e da Panreac. Il cloruro di sodio e il bicarbonato di sodio sono stati forniti da Carlo Erba. La soluzione standard concentrata di OTA è stata fornita dalla ditta Biopure: si tratta di una soluzione certificata a 10 µg/mL in acetonitrile, con purezza, concentrazione e stabilità dichiarate. A partire dalla soluzione concentrata è stata preparata una soluzione intermedia a 0,5 µg/mL nella fase mobile per HPLC (vedi Analisi HPLC-FL). Da quest'ultima sono state preparate nella stessa miscela quattro soluzioni di lavoro per la determinazione quantitativa in HPLC-FL aventi le seguenti concentrazioni: 2; 6; 20; 60 ng/mL. Le colonnine di immunoaffinità (IAC) sono state fornite da R-Biopharm (Ochrapprep); devono essere conservate a 2÷8°C.

#### Preparazione del campione

##### Vino

Prelevare 10 mL di campione (misurati con matraccio di classe A) in provettone; aggiungerci 10 mL di soluzione di diluizione contenente 1% PEG e 5% sodio bicarbonato;

tappare e miscelare su vortex; filtrare su carta. Riportare le colonnine IAC a temperatura ambiente prima dell'uso (almeno 30 minuti); alloggiarle sull'apposito supporto per colonnine IAC e innestarvi sopra i serbatoi da 10 mL. Caricare 10 mL (misurati con matraccio di classe A) su IAC e lasciare percolare lentamente; dopo la fase di carico segue una prima fase di lavaggio con 5 mL di soluzione contenente 2,5% cloruro di sodio e 0,5% sodio bicarbonato. Segue una seconda fase di lavaggio con 5 mL di acqua; eliminare ogni traccia di acqua dalla colonnina, mediante passaggio di aria. In questa fase la colonnina IAC deve andare a secco. Eluire lentamente con 2 mL di metanolo e raccogliere l'eluato in provetta conica in polipropilene da 15 mL. Agitare su vortex a bassa velocità in modo da rendere perfettamente omogenea la soluzione di eluato. Tirare a secco l'eluato in corrente di azoto a  $40\pm 5^{\circ}\text{C}$ . Riprendere il residuo con 250 mL di fase mobile composta da acqua: acetonitrile: acido acetico glaciale = 49,5:49,5:1 (v/v/v). Vortexare e centrifugare a 2000 rpm per 5 minuti.

### **Aceto e aceto balsamico**

Pesare 10 g di campione (bilancia tecnica con sensibilità 1 mg) in provettone; aggiungervi lentamente 30 g di soluzione di diluizione contenente 1% PEG e 5% sodio bicarbonato; tappare e miscelare a mano lentamente; filtrare su carta. Riportare le colonnine IAC a temperatura ambiente prima dell'uso (almeno 30 minuti); alloggiarle sull'apposito supporto per colonnine IAC e innestarvi sopra i serbatoi da 20 mL. Caricare 20 mL (misurati con pipetta da 20 mL di classe A) su IAC e lasciare percolare lentamente; dopo la fase di carico segue una prima fase di lavaggio con 5 mL di soluzione contenente 2,5% cloruro di sodio e 0,5% sodio bicarbonato. Segue una seconda fase di lavaggio con 5 mL di acqua; eliminare ogni traccia di acqua dalla colonnina, mediante passaggio di aria. In questa fase la colonnina IAC deve andare a secco. Eluire lentamente con 4 mL di metanolo e raccogliere l'eluato in provetta conica in polipropilene da 15 mL. Agitare su vortex a bassa velocità in modo da rendere perfettamente omogenea la soluzione di eluato. Tirare a secco l'eluato in corrente di azoto a  $40\pm 5^{\circ}\text{C}$ . Riprendere il residuo con 250 mL di fase mobile composta da acqua: acetonitrile: acido acetico glaciale = 49,5:49,5:1 (v/v/v). Vortexare e centrifugare a 2000 rpm per 5 minuti.

### **Caffè**

Pesare 5 g di campione (bilancia tecnica con sensibilità 1 mg) in beuta ambrata da 100 mL; aggiungervi 50 mL di soluzione estraente contenente 0,5% PEG e 2,5% sodio bicarbonato; tappare e mantenere su shaker per 60 minuti; centrifugare a 3000 rpm per 10 minuti; filtrare su carta. Riportare le colonnine IAC a temperatura ambiente prima dell'uso (almeno 30 minuti); alloggiarle sull'apposito supporto per colonnine IAC e innestarvi sopra i serbatoi da 5 mL. Caricare 5 mL (misurati con matraccio di classe A) su IAC e lasciare percolare lentamente; dopo la fase di carico segue una prima fase di lavaggio con 5 mL di soluzione di lavaggio contenente 2,5% cloruro di sodio e 0,5% sodio bicarbonato. Segue una seconda fase di lavaggio con 5 mL di acqua; eliminare ogni traccia di acqua dalla colonnina, mediante passaggio di aria. In questa fase la colonnina IAC deve andare a secco. Eluire lentamente con 3 mL di soluzione di eluazione composta da metanolo: acido acetico = 98:2 (v/v) e raccogliere l'eluato in provetta conica in polipropilene da 15 mL. Agitare su vortex a bassa velocità in modo da rendere perfettamente omogenea la soluzione di eluato. Tirare a secco l'eluato in corrente di azoto a  $40\pm 5^{\circ}\text{C}$ . Riprendere il residuo con 250 mL di fase mobile composta da acqua: acetonitrile: acido acetico glaciale = 59:40:1 (v/v/v). Vortexare e centrifugare a 2000 rpm per 5 minuti.

## Analisi HPLC-FL

Stazione HPLC Agilent Technologies 1100 composta da: pompa binaria, autocampionatore, rivelatore a fluorescenza, sistema computerizzato di acquisizione e calcolo del dato cromatografico. Le condizioni cromatografiche sono le seguenti: colonna cromatografica a fase inversa Discovery C18 Supelco (lunghezza 15 cm, diametro interno 4,6 mm, diametro medio delle particelle 5 mm); flusso 1 mL/min; lunghezza d'onda di eccitazione 333 nm; lunghezza d'onda di emissione 460 nm; volume di iniezione 100 mL (vino, aceto), 50 mL (caffè), eluizione isocratica con fase mobile composta da:

- acqua: acetonitrile: acido acetico glaciale = 49,5:49,5:1 (v/v/v) nel caso di vino e aceto;
- acqua: acetonitrile: acido acetico glaciale = 59:40:1 (v/v/v) nel caso del caffè.

### Modalità di calcolo

Costruire la retta di calibrazione riportando, per ogni standard, l'area del picco registrato in funzione delle quantità assolute di OTA iniettata. Dall'area del picco relativo al campione si risale per interpolazione mediante la retta di taratura alla quantità, espressa in ng di OTA presente nel volume di campione iniettato. Procedere al calcolo quantitativo della concentrazione C mediante la formula:

- Vino:  $C \text{ (mg/L)} = ng_{inj} \times 0,5$
- Aceto:  $C \text{ (mg/kg)} = ng_{inj} \times 0,5$
- Caffè:  $C \text{ (mg/kg)} = ng_{inj} \times 10$

dove  $ng_{inj}$  rappresenta la quantità assoluta di OTA relativamente al volume iniettato espresso in mL.

## Risultati e discussione

### Metodo

Per i campioni di vino è stato usato un metodo IAC-HPLC normato (8) e validato mediante studio interlaboratorio. Il metodo, previo opportuno aggiustamento del pH nella fase iniziale di diluizione, è stato anche applicato ai campioni di aceto. Dal medesimo è stata poi messa a punto una variante adatta per la matrice caffè. I metodi sulle matrici aceto e caffè sono stati validati intralaboratorio. La concentrazione minima rilevabile del metodo è 0,02 mg/L e 0,02 mg/kg per vino e aceto rispettivamente, mentre è 1 mg/kg per il caffè. Nella Tabella 1 sono riportati i parametri prestazionali in termini di accuratezza e precisione:

**Tabella 1. Prestazioni analitiche dei metodi**

Parametro	Matrice		
	Vino	Aceto	Caffè
Recupero medio %	93	90	96
CV %	3,2	5,2	4,5

In Figura 1 sono riportati, a titolo di esempio, i cromatogrammi di tre campioni naturalmente contaminati.

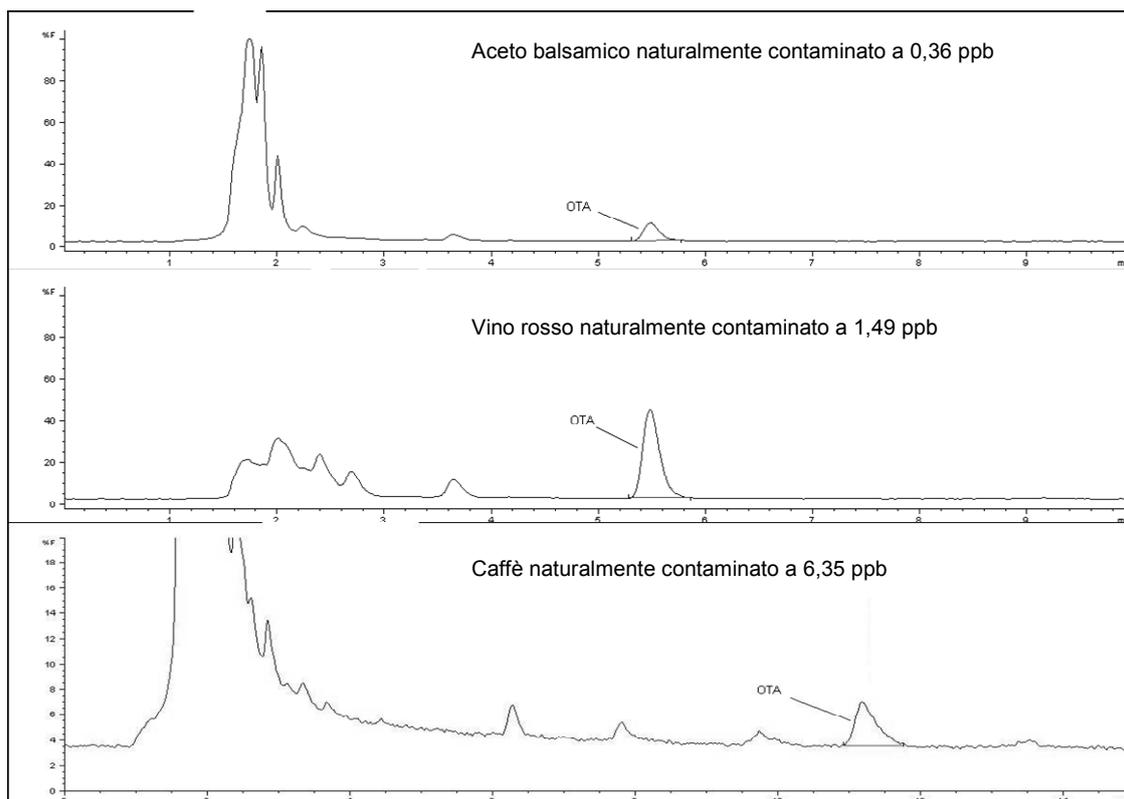


Figura 1. Cromatogrammi di aceto balsamico, vino rosso e caffè naturalmente contaminati

### Diffusione di OTA nel caffè

Per quanto riguarda i campioni di caffè (Figura 2) esaminati (n. 104), il 95% è risultato negativo ovvero <1 mg/kg. Il restante 5% è risultato >1 mg/kg. I valori riscontrati sono 2,45 mg/kg, 2,83 mg/kg, 3,47 mg/kg, 4,02 mg/kg e 6,35 mg/kg (unico valore superiore al limite normato di 5 mg/kg).

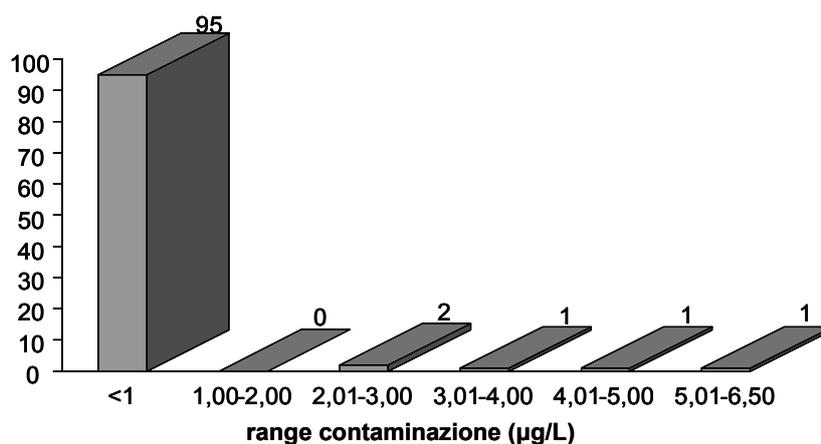


Figura 2. Incidenza % di OTA nei campioni di caffè

La situazione è dunque del tutto rassicurante circa il rischio di esposizione ad OTA attraverso il caffè; ciò è essenzialmente da attribuire alle drastiche condizioni di tostatura (>200°C) che comportano una significativa riduzione del tenore di OTA eventualmente presente nelle materie prime.

### Diffusione di OTA nel vino

Sono stati analizzati 101 campioni di vino (rossi e bianchi commerciali, provenienza Nord Italia) e 21 campioni di uve (Nord Italia) per un totale di n. 122.

Complessivamente l'84% dei campioni è risultato negativo ovvero <0,02 µg/L; rientrano in questo gruppo anche i 21 campioni di uve.

Nel restante 16% dei campioni è stata riscontrata la presenza di OTA a valori bassi; in dettaglio (Figura 3) l'incidenza è del 2% a 0,02 µg/L, 8% nel range 0,021÷0,10 µg/L, 5% nel range 0,11÷0,50 µg/L e solo 1% nel range 1,01÷1,50 µg/L.

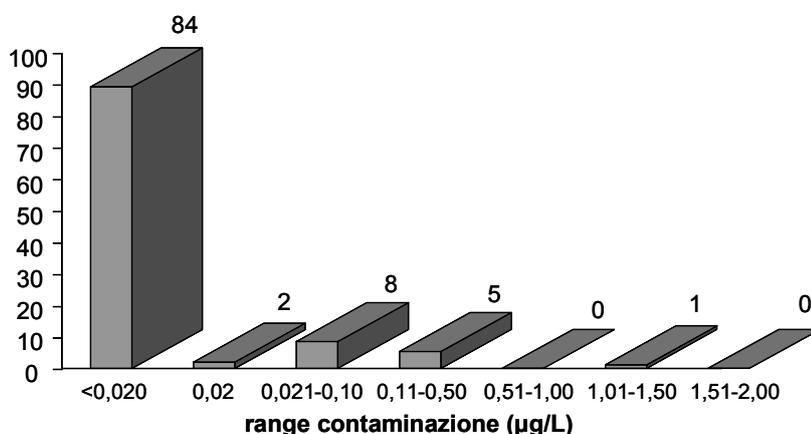


Figura 3. Incidenza % di OTA nei campioni di vino

Ad eccezione di due campioni di vino bianco a 0,19 µg/L, tutti gli altri campioni contaminati sono risultati essere vini rossi.

Ciò è in accordo con quanto riportato in letteratura: la maggiore incidenza di OTA nei vini rossi è dovuta al maggior tempo di contatto tra le bucce e la componente liquida del mosto durante la fase di macerazione (9).

Il panorama complessivo pare quindi rassicurante; nessun campione è risultato positivo al di sopra del limite normato (il valore più alto riscontrato è 1,49 µg/L).

Tali evidenze potrebbero essere correlabili al diffuso impiego di buone pratiche vitivinicole. Questo è in effetti l'unico modo per ridurre l'incidenza di OTA nel vino ovvero partire da materie prime di buona qualità. In tal senso gli interventi di prevenzione in vigneto hanno un'importanza fondamentale. I valori puntuali sono riportati in Figura 4.

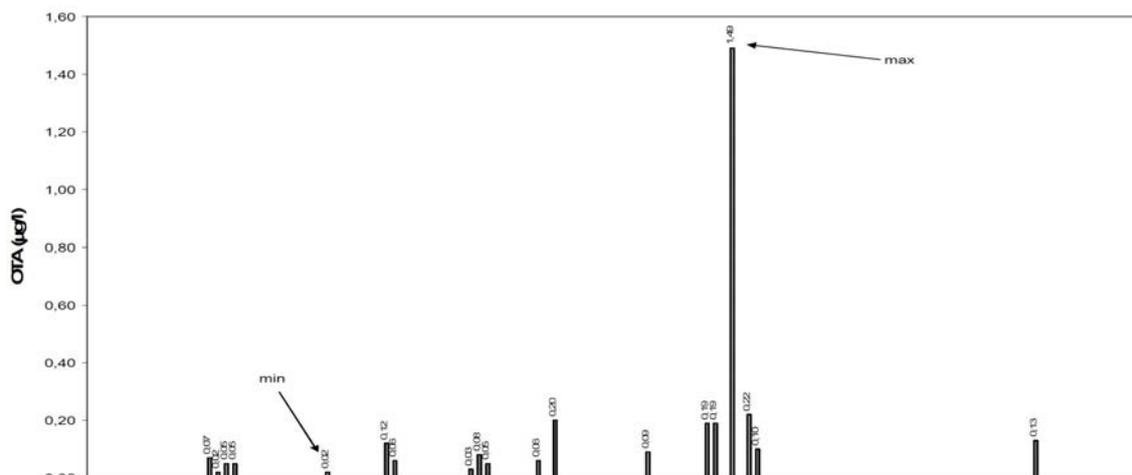


Figura 4. Valori di OTA (µg/L) riscontrati nei campioni di vino

### Diffusione di OTA nell'aceto

Interessante notare la diffusa presenza di OTA nei campioni di aceto (Figura 5). Solo il 10% dei campioni di aceto (non balsamico, balsamico e balsamico tradizionale per un totale di 100) è risultato negativo ovvero  $<0,02 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Nel 90% dei campioni è stata riscontrata la presenza di OTA tra  $0,02 \mu\text{g}/\text{kg}$  e  $2 \mu\text{g}/\text{kg}$  con un massimo di incidenza del 40% nel range  $0,11 \div 0,50 \mu\text{g}/\text{kg}$ .

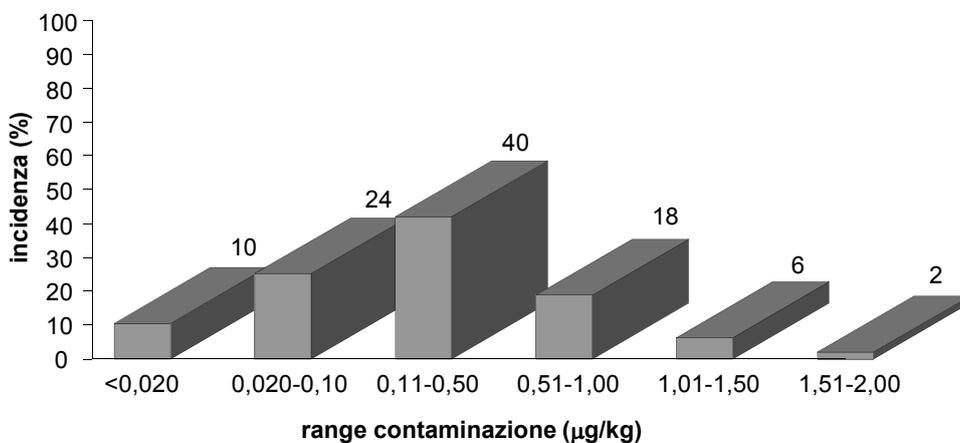


Figura 5. Incidenza % di OTA nei campioni di aceto

Dei 100 campioni analizzati, il 15% è costituito da aceto non balsamico, 81% balsamico e 4% balsamico tradizionale. Tra i campioni di aceto non balsamico sette sono risultati completamente negativi ( $<0,02 \mu\text{g}/\text{kg}$ ), sei nel range  $0,021-0,10 \mu\text{g}/\text{kg}$ , due nel range  $0,11-0,50 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Relativamente ai campioni di aceto balsamico, è stata riscontrata la presenza di OTA tra  $0,02 \mu\text{g}/\text{kg}$  e  $2 \mu\text{g}/\text{kg}$  con un massimo di incidenza del 44% nel range  $0,11 \div 0,50 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Nondimeno un'incidenza significativa (26%) è stata riscontrata tra  $0,51 \mu\text{g}/\text{kg}$  e  $2,00 \mu\text{g}/\text{kg}$ .

Negli aceti balsamici tradizionali è stata individuata la presenza di OTA a 0,11 µg/kg, 0,34 µg/kg e 0,44 µg/kg; solo un campione è risultato completamente negativo. Questa diffusa presenza di OTA, che potrebbe essere ascrivibile ad un eventuale uso di materie prime di scarsa qualità ovvero già contaminate, è stata riscontrata più nell'aceto balsamico che nel comune aceto di vino non balsamico; ciò potrebbe essere spiegato sulla base di un possibile effetto di concentrazione di OTA durante la fase di cottura del mosto e di maturazione del prodotto.

I valori puntuali sono riportati in Figura 6.

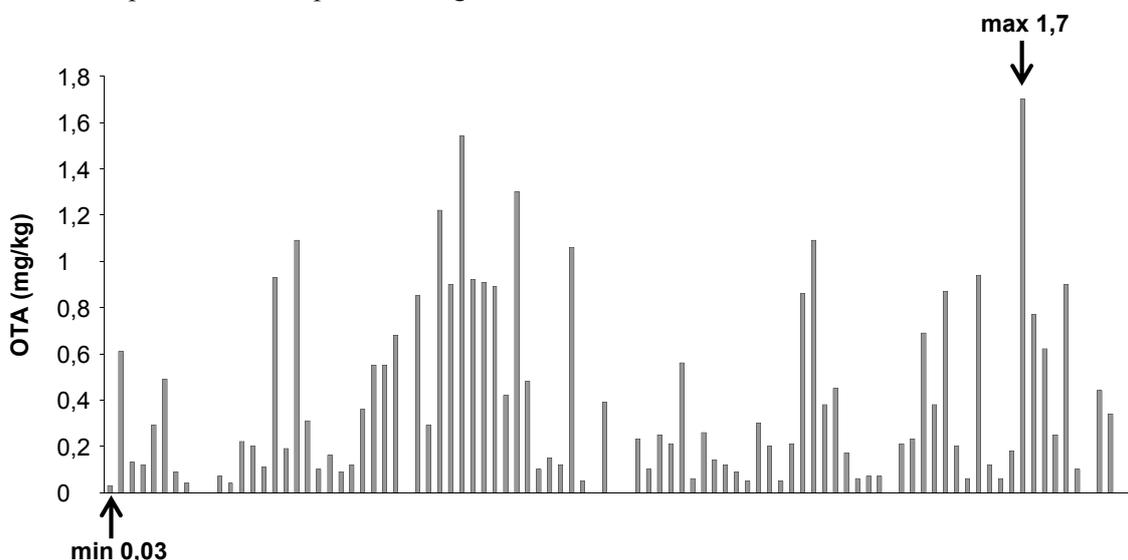


Figura 6. Valori di OTA (mg/kg) riscontrati nei campioni di aceto

## Conclusioni

Se il quadro complessivo di esposizione ad OTA è rassicurante per quanto riguarda le matrici vino e caffè, non altrettanto si può affermare per quanto riguarda l'aceto. Come appare chiaramente dagli istogrammi riportati, uno spostamento significativo a concentrazioni più alte di OTA è evidente passando dal vino all'aceto. Mentre nel caso del vino i campioni negativi (<0,02 µg/kg) rappresentano la maggioranza assoluta (84%), invece per i campioni di aceto il livello di contaminazione più frequente è quello tra 0,11 e 0,50 µg/kg. Soltanto il 10% dei campioni di aceto esaminati è completamente OTA-free. Due possibili ragioni possono giustificare questo fenomeno. La prima potrebbe essere ascrivibile ad un eventuale uso di materie prime (vino) di scarsa qualità ovvero già contaminate; la seconda potrebbe essere in relazione ad un effetto di concentrazione di OTA durante la fase di cottura del mosto e di maturazione del prodotto. Entrambi i fattori potrebbero coesistere.

Da questo punto di vista, OTA potrebbe essere considerata un ottimo "safety marker" non solo del prodotto finito ma anche del processo di produzione di aceto, in particolare quello balsamico, a partire dal vino.

## Bibliografia

1. Keeper-Goodman T, Scott PM. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin. *Biomedical Environmental Science* 1989;2:179-248.

2. Castegnaro M, Mohr U, Pfohl-Leszkowicz A, Esteve J, Steinmann J, Tillmann J, Michelson T, Bartsch J. Sex- and strain-specific induction of renal tumors by ochratoxin A in rats correlated with DNA adduction. *International Journal of Cancer* 1998;77:70-5.
3. Pfohl-Leszkowicz A, Pinelli E, Bartsch H, Mohr U, Castegnaro M. Sex- and strain-specific expression of cytochrome P450s in ochratoxin A-induced genotoxicity and carcinogenicity in rats. *Molecular Carcinogenesis* 1998;23:76-85.
4. Duarte SC, Pena A, Lino CM. Ochratoxin A non-conventional exposure sources. A review. *Microchemical Journal* 2009;93:115-120.
5. Varga J, Kozakiewicz Z. Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. *Trends in Food Science & Technology* 2006;17:72-81.
6. Mateo R, Medina A, Mateo EM, Mateo F, Jiménez M. An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International Journal of Food Microbiology* 2007;119:79-83.
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, 20 dicembre 2006.
8. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. *Method OIV-MA-AS315-10. Measuring ochratoxin A in wine after going through an immunoaffinity column and HPLC with fluorescence detection*. Paris: OIV; 2011
9. Majerus P, Bresch H, Otteneder H. Ochratoxin A in wines, fruit juices and seasonings. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 2000;51:95-7.

## **ASPETTI PRATICI LEGATI AD UNA CORRETTA ESECUZIONE DELLE PROCEDURE DI CAMPIONAMENTO**

Carlo Brera, Francesca Debegnach, Emanuela Gregori, Elena Pannunzi, Barbara De Santis  
*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

### **Introduzione**

Ai fini della tutela della salute pubblica, il tenore dei contaminanti negli alimenti è mantenuto a livelli tollerabili sul piano tossicologico dai limiti massimi che sono in vigore nella legislazione comunitaria.

Le Autorità Competenti, nell'ambito delle attività ufficiali di controllo in materia di alimenti, garantiscono l'attendibilità dei controlli per la verifica della conformità ai tenori massimi, attraverso una scrupolosa applicazione delle procedure previste nella legislazione vigente inclusa quella relativa alle modalità di campionamento.

Uno degli elementi essenziali per garantire l'affidabilità e la qualità dei controlli è quello relativo alla corretta effettuazione delle procedure di campionamento ed è di fondamentale importanza rilevare che senza l'applicazione di opportuni piani di campionamento è altamente probabile incorrere in errate valutazioni non solo nell'ambito del controllo ufficiale, dove le ricadute hanno implicazioni di ordine legale/amministrativo, ma anche nell'ambito della sorveglianza sanitaria dove i dati devono riflettere il livello di protezione della salute umana, animale e dell'ambiente.

Secondo l'art. 2 del Regolamento (CE) 882/2004 il "campionamento per analisi" è definito come "il prelievo di un mangime o di un alimento oppure di una qualsiasi altra sostanza (anche proveniente dall'ambiente) necessaria alla loro produzione, trasformazione e distribuzione o che interessa la salute degli animali, per verificare, mediante analisi, la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute degli animali".

Per campione si intende invece generalmente una piccola parte del tutto di un materiale dalla cui analisi deriverà il giudizio di conformità della partita a cui appartiene.

Come è ormai noto, la contaminazione da micotossine negli alimenti e mangimi è riconosciuta, sia in ambito scientifico che legislativo, come prioritaria in termini di sicurezza alimentare, così come ampiamente confermato dalle notifiche degli ultimi dieci anni del *Rapid Alert System for Food and Feed* (RASFF).

La necessità di adottare piani di campionamento mirati caratterizzati dalla necessaria attendibilità nasce dalla natura estremamente eterogenea della contaminazione delle micotossine in una derrata alimentare, che obbliga ad osservare, all'atto del prelievo del campione, una serie di procedure tese a garantire la rappresentatività dell'intero lotto, caratteristica principale e indispensabile che un Campione Globale (CG), prelevato da una massa, deve possedere.

La rappresentatività è necessaria per assicurare che le informazioni relative alla distribuzione delle micotossine e ai livelli di contaminazione delle stesse nei lotti sia di piccole che di grandi dimensioni siano mantenute in modo accurato nel campione globale prelevato (principio di inferenza).

Un'altra imprescindibile caratteristica della fase di campionamento è la fattibilità. A tale proposito, la Commissione Europea ha recentemente pubblicato una linea guida relativa alle

modalità di campionamento per grandi partite (>>500 t) di cereali (1), dove sono descritte procedure semplificate per casi particolarmente difficili come le partite trasportate nelle navi o stoccate nei silos e nei magazzini.

Esistono diverse tipologie di campionamento: di tipo casuale, semplice o sistematico, a grappolo, stratificato, di carattere probabilistico e non probabilistico. Il presupposto è che ogni campione incrementale debba avere la stessa probabilità di essere scelto (campionamento casuale semplice) rispetto all'intera massa. Per le micotossine la tipologia di campionamento più idonea è quella di tipo casuale sistematico, in quanto in questa procedura è possibile prelevare i vari campioni incrementali in condizioni dinamiche e a intervalli di tempo predeterminati. Un'ulteriore differenziazione riguarda le diverse metodologie per prelevare i campioni, che in funzione della natura del materiale e delle modalità di stoccaggio si possono effettuare in condizioni statiche o dinamiche.

Il campionamento statico prevede prelievi in punti diversi di una massa, costituente il lotto/partita, stoccata in sacchi o container con l'ausilio di opportune sonde.

Le procedure di campionamento dinamico si eseguono quando la massa da campionare è in movimento ed è possibile prelevare i campioni elementari in tempi diversi con una frequenza stabilita durante il flusso del materiale. Questa tipologia di campionamento può essere effettuata sia in condizioni manuali che automatiche.

La frequenza di campionamento espressa in minuti è calcolata sulla base della durata dello scarico/carico e del numero di campioni elementari richiesti dal regolamento di riferimento secondo la formula:

$$\text{Frequenza di campionamento} = \text{durata scarico (min)} \times n. \text{campioni elementari}$$

Per le micotossine, il campionamento dinamico è senz'altro quello che offre le maggiori garanzie di praticabilità, assicurando che le operazioni di campionamento siano sempre condotte in condizioni idonee per la sicurezza degli operatori e tengano anche conto della protezione del campione da contaminazioni esterne.

Un'ultima diversificazione per le procedure di campionamento è relativa alla possibilità di utilizzare campionatori automatici in alternativa al tradizionale campionamento manuale.

Nel campionamento manuale viene impiegato comunemente il personale a disposizione che deve rispondere alle seguenti condizioni:

- essere stato opportunamente formato e aggiornato;
- essere munito degli opportuni strumenti necessari per il campionamento;
- essere munito dei dispositivi di protezione individuale come la tuta, il casco, gli occhiali se del caso, i guanti e la maschera.

Nell'effettuare un campionamento manuale devono essere garantiti la massima rappresentatività del campione prelevato, il controllo sistematico del personale addetto al campionamento, la tracciabilità delle operazioni di prelievo dei campioni incrementali e di formazione del campione globale e la piena osservanza delle procedure previste dalla normativa vigente.

Il campionamento automatico si avvale di campionatori in grado di effettuare il prelievo dei campioni incrementali sia in condizioni dinamiche, nel pieno rispetto dei principi del campionamento casuale sistematico in quanto è possibile programmare nel tempo la frequenza di prelievo dei campioni incrementali, attraverso il controllo informatizzato dei tempi e della grandezza dei singoli prelievi, sia in condizioni statiche attraverso l'utilizzo di sonde dotate di sistema di trasporto pneumatico comandato da trasmissione elettromeccanica.

Tramite l'utilizzo dei campionatori automatici e in condizioni dinamiche, si ottiene la massima garanzia di efficienza della fase di campionamento in quanto viene altamente garantita

la massima attendibilità, in termini di precisione ed esattezza del campione globale formato, oltre alla possibilità di disporre della tracciabilità delle operazioni di prelievo effettuate.

L'errore totale, associato a tutte le varie fasi della "filiera analitica" corrisponde alla somma dei singoli contributi di ciascuna fase (campionamento, preparazione del campione e analisi).

Studi effettuati su basi statistiche (2), hanno evidenziato che per una sostanza o materiale eterogeneamente distribuiti in una derrata alimentare, come nel caso delle micotossine, l'errore attribuibile al campionamento, misurato come varianza, dà, nella stima dell'errore totale, un contributo di gran lunga superiore a quello riferibile agli altri stadi della filiera analitica, vale a dire la preparazione del campione e analisi. Nella tabella viene riportato il contributo percentuale alla varianza totale associata alla misura della contaminazione da aflatossina B1 nelle arachidi sgusciate, (2). Si può notare che il contributo maggiore alla varianza totale è dato comunque dalla fase di campionamento (5 kg contro 20 kg) e che, in valore assoluto, la varianza che deriva dal campione di dimensioni più piccole è maggiore di quella che deriva dal campione di dimensioni più grandi (20 kg), confermando quanto indicato in precedenza, vale a dire che maggiore è il grado di rappresentatività del campione globale, minore è l'errore associato alla misura.

La Commissione Europea riconoscendo il ruolo cruciale del campionamento nella valutazione della conformità delle derrate alimentari alle micotossine, ha recentemente emanato due Regolamenti quadro relativi al campionamento delle micotossine negli alimenti e nei mangimi: il Regolamento (CE) 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006 (3) relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari, modificato dal Regolamento 165/2010 e il Regolamento (CE) 152/2009 della Commissione del 27 gennaio 2009 (5) che fissa i metodi di campionamento e d'analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali, regolamento che riprende integralmente il DM del 20 aprile 1978, con alcune modifiche relative al criterio di accettazione delle partite. Alla espressione dei risultati e alle indicazioni per alcuni metodi di analisi da utilizzare nella determinazione delle sostanze indesiderabili.

Le disposizioni generali di entrambi i Regolamenti prevedono l'applicazione delle procedure in conformità con le disposizioni del Regolamento (CE) 882/2004 sul controllo ufficiale, per cui solo i campioni ottenuti seguendo le indicazioni dei citati Regolamenti si considerano rappresentativi delle partite oggetto di controllo. Bisogna altresì considerare che nel Regolamento (CE) 401/2006 laddove sussistano difficoltà oggettive tali da non consentire l'effettuazione delle procedure descritte è previsto il ricorso ad altre tipologie di campionamento, purché venga garantita la massima rappresentatività.

Alla luce di quanto detto, si può delineare uno scenario ideale per il miglior campionamento finalizzato all'analisi delle micotossine.

Tale campionamento ideale dovrebbe essere predisposto sulla matrice non trasformata, possibilmente nella fase post-raccolto, dovrebbe prediligere, quando possibile, una modalità di campionamento dinamico con prelievi di Campioni Incrementali (CI) in automatico, predisporre la raccolta di un elevato numero di campioni elementari calcolato in funzione della grandezza del lotto/partita, e prevedere la macinazione del campione di laboratorio con molini che garantiscano un particolato fine (20 mesh o 0,75 mm) e l'omogeneizzazione per mezzo della formazione dello slurry.

Ad ogni modo, ogni standardizzazione di procedura di campionamento dovrebbe essere guidata al fine di ridurre la variabilità tenendo conto delle esigenze in termini di costi e fattibilità. Poiché ogni fase ha costi differenziati, è importante pertanto ottimizzare gli sforzi e le risorse per effettuare una corretta valutazione del contenuto di micotossine secondo piani di campionamento rappresentativi.

## Casi specifici

Si descrivono di seguito le procedure di campionamento da seguire a seconda dei siti di campionamento.

### Campionamento da stive di navi

Il controllo fisico di una partita di prodotti alimentari sita su una nave deve essere campionata preferibilmente in condizioni dinamiche e attraverso l'utilizzo di campionatori automatici. Il campionamento in condizioni dinamiche deve essere effettuato durante le operazioni di scarico della stiva, avendo cura di prelevare, tramite l'uso di campionatori automatici, i campioni incrementali in tempi predeterminati sulla base della velocità di scarico.

Alternativamente, il campionamento di una stiva di navi può essere effettuato sempre in condizioni dinamiche ma manualmente, tramite l'utilizzo di personale altamente esperto. In questo caso, sulla base della velocità di scarico della nave e sulla conoscenza del numero di campioni incrementali da prelevare, saranno raccolti campioni incrementali tramite l'uso di opportune sessole o pale in tempi prefissati.

Ulteriore procedura di campionamento di una stiva di una nave è il prelievo del materiale in condizioni statiche, da effettuarsi in due modalità: o attraverso l'uso di una sonda di opportune dimensioni in grado di prelevare i campioni incrementali in modo rappresentativo degli strati di tutta la massa oppure o prelevando direttamente dai camion durante la fase di scarico della stiva della nave effettuata con opportuna tramoggia.

In entrambi i casi i campioni incrementali saranno prelevati avendo previamente tarato, tramite bilancia di servizio, la sessola con la quantità da prelevare, nel caso del campionamento manuale o l'apertura del campionatore automatico nel caso di campionamento non manuale. Successivamente i campioni incrementali saranno riuniti e opportunamente mescolati per formare il campione globale. Una volta registrato il peso del campione globale, sempre su bilancia di servizio, quest'ultimo sarà posto in contenitori appropriati, come un sacco di juta o di polietilene, per le successive operazioni legate alle attività di controllo ufficiale.

### Campionamento da container

Il prelievo di campioni incrementali da una partita di prodotto alimentare in sacchi e/o confezioni conservate in container può essere effettuato solo in condizioni statiche.

Una volta accertata l'identità della partita, il controllo fisico deve avvenire svuotando interamente il container e collocando i sacchi o le confezioni in un'area riservata come quella dei DPE. Individuato il numero di campioni incrementali da prelevare, si procederà a selezionare in modo del tutto casuale un corrispondente numero di sacchi o confezioni da cui prelevare, tramite opportuna sonda, un campione incrementale per ciascun sacco o confezione. Una volta prelevato il campione incrementale, si dovrà richiudere il foro con appositi adesivi.

Come negli altri casi, i campioni incrementali sono riuniti per formare il campione globale, che opportunamente omogeneizzato, viene inviato al laboratorio per le analisi di controllo.

### Campionamento da magazzini

Anche nel caso di campionamenti effettuati nei magazzini, dove la partita è ammassata in mucchi, è consigliabile effettuare il campionamento in condizioni statiche tramite l'utilizzo di

opportune sonde. In questo caso si preleveranno i campioni incrementali da vari punti della massa stoccata avendo cura di registrare il peso di ogni singolo campione, di riunire i campioni incrementali, di formare il campione globale e di registrare il peso dello stesso prima di chiuderlo in apposito contenitore secondo i protocolli ufficiali.

In condizioni statiche, il prelievo dei campioni incrementali può anche avvenire seguendo le indicazioni della Guida della DG SANCO (5) disponibile al sito <http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/guidance-sampling-final.pdf>.

Secondo le indicazioni della DG SANCO, se la partita è stoccata in un magazzino in cui è accessibile solo un lato, disponendo di una sonda da 2 o 5 metri, si andrà a campionare una sottopartita delle seguenti dimensioni: profondità pari alla lunghezza della sonda, altezza e larghezza in metri della massa da campionare. Così ad esempio per un magazzino accessibile da un solo lato di altezza pari a 4 metri, di larghezza pari 30 metri, e di profondità pari a 50 metri, corrispondente ad un volume di 6000 metri cubi e circa 4500 tonnellate, disponendo di una sonda di 2 metri, si potrà campionare una sottopartita di volume pari a 2m (dimensioni della sonda) x 30m x 4m, pari a 240 metri cubi e circa 180 tonnellate.

A questo punto, si preleverà un numero di campioni incrementali calcolati secondo la seguente equazione:

$$100 + \sqrt{\text{dimensioni del lotto in } t}$$

Nel caso specifico, il numero dei campioni incrementali risulterà uguale a  $100 + \sqrt{4500} = 167$  campioni incrementali di circa 100 grammi ciascuno per formare un campione globale di 16,7 kg.

Questo campione globale dovrà essere ritenuto rappresentativo dell'intera partita di 4500 tonnellate. Disponendo di una sonda da 2 metri con 8 aperture, si dovrà effettuare il prelievo in circa  $167/8 = 21$  punti diversi dal lato accessibile. Se dovessero essere accessibili due lati, il numero dei prelievi dovrà essere equamente distribuito sui due lati. Nel caso precedente, si effettueranno, in modo rappresentativo, 11 prelievi da un lato ed 11 prelievi dal secondo lato.

## Campionamento da silos

Il campionamento di partite stoccate nei silos può avvenire tramite un campionamento sia dinamico sia statico.

In condizioni dinamiche, la partita può essere campionata tramite campionatori automatici o manualmente o durante le operazioni di carico o di quelle di scarico della partita nel/dal silos rispettivamente.

Le modalità di campionamento dovranno essere effettuate calcolando il numero di campioni incrementali da prelevare e la frequenza di prelievo di ogni singolo campione incrementale in funzione della equazione precedentemente riportata nella descrizione del campionamento dinamico.

Inoltre, in condizioni dinamiche si può effettuare il campionamento attraverso il prelievo di campioni incrementali direttamente dal flusso di materiale da un silos pieno ad uno vuoto, o durante la condizione di riciclo del materiale nello stesso silos. Questa modalità dovrebbe essere effettuata ad esempio in presenza di silos non accessibili dall'alto.

In condizioni statiche, il prelievo dei campioni incrementali può avvenire seguendo le indicazioni della Guida della DG SANCO (6) disponibile al sito <http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/guidance-sampling-final.pdf>.

Seguendo le istruzioni della linea guida per campionare un silos la lunghezza minima di una sonda deve essere pari a 2 metri (immagine di sonda lunga 2 metri).

In questo caso, deve essere effettuata una procedura che sia rappresentativa della sola parte accessibile, considerando il risultato finale relativo alla conformità come valido per l'intera partita. In caso di non conformità e in caso sia posta in discussione la rappresentatività della

procedura di campionamento effettuata, l'operatore può richiedere all'autorità Competente di effettuare a sue spese un campionamento più rappresentativo movimentando la partita da un silos pieno ad uno vuoto.

### **Campionamento di partite in camion o treni**

Il campionamento sui camion deve essere effettuato in condizioni statiche o manualmente o attraverso l'utilizzo di un campionatore automatico. In entrambi i casi si dovranno scegliere cinque o otto punti di campionamento a seconda della presenza o meno della motrice.

In ciascun punto di campionamento si dovranno prelevare campioni incrementali a varie altezze utilizzando le aperture presenti nella sonda manuale o azionando la sonda automatica per prelevare il campione a diverse altezze.

### **Campionamento di confezioni**

Nel caso di partite trasportate in confezioni collocate in container si dovrà campionare in condizioni statiche un congruo numero di campioni incrementali ciascuno corrispondente ad una confezione. Le confezioni dovranno successivamente essere aperte e mescolate al fine di formare il campione globale, in accordo con il DPR 327/1980 (7).

### **Campionamento di confezioni al dettaglio**

In accordo con il Regolamento (CE) 401/2006, il confezionamento al dettaglio segue i seguenti criteri:

- Se il peso dei CI è superiore a 100 g o 300 g, il peso del CG sarà superiore a 10 kg o 30 kg.
- Se il peso di un CI è molto superiore ai 100 g o 300 g si apre la confezione e si prelevano 100 g o 300 g.
- Nel caso di CI da 500 g o 1 kg si preleva un numero inferiore di CI purché il peso del CG sia quello previsto.
- Se il peso del CI è inferiore a 100 g o 300 g e la differenza non è significativa una confezione può essere considerata come un CE.
- Se il peso del CI è di molto inferiore a 100 g o 300 g un CI sarà formato da più confezioni aventi peso complessivo di 100 g o 300 g.

Inoltre, conformemente all'art. 6 del DPR 327/1980, § 3. "Norme generali da seguire per il prelievo dei campioni da analizzare" (7) è importante ribadire che nel comma e) è riportato che:

Nel caso di sostanze o prodotti contenuti in confezioni originali chiuse e quando la natura di tale sostanza o prodotto, e il tipo di controllo analitico da effettuare ne consentano l'apertura si prelevano a caso, da un numero di confezioni rappresentative della partita, aliquote di sostanza o prodotto dalle quali, riunite e mescolate, si ricava il campione per l'analisi.

## **Conclusioni**

La effettuazione di una corretta fase di campionamento rappresenta di gran lunga la sfida più difficile da affrontare sia in quanto i costi associati sono considerevoli sia in quanto implica una difficoltà operativa oggettiva sia infine perché i tempi richiesti sono compatibili con le sole attività di controllo ufficiale non essendo invece proponibili con la realtà aziendale. Tuttavia,

pur considerando queste difficoltà, rimane assolutamente incontrovertibile la considerazione che l'adozione di piani di campionamento meno rigorosi porta inevitabilmente ad una significativa inaccuratezza sia dei risultati analitici che dell'associato giudizio di conformità.

## Bibliografia

1. Europa. DG SANCO *Guidance document for the sampling of cereals for mycotoxins*. Disponibile all'indirizzo: <http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/guidance-sampling-final.pdf>; ultima consultazione 17/14/2013.
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, 20 dicembre 2006.
3. Whitaker TB. Standardisation of mycotoxin sampling procedures: an urgent necessity. *Food Control* 2003;14:233-7.
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, 9 marzo 2006.
5. Europa. Regolamento (UE) n. 165/2010 della Commissione del 26 febbraio 2010 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 dell'Unione europea* L 50/8, 27 febbraio 2010.
6. Europa. Regolamento (CE) n. 152/2009 della commissione del 27 gennaio 2009 che fissa i metodi di campionamento e d'analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 54/1, 26 febbraio 2009.
7. Italia. Decreto del Presidente della Repubblica n. 327 del 26 marzo 1980. 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, 16 luglio 1980.

# MICOTOSSINE NEGLI ALIMENTI: CONTROLLI UFFICIALI IN PIEMONTE 2002-2011

Sara Jenifer Coluccia, Francesca Alesso, Marisa Bodda, Sara Ciacciarelli, Andreina Delaini,  
Sara Pelligra, Francesco Ricci  
*Polo Alimenti, ARPA Piemonte, La Loggia, Torino*

## Introduzione

La Regione Piemonte, attraverso le Aziende Sanitarie Locali, la Dogana di Torino Caselle e i carabinieri del NAS, ha realizzato un vasto programma di controllo degli alimenti a rischio, sia alla produzione sia al commercio. La ricerca analitica è affidata al Polo Alimenti dell'ARPA Piemonte. Dal 2010 il laboratorio ha eseguito controlli anche per conto di alcuni Uffici di Sanità Marittima e di Frontiera di altre regioni Italiane che operano secondo i criteri previsti dalla specifica normativa sui controlli all'importazione. Il numero di campioni analizzati è aumentato del 90% rispetto agli anni precedenti e, come conseguenza, è aumentata la percentuale di positività e non conformità riscontrate. Tali risultati sono da riportare comunque al prelievo mirato di prodotti "a rischio" per tipologia e provenienza.

I campioni analizzati nei dieci anni considerati sono circa 6000. Gli alimenti indagati sono stati soprattutto cereali, frutta secca, vino, caffè, cacao, e i loro derivati; sono state ricercate, nelle varie matrici, una o più delle seguenti micotossine: aflatossine B1, B2, G1, G2, aflatossina M1, ocratossina A (OTA), patulina, zearalenone, fumonisine B1 e B2, deossinivalenolo, per un totale di oltre 25000 determinazioni. La quantità di risultati prodotti e la loro interpretazione rappresentano uno dei fattori determinanti per la pianificazione dei Controlli Ufficiali sul territorio regionale. Periodicamente viene, infatti, aggiornata l'elaborazione dei dati, sia a livello globale che, se rilevante, a livello specifico.

## Materiali e metodi

Le prove adottate dal laboratorio (Tabella 1) sono tutti metodi cosiddetti di conferma in cromatografia liquida con rivelatori spettrofotometrica previa purificazione su colonnine a immunoaffinità.

**Tabella 1. Prove per la determinazione di micotossine adottate e/o sviluppate dal Polo Alimenti**

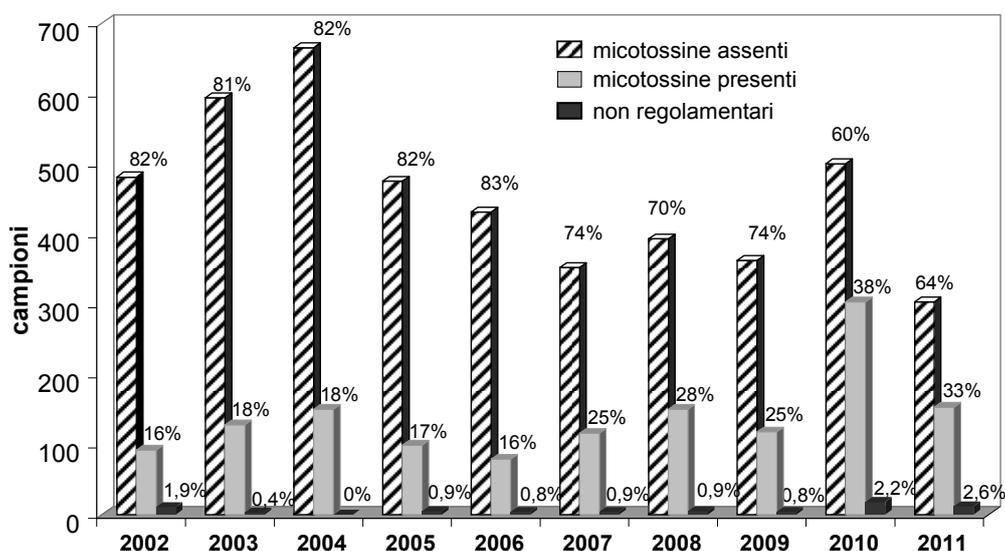
Micotossine	Metodo	Campo di applicazione	Prima validazione
Aflatossine B1, B2, G1, G2	Metodo interno, 2011	Frutta secca, cereali e derivati, spezie, infusi, legumi	1999
Aflatossina M1	UNI EN ISO 14501:2008	Latte e derivati	2000
OTA	Metodo interno, 2011	Frutta secca, cereali e derivati, legumi, vino, cacao	1999
Patulina	Metodo interno, 2011	Frutta fresca e derivati	2002
Zearalenone	Metodo interno, 2011	Cereali e derivati	2003
Fumonisine B1, B2	UNI EN 14352:2005	Mais e derivati	2008
Deossinivalenolo	Metodo interno, 2009	Cereali e derivati	2007

Le prove sono validate e la loro idoneità è stata verificata rispetto ai requisiti di prestazione definiti dal Regolamento (CE) 401/2006 e sue modifiche.

La procedura analitica è stata ottimizzata negli anni per rispondere alle variazioni della normativa relativamente al campo di applicazione e di misura. La scelta di adottare, nella maggior parte dei casi, metodi interni è risultata conveniente proprio per la maggiore versatilità rispetto alle diverse matrici adottando un sistema razionale di assicurazione della qualità del dato.

## Elaborazione dei risultati

Le positività riscontrate sono state numerose (~30% dei campioni) ma solo in pochi campioni (1-2%) la concentrazione di micotossine ha superato i limiti di legge (Figura 1).



**Figura 1. Controlli ufficiali in Piemonte 2002-2011: contaminazione da micotossine (l'assenza è intesa come concentrazione inferiore al limite di rilevanza)**

La quantità di risultati prodotti e la loro interpretazione rappresentano uno dei fattori determinanti per la pianificazione dei Controlli Ufficiali sul territorio regionale.

Periodicamente viene infatti aggiornata l'elaborazione dei dati, sia a livello globale che, se rilevante, a livello specifico.

La valutazione generale dei risultati permette di evidenziare gli alimenti più a rischio e le micotossine maggiormente ricorrenti (Tabella 2 e 3).

I risultati esposti si riferiscono quasi esclusivamente a prodotti pronti per il consumo diretto o per l'utilizzo come ingredienti. È interessante aggiungere che 128 campioni sono risultati contaminati da più tipologie di micotossine.

I dati relativi al cacao meritano di essere immediatamente trattati in dettaglio, in quanto rappresentano un esempio perfetto di impatto delle modifiche alla normativa sull'entità e gli esiti dei controlli (Figura 2).

Tabella 2. Controlli ufficiali in Piemonte 2002-2011: alimenti contaminati da micotossine

Alimenti	Campioni		
	analizzati	contaminati	non conformi
Mais e derivati	645	277 (43%)	12 (2%)
Cacao e derivati	430	145 (34%)	6 (1%)
Frutta secca e derivati	1364	432 (32%)	34 (2%)
Latte e derivati	388	109 (28%)	0
Legumi e derivati	193	52 (27%)	1 (0,5%)
Spezie e infusi	268	70 (26%)	1 (0,4%)
Altri cereali e derivati	1064	204 (19%)	1 (0,1%)
Vino e simili	400	75 (19%)	0
Baby food	255	31 (12%)	1 (0,4%)
Vari	50	5 (10%)	0
Succo di frutta	163	11 (7%)	1 (0,6%)
Caffè	531	33 (6%)	1 (0,2%)

Tabella 3. Controlli ufficiali in Piemonte 2002-2011: micotossine riscontrate

Campioni	Aflatossine B1, B2, G1, G2	Aflatossina M1	DON	Fumonisine	OTA	Patulina	Zearalenone
Analizzati	6097	698	1002	210	6007	333	2322
Contaminati	687 (11%)	106 (15%)	85 (8%)	83 (40%)	400 (7%)	16 (4,8)	194 (8%)
Non conformi	37 (0,6%)	0	0	5 (2,4%)	7 (0,1%)	1 (0,3%)	8 (0,3%)

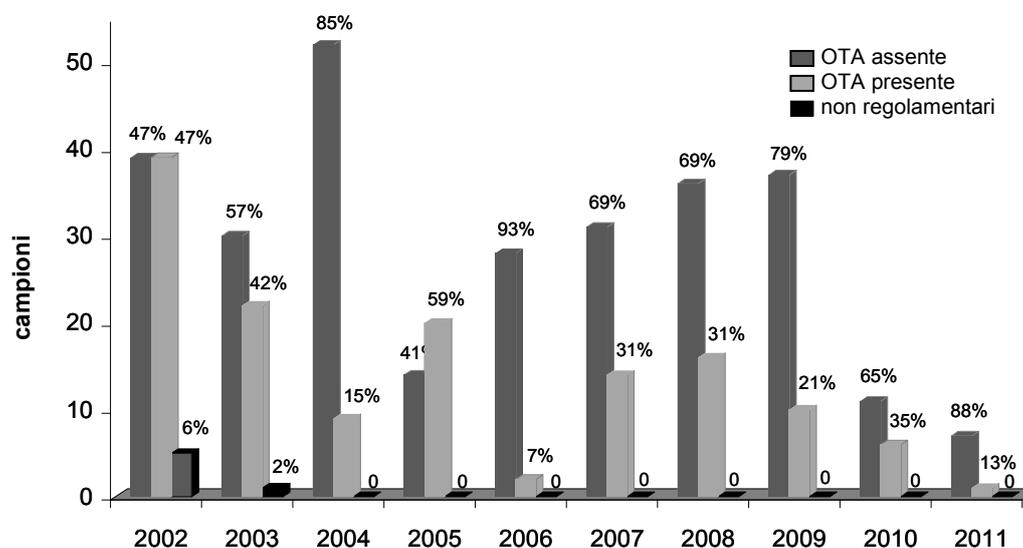


Figura 2. Controlli ufficiali in Piemonte 2002-2011: OTA in cacao e derivati

Inoltre, intendere i risultati riferiti a tutto il periodo considerato sarebbe scorretto: tutte le non conformità registrate si riferiscono al 2002 e 2003, anno dell'innalzamento dei tenori massimi da 0,5 a 2,0 µg/kg, stabilito dalla Circolare del Ministero della Salute n. 6 del 28/11/2003.

In seguito, per armonizzare la legislazione italiana a quella comunitaria e alla luce di studi sull'effettivo rischio correlato al consumo di tali prodotti, tali limiti sono stati abrogati (Circolare del Ministero della Salute del 10/12/2009) e di conseguenza i controlli sono diminuiti drasticamente a favore di tipologie di alimenti ritenute più rilevanti.

Un altro settore che merita una valutazione particolare è quello della frutta secca; nel corso dei controlli eseguiti negli ultimi 10 anni è stata costantemente evidenziata una criticità specifica della produzione Piemontese: la contaminazione da aflatossine e OTA delle castagne secche. La frutta a guscio è notoriamente uno degli alimenti più a rischio di contaminazione da micotossine, ma l'attenzione è rivolta soprattutto a pistacchi, mandorle, nocciole e arachidi, prodotti prevalentemente di importazione e di largo consumo.

I controlli sulle castagne sono in generale molto limitati, anche se intensificate nelle regioni produttrici.

In Piemonte, a seguito delle numerose non conformità rilevate, ogni anno si sono ripetuti prelievi e analisi che hanno rivelato una sostanziale persistenza dei livelli riscontrati (Tabella 4).

**Tabella 4. Controlli ufficiali in Piemonte 2002-2012: castagne secche e farina di castagne**

Anno	Campioni analizzati	Campioni con presenza di micotossine	Campioni non conformi
2002	3	2	1
2003	0	0	0
2004	7	2	0
2005	10	4	1
2006	5	4	0
2007	7	7	1
2008	39	36	1
2009	25	25	3
2010	38	35	4
2011	30	22	4
1° semestre 2012	2	2	1
<b>Totale</b>	<b>166</b>	<b>139 (84%)</b>	<b>16 (10%)</b>

I campioni analizzati sono di castagne secche e, più frequentemente, di farina di castagne; proprio questa ultima tipologia di prodotti si è dimostrata quella più contaminata, verosimilmente perché rappresentata dalla parte peggiore della derrata destinata alla macinazione.

I tenori rilevati sui campioni sono risultati spesso molto elevati rispetto ai tenori massimi previsti (2 µg/kg per l'aflatossina B1, 4 µg/kg per le aflatossine totali, nessun limite per l'OTA - Regolamento (CE) 1881/2006 e s.m.i. (Tabella 5).

**Tabella 5. Controlli ufficiali in Piemonte 2002-2012: livelli di contaminazione in castagne secche e farina di castagne**

Micotossine	Concentrazione (µg/kg)		
	media	minima	massima
Aflatossine	4,1	0,1	90,3
OTA	5,7	1,0	23,5

Considerata la ricorrenza degli esiti ottenuti, è attualmente in corso di valutazione un'azione di prevenzione della contaminazione presso le aziende di produzione sul territorio.

Contemporaneamente è in corso una valutazione per l'innalzamento dei tenori massimi anche per questa categoria di frutta a guscio; si segnala comunque che, data la particolarità della contaminazione da micotossine, tale intervento non si risolverebbe completamente la criticità delineata.

A questo proposito si è provato a valutare l'effetto sulle non conformità segnalate per la frutta secca a seguito dell'entrata in vigore del Regolamento (UE) 165/2010: nel 2010 e 2011 il laboratorio ha eseguito controlli su 480 campioni di frutta secca di provenienza extra UE per conto di alcuni USMAF del Mezzogiorno con un aumento significativo dei campioni analizzati, di positività e non conformità. Solo due campioni (1 nocciola e 1 noce del Brasile) sono risultati regolamentari grazie all'innalzamento dei limiti.

Un'altra particolarità rilevata nel corso dei controlli è quella relativa alla contaminazione da aflatossine e OTA dei legumi e dei prodotti derivati; a fronte di una contaminazione decisamente diffusa (Tabella 6), per tale matrice non sono attualmente previsti tenori massimi e quindi la valutazione dei risultati ottenuti risulta difficile.

**Tabella 6. Controlli ufficiali in Piemonte 2002-2012: livelli di contaminazione in legumi e derivati**

Alimenti	Campioni	
	analizzati	contaminati
Ceci	67	36 (54%)
Soia	44	13 (30%)
Altri legumi	53	3 (6%)

Relativamente ai prodotti destinati ai bambini sotto i 3 anni, come evidenziato in Tabella 2 (*baby food*), la contaminazione risulta decisamente contenuta; considerando però i prodotti potenzialmente a largo consumo infantile, quali il cacao, i gelati e i derivati dei cereali, l'entità dell'esposizione a tutte le micotossine finora considerate cresce notevolmente.

## Conclusioni

La modalità di elaborazione scelta si è dimostrata efficace per valutare i numerosi dati raccolti evidenziando criticità interessanti.

Progressivamente è stata incrementata anche la quantità e il dettaglio delle informazioni registrate per ogni singolo campione. La nuova procedura standardizzata è inoltre allineata alle richieste di raccolta dati dell'EFSA (*European Food Safety Authority*).

Le difficoltà sino ad ora incontrate per la condivisione e la gestione a livello nazionale e comunitario hanno senz'altro limitato le possibilità di utilizzo dei risultati ottenuti. Solo il coordinamento del laboratorio nazionale di riferimento ha permesso in questi anni, almeno per criticità puntuali, di aggregare i dati dei diversi Enti di controllo; si auspica che il nuovo sistema informativo, già in uso da anni per il piano residui fitosanitari, permetterà finalmente una gestione più razionale per la pianificazione dei controlli.

# UTILIZZO DI UN SISTEMA AUTOMATIZZATO PER L'ESTRAZIONE DI AFLATOSSINE B1, B2, G1, G2 E OCRATOSSINA A IN VARIE MATRICI ALIMENTARI

Sara Jenifer Coluccia, Francesca Alesso, Marisa Bodda, Sara Ciacciarelli, Andreina Delaini,  
Sara Pelligra, Francesco Ricci  
*Polo Alimenti, ARPA Piemonte, La Loggia, Torino*

## Introduzione

Il laboratorio del Polo Alimenti dell'ARPA Piemonte fornisce supporto analitico e tecnico-scientifico alle Aziende Sanitarie Locali (ASL) e agli altri organi di vigilanza per i controlli di alimenti e bevande, cosmetici e altre matrici di interesse sanitario. Il laboratorio, nell'ambito del controllo ufficiale, esegue la ricerca di micotossine in matrici alimentari diverse per un totale di circa 4000 analisi (per 500 campioni) all'anno.

Per ottimizzare le risorse e standardizzare la procedura analitica è stato messo a punto e validato un sistema automatico per la purificazione degli estratti alimentari su colonnine a immunoaffinità. Il laboratorio possiede un sistema automatico Gilson GX-274 già modificato per la purificazione SPE (*Solid Phase Extraction*) di estratti di prodotti vegetali per la determinazione di residui di fitofarmaci.

Variando le condizioni è stato possibile applicare il sistema anche alle colonnine a immunoaffinità senza apportare eccessive modifiche al metodo in uso già validato e accreditato.

Il sistema purifica in sequenza fino a 16 campioni (4 campioni per volta). Il metodo comprende la fase di condizionamento della colonnina, carico del campione, lavaggio, eluizione del campione. L'automazione permette di aumentare la quantità di estratto caricato in colonnina senza incidere sull'impegno dell'operatore; di conseguenza è possibile aumentare la rappresentatività dell'aliquota da saggio e raggiungere sensibilità più elevate. Inoltre è assicurata la costanza di flusso per tutta l'analisi senza sbalzi da contropressione.

Il metodo di purificazione è stato validato per la determinazione di aflatossine B e G e ocratossina A in numerose matrici alimentari, con una particolare attenzione per i prodotti destinati all'infanzia che rappresentano una criticità analitica con la procedura tradizionale.

## Materiali e metodi

### Procedura analitica

Da diversi anni il laboratorio ha validato due metodi interni per aflatossine e ocratossina A. Per entrambi i metodi la prova consiste in 4 fasi:

- preparazione del campione;
- estrazione dal campione;
- purificazione su colonne ad immunoaffinità (sistema automatico o manuale);
- determinazione in HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) con rivelatore a fluorescenza (per le aflatossine previa derivatizzazione post-colonna con soluzione saturata di iodio,  $\lambda_{ex}$  364 nm,  $\lambda_{em}$  430 nm – ocratossina A  $\lambda_{ex}$  334 nm,  $\lambda_{em}$  460 nm).

La procedura di estrazione solido liquido è differenziata per i diversi alimenti a seconda delle loro caratteristiche chimico-fisiche e della necessità di raggiungere specifici livelli di concentrazione. Si riportano in Tabella 1 le principali modalità di estrazione adottate.

**Tabella 1. Procedura di estrazione e diluizione per la determinazione di micotossine**

Micotossine	Matrice	Aliquota	Soluzione estraente	Estratto prelevato	Diluizione
Aflatossine B e G	Cereali e derivati Spezie Frutta secca	10 g	50 mL CH <sub>3</sub> OH/H <sub>2</sub> O (80/20) + 5 g NaCl	10 mL	70 mL PBS
	<i>Baby food</i>	25 g	150 mL CH <sub>3</sub> OH/H <sub>2</sub> O (80/20)	30 mL	210 mL PBS
Ocratossina A	Cereali e derivati Caffè verde, cacao Frutta secca	25 g	75 mL CH <sub>3</sub> OH/NaHCO <sub>3</sub> 0,1% (70/30) + 1 g PEG 8000	10 mL	40 mL PBS+ tween 20

La purificazione dell'estratto diluito viene eseguita con colonnine a immunoaffinità (VICAM AflaTest e VICAM Ochra Test) con le stesse modalità sia per la procedura manuale che per quella automatizzata eccetto che per le aflatossine nel *baby food*: non è possibile caricare manualmente una quantità così elevata di campione sulla colonnina, pertanto, per la purificazione normale, si evapora parte della soluzione estraente per arrivare a un volume di circa 10mL e procedere come per i cereali. Dopo il caricamento del campione la colonnina viene lavata con acqua, asciugata con flusso di azoto ed eluita direttamente nei vials per HPLC.

### Validazione procedura automatica

Le prove sono state eseguite a livelli di concentrazione compresi tra ~ 0,1 µg/kg e ~ 3 µg/kg su farina di mais, farina di frumento, *baby food*, frutta secca. Sui risultati ottenuti sono stati eseguiti test statistici per verificare la presenza di dati anomali (Dixon, Huber), la normalità (Shapiro-Wilks) e l'omogeneità delle varianze (test "F" di Fisher). I parametri considerati sono la precisione (RSDr e limite di ripetibilità) e il recupero percentuale.

I risultati ottenuti hanno permesso di valutare le prestazioni dei metodi in termini di precisione ed esattezza rispetto ai criteri previsti dal Regolamento UE 401/2006 e sue modifiche.

### Risultati e conclusioni

Si riportano di seguito i risultati ottenuti per l'aflatossina B1, le aflatossine totali e l'ocratossina A (Tabelle 2-4). Le prove sono state valutate individualmente anche per le altre aflatossine (B2, G1, G2) con esito positivo.

Tabella 2. Prove di validazione per aflatossina B1

Purificazione	Concentrazione (µg/kg)	RSDr (%)		Recupero (%)	
		richiesto	ottenuto	richiesto	ottenuto
Sistema automatico Gilson	0,73 (farina mais)	< 31,3	7,0	50-120	76
	1,42 (farina mais)	< 28,3	5,1	70-110	74
	2,68 (farina mais)	< 25,7	4,9	70-110	70
	0,095 ( <i>baby food</i> )	< 42,9	4,9	50-120	93
	0,74 (farina bianca)	< 31,2	3,9	50-120	77
	1,56 ( frutta secca)	< 27,9	1,9	70-110	81
Tradizionale	0,12 ( <i>baby food</i> )	< 41,1	5,3	50-120	80,0
	0,35 (farina)	< 35,0	1,7	50-120	93,8
	1,33 (farina)	< 28,6	3,3	70-110	90,4
	3,49 (farina)	< 24,7	2,3	70-110	95,2

Tabella 3. Prove di validazione per aflatossine totali

Purificazione	Concentrazione (µg/kg)	RSDr (%)		Recupero (%)	
		richiesto	ottenuto	richiesto	ottenuto
Sistema automatico Gilson	2,01 (farina mais)	< 26,8	5,8	50-120	78,5
	4,00 (farina mais)	< 24,2	4,1	70-110	78,3
	7,40 (farina mais)	< 22,1	9,1	70-110	72,3
	5,12 (frutta secca)	< 24,1	2,1	70-110	81,4
	2,56 (farina bianca)	< 26,9	3,4	70-110	78,9
	0,26 ( <i>baby food</i> )	< 37,5	1,4	50-120	85,9
Tradizionale	0,77 (farina)	< 31,1	3,2	50-120	78,1
	3,96 (farina)	< 24,3	4,6	70-110	83,4
	9,49 (farina)	< 21,3	3,0	70-110	95,9

Tabella 4. Prove di validazione per ocratossina A

Purificazione	Concentrazione (µg/kg)	Precisione	Recupero (%)	
		limite di ripetibilità	richiesto	ottenuto
Sistema automatico Gilson	2,0 (cacao)	0,15	70-110	84,0
	3,1 (farina grano)	0,49	70-110	87,2
	9,8 (noci)	1,13	70-110	87,0
	2,0 (cacao)	0,37	70-110	72
Tradizionale	3,0 (farina grano)	0,52	70-110	73
	10 (pistacchi)	1,34	70-110	82

Il metodo automatizzato si è rivelato, come del resto era prevedibile, più preciso di quello tradizionale. Per gli alimenti in genere i recuperi non si sono rivelati significativamente differenti, mentre per l'alimentazione per la prima infanzia si è misurato un notevole incremento delle performance.

L'utilizzo dei test statistici opportuni ha permesso di dimostrare l'intercambiabilità delle procedure snellendo quindi le operazioni di estensione della validazione ad altre matrici e/o tossine.

# **FUSARIUM-TOSSINE NEGLI ALIMENTI ZOOTECNICI: APPLICAZIONE DELLA SPETTROSCOPIA NIR-AOTF PER L'ANALISI DI SCREENING DEI SOTTOPRODOTTI DELLA MOLITURA DEL FRUMENTO**

Pier Paolo Danieli (a), Andrea Bellincontro (b), Alfio Chiavaioli (a), Amedeo Pietri (c),  
Terenzio Bertuzzi (c), Fabio Mencarelli (b), Umberto Bernabucci (a), Bruno Ronchi (a)

(a) *Dipartimento di Scienze e Tecnologie per l'Agricoltura, le Foreste, la Natura e l'Energia, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo*

(b) *Dipartimento per l'Innovazione nei Sistemi Biologici, Agroalimentari e Forestali, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo*

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

## **Introduzione**

La presenza delle micotossine negli alimenti zootecnici costituisce un problema sia in termini di produttività per i sistemi d'allevamento (Fink-Gremmels, 2008) che in relazione al rischio di trasferimento di metaboliti e agenti patogeni lungo le filiere dei prodotti d'origine animale (Brown *et al.*, 1981; Shoental, 1985; Atroshi *et al.*, 1998). In particolare, per quanto riguarda il frumento tenero e duro, la presenza dei tricoteceni nelle granelle è tipicamente ricorrente nelle regioni temperate (Larsen *et al.*, 2004).

Tra i diversi composti noti appartenenti a tale categoria, la tossina T-2 e il deossinivalenolo (DON) sono le micotossine di maggiore interesse a causa dell'elevata tossicità della prima e dell'ampia diffusione della seconda (Vilà *et al.*, 2002), talora a concentrazioni relativamente elevate (Tanaka *et al.*, 1988, 1990; Rotter, 1996; Placinta *et al.*, 1999). La presenza della tossina T-2 nei mangimi è considerata una possibile causa d'infertilità negli allevamenti (D'Mello *et al.*, 1999) mentre il DON, anche noto con il nome di "vomitossina" (Canady *et al.*, 2001), sembra essere implicato nelle fusario-tossicosi umane (Luo, 1988) oltre che nei casi di anoressia, emesi, leucocitosi, crisi emorragiche e altri stati patologici rilevabili negli animali da reddito e/o da laboratorio (Ueno, 1984). Al fine di prevenire l'impatto dovuto alla presenza di tricoteceni sui sistemi d'allevamento, la vigente normativa comunitaria prevede valori guida per il DON riferiti ai cereali e ai mangimi completi destinati agli animali da reddito ma non per le contaminazioni da tossina T-2 o altri tricoteceni (es. il nivalenolo, NIV) (Raccomandazione 2006/576/CE). Tuttavia, l'attuale stato delle conoscenze sulla diffusione del DON, nel diversificato settore della mangimistica, necessita di un notevole sforzo per la raccolta dei dati di contaminazione e lo sviluppo di metodi d'analisi idonei al fine di migliorare le stime d'esposizione degli animali da reddito (EFSA, 2004).

La necessità di metodi rapidi per la valutazione delle contaminazioni da micotossine negli alimenti comporta lo studio delle potenzialità applicative di tecniche analitiche di tipo non-distruttivo, come la spettroscopia di riflettanza nel vicino infrarosso (*Near-InfraRed Spectroscopy*, NIRS) che, tra gli altri vantaggi, rende possibili applicazioni di tipo "on-site" (Shepard *et al.*, 2010). Negli ultimi anni, l'applicabilità della NIRS nell'analisi di screening è stata dimostrata per la ricerca degli alcaloidi dell'ergot nei foraggi conservati (Roberts *et al.*, 2005; 2009), per il DON nel frumento duro e tenero (Dowell *et al.*, 1999; Petterson *et al.*, 2003;

De Girolamo *et al.*, 2009; Peiris *et al.*, 2010), per la contaminazione da aflatossine nella paprica (Hernandez-Hierro *et al.*, 2008), nel peperoncino (Tripathy & Mishra, 2009) e nei cereali (mais e orzo) (Fernandez-Ibanez *et al.*, 2009). Altri studi hanno messo in evidenza le potenzialità della NIRS in applicazione al controllo delle contaminazioni da OTA e aflatossine totali nella paprica (Hernandez-Hierro *et al.*, 2008), da DON (Balduan *et al.*, 2009) e fumonisine nelle cariossidi di mais (Berardo *et al.*, 2005). Diverse sono le soluzioni tecniche che consentono l'utilizzo della spettroscopia NIR per applicazioni in vari settori della produzione. In particolare, la spettroscopia NIR-AOTF (*Near Infrared Reflectance – Acousto Optically Tunable Filter*) è una tecnologia ad alta performace spettrale (Workman & Burns, 2001) che annovera alcune recenti applicazioni nel settore agroalimentare, specialmente frutta e vegetali, per la predizione e la misura non-distruttiva di parametri qualitativi e analitici (Bellincontro *et al.*, 2012). In considerazione delle potenzialità predittive della tecnica NIR applicata allo screening delle micotossine, del potenziale impatto economico e igienico-sanitario del DON e di altri tricoteceni sui sistemi d'allevamento e della rilevanza del mercato nazionale dei cruscami di frumento duro e tenero per l'alimentazione zootecnica (Padel, 2005; Gigli *et al.*, 2009; ASSALZOO, 2011; Chiavaioli, 2012) lo scopo del presente contributo è stato quello di valutare le potenzialità applicative della tecnica NIR-AOTF per la predizione dei livelli di contaminazione da tricoteceni nei sottoprodotti della molitura del grano duro e tenero d'origine nazionale.

## Materiali e metodi

### Campioni

Nell'ambito di un recente programma di ricerca finanziato dal MIPAF, denominato MICORID, volto ad incrementare lo stato conoscitivo sulla presenza di micotossine negli alimenti zootecnici di origine nazionale, campioni rappresentativi, relativi al biennio 2008/2009, di sottoprodotti della molitura (crusca, tritello e farinaccio) del frumento tenero e duro sono stati raccolti presso centri di produzione, stoccaggio e trasformazione presenti sul territorio nazionale. Il campionamento, laddove possibile, è stato effettuato in accordo con le indicazioni operative contenute nel Regolamento (CE) 152/2009, specifico per la ricerca dei contaminanti negli alimenti e materie prime destinate alla zootecnia. I campioni raccolti sono stati quindi analizzati per determinarne il livello di contaminazioni da tricoteceni. Per il seguente lavoro preliminare, sono stati impiegati 89 campioni di cruscame di cui 44 di grano tenero e 45 di grano duro. I due gruppi campionari sono stati selezionati da un pool più ampio al fine di rappresentare in maniera il più possibile uniforme i livelli di contaminazione da tricoteceni nell'ambito del range di valori osservati per ogni tipologia di sottoprodotto sia per il grano duro: crusca (GD\_C), tritello (GD\_T) e farinaccio (GD\_F) che per il frumento tenero: crusca (GT\_C), tritello (GT\_T) e farinaccio (GT\_F). I campioni sono stati conservati in confezioni sotto vuoto fino al momento delle analisi.

### Caratterizzazione della contaminazione dei cruscami

I campioni di cruscame sono stati sottoposti ad analisi per i tricoteceni adottando come metodo di riferimento quello proposto da Rossi *et al.* (2006). In sintesi, 25 g di campione sono stati sottoposti ad estrazione con 100 mL di miscela acetone/acqua (86:14); in seguito 6 mL d'estratto, preventivamente filtrato, sono stati purificati mediante colonnine multifunzione a fase inversa MycoSep<sup>®</sup> 227 (Romer Labs, Washington DC, USA). I tricoteceni sono stati quindi

separati e quantificati per gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS) previa derivatizzazione con trimetilsililimidazolo/trimetilclorosilano (TMSI/TMCS). Le percentuali di recupero del metodo sono state superiori al 90% per il DON e all'85% per NIV, T-2, HT-2 e i metaboliti del DON (3-AcDON e 15-AcDON). I limiti di rivelabilità e di quantificazione sono stati rispettivamente pari a 5 e 10 µg/kg.

## Acquisizioni NIR-AOTF

Su aliquote degli stessi campioni sottoposti ad analisi per i tricoteceni con il metodo di riferimento, è stata messa a punto una procedura d'acquisizione spettrale di tipo NIRS. A tale scopo è stato impiegato un sistema NIR-AOTF (*Acousto Optically Tunable Filter*) LUMINAR 5030 Hand-held NIR Analyzer (Brimrose Corp., MA, USA) che basa la preselezione spettrale su un filtro acusto-ottico di natura cristallina (TeO<sub>2</sub>) in quale garantisce un'ottima capacità di scansione in termine di accuratezza ( $\pm 0,5$  nm) e di velocità di acquisizione (fino a 16.000 nm/s). Il dispositivo impiegato (Figura 1) è dotato di una *probe* di misura esterna al corpo strumentale a cui è collegata un'apposita *gun* d'acquisizione per interattanza.



Figura 1. Sistema NIS-AOTF utilizzato per l'acquisizione dei dati spettrali NIR

L'acquisizione spettrale tra 1100 e 2300 nm è stata ottenuta per immersione del cono d'acquisizione all'interno di 8 differenti punti del campione contenuto in una specifica tazza rotante. Ogni acquisizione spettrale è il risultato medio di 10 spettri per ogni punto di misura. L'acquisizione e la trasformazione delle informazioni spettrali (calibrazione e validazione) sono state condotte mediante il programma Brimrose Snap 2.04 (Brimrose Corp., MD, USA).

## Chemometria e analisi statistica dei dati

Sui dati spettrali, è stata applicata preliminarmente un'analisi delle componenti principali (*Principal Component Analysis*, PCA) nel tentativo d'individuare eventuali *outlier* nonché di produrre un'analisi di discriminazione e separazione dei campioni testati in funzione della natura (grano tenero *vs* grano duro) o della tipologia (crusca, tritello e farinaccio). I modelli calibrativi sono stati sviluppati mediante regressione PLS (*Partial Least Square*) (Bjorsvik & Martens, 2001) applicando un metodo di validazione interno al set dei dati (*Internal Full Cross Validation*) che tiene conto, a turno, di tutti i campioni del set di calibrazione secondo la tecnica *leave-one-out*. Il

pretrattamento dei dati spettrali è stato condotto mediante il filtro Standard Normal Variate (SNV) abbinato ad una derivazione Savitzky-Golay di 2° grado. La bontà dei modelli regressivi ottenuti è stata valutata mediante il coefficiente di determinazione in calibrazione ( $R_c^2$ ) e in cross-validazione ( $R_{CV}^2$ ), l'errore standard in calibrazione ( $RMSE_C$ ) e in cross-validazione ( $RMSE_{CV}$ ). Inoltre sono stati determinati anche gli indici *Residual Predictive Deviation* (RPD) e *Range Error Ratio* (RER) (Fearn, 2002). L'elaborazione statistica multivariata è stata condotta utilizzando il pacchetto software Unscrambler v. 9.7 (Camo, Oslo, Norvegia). Per quanto riguarda la diffusione delle contaminazioni da tricoteceni nei campioni di crusame, l'analisi statistica dei dati è stata condotta utilizzando il pacchetto software Statistica 7 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

## Risultati e discussioni

### Contaminazione da tricoteceni

Le statistiche relative alle contaminazioni da DON, NIV e somma dei tricoteceni per l'intero set campionario in studio sono riepilogate nella Tabella 1. La contaminazione da DON ha presentato una positività del 100% con un range compreso tra 80 e 6486  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e un livello medio di concentrazione pari a 1141  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (mediana pari a 656  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Il valore massimo (6486  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) è stato riscontrato in un campione di farinaccio di grano duro e la distribuzione dei dati è risultata non normale (Shapiro & Wilks test: 0,4432;  $P < 0,001$ ).

**Tabella 1. Statistiche descrittive della contaminazione da DON, NIV e tricoteceni totali dei campioni di sottoprodotti della molitura utilizzati per lo sviluppo di modelli predittivi NIR-AOTF**

Micotossine	Positività	Media $\mu\text{g}/\text{kg}$	DS $\mu\text{g}/\text{kg}$	CV%*	Min-max $\mu\text{g}/\text{kg}$	Percentile		
						5°	50°	95°
DON	89/89	1141	1254	109,9	80-6486	151	656	3802
NIV	43/89	87***	145***	166,7***	<10-26	<10	<10	322
Tri <sub>TOT</sub> **	89/89	1258***	1327***	105,5***	80-6596**	158	828	3950

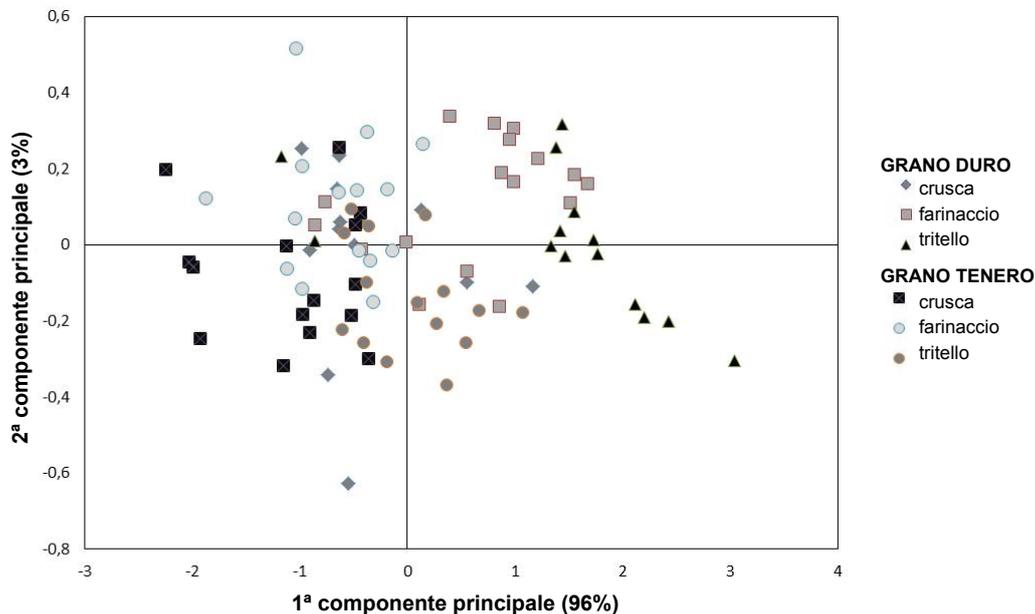
\* Coefficiente di Variazione \*\*[DON]+[NIV]+[3-AcDON]+[15-AcDON]; \*\*\* ai fini computazionali i valori inferiori al limite di rilevabilità della metodica di riferimento (GC-MS) sono stati posti pari a zero

Per gli altri tricoteceni in studio, la positività più frequente è stata riscontrata nel caso del NIV (48,3% dei campioni) con valori compresi tra il valore massimo pari a 926  $\mu\text{g}/\text{kg}$  NIV/kg e il limite di metodo. Sporadica invece è risultata la presenza dei due metaboliti del DON (positività pari al 9,2% dei casi per il 3-AcDON e al 7% dei casi per il 15-AcDON) mentre nessun campione ha fatto registrare concentrazioni per le tossine T-2 e HT-2 oltre i limiti di metodo. In termini di presenza cumulata delle diverse tossine in studio (Tri<sub>TOT</sub>), il valore medio è risultato pari a 1258  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Come per il DON, l'elevata dispersione dei dati è indicata dall'ampio range (80-6596  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e da un CV% pari a 105,5.

### Analisi spettrale NIR e sviluppo di modelli predittivi

La PCA effettuata sui dati spettrali non ha permesso di ordinare sul primo piano principale i campioni in base alla tipologia di grano (duro vs tenero) o di sottoprodotto (Figura 2). Considerando la prima componente principale (96% della varianza spiegata) sebbene sia

possibile evidenziare come alcuni campioni di crusca di tenero e di tritello di frumento duro si collochino agli estremi dell'ordinamento, il resto della casistica in studio non appare poter essere ulteriormente discriminata.



**Figura 2. Ordinamento PCA dei campioni di cruscami di grano duro e tenero condotto sui dati spettrali NIR**

In ragione di ciò, stante anche il numero limitato dei campioni all'interno delle diverse categorie di sottoprodotto, si è deciso di procedere con lo sviluppo preliminare di modelli calibrativi PLS considerando indistintamente le diverse tipologie di cruscame. Sugli spettri acquisiti, previa trasformazione con filtro in derivata 1<sup>a</sup>, è stato possibile mettere in evidenza alcune zone spettrali di particolare interesse (Figura 3). Tali zone dello spettro sono state rilevate in corrispondenza delle lunghezze d'onda di 1420 e 1900 nm. Picchi secondari, sono stati rilevati alle lunghezze d'onda di 1356, 1690 e 2030 nm.

Con riferimento all'analisi spettrale, sebbene complessa a causa dell'elevato grado di sovrapposizione di bande corrispondenti a differenti composti presenti nel campione e/o di bande contenenti informazioni relative a più di un tipo di vibrazione molecolare (Berardo *et al.*, 2005), è interessante evidenziare che le regioni spettrali NIR individuate ricadono entro bande comprese tra 1390-1770 e 1880-2070 per le quali Dvořáček *et al.* (2012) e Peiris *et al.* (2009) hanno osservato un elevato grado di correlazione con i livelli di contaminazione da DON nel grano. Tuttavia queste stesse regioni, riflettono differenze in termini di composizione chimica dei campioni (De Girolamo & Lippolis, 2009) imputabili a vari fattori abiotici e biotici, tra i quali anche il livello d'infezione fungina e il conseguente scadimento qualitativo delle granelle. In considerazione dei contenuti relativamente modesti di DON e NIV registrati, è probabilmente più realistico attribuire le differenze spettrali registrate alla variabilità composizionale dei campioni, almeno in parte dovute allo sfruttamento della matrice da parte del fungo e di cui il rilascio dei tricoteceni è una diretta conseguenza (Peiris *et al.*, 2009). Tale ipotesi sembra essere supportata dai parametri relativi ai modelli di regressione PLS sviluppati per il DON (Figura 4A-B) e per la concentrazione cumulata dei tricoteceni (Figura 4C-D).

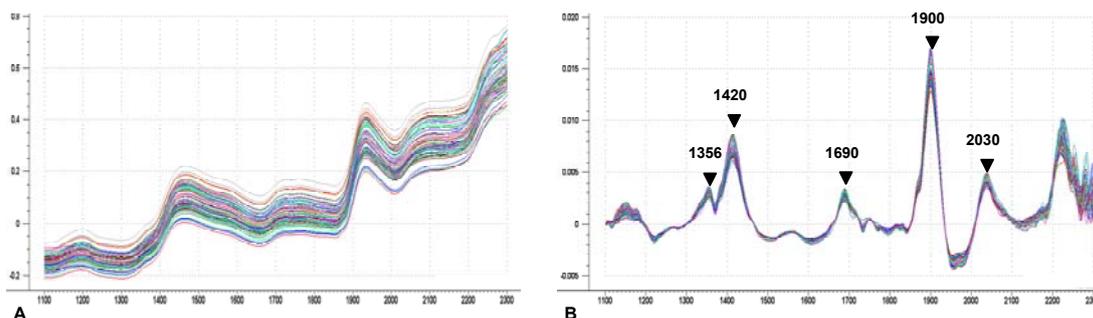


Figura 3. Spettri d'assorbanza NIR-AOTF dell'intero pool campionario in studio nel range di lunghezze d'onda 1100-2300 nm (A) e relativa trasformazione (derivata 1<sup>a</sup>)(B)

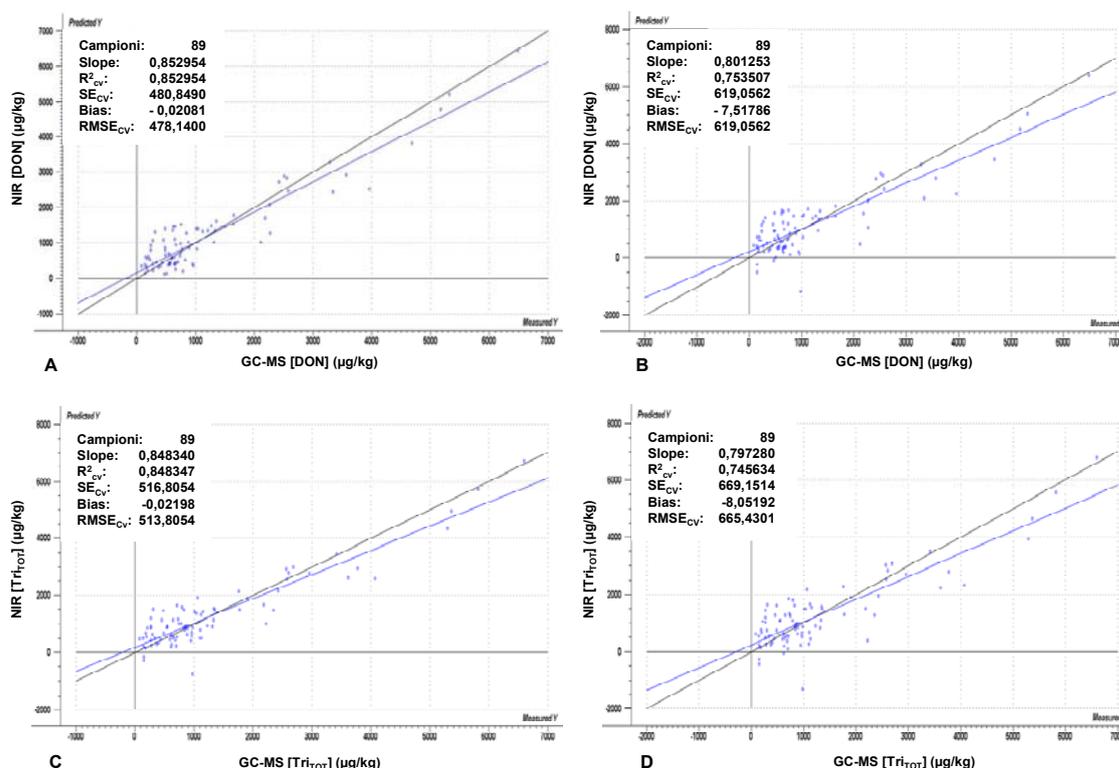


Figura 4. Modelli regressivi PLS in calibrazione (A, C) e in predizione (B, D) per la stima delle contaminazioni da DON (A, B) e da tricoteceni totali (C, D) in campioni di crusca di grano duro e tenero. R<sup>2</sup><sub>c</sub>/R<sup>2</sup><sub>cv</sub> = coefficiente di determinazione in calibrazione e in cross-validazione; Bias = scarto delle medie tra valori in predizione (NIR) e valori di riferimento (GC-MS); SE<sub>c</sub>/RMSE<sub>c</sub> = errore standard di calibrazione; SE<sub>cv</sub>/RMSE<sub>cv</sub> = errore standard di cross-validazione; Slope = pendenza della regressione NIR/GC-MS

Per quanto riguarda lo sviluppo e la validazione del modello PLS per la stima del DON nei crusca di grano duro e tenero, è stato ottenuto un *fitting* di calibrazione pari a 0,853 (0,754 in cross-validazione) con un relativo errore standard pari a 478 µgDON/kg (619 µgDON/kg in cross-validazione). Il valore del coefficiente di determinazione in cross-validazione del modello regressivo sviluppato per il

DON consente di attribuire al modello stesso una capacità predittiva di tipo semi-quantitativo essendo inferiore a 0,81, limite per l' $R^2_{cv}$  indicato da Williams (2003) per modelli quantitativi. Nel complesso, i risultati ottenuti per il DON, appaiono sostanzialmente in linea e talora migliori se confrontati con quelli riportati in altri studi inerenti il frumento duro e tenero e il mais (Tabella 2). Gli scarti tra le medie dei valori in predizione (NIR) rispetto alle osservazioni ottenute con il metodo di riferimento (GC-MS) sono risultati estremamente modesti sia nel caso della calibrazione (Bias = -0,02  $\mu\text{gDON/kg}$ ) che della cross-validazione (bias = -7,51  $\mu\text{gDON/kg}$ ).

**Tabella 2. Comparazione tra modelli PLS sviluppati su dati di spettroscopia NIR per la stima della contaminazione da DON in campioni di crusame di frumento (presente contribuito) e proposti in letteratura per la granella di grano tenero, grano duro e mais**

Matrice	Range ( $\mu\text{g/kg}$ )	$N_c/N_p^*$	Modello	$R^2_c$	$SE_c^{**}$	$R^2_{cv}$	$SE_{cv}^{**}$	$R^2_p$	$SE_p^{**}$	Rif.
GD+GT** (cruscami)	80-6486	89	PLS	0,93	481	0,75	623	-	-	-
GD+GT	50-3.000	167/75	PLS	0,71	-	-	555	0,58	379	(1)
Mais	1.000-9.000	539	PLS	0,90	440	0,88	500	-	-	(2)
GT	0-10.000	50	PLS	-	-	0,98	404	-	-	(3)
GT	0-5.000	268/30	PLS	0,49	880	0,45	920	-	950	(4)
GT	0-13.000	306/33	PLS	0,79	1080	0,69	1300	-	1200	(4)
GT (SC)	0-788.600	88	PLS	0,64	44000	0,66	52000	-	-	(5)
GT (SC)	0-1.000.000	120	PLS	-	-	0,72	154000	0,87	60800	(6)

\* $N_c/N_p$  = numerosità dei pool campionari utilizzati rispettivamente per la calibrazione e la predizione; \*\*oppure  $RMSE_{C/CV/P}$  (in  $\mu\text{g/kg}$ ); GD = grano duro; GT = grano tenero, SC = singola cariosside.

Rif. (1) De Girolamo *et al.*, 2009; (2) Bolduan *et al.*, 2009; (3) Pettersson & Aberg, 2003; (4) Dvořáček *et al.* 2012; (5) Dowel *et al.*, 1999; (6) Peiris *et al.*, 2010.

Il modello PLS relativo alla stima dei tricoteceni totali nei campioni in studio è risultato lievemente meno performante di quello per il DON con valori di *fitting* di poco inferiori ed errore standard in calibrazione ( $RMSE_c = 514 \mu\text{gTri}_{TOT}/\text{kg}$ ) e in cross-validazione ( $RMSE_{cv} = 665 \mu\text{gTri}_{TOT}/\text{kg}$ ) superiori rispettivamente del 7% ed 8% se confrontati con i corrispondenti valori per il DON. Anche per i tricoteceni totali, i valori di Bias denotano un lieve tendenza della predizione NIR alla sottostima rispetto al metodo di riferimento (GC-MS). Al fine di valutare l'utilità applicativa dei modelli sviluppati, sia per la stima del contenuto in DON che in tricoteceni totali nei cruscami di grano tenero e duro, si è ricorso al calcolo degli indici RPD (rapporto tra deviazione standard dei dati ottenuti con il metodo di riferimento e l'errore standard in cross-validazione/predizione) e RER (rapporto tra range dei dati ottenuti con il metodo di riferimento e l'errore standard in cross-validazione o predizione) per entrambi i modelli al confronto dei valori ottenuti con i limiti indicati in letteratura (Williams, 2001; Fearn, 2002; Williams, 2003; Smyth *et al.*, 2008) (Tabella 3).

**Tabella 3. Calcolo degli indici RPD e RER per i modelli PLS sviluppati e confronto con i limiti proposti in letteratura**

Matrice	$SE_{cv}$	SD osservato	RPD	LIM*	$SE_{cv}$	RANGE osservato	RER	LIM**
[DON] $\mu\text{g/kg}$	623	1254	2,01	2	623	6388	10,25	10
[Tri <sub>TOT</sub> ] $\mu\text{g/kg}$	669	1327	1,98	2	669	6512	9,74	10

\* Limite per modelli predittivi con performance adeguate (Williams, 2001; Smyth *et al.*, 2008); \*\* limite per modelli predittivi caratterizzati da elevata utilità pratica (Fearn, 2002; Williams, 2003).

Per quanto attiene alla stima predittiva del DON nei cruscamì, il modello PLS sviluppato è risultato di performance adeguata per la maggior parte dei casi ( $RPD > 2$ ) e d'elevata utilità pratica ( $RER > 10$ ). Il modello per la stima della contaminazione cumulata da tricoteceni è risultato al limite dell'adeguatezza in termini di performance ( $RPD = 1,98$ ) e grado d'utilità ( $RER = 9,74$ ) potendosi collocare, quindi, ad un livello di affidabilità complessiva leggermente inferiore a quello per il DON, ma comunque soddisfacente per lo screening.

## Conclusioni

I risultati ottenuti nello sviluppo di modelli predittivi NIR-AOTF per i cruscamì di grano tenero e duro, sebbene in via preliminare, consentono di affermare che tale tecnica analitica presenta caratteristiche quali rapidità, affidabilità e praticità (inclusa la portabilità del dispositivo strumentale utilizzato) di rilievo per la predizione semi-quantitativa del contenuto di deossinivalenolo e altri tricoteceni nei sottoprodotti della molitura del frumento tenero e duro. Ulteriori approfondimenti, soprattutto tesi ad incrementare la base campionaria, la configurazione ottimale di misura e a valutare la piena applicabilità a scala aziendale (industria molitoria, centri di stoccaggio, industria mangimistica), sono attualmente in corso al fine di verificarne il reale potenziale applicativo nel controllo della presenza dei tricoteceni nelle filiere di produzione agro-zootecnica.

## Bibliografia

- Associazione Nazionale tra i Produttori di Alimenti Zootecnici. *Annuario 2011*. Roma: ASSALZOO; 2012. Disponibile all'indirizzo: [www.assalzoo.it/documenti/annuario/doc\\_download/99-annuario-2011](http://www.assalzoo.it/documenti/annuario/doc_download/99-annuario-2011); ultima consultazione 9/7/13.
- Atroschi F, Rizzo A, Westermarck T, Ali-Vehmas T. Effects of tamoxifen, melatonin, coenzyme Q10, and L-carnitine supplementation on bacterial growth in the presence of mycotoxins. *Pharmacology Research* 1998;38:289-95.
- Bellincontro A, Taticchi A, Servili M, Esposto S, Farinelli D, Mencarelli F. Feasible application of a portable NIR-AOTF tool for on-field prediction of phenolic compounds during ripening of olives for oil production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2012;60(10):2665-73.
- Berardo N, Pisacane V, Battilani P, Scandolara A, Pietri A, Marocco A. Rapid detection of kernel rots and mycotoxins in maize by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005;53:8128-34.
- Bjorsvik HR, Martens H. Calibration of NIR instruments by PLS regression. In: Burns D, Ciurczak EW (Ed.). *Handbook of Near-Infrared analysis*. New York: Marcel Dekker; 2001.
- Brown VMD, Pier AC, Richard JL, Krogstad RE. Effects of dietary aflatoxin on exiting bacterial intramammary infections in dairy cows. *American Journal of Veterinary Research* 1981;42:927-33.
- Canady RA, Coker RD, Regan SK, Krska R, Kuiper-Goodman T, Olsen M, Pestka JJ, Resnik S, Schlatter J. Deoxynivalenol. *Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. Fifty-Sixth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. International Programme on Chemical Safety*. Geneva: World Health Organization; 2001.
- Chiavaioli A. *Effetto della presenza di contaminanti biogenici (micotossine) sul valore nutrizionale di sottoprodotti della molitura dei cereali destinati all'alimentazione animale*. Viterbo: Università degli Studi della Tuscia; 2011. [Tesi di Laurea Specialistica]

- De Girolamo A, Lippolis V, Nordkvist E, Visconti A. Rapid and non-invasive analysis of deoxynivalenol in durum and common wheat by Fourier-Transform Near Infrared (FT-NIR) spectroscopy. *Food Additives and Contaminants Part A* 2009;26:907-17.
- D'Mello JPF, Placinta CM, Macdonald AMC. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology* 1999;80:183-205.
- Dowell FE, Ram MS, Seitz LM. Predicting scab, vomitoxin, and ergosterol in single wheat kernels using Near-Infrared Spectroscopy. *Cereal Chemistry* 1999;76(4):573-76.
- Dvořáček V, Prohasková A, Chrpová J, Štočková L. Near infrared spectroscopy for deoxynivalenol content estimation in intact wheat grain. *Plant & Soil Environment* 2012;58(4):196-203.
- European Food Safety Authority (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Deoxynivalenol (DON) as undesirable substance in animal feed. *The EFSA Journal* 2004;73:1-42.
- Fearn T. Assessing calibrations: SEP, RPD, RER and R<sup>2</sup>. *NIR news* 2002;13(6):12-4.
- Fernandez-Ibanez V, Soldado A, Martinez-Fernandez A, De la Roza-Delgado B. Application of near infrared spectroscopy for rapid detection of aflatoxin B<sub>1</sub> in maize and barley as analytical quality assessment. *Food Chemistry* 2009; 113: 629-34.
- Fink-Gremmels, J. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *Veterinary Journal* 2008;176:84-92.
- Gigli S, Guarino Amato M, Ronchi B, Primi R. *Fabbisogno e disponibilità di alimenti concentrati per le esigenze dei sistemi di allevamento biologico in Italia*. Roma: Consiglio per la ricerca e la sperimentazione in Agricoltura; 2009.
- Hernandez-Hierro JM, Garcia-Villanova RJ, Gonzalez-Martin I. Potential of near infrared spectroscopy for the analysis of mycotoxins applied to naturally contaminated red paprika found in the Spanish market. *Analytica Chimica Acta* 2008;622:189-94.
- Larsen JC, Hunt J, Perrin I, Ruckebauer P. Workshop on trichothecenes with a focus on DON: summary report. *Toxicology Letters* 2004;153:1-22.
- Luo XY. *Fusarium* toxin contamination in China. *Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology* 1988;1:97-8.
- Padel A. *Overview of supply and demand for concentrated organicfeed in the EU in 2002 and 2003 with a particular focus on protein sources for mono-gastric animals. Organic Revision - Research to support the EU-regulation on Organic Agriculture*. Disponibile all'indirizzo <http://www.organic-revision.org>; ultima consultazione 22/05/2012.
- Peiris KHS, Pumphrey MO, Dowell FE. NIR absorbance characteristics of deoxynivalenol and of sound and *Fusarium*-damaged wheat kernels. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 2009;17:213-21.
- Peiris KHS, Pumphrey MO, Dong Y, Maghirang EB, Berzonsky W, Dowell FE. Near-infrared spectroscopic method for identification of fusarium head blight damage and prediction of deoxynivalenol in single wheat kernels. *Cereal Chemistry* 2010;87(6):511-17.
- Pettersson H, Åberg L. Near infrared spectroscopy for determination of mycotoxins in cereals. *Food Control* 2003;14:229-32.
- Placinta CM, D'Mello JPF, Macdonald AMC. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 1999;78:21-37.
- Roberts CA, Benedict HR, Hill NS, Kallenbach RL, Rottinghaus GE. Determination of ergot alkaloid content in tall fescue by near-infrared spectroscopy. *Crop Science* 2005;45:778-83.
- Roberts CA, Kallenbach RL, Hill NS, Rottinghaus GE, Evans TJ. Ergot alkaloid concentrations in tall fescue hay during production and storage. *Crop Science* 2009;49:1496-502.

- Rossi F, Bertuzzi T, Comizzoli S, Turconi G, Roggi C, Pagani M, Cravedi P, Pietri A. Preliminary survey on composition and quality of conventional and organic wheat. *Italian Journal of Food Science* 2006;18(4):355-66.
- Rotter BA, Prelusky DB, Pestka JJ. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *Journal of Toxicology and Environmental Health* 1996;48:1-34
- Shephard GS, Berthiller F, Dorner J, Krska R, Lombaert GA, Malone B, Maragos C, Sabino M, Solfrizzo M, Trucksess MW, van Egmond HP, Whitaker TB. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2008-2009. *World Mycotoxin Journal* 2010;3(1):3-23.
- Shoental R. Trichothecenes, zearalenone, and other carcinogenic metabolites of *Fusarium* and related microfungi. *Advances in Cancer Research* 1985;45:217-90.
- Smyth HE, Cozzolino D, Cynkar WU, Damberg RG, Sefton M, Gishen M. Near infrared spectroscopy as a rapid tool to measure volatile aroma compounds in Riesling wine: possibilities and limits. *Analytical & Bioanalytical Chemistry* 2008;390:1911-6.
- Tanaka T, Hasegawa A, Yamamoto S, Lee U-S, Sugiura Y, Ueno Y. Worldwide contamination of cereals by *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone. 1. Survey of 19 countries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1988;36:979-83
- Tanaka T, Yamamoto S, Hasegawa A, Aoki N, Besling JR, Sugiura Y, Ueno Y. A survey of the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone, in cereals harvested in the Netherlands. *Mycopathologia* 1990;110:19-22.
- Tripathi S, Mishra HN. A rapid FT-NIR method for estimation of aflatoxin B1 in red chili powder. *Food Control* 2009;20:840-6.
- Ueno Y. Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes. *Fundamentals in Applied Toxicology* 1984;4:S124-S132.
- Vilà B, Jaradat ZW, Marquardt RR, Frohlich AA. Effect of T-2 toxin on *in vivo* lipid peroxidation and vitamin E status in mice. *Food and Chemical Toxicology* 2002;40:479-86.
- Williams PC. Implementation of near infrared technology. In: Willimas P & Norris K, (Ed.). *Near-infrared technology in the agricultural and food industries*. 2<sup>nd</sup> ed. St. Paul, Mn: American Association of Cereal Chemists; 2001.
- Williams P. Near-infrared technology: getting the best out of light. In: North Ryde NSW (Ed.): *A short course in the practical implementation of near infrared spectroscopy for the user*. Nanaimo, Canada: PDK Projects Inc; 2003.
- Workman J Jr, Burns DA. Commercial NIR Instrumentation. In: Burns D, Ciurczhak EW (Ed.). *Handbook of Near-Infrared Analysis*; New York: Marcel Dekker; 2001.

# DETERMINAZIONE DI OCRATOSSINA A NEL FRUMENTO MEDIANTE L'USO DI APTAMERI A DNA

Annalisa De Girolamo, Roberto Schena, Angelo Visconti  
*Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Bari*

## Introduzione

L'ocratossina A (OTA) è una micotossina prodotta da numerose specie fungine appartenenti ai generi *Penicillium* e *Aspergillus*. I prodotti più a rischio di contaminazione da OTA sono cereali, birra, vino, cacao e prodotti derivati, caffè, uve secche, spezie e mangimi animali. Inoltre, la presenza di OTA nei mangimi destinati all'alimentazione dei suini può indurre la contaminazione da tale tossina nei prodotti carnei (freschi e stagionati) e nel siero animale. L'OTA possiede attività epatotossica, teratogena, immunotossina e cancerogena (1-2). L'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro ha classificato l'OTA come un possibile cancerogeno per l'uomo (gruppo 2B) (3). Il gruppo di esperti scientifici sui contaminanti nella catena alimentare (gruppo CONTAM) dell'Autorità europea per la sicurezza alimentare (*European Food Safety Authority*, EFSA) ha elaborato per l'OTA una dose settimanale tollerabile (*Tolerable Weekly Intake*, TWI) di 120 ng/kg di peso corporeo (4). La Commissione europea ha definito i tenori massimi ammissibili di OTA in diverse tipologie di alimenti, tra cui i cereali non trasformati e i prodotti derivati, caffè, vino, frutta secca, alimenti per l'infanzia, e solo recentemente nelle spezie e nella radice di liquirizia (5-6).

Per assicurare il rispetto della legislazione e preservare la salute del consumatore dall'esposizione all'OTA si rende necessario disporre di metodiche analitiche robuste e affidabili in grado di identificarne la presenza durante l'intera filiera alimentare. I metodi più comunemente impiegati per la determinazione dell'OTA negli alimenti e nei mangimi prevedono la purificazione degli estratti su colonnine ad immunoaffinità e separazione mediante cromatografia liquida (*Liquid Chromatography*, LC) con rivelatore a fluorescenza (*Fluorescence Detector*, FLD). L'elevata specificità di riconoscimento nei confronti delle micotossine rende gli anticorpi la principale classe di recettori impiegata nelle tecniche diagnostiche per la determinazione di tali contaminanti. Tuttavia, i problemi legati alla bassa stabilità, i costi elevati e la necessità di utilizzare animali per la loro preparazione ha orientato la ricerca verso lo sviluppo di recettori sintetici da utilizzare in alternativa agli anticorpi. Tra questi vanno menzionati gli aptameri, sequenze oligonucleotidiche a DNA o RNA a singola elica generati da un processo di selezione in vitro chiamato SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*), che legano con elevata specificità e affinità la molecola bersaglio. Recentemente sono stati riportati aptameri a DNA specifici per l'OTA e la fumonisina B1 (7, 8). L'aptamero specifico per l'OTA è stato impiegato in numerosi metodi per l'analisi di tale micotossina, tuttavia solo alcuni di questi metodi sono stati applicati all'analisi di matrici alimentari, e in particolare all'analisi di OTA nei cereali. Presso l'Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) è stata messa a punto una metodica ad hoc per la preparazione di colonnine ad affinità basate sull'impiego dell'aptamero per OTA. Tali colonnine sono state utilizzate per lo sviluppo di un metodo LC/FLD per la determinazione di OTA in estratti di frumento (9). Le prestazioni analitiche (precisione e recupero) del metodo rientrano nei criteri di accettabilità previsti dal Regolamento (CE) 401/2006 per l'OTA (10). I risultati ottenuti hanno permesso di ottimizzare

ulteriormente le colonnine aptameriche che sono state successivamente commercializzate da una ditta canadese (NeoVentures Biotechnology, London, Ontario, Canada). La stessa ditta ha integrato tali colonnine aptameriche in un sistema diagnostico innovativo che impiega il principio della fluorescenza risolta nel tempo (*Time Resolved Fluorescence*, TRF) in combinazione con il Trasferimento di Energia per Risonanza di Fluorescenza (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*, FRET) per l'analisi di OTA, previa reazione con una soluzione fluorescente contenente il terbio e l'aptamero a DNA specifico per l'OTA. Tale sistema è stato provato presso i laboratori ISPA-CNR allo scopo di valutarne l'applicabilità all'analisi di OTA in campioni di frumento duro (11).

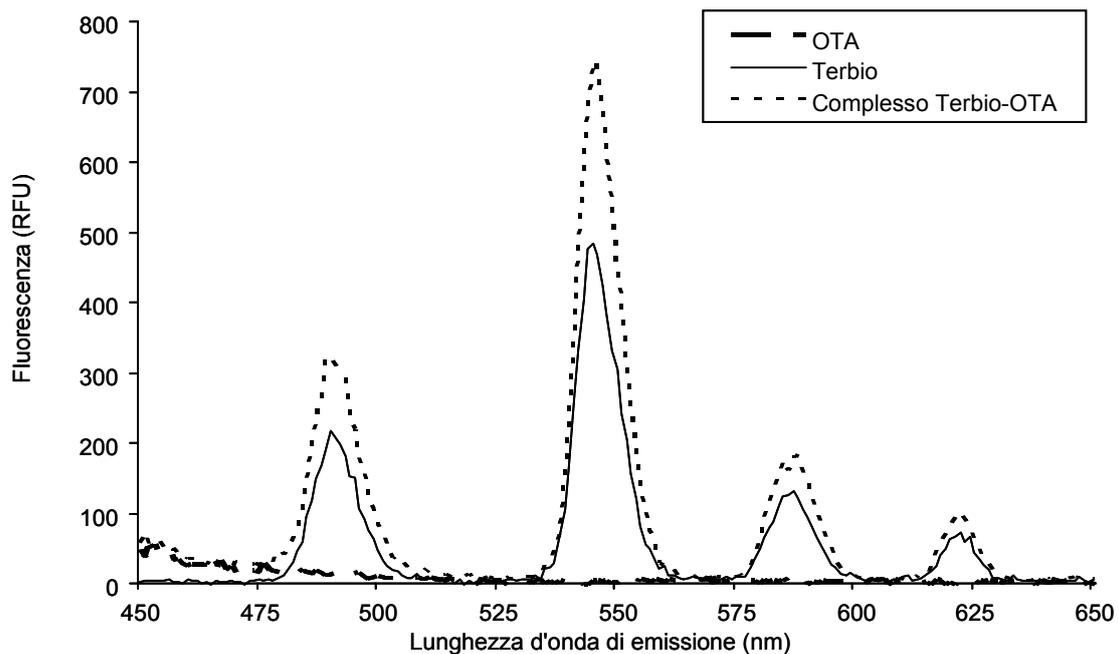
## Spettroscopia FRET-TRF

Rispetto alla spettroscopia di fluorescenza tradizionale, secondo la quale una molecola organica assorbe radiazioni nell'UV ed emette fluorescenza nel visibile in un intervallo di tempo di  $10^{-9}$  secondi, la spettroscopia TRF sfrutta le proprietà di alcuni complessi di metalli di transizione, detti lantanidi (es. il terbio), di emettere la radiazione assorbita in un tempo molto più lungo e compreso tra  $10^{-6}$ - $10^{-3}$  s circa. La spettroscopia TRF permette di aumentare significativamente la sensibilità della rivelazione, in quanto elimina l'interferenza dovuta all'autofluorescenza del campione e alla luce di eccitazione diffusa. Inoltre, la contemporanea presenza in soluzione di due molecole fluorescenti, quali l'OTA e il terbio, permette di usufruire del fenomeno del FRET tra una molecola *donatore* (OTA) e una molecola *accettore* (terbio). Infatti, la lunghezza d'onda di eccitazione del terbio (380 nm) eccita anche l'OTA il cui spettro di emissione si sovrappone in maniera considerevole a quello di assorbimento del terbio. Questo permette il trasferimento di energia mediante spettroscopia FRET al terbio, il quale, a sua volta, emette con spettroscopia TRF.

## Analisi di OTA in campioni di frumento

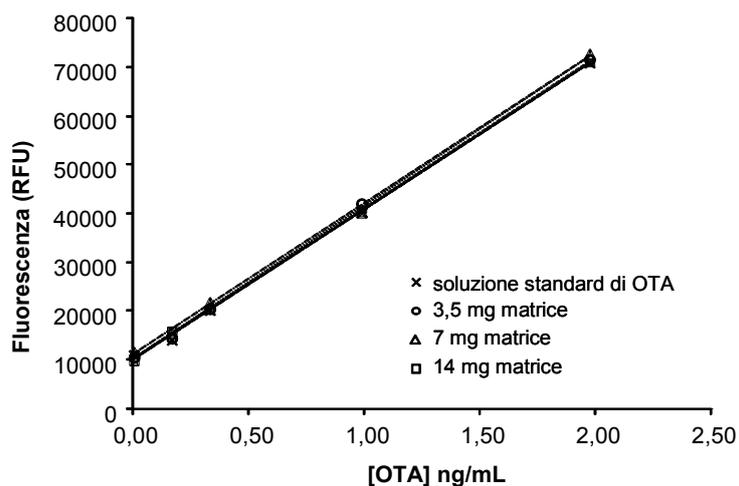
Il metodo basato sulla spettroscopia FRET-TRF opportunamente ottimizzato è stato applicato all'analisi di OTA nel frumento duro non processato. Il protocollo di analisi prevede l'estrazione di OTA dal campione di frumento finemente macinato con una miscela di acetonitrile:acqua (60:40, v/v) mediante agitazione per 5 min, filtrazione e purificazione su colonnine aptameriche. L'OTA eluita dalla colonnina viene diluita con una soluzione fluorescente contenente il terbio e con una soluzione contenente l'aptamero a DNA specifico per l'OTA. La rivelazione viene condotta mediante spettroscopia FRET-TRF utilizzando un lettore di piastre multipozzetto provvisto di un filtro di eccitazione settato alla lunghezza d'onda di 380 nm e uno di emissione alla lunghezza d'onda di 540 nm. Il tempo complessivo di analisi, incluso il tempo per la preparazione del campione, è risultato inferiore a 30 minuti. Come si osserva in Figura 1, l'intensità di fluorescenza del terbio aumenta di circa il 50% in presenza di OTA rispetto alla fluorescenza emessa quando si trova da solo in soluzione (Figura 1). Un ulteriore aumento della fluorescenza viene ottenuto in seguito alla formazione del complesso di coordinazione aptamero/terbio/OTA probabilmente perché la presenza di DNA in prossimità del terbio favorisce l'allontanamento delle molecole di acqua che ne ridurrebbero l'intensità di fluorescenza. Il terbio, infatti, funziona da ponte tra il DNA e l'OTA, entrambi presenti in soluzione in forma anionica.

Al fine di valutare la possibile presenza di effetto matrice sul segnale FRET-TRF emesso dal complesso di coordinazione aptamero/terbio/OTA, sono stati condotti diversi esperimenti utilizzando diverse soluzioni calibranti di OTA (0,16-1,97 ng/mL) in presenza di quantità crescenti di matrice (3,5 mg, 7,0 mg e 14 mg) e di una quantità fissa di aptamero.



**Figura 1. Spettri di fluorescenza di una soluzione di terbio (3 mM), di soluzione standard di OTA (100 nM) e del complesso di coordinazione OTA/terbio acquisiti alla lunghezza d'onda di 370 nm**

I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti in assenza di matrice. I risultati del test statistico del parallelismo applicato alle 4 rette di regressione indicano che le rette non sono significativamente diverse ( $t_{calcolato} < t_{Student}$ ) sia per il coefficiente angolare che per la posizione, confermando l'assenza di effetto matrice a tutte le concentrazioni di OTA saggiate (Figura 2). Inoltre, le prove di stabilità a diversi tempi di incubazione (0-30 min) indicano che il complesso di coordinazione aptamero/terbio/OTA è stabile nell'intervallo di tempo provato, rendendo tale metodo idoneo all'analisi parallela di numerosi campioni di frumento mediante l'uso di un lettore di piastre multipozzetto per la rivelazione finale della micotossina.

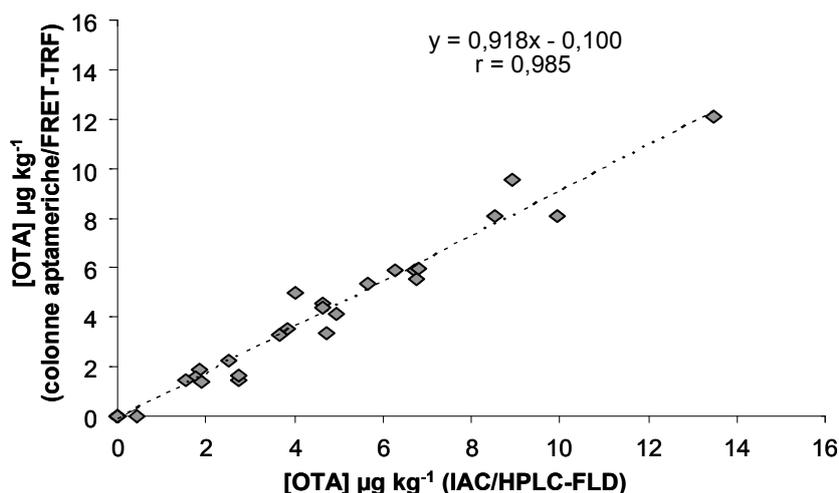


**Figura 2. Rette di regressione ottenute analizzando mediante spettroscopia FRET-TRF diverse soluzioni calibranti di OTA in presenza di quantità di matrice crescenti**

La precisione del sistema diagnostico aptamerico è stata valutata mediante prove di recupero condotte a 6 differenti livelli di concentrazione compresi tra 2,5 e 25,0 µg/kg di OTA (n. 3 repliche per livello), mentre il metodo di riferimento LC/FLD è stato usato, per confronto, a 3 livelli di concentrazione compresi tra 2,5 e 7,5 µg/kg (n. 3 repliche per livello). I recuperi medi ottenuti per il metodo proposto sono risultati compresi tra 72% e 81% con deviazioni standard minori del 7%. I recuperi medi ottenuti per il metodo LC/FLD sono risultati compresi tra 82% e 91%, con deviazioni standard minori del 3%. I valori di recupero e di ripetibilità di entrambi i metodi rispettano i criteri stabiliti dalla Commissione Europea per l'accettabilità di un metodo analitico per la determinazione di OTA (10). Il limite di quantificazione (calcolato come la media di 10 analisi ripetute di un campione di frumento privo di OTA più 10 volte la deviazione standard del segnale medio) del sistema diagnostico aptamerico è risultato pari a 0,5 µg/kg di OTA, mentre il quello del metodo di riferimento pari a 0,3 µg/kg.

L'affidabilità del sistema diagnostico aptamerico è stata valutata mediante l'analisi di un materiale di controllo di frumento duro (BRM 003023) naturalmente contaminato con 8,6 µg/kg di OTA (incertezza estesa  $\pm 3,6$  µg/kg) e di un materiale FAPAS con valore teorico di 2,10 µg/kg di OTA (intervallo di accettabilità 1,18-3,03 µg/kg). I livelli medi misurati, ovvero  $5,89 \pm 0,12$  µg/kg di OTA per il materiale BRM e  $1,45 \pm 0,03$  µg/kg di OTA per il materiale FAPAS, erano entrambi all'interno dei limiti di accettabilità dei materiali utilizzati, indicando buone caratteristiche di affidabilità del metodo proposto.

Il sistema diagnostico aptamerico è stato applicato all'analisi di 29 campioni di frumento duro non trasformato naturalmente contaminati da OTA di differenti varietà e annate agrarie e provenienti da diverse regioni italiane e canadesi. L'OTA era presente in 24/29 campioni di frumento a livelli compresi tra 0,5 µg/kg (limite di quantificazione) e circa 14 µg/kg. Al fine di confermare i risultati ottenuti, l'estratto filtrato è stato analizzato parallelamente con un metodo di riferimento comunemente utilizzato per la determinazione quantitativa di OTA nel frumento e basato su rivelazione mediante LC/FLD previa purificazione su colonnine ad immunoaffinità. L'analisi con il sistema diagnostico aptamerico non ha mostrato la presenza di campioni falsi-positivi, mentre un solo campione con un livello di contaminazione inferiore al limite di quantificazione del metodo proposto (0,4 µg/kg) è risultato positivo (0,4 µg/kg) quando analizzato con il metodo di riferimento. L'analisi comparativa ha tuttavia indicato una buona correlazione (coefficiente di correlazione  $r > 0,918$ ) tra le due metodiche analitiche messe a confronto (Figura 3).



**Figura 3. Correlazione dei valori di ocratossina A (OTA) ottenuti mediante analisi FRET-TRF e metodo di riferimento LC/FLD in campioni di frumento naturalmente contaminati**

## Conclusioni

Il sistema diagnostico aptamerico basato sulla spettroscopia FRET-TRF previa purificazione su colonnine aptameriche per la determinazione di OTA in campioni di frumento ha mostrato buone prestazioni analitiche in termini di precisione e recupero. I valori di recupero e di ripetibilità rispettavano i criteri stabiliti dal Commissione Europea per l'accettabilità di un metodo analitico per la determinazione di OTA.

L'analisi comparativa di campioni di frumento naturalmente contaminati con OTA ha mostrato una buona correlazione tra il metodo proposto e quello di riferimento che impiega colonnine ad immunoaffinità e separazione mediante LC/FLD. Inoltre, i tempi ridotti di analisi e l'uso di un lettore di piastre multipozzetto per la rivelazione finale della micotossina rendono tale sistema diagnostico aptamerico idoneo all'analisi parallela di numerosi campioni di frumento.

I risultati ottenuti dimostrano che gli aptameri rappresentano una valida alternativa all'utilizzo degli anticorpi per l'analisi delle micotossine in prodotti alimentari.

## Bibliografia

1. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *Evaluation of certain mycotoxins in food, Fifty-sixth report*. Geneva: WHO; 2002. (WHO Technical Report Series No 906, 16-26).
2. Opinion of the scientific panel on contaminants in food chain on a request from the Commission related to ochratoxin A (OTA) as undesirable substance in animal feed. *The EFSA Journal* 2004;101:1-36.
3. International Agency for Research on Cancer. Ochratoxin A. In: *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxin*. Vol. 56. Lyon, France:IARC; 1993. p. 489-521.
4. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the Commission related to ochratoxin A in food. *The EFSA Journal* 2006;365:1-56.
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, 20 dicembre 2006.
6. Europa. Regolamento (UE) n. 105/2010 della Commissione del 5 febbraio 2010 recante modifica del regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari, per quanto riguarda l'ocratossina A. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 35, 6 febbraio 2010.
7. Cruz-Aguado JA, Penner G. Determination of ochratoxin A with a DNA aptamer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008;56:10456-61.
8. McKeague M, Bradley CR, De Girolamo A, Visconti A, Miller JD, DeRosa MC. Screening and Initial binding assessment of fumonisin B<sub>1</sub> aptamers. *International Journal of Molecular Sciences* 2010; 11:4864-81.
9. De Girolamo A, McKeague M, Miller JD, DeRosa MC, Visconti A. Determination of ochratoxin A in wheat after clean-up through a DNA aptamer-based solid phase extraction column. *Food Chemistry* 2011;127:1378-84.
10. 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 delle Comunità Europee* L70, 9 marzo 2006.
11. De Girolamo A, Le L, Penner G, Schena R, Visconti A. Analytical performances of a DNA-ligand system using time-resolved fluorescence for the determination of ochratoxin A in wheat. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2012;403:2627-34.

# CONTROLLI UFFICIALI DI MICOTOSSINE NEL GRANO DI PROVENIENZA COMUNITARIA ED EXTRACOMUNITARIA IN ENTRATA NEI PORTI PUGLIESI

Rita De Pace, Cinzia Franchino, Valeria Vita

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

## Introduzione

In questi ultimi anni, è stata posta sempre maggiore attenzione ai temi riguardanti la sicurezza alimentare e la salubrità delle derrate alimentari. I cereali rappresentano una delle matrici a più alto rischio di contaminazione da micotossine. A tale riguardo assume una particolare importanza la prevenzione del rischio di contaminazione da micotossine, metaboliti secondari tossici prodotti da miceti che si sviluppano sugli alimenti. Nell'uomo le micotossine determinano possibili effetti immunodepressivi, organotossici, teratogeni, cancerogeni (Caloni & Nebbia, 2009).

Dai dati forniti dalla *Food and Agriculture Organization* (FAO) risulta che circa il 25% dei raccolti di tutto il mondo risulta essere contaminato, con una ricaduta economica negativa che è stata valutata dell'ordine di molti miliardi di dollari. Negli Stati Uniti la perdita annuale dovuta a derrate contaminate supera i 400 milioni di dollari. Le micotossine identificate attualmente sono più di 300, i principali miceti produttori di micotossine appartengono ai generi, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* la cui tossinogenesi è favorita da idonea umidità (<70%) e temperatura (20-25°C), infestazioni di insetti, pratiche colturali inadeguate e scorrette pratiche di conservazione, in post raccolta e durante il trasporto e lo stoccaggio (D'Egidio & Desiderio, 2006). L'infezione delle piante da parte di funghi patogeni durante la coltivazione può comportare la permanenza dei funghi stessi (e/o delle micotossine da essi prodotte) non solo nella materia prima tal quale (cariossidi) ma anche nei sottoprodotti e prodotti finiti (sfarinati, mangimi, pane e pasta) (Bognani *et al.*, 2007). Tra le possibili soluzioni tecnologiche rivolte all'abbattimento della carica dei miceti dalla superficie delle cariossidi si annovera la decorticazione pre-macinazione (Ranieri, 2011).

Si è dimostrato che il trattamento di decorticazione pre-macinazione determina un significativo abbattimento della Carica Batterica Totale (CBT) dei lieviti e in particolare delle muffe e quindi delle micotossine che vengono ridotte di un ciclo logaritmico già con un livello di decorticazione del 2,5%.

La produzione nazionale di grano duro (circa 4 milioni di tonnellate) non riesce a soddisfare le richieste dell'industria di trasformazione, quindi ogni anno si importano quantità di cereale che mediamente oscillano tra 1 e 2.3 milioni di tonnellate.

L'importazione di grano duro è quindi molto consistente e probabilmente lo sarà ancora di più vista la tendenza alla contrazione delle superfici coltivate osservata negli ultimi anni. Scopo del lavoro è stato di verificare lo stato igienico sanitario del grano importato durante gli anni 2010, 2011 e inizio 2012.

## Materiali e metodi

### Prelievo dei campioni e macinazione

Il grano nelle stive delle navi o su camion è prelevato da personale tecnico degli Uffici di Sanità Marittima Aerea e di Frontiera (USMAF) secondo le procedure stabilite dal Regolamento (CE) 401/2006. Utilizzando, preferibilmente, il campionamento dinamico, si preleva, in tempi diversi, la massa del campione in movimento, utilizzando nastri trasportatori o campionatori automatici. Questa procedura garantisce una maggiore omogeneità delle micotossine nel campione, poiché, generalmente, queste si distribuiscono a macchia di leopardo. Il campione globale di 30 kg, mescolato e suddiviso in 3 campioni di laboratorio del peso di 10 kg, sigillati da piombini e accompagnati dal verbale di prelievo, sono consegnati all'Istituto Zooprofilattico di Foggia, che provvede alla macinazione e omogeneizzazione con un Mulino Romer Series II<sup>TM</sup> Mil Manual.

### Estrazione e quantificazione delle micotossine

Per la fase di estrazione delle micotossine dai campioni di grano, abbiamo utilizzato le procedure indicate dalle ditte produttrici dei kit immunoenzimatici. Per aflatoxina B1 è stato scelto il kit della ditta Tecna cod. MA314. Lo stesso criterio è stato utilizzato per la scelta dei kit della ditta R-Biopharm per la determinazione del deossivalenolo (DON) (codice 5906), ocratossina A (OTA) (codice R1311) e zearalenone (ZEA) (codice R1401).

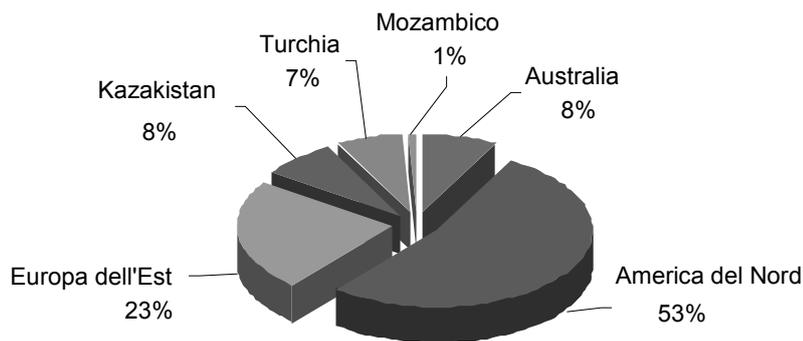
I kit immunoenzimatici sono accreditati ai sensi UNI CEI EN ISO/IEC/17025, in ottemperanza all'art. 12 del Regolamento (CE) 882/2004, la Decisione 2002/657/CE e il Regolamento (CE) 401/2006. I kit sono controllati periodicamente attraverso carte di controllo e circuiti interlaboratorio organizzati da *Food Analysis Performance Assessment Scheme* (FAPAS) e Associazione Italiana Allevatori (AIA).

### Analisi statistica

I parametri considerati nella validazione delle micotossine (Decisione 2002/657/CE), sono: specificità, verifica dell'errore  $\beta$ , precisione, robustezza. Sono stati 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 (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) sono stati confermati con metodo cromatografico HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) riscontrando concentrazioni di micotossine sovrapponibili (De Pace *et al.*, 2010).

## Risultati

In Figura 1 sono riportate le provenienze della merce importata negli anni 2010-2012 (125 campioni di grano duro e tenero): in accordo con una indagine svolta nel 1988 da Fares *et al.* (1999), abbiamo osservato che il paese extracomunitario da cui si importa la maggior parte della merce è ancora l'America del Nord (53%) seguita dall'Europa dell'Est (23%), Kazakistan (8%), Turchia (7%), Australia (8%) e Mozambico (1%).



**Figura 1. Campioni di grano duro e tenero importato da Paesi comunitari ed extracomunitari negli anni 2010-2012**

In questi anni dalle analisi eseguite su 125 campioni di grano duro e tenero importati dai paesi sopraelencati, come si evince dalla Tabella 1, abbiamo riscontrato che 119 campioni, pari al 95%, sono compresi nei Regolamenti (CE) 1881/2006 e Regolamento (CE) 1126/2007, nei quali i livelli massimi accettabili per le micotossine sono: aflatossina B1 2,0 µg/kg per tutti i cereali; OTA 5,0 µg/kg in cereali non trasformati; DON 1750 µg/kg e ZEA 100 µg/kg per grano duro non processato.

**Tabella 1. Concentrazioni medie di micotossine (µg/kg) in 119 campioni di grano esaminati (2011-2012)**

Anno	Aflatossina B1 (2 µg/kg)*	DON (1750 µg/kg)**	ZEA (100 µg/kg) **	OTA (5 µg/kg)*
2010	1,93	1240	58,81	3,60
2011	1,88	1,24	22,03	3,94
2012	1,31	0,20	57,93	3,76
<i>Limite di rilevanza dei kit (µg/kg)</i>	0,5	0,09	0,03	1,25

\* limite massimo tollerabile secondo il Reg. 1881/2006

\*\* limite massimo tollerabile secondo il Reg. 1126/2007

Solo 6 campioni, 5%, sono risultati positivi alle micotossine. In Figura 2, si visualizza che abbiamo trovato una positività alla aflatossina B1, pari al 2% in campioni di grano duro proveniente dalla Turchia e Moldavia (3 campioni positivi), al DON del 1%, in un campione positivo di grano tenero proveniente dalla Croazia (1 campione positivo) e all'OTA del 2% in campioni di grano duro provenienti dal Canada (2 campioni positivi). I dati ottenuti rispecchiano abbastanza fedelmente l'andamento climatico verificatosi in questi anni nelle zone da cui provengono i campioni contaminati. Nel Nord America, infatti, il clima è stato piuttosto favorevole come attestano anche i dati sulle produzioni, mentre il Nord Est Europa è stato penalizzato da frequenti piogge e temperature altalenanti che hanno favorito l'attacco dei miceti con conseguenti contaminazioni da micotossine.

I risultati riportati nel nostro lavoro, inoltre, hanno evidenziato concentrazioni di micotossine più basse rispetto a quelli riscontrate in Italia nella campagna cerealicola 2010-2011 eseguite sulle prove nazionali dal Consiglio per la Ricerca in Agricoltura. L'annata 2010 in Italia, infatti, è stata caratterizzata da frequenti piogge e temperature variabili che hanno favorito l'attacco della spiga da parte di miceti e quindi da micotossine soprattutto al Nord.

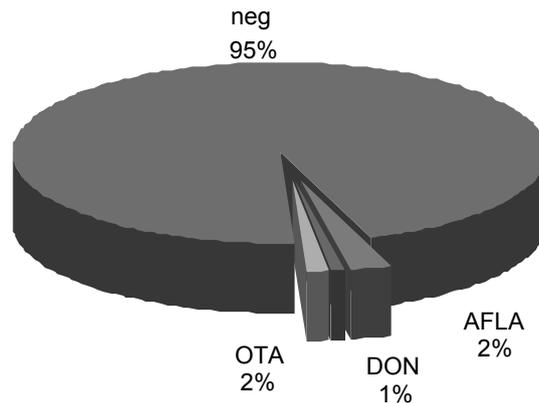


Figura 2. Campioni di grano positivi alle micotossine negli anni 2010-2012

## Discussione

Il controllo di prodotti all'importazione è strettamente legato ad aspetti economici, perciò in questi anni, è stato osservato un calo dei quantitativi di cereali in ingresso nei porti di Bari e Manfredonia e conseguentemente del numero di campioni analizzati. In particolare, la recente crisi mondiale ha avuto pesanti ripercussioni su queste attività.

Osservando le concentrazioni delle micotossine, emerge un dato importante cioè che la maggior parte dei campioni, 95%, rientra nei range indicati dai Regolamenti (CE) 1881/2006 e 1126/2007, anche se in alcuni di questi campioni abbiamo riscontrato concentrazioni molto vicine ai limiti dei Regolamenti. Solo il 5% dei campioni, inoltre, è risultato positivo alle micotossine, quindi una percentuale molto bassa. Considerando che i grani esaminati sono materie prime sottoposte ad ulteriori trattamenti fisici come la decorticazione e la stessa macinazione che determinano un notevole abbattimento di eventuali residui di micotossine, possiamo considerare che i dati analitici riscontrati, sono abbastanza confortanti. Tuttavia è importante continuare l'attività di sorveglianza in maniera continua e costante per garantire la salvaguardia della salute dei consumatori da eventuali rischi di contaminazione di micotossine negli alimenti.

## Bibliografia

- Bognani R, Lo Bianco M, Sainbene G, Gallo G. Micotossine nella granella di frumento duro. Sanità produzione siciliane. *Tecnica Molitoria* 2007;8:865-74.
- Caloni F, Nebbia C. Micotossine. In: Nebbia C (Ed.). *Residui di farmaci e contaminazioni ambientali nelle produzioni animali*. Napoli: Edises Editore; 2009. p. 453-480.
- D'Egidio MG, Desiderio E. Qualità e sicurezza nel grano duro. *L'Informatore Agrario* 2006;Suppl.12:9-11.
- De Pace R, Vita V. Validazione secondo la Decisione 657/2002/CE di un metodo di screening in immunoenzimatica per la determinazione di Zearalenone nell'alimentazione umana. In: Brera C, Gregori E, De Santis B, Miraglia M (Ed.). *3° Congresso nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare e zootecnica. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 28-30 settembre 2009. Atti*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2010. (Rapporti ISTISAN 10/32). p. 189-92.

- Europa. Decisione della Commissione del 12 agosto 2002 che attua la direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati (2002/657/CE). *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee* L221/8, 17 agosto 2002.
- 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 granturco e nei prodotti a base di granturco. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee* L 255/14, 29 settembre 2007.
- 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, 20 dicembre 2006.
- 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, 9 marzo 2006.
- 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 delle Comunità Europee* L165/1, 30 aprile 2004.
- Fares C, Mambelli P, Platani C, Nigro F, Maddalena V, Schiavone MG, Di Fonzo N, De Monte F, Padalino O. Indagine sulla qualità tecnologica e residui di pesticidi su grano duro estero in arrivo al porto di Manfredonia nel 1988. *Tecnica Molitoria* 1999;10:1085-90.
- Ranieri R. La decorticazione nel grano duro in Italia. *Molini d'Italia* 2012;2:47-61.

# SVILUPPO E APPLICAZIONE DI UN METODO ELISA PER L'ANALISI DI OCRATOSSINA A IN CAMPIONI DI MANGIME

Rita De Pace, Cinzia Franchino C, Valeria Vita

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

## Introduzione

Le ocratossine sono micotossine prodotte da miceti appartenenti ai generi *Aspergillus* e *Penicillium*. L'ocratossina A, che è la più importante dal punto di vista tossicologico, è nefrotossica, teratogena, immunosoppressiva, ed è classificata come cancerogeno di gruppo 2B, cioè sostanza sicuramente cancerogena per gli animali e possibilmente anche per l'uomo (1).

Gli alimenti maggiormente esposti alla contaminazione sono: cereali, frutta secca, legumi, spezie, caffè, cacao, formaggio e insaccati (2).

L'effetto nefrotossico è stato dimostrato in tutti i mammiferi. Questa tossina può provocare danni all'intero organismo, essendo capace di legarsi alle siero-albumine del sangue: tale interazione è responsabile della diffusione sistemica della stessa. Nefropatie spontanee indotte da ocratossine negli animali da allevamento sono state accertate in molti paesi. Tra queste le più comuni sono le nefropatie aviarie e suine.

Da studi effettuati in Danimarca e Svezia si è evidenziato come il 30% circa dei reni di suini affetti da tali patologie avevano residui di ocratossina A.

Notevoli sono le perdite economiche negli animali da produzione connesse non solo all'azione nefrotossica, ma anche all'intenso effetto immunosoppressivo che si evidenzia nella specie suina in seguito ad esposizioni a lungo termine (3).

Le perdite ingenti sono, peraltro, da attribuirsi non solo alla immunodepressione ma anche alla lunga emivita biologica della micotossina e al frequente riscontro, alla macellazione, di alte quote residuali nelle carni destinate al consumo umano, la qual cosa comporta la distruzione della carcassa.

Le uniche possibilità di contenimento per limitare l'esposizione della popolazione e degli animali alle ocratossine entro una dose tollerabile sono: l'attuazione delle più corrette pratiche agricole e di stoccaggio, un adeguato autocontrollo di tutte le fasi della filiera, la selezione rigorosa di tutte le materie prime impiegate.

Sulla base delle disposizioni indicate nel Regolamento (CE) 882/2004 (4) e a seguito della fissazione di limiti massimi ammissibili, secondo quanto stabilito dalla Raccomandazione della Commissione 2006/576/CE del 17 agosto 2006 (5), si rende oggi necessario disporre di metodi di controllo validati per la determinazione di residui nei prodotti destinati all'alimentazione zootecnica da utilizzarsi nell'ambito dei controlli ufficiali.

## Materiali e metodi

### Campionamento

I campioni di mangimi, oggetto del nostro studio di validazione, sono stati campionati dalle Unità Sanitarie Locali come prescritto dal Regolamento (CE) 152/2009 (6). Dall'aliquota globale prelevata sono state formate, dopo opportuna macinazione-omogenizzazione, le aliquote finali da lavorare mentre le altre aliquote sono conservate a disposizione delle autorità competenti.

### Preparazione del campione

Nella preparazione dei campioni è necessario procedere come segue:

- pesare 2 g di campione;
- aggiungere HCl 1N e agitare per 5 minuti;
- aggiungere diclorometano e agitare energicamente per 15 minuti in posizione orizzontale;
- centrifugare per 15 minuti a 3500 giri;
- eliminare lo strato acquoso superiore;
- filtrare con carta bibula lo strato di diclorometano che si forma sotto la parte solida;
- aggiungere al filtrato una uguale quantità di NaHCO<sub>3</sub> 0,13M pH 8,1 e agitare per 15 minuti;
- centrifugare a 3500 giri per 15 minuti;
- diluire (1:5) la fase prelevata con NaHCO<sub>3</sub> 0,13 M;
- diluire ulteriormente 1:10 con NaHCO<sub>3</sub>. Fattore di diluizione finale: 250.

### Procedura analitica

Le analisi sono state effettuate in doppio per ogni singolo campione utilizzando un metodo immunoenzimatico (ELISA, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) e nello specifico un kit della R-Biopharm.

Le specifiche del kit sono:

- LoQ = 50 ng/kg.
- Cross-reattività: ocratossina A 100%;
- Soluzioni standard: 0,50,100,300,900,1800 ng/kg;

Il recupero medio ottenuto durante le prove di validazione è stato del 106,5%.

Le caratteristiche di efficienza del metodo sono state:

- specificità e verifica dell'errore  $\beta$ ;
- robustezza;
- precisione.

## Risultati e discussione

Le prove per la verifica della specificità e dell'errore  $\beta$  (<5%) sono state condotte parallelamente, infatti, a ciascun bianco-campione è stato associato il suo fortificato al livello di interesse nella stessa seduta analitica.

Pertanto, sono stati testati 20 bianchi-campione rappresentativi e i relativi fortificati con ocratossina A a 0,25 ppm. Dato l'elevato numero di prove sono state eseguite 2 sedute analitiche (Tabella 1).

Tabella 1. Prove per la verifica della specificità e dell'errore  $\beta$  (<5%)

N. campione	Tipo campione	B/Bo (%) Bianco	B/Bo (%) Fortificato
<b>Prima seduta analitica</b>			
1	Avena	94,4	25,7
2	Avena	89,7	24,5
3	Grano duro	95,4	19,1
4	Grano duro	92,1	20,1
5	Orzo	91,9	27,2
6	Orzo	91,7	25,4
7	Mais	90,4	20,7
8	Mais	90,1	18,0
9	Mais	85,20	20,30
10	Mais	86,40	19,80
Media		90,73	22,08
Deviazione standard		6,04	1,05
Varianza		36,48	1,102
<b>Seconda seduta analitica</b>			
11	Mais	87,00	20,20
12	Mais	92,90	20,20
13	Orzo	92,90	27,50
14	Avena	90,90	24,70
15	Grano tenero	96,10	19,40
16	Grano tenero	90,60	18,10
17	Mais	85,70	20,70
18	Orzo	92,20	25,60
19	Mais	91,00	20,90
20	Avena	96,2	25,8
Media		91,55	22,31
Deviazione standard		3,38	3,25
Varianza		11,424	10,56

### Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state condotte con un programma computerizzato calcolando la varianza (ANOVA test), il test di Fisher, il test di Student.

Le variabili sono state modificate utilizzando piani sperimentali secondo la procedura elaborata da Youden. Il metodo è risultato robusto per i parametri: preparazione del campione, apertura kit, filtrazione campioni, temperatura kit, tempo di agitazione manuale e tempo di centrifugazione.

La precisione è stata eseguita su due livelli di fortificazione: 0,05-0,25 mg/kg (Tabella 2).

Tabella 2. Precisione delle misure effettuate sui campioni fortificati

Parametro	0,05 mg/kg	0,25 mg/kg
Valore medio mg/kg	0,051	0,27
Scarto tipo %	0,002	0,016
Recupero %	103,3	109,8

## Discussione

Il metodo validato (7) è risultato idoneo allo scopo della ricerca di ocratossina A in campioni di mangimi destinati all'alimentazione zootecnica ed è stato recentemente accreditato da Accredia. Il metodo viene costantemente verificato, sia mediante la costruzione semestrale di carte di controllo, sia mediante la partecipazione a ring test organizzati dalla FAPAS (*Food and Environment Research Agency*) e AIA (Associazione Italiana Allevatori). Dalle analisi finora effettuate su matrici di cereali non trasformati, prelevati in maniera ufficiale dagli organi competenti (PIF, ASL), non si segnalano alti livelli di contaminazione. Tuttavia considerando che è l'effetto cronico, ovvero l'accumulo nel tempo di piccole quantità di micotossine, il più grave rischio derivante da mangimi contaminati, non bisogna abbassare il livello di vigilanza messo in atto, sia applicando i più rigorosi standard di verifica che monitorando nel tempo la prestazione del metodo per fornire dichiarazioni di conformità affidabili e accettate a livello internazionale.

## Bibliografia

1. World Health Organization; IARC Working Group. Ochratoxin A. In: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks Humans Vol. 56*. International Agency for Research on Cancer; 1993. p. 489-521.
2. Battilani P, Pietri A, Piva G. Micotossine, dal campo alla tavola. *L'Informatore Agrario* 2005 (Suppl.1); 7-11.
3. Hult K, Hokby E, Gatenbeck S, Rutqvist L. Ochratoxin A in pig blood: method of analysis and use as a tool for feed studies. *Appl Environ Microbiol* 1979;38:772-6.
4. 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* L 165, 30 aprile 2004.
5. Europa. Raccomandazione della Commissione del 17 agosto 2006 sulla presenza di deossivalenolo, 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, 28 agosto 2006.
6. Europa. Regolamento (CE) n. 152/2009 della commissione del 27 gennaio 2009 che fissa i metodi di campionamento e d'analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 54/1, 26 febbraio 2009
7. Desimoni E, Brunetti B. *Assicurazione di qualità nel laboratorio chimico. Validazione dei metodi di analisi*. Bologna: Clueb; 2003.

# LIVELLI ACCRESCIUTI DEI CONTROLLI UFFICIALI SUI PRODOTTI DI IMPORTAZIONE

Carlo Donati

*Direzione Generale per l'Igiene e la Sicurezza degli Alimenti e la Nutrizione, Dipartimento della Sanità Pubblica Veterinaria, della Sicurezza Alimentare e degli Organi Collegiali per la Tutela della Salute, Ministero della Salute, Roma*

## Introduzione

Le micotossine accompagnano da sempre la storia alimentare dell'uomo, e certamente ne hanno condizionato lo stato di salute fin dai tempi più antichi: tuttavia, solo da qualche decennio si è riconosciuta la loro effettiva pericolosità. Di conseguenza, la Commissione Europea e le Autorità sanitarie competenti hanno definito regole sempre più stringenti per il controllo ufficiale degli alimenti, dedicando un'attenzione sempre maggiore a queste sostanze, notoriamente dotate di un'elevata attività tossica, anche se tuttora mancano sufficienti evidenze epidemiologiche nell'uomo.

## Allerta rapido europeo

Il meccanismo delle comunicazioni rapide (ovvero allerta rapido RASFF dall'inglese *Rapid Alert System for Food and Feed*) (sempre più numerose negli ultimi anni) è uno strumento essenziale per la valutazione di eventuali rischi e per la tutela del consumatore. Per notificare in tempo reale i rischi diretti o indiretti per la salute pubblica connessi al consumo di alimenti o mangimi è stato istituito il sistema rapido di allerta comunitario, sotto forma di rete, a cui partecipano la Commissione Europea, l'EFSA (*European Food Safety Authority* – Autorità europea per la sicurezza alimentare) e gli Stati membri dell'Unione.

Il sistema di allerta comunitario trova il fondamento giuridico nella Direttiva 92/59/CEE del Consiglio europeo, recepita col decreto legislativo 115/95, relativa alla sicurezza generale dei prodotti, e nel Regolamento (CE) 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio, 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.

Il flusso delle "allerte" deve garantire sia la completezza delle informazioni che la tempestività della comunicazione. Le notifiche vengono comunicate e condivise tra gli Stati membri via rete, in tempo reale, e l'attività del sistema di allerta prevede il ritiro di prodotti pericolosi per la salute umana o animale. Ogni anno viene pubblicata una relazione annuale relativa ai dati dell'Unione Europea.

Considerando la "Relazione sul sistema di allerta comunitario" contenente i dati del 2011 (1), con particolare attenzione alle micotossine negli alimenti destinati al consumo umano, si osserva che esse costituiscono i contaminanti chimici più frequentemente notificati attraverso il RASFF, anche se in diminuzione rispetto alle segnalazioni dell'anno precedente. La maggior parte delle notifiche sulle micotossine si riferisce alle aflatoossine (92%), seguite da ocratossina A, deossinivalenolo e fumonisine.

Negli alimenti quali *frutta secca e snack*, le segnalazioni pervenute a livello europeo sono state 633, in calo rispetto alle 652 del 2010, quasi tutte da respingimenti al confine di frutta secca contenente micotossine (389), soprattutto aflatossine (381). Dei 633 prodotti notificati, 159 provenivano dalla Turchia, 101 dalla Cina, 74 dall'Ucraina, 49 dall'India e 45 dall'Iran (seguono altri Paesi con un minor numero di notifiche).

Su *cereali e derivati* sono state trasmesse 173 notifiche, di cui 32 per la presenza di micotossine (12 per aflatossine). L'origine dei prodotti segnalati è varia, ma il maggior numero di notifiche riguarda la Cina (70), seguita da Germania (10), Gran Bretagna (9) e Italia (9).

Inoltre, complessivamente, si sono avute 303 segnalazioni di irregolarità per *erbe e spezie*, in notevole aumento rispetto alle 234 del 2010, che hanno coinvolto diverse tipologie di rischio sanitario, con prevalenza di contaminazioni microbiologiche (159, delle quali 141 per Salmonella), contaminazioni da micotossine (69, 55 per aflatossine e 14 per ocratossina A) seguite da residui di pesticidi (38) e coloranti (14). L'origine dei prodotti è varia, ma il Paese col maggior numero di notifiche è l'India (76, delle quali 41 per aflatossine), seguita dal Bangladesh (72, tutte per Salmonella in foglie di paan) e Vietnam (35).

Come si è detto, il respingimento spesso avviene al confine: l'Italia esegue i controlli ufficiali sugli alimenti di origine non animale provenienti da Paesi terzi attraverso gli Uffici di Sanità Marittima, Aerea e di Frontiera (USMAF) del Ministero della Salute.

## Attività degli USMAF

L'incremento globale del flusso delle merci ha fatto sì che l'attività di controllo sugli alimenti di origine non animale e sui materiali a contatto eseguita dagli USMAF si sia accresciuta in pochi anni, da una semplice "vigilanza" sull'importazione di merci destinate all'alimentazione umana (2), fino a costituire una parte attiva e considerevole dell'attività di questi Uffici periferici, con una vera e propria funzione di tutela della salute dei cittadini italiani ed europei.

Queste attività si svolgono in ottemperanza a norme nazionali e a Regolamenti europei, e questo fa sì che il sistema italiano dei controlli in frontiera (praticamente unico in Europa, dal momento che la maggioranza degli Stati Membri ha preferito i controlli sul territorio, dopo lo sdoganamento della merce) costituisca un efficace filtro all'ingresso per merci provenienti da Paesi terzi. Ciò è di rilevante interesse soprattutto alla luce della recente entrata in vigore di Regolamenti europei che prevedono proprio condizioni particolari o livelli accresciuti di controlli ufficiali (con Punti di Entrata Designati) per le importazioni di alcuni alimenti di origine non animale.

Il Regolamento (CE) 882/2004 (3) (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) ha dettato regole precise per tutti gli Stati Membri con lo scopo di armonizzare l'esecuzione dei controlli, fornendo indicazioni, tra l'altro, su: designazione delle autorità competenti, formazione del personale, necessità di procedure operative, attività, metodi e tecniche di controllo, metodi di campionamento e di analisi e laboratori ufficiali, eventuali piani di emergenza, rinvio di partite, tasse o diritti a copertura dei costi sostenuti per i controlli ufficiali.

Alcune importanti norme nazionali sono derivate da questo Regolamento. Basti ricordare, ad esempio, il DL.vo 193 del 6 novembre 2007 che definisce le autorità competenti (4), o il DL.vo 194 del 19 novembre 2008, che disciplina le modalità di rifinanziamento dei controlli sanitari ufficiali (5).

Più recentemente, in applicazione dell'articolo 15.5 del Regolamento (CE) 882/2004, sono stati pubblicati anche nuovi Regolamenti europei che riguardano i mangimi e gli alimenti di

origine non animale che, sulla base dei rischi noti o emergenti, devono essere oggetto di un livello accresciuto di controlli ufficiali nel punto di entrata negli Stati Membri oppure che stabiliscono condizioni particolari per l'importazione di determinati prodotti alimentari e il loro campionamento (6-13).

L'attività degli USMAF consente il controllo di alimenti e materiali a contatto prima che siano nazionalizzati e distribuiti sul territorio, garantendo una rilevante attività di filtro e permettendo così, in caso di non conformità, il respingimento in blocco della partita, prima che venga suddivisa e possa raggiungere i consumatori italiani ed europei. In tal modo, si evita di avviare le procedure di controllo e di ritiro dal commercio sul territorio, con notevole risparmio economico e di risorse umane.

Gli USMAF sono suddivisi in 12 Uffici di livello dirigenziale non generale e 37 Unità Territoriali, distribuiti omogeneamente sul territorio nazionale nei principali porti e aeroporti.

In sintesi, il controllo ufficiale alle frontiere italiane prevede che, dopo l'esame documentale, che viene eseguito sul 100% delle partite in arrivo, nei casi previsti dai Regolamenti vigenti e in quelli in cui, a giudizio del Dirigente Medico dell'USMAF, la sicurezza non sia garantita, si proceda ad un ulteriore approfondimento, con controllo ispettivo della merce e, quando necessario, con prelievo di campioni, che vengono inviati ad un laboratorio di analisi pubblico accreditato. In caso favorevole, il Dirigente Medico emette, firmandolo, il Documento Comune di Entrata, con il quale è consentito l'ingresso degli alimenti (o materiali a contatto) nel territorio nazionale; in caso di controllo non superato, la merce, a scelta del destinatario, può essere rispedita al mittente, distrutta, oppure può essere concesso un Nulla Osta con una variazione di utilizzo della stessa (per uso non alimentare).

La Tabella 1 indica i principali USMAF per volumi di traffico di alimenti di origine non animale provenienti da Paesi terzi.

**Tabella 1. Elenco delle prime 20 Unità Territoriali USMAF per volumi di traffico di alimenti di origine non animale provenienti da Paesi terzi (dati riferiti al 2011)**

<b>Unità Territoriali USMAF</b>	<b>Partite di alimenti di origine non animale provenienti da Paesi terzi (n.)</b>
Genova	19326
Trieste	14878
Milano Malpensa	11947
Livorno	6314
Napoli	5966
Savona	5198
Salerno	3599
La Spezia	3140
Ravenna	2504
Reggio Calabria	2364
Torino Caselle	2168
Venezia	2131
Fiumicino	1685
Civitavecchia	909
Palermo	813
Bari	429
Ancona	263
Imperia	223
Siracusa	192
Bergamo / Orio al Serio	181

Nel 2011, gli USMAF hanno eseguito controlli ufficiali documentali su 84.810 partite di alimenti di origine non animale, controlli di identità su 7.771 partite (9,2%) e controlli con campionamento e analisi su 4.796 partite (5,7%). I respingimenti sono stati nell'ordine dello 0,2%.

La Tabella 2 indica i principali Paesi terzi di origine delle importazioni di alimenti di origine non animale e il relativo numero di partite. La Tabella 3 rappresenta invece i principali alimenti di origine non animale importati nel 2011 da Paesi terzi.

**Tabella 2. Principali Paesi terzi di origine delle importazioni di alimenti di origine non animale per numero di partite presentate all'importazione (dati riferiti al 2011)**

Paesi terzi di origine delle importazioni	Partite presentate all'importazione (n.)
Turchia	8993
Cina	8085
Svizzera	4963
India	4876
Stati Uniti	4225
Brasile	4177
Egitto	3981
Argentina	3287
Tunisia	3052
Cile	2701
Israele	2696
Vietnam	2455
Costa Rica	1983
Tailandia	1945
Ecuador	1558
Perù	1446
Sud Africa	1338
Marocco	1205
Sri Lanka	1175
Indonesia	1086

**Tabella 3. Principali alimenti di origine non animale importati da Paesi terzi per numero di partite presentate all'importazione ((dati riferiti al 2011)**

Principali alimenti importati	Partite presentate all'importazione (n.)
Caffè crudo in grani	12973
Nocciole sgusciate	5483
Fichi secchi	4049
Funghi porcini freschi	3952
Nocciole tostate	3334
Fagioli	2911
Limoni	2575
Banane	2433
Macedonia di frutta fresca	1858
Carciofi in salamoia	1727
Erbe aromatiche	1715
Funghi porcini congelati	1699
Preparazioni alimentari	1591
Pere	1552
Fruttosio	1483
Zucchero bianco cristallino	1380
Pasta sfoglia	1367
Funghi porcini secchi	1257
Uva sultanina	1257
Arachidi in guscio	1227

In totale, sono stati effettuati 180 respingimenti e sono state eseguite 59 analisi di laboratorio per la ricerca di aflatossine. Venti partite sono state respinte per irregolarità di natura documentale, 34 per irregolarità emerse ai controlli ispettivi (quali ad esempio difetti di confezionamento, difetti di etichettatura, incongruità con i documenti presentati), mentre 126 partite sono state respinte a seguito di risultati sfavorevoli delle analisi di laboratorio. Circa un terzo di questi era dovuto alla presenza di aflatossine.

## Conclusioni

I possibili contaminanti degli alimenti sono numerosi e diversi, e spesso rappresentano un pericolo reale e importante. Le segnalazioni a livello europeo sono molto numerose, e talora in aumento, e quindi è necessario mantenere alta la guardia dei controlli ufficiali. L'Unione Europea esercita un ruolo determinante per i controlli ufficiali, insieme agli Stati Membri, soprattutto mediante la pubblicazione di regolamenti europei (che sono direttamente applicabili), l'attività di formazione (come ad esempio i corsi nell'ambito del programma *Better Training for Safer Food*), e le ispezioni condotte dal *Food and Veterinary Office*.

Il sistema di controlli alla frontiera su alimenti di origine non animale e materiali a contatto, previsto dalla normativa italiana ed europea e attuato in Italia mediante la rete degli USMAF, costituisce una valida barriera non solo a livello nazionale, ma anche a vantaggio dell'Unione Europea, soprattutto in considerazione dell'entrata in vigore dei regolamenti comunitari sui controlli ufficiali accresciuti, che prevedono la definizione di specifici PED (Punti di Entrata Designati). L'efficacia della rete di controllo italiana è stata anche confermata, in settembre 2010, da un'ispezione eseguita dal *Food and Veterinary Office* della Commissione Europea.

Per rafforzare il sistema dei controlli, il Ministero della Salute ha firmato nel 2007 un documento d'intesa con l'Agenzia delle Dogane, con la quale ha continui rapporti di collaborazione, finalizzati alla repressione delle frodi e al miglioramento costante del controllo ufficiale. Inoltre ha avviato colloqui con le Autorità Portuali, a livello centrale e locale, al fine di sensibilizzarle sulla necessità di fornire agli USMAF strutture e attrezzature sempre più adeguate per l'espletamento della loro attività istituzionale di controllo ufficiale sugli alimenti, divenuta ormai di rilievo preponderante e sempre più regolamentata, sia a livello nazionale e che comunitario.

Infine, grazie anche all'utilizzo dei fondi introitati dagli USMAF, secondo quanto previsto dal DL.vo 194/2008, la Direzione Generale per l'Igiene e la Sicurezza degli Alimenti e la Nutrizione intende dare sempre più importanza alle attività di audit, all'adozione di Procedure Operative Standard e ai corsi di formazione per il personale degli USMAF. Tutte queste iniziative tendono ad assicurare l'aggiornamento costante sulle normative e l'armonizzazione delle procedure di controllo, al fine di offrire al cittadino italiano ed europeo un livello sempre più elevato di sicurezza sugli alimenti che vengono introdotti attraverso i porti e gli aeroporti del nostro Paese.

## Bibliografia

1. Ministero della Salute. *Relazione sul sistema di allerta comunitario – Anno 2011*. Roma: Ministero della Salute; 2012. Disponibile all'indirizzo: <http://www.salute.gov.it/sicurezzaAlimentare/paginaInternaMenuSicurezzaAlimentare.jsp?id=1148&lingua=italiano&menu=sistema;> ultima consultazione 14/8/2012.

2. Ministero della Sanità. Decreto Ministeriale 2 maggio 1985: Direttive alle regioni e alle province autonome di Trento e Bolzano in materia di profilassi internazionale e di sanità pubblica (art. 1, punto “n”). *Gazzetta Ufficiale* n. 142, 18 giugno 1985.
3. 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* L 165, 30 aprile 2004.
4. Italia. Decreto legislativo 6 novembre 2007, n. 193 “Attuazione della direttiva 2004/41/CE relativa ai controlli in materia di sicurezza alimentare e applicazione dei regolamenti comunitari nel medesimo settore”. *Gazzetta Ufficiale* n. 261 - *Suppl. Ordinario* n. 228, 9 novembre 2007.
5. Italia. Decreto legislativo 19 novembre 2008, n. 194. Disciplina delle modalità di rifinanziamento dei controlli sanitari ufficiali in attuazione del regolamento (CE) n. 882/2004. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale* n. 289, 11 dicembre 2008
6. Europa. Regolamento (CE) n. 669/2009 del Parlamento Europeo e del Consiglio 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* L 194/11, 25 luglio 2009.
7. Europa. Regolamento (CE) n. 1135/2009 della Commissione del 25 novembre 2009 che impone condizioni speciali per l’importazione di determinati prodotti originari della Cina o da essa provenienti e che abroga la decisione 2008/798/CE della Commissione. *Gazzetta Ufficiale dell’Unione Europea* L 311/3, 26 novembre 2009
8. Europa. Regolamento (CE) n. 1151/2009 della Commissione del 27 novembre 2009 che subordina a particolari condizioni l’importazione di olio di girasole originario dell’Ucraina, o proveniente da tale paese, a causa del rischio di contaminazione da oli minerali e che abroga la decisione 2008/433/CE. *Gazzetta Ufficiale dell’Unione Europea* L 313/36, 28 novembre 2009
9. Europa. Regolamento (CE) n. 1152/2009 della Commissione del 27 novembre 2009 che stabilisce condizioni particolari per l’importazione di determinati prodotti alimentari da alcuni paesi terzi a causa del rischio di contaminazione da aflatoxine e che abroga la decisione 2006/504/CE. *Gazzetta Ufficiale dell’Unione Europea* L 313/40, 28 novembre 2009
10. Europa. Regolamento (UE) 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, le mandorle di albicocche, la liquirizia e l’olio vegetale. *Gazzetta Ufficiale dell’Unione Europea*, 3 marzo 2010.
11. Europa. Regolamento (UE) n. 212/2010 della Commissione del 12 marzo 2010 che modifica il regolamento (CE) n. 669/2009 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. *Gazzetta Ufficiale dell’Unione Europea* L 65/16, 13 marzo 2010
12. Europa. Regolamento (UE) n. 258/2010 della Commissione del 25 marzo 2010 che impone condizioni speciali per l’importazione di gomma di guar originaria o proveniente dall’India a causa del rischio di contaminazione da pentaclorofenolo e diossine e che abroga la decisione 2008/352/CE. *Gazzetta Ufficiale dell’Unione Europea* L 80/28, 26 marzo 2010
13. Europa. Regolamento di esecuzione (UE) n. 274/2012 della Commissione del 27 marzo 2012 recante modifica del regolamento (CE) n. 1152/2009 che stabilisce condizioni particolari per l’importazione di determinati prodotti alimentari da alcuni paesi terzi a causa del rischio di contaminazione da aflatoxine. *Gazzetta Ufficiale dell’Unione Europea* L 90/14, 28 marzo 2012.

# MONITORAGGIO DELLA CONTAMINAZIONE DA MICOTOSSINE IN PRODOTTI ALIMENTARI: ATTIVITÀ 2008-2010 DEL POLO ALIMENTI ARPA PUGLIA-BARI

Francesca Ferrieri, Carmela Amenduni, Nicola Battista, Angela Brunetti, Giovanni Corte, Egidio Leonetti, Francesco Lo Greco, Mariangela Palma, Tiziana Santoro, Francesco Fiume  
*Polo di Specializzazione Alimenti, ARPA Puglia-Bari, Bari*

## Introduzione

Il Laboratorio dell'Unità Operativa Chimica degli Alimenti del Polo di Specializzazione Alimenti ARPA Puglia di Bari opera a livello regionale per l'esecuzione degli accertamenti analitici finalizzati al controllo ufficiale di alimenti, bevande e materiali a contatto con gli alimenti, verificandone la conformità alla normativa vigente; ha iniziato ad eseguire analisi di micotossine alla fine degli anni '90; nel 2007 ha avviato il sistema di gestione della qualità conformemente alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 e dal 2009 è accreditato ACCREDIA.

Il monitoraggio nel triennio 2008-2010 ha riguardato la ricerca di aflatossine, ocratossina A (OTA), deossivalenolo (DON) e zearalenone (ZEA) ed essenzialmente è stato effettuato su campioni pervenuti nell'ambito dei controlli delle merci all'importazione da parte dell'USMAF (Ufficio di Sanità Marittima, Aerea e di Frontiera) e su campioni prelevati da parte dei Nuclei Antisofisticazioni e Sanità (NAS) nell'ambito di particolari campagne di monitoraggio.

## Risultati del monitoraggio

Nel triennio 2008-2010 sono state effettuate 1858 determinazioni di micotossine. Il maggior numero di determinazioni (51,7%) ha riguardato la ricerca di aflatossine B1, B2, G1, G2 effettuata su cereali (grano, pasta, prodotti della macinazione) e sulla frutta a guscio (arachidi, mandorle, noccioli di albicocca). Il 23,6% delle determinazioni ha riguardato la ricerca di OTA effettuata su cereali, caffè e vino. DON e ZEA costituiscono ciascuno il 12,4% delle determinazioni e sono state ricercate sui cereali (Figura 1).

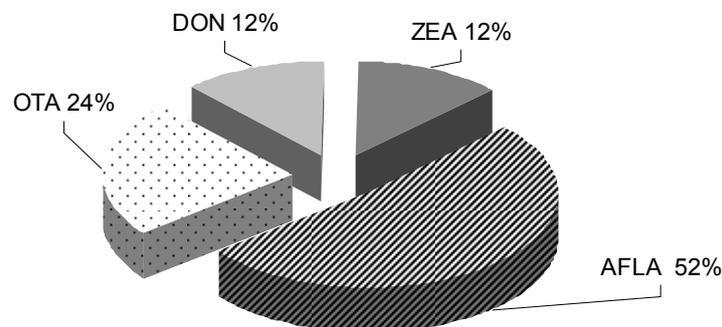


Figura 1. Distribuzione delle determinazioni di micotossine

Le tipologie di alimenti maggiormente monitorate sono stati i cereali (51,3%) e i vini (44,6%). La frutta a guscio è stata monitorata per il 2,2%, mentre il caffè costituisce l'1,8% dei campioni analizzati (Figura 2).

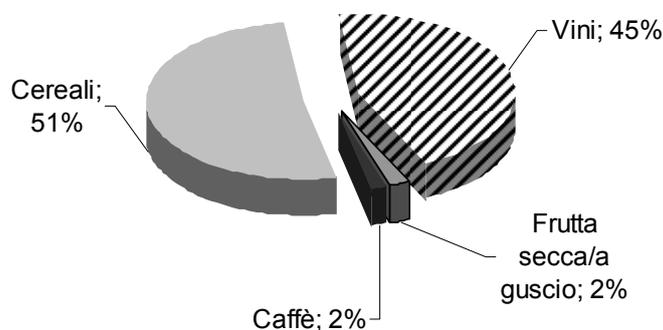


Figura 2. Distribuzione delle tipologie di alimenti monitorati

## Cereali

Più del 95% dei cereali analizzati è costituito da grano di varia provenienza (soprattutto da Australia, Canada, Kazakistan, Russia e USA) (Figura 3). Il campionamento è stato effettuato principalmente (73%) dall'USMAF ai punti di entrata nel territorio nazionale o effettuato a destinazione, sempre per conto dell'USMAF, dal personale appartenente ai Servizi delle ASL (27%).

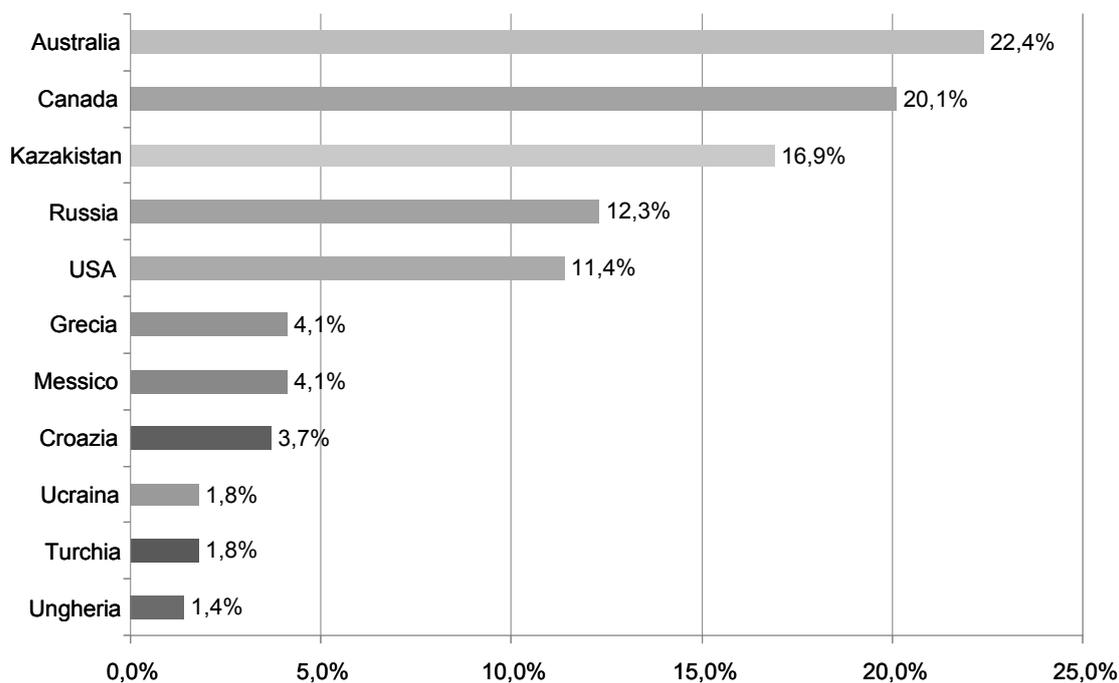
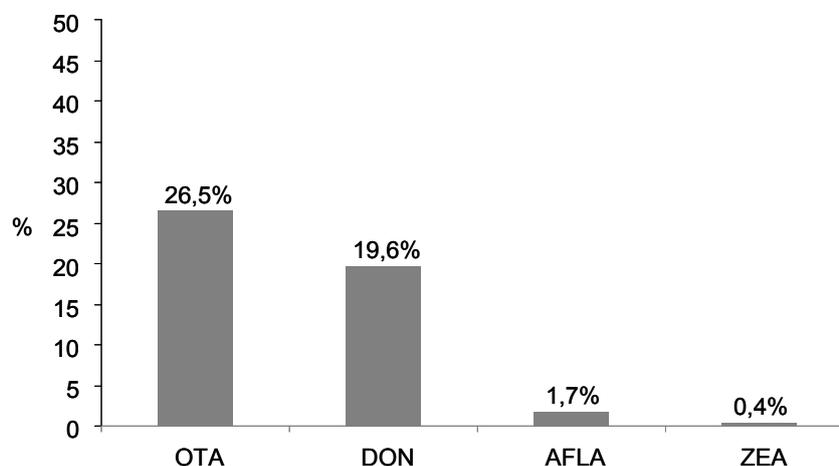


Figura 3. Paesi di provenienza dei campioni di grano

Il 26,5% dei campioni di cereali analizzati è risultato naturalmente contaminato da OTA, il 19,6% da DON, 1,7% da aflatossina B1 e lo 0,4%, da ZEA (Figura 4). Tra i campioni di cereali naturalmente contaminati da OTA, il 73,5% presenta comunque livelli di contaminazione inferiore a 2 µg/kg. Si tratta di grano non trasformato per il quale la normativa fissa come tenore massimo di OTA un valore di 5 µg/kg (1).



**Figura 4. Distribuzione della contaminazione nei campioni di cereali**

I campioni con più alti livelli di contaminazione sono risultati quelli provenienti dal Canada (fino a 4,9 µg/kg) e dalla Grecia (fino a 4,4 µg/kg); nessun campione ha presentato valore superiore al tenore massimo fissato. Tra i campioni di cereali contaminati da DON sono stati riscontrati livelli di contaminazione fino a 600 µg/kg. La provenienza dei campioni di grano più contaminati da DON è risultata la Croazia e il Canada. Presenza di DON è stata riscontrata anche in alcuni prodotti della macinazione quali semole e farine. Nessun campione è risultato non conforme per la presenza di DON superiore ai tenori massimi fissati (2). La contaminazione da aflatossina B1 nei campioni di cereali analizzati è stata riscontrata a livelli molto bassi, al massimo 0,2 µg/kg: tutti i campioni contaminati provenivano dalla Russia.

## Vini

Sui campioni di vino è stata ricercata l'OTA per la quale la normativa fissa come tenore massimo ammissibile 2 µg/L. I vini rossi sono stati quelli maggiormente monitorati (54%), seguono i bianchi (33,5%) e i rosati (12,5%).

L'85% dei campioni di vino su cui è stata ricercata l'OTA sono stati campionati nel 2010, soprattutto dal NAS (Bari e Foggia), nell'ambito di un'attività di monitoraggio su vini nazionali, pianificata dal Comando dei Carabinieri per la Tutela della Salute di Roma e finalizzata al rintraccio di vini sofisticati e/o contaminati.

Più dell'80% dei campioni analizzati era costituito da vini di produzione pugliese (Foggia, Nord Barese, Sud Barese, Lecce, Taranto); il resto proveniva da altre regioni di Italia (Basilicata, Campania, Sicilia, Emilia, Lazio, Lombardia, Piemonte, Valle d'Aosta, Veneto). Un campione di vino era di origine spagnola.

Come evidenziato in Figura 5, il 52,8% dei campioni analizzati è risultato naturalmente contaminato da OTA ossia con livelli di OTA superiori ai limiti di quantificazione (LoQ=0,1 µg/L).

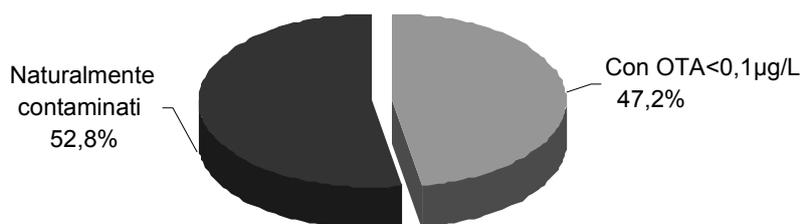


Figura 5. Distribuzione della contaminazione da OTA sul totale dei campioni di vino

La distribuzione della contaminazione varia per tipologia di vino: i rossi sono risultati contaminati al 70,9%; la percentuale di contaminazione nei rosati risulta più bassa (52,4%) e ancora più bassa nei vini bianchi (23,1%) (Figura 6).

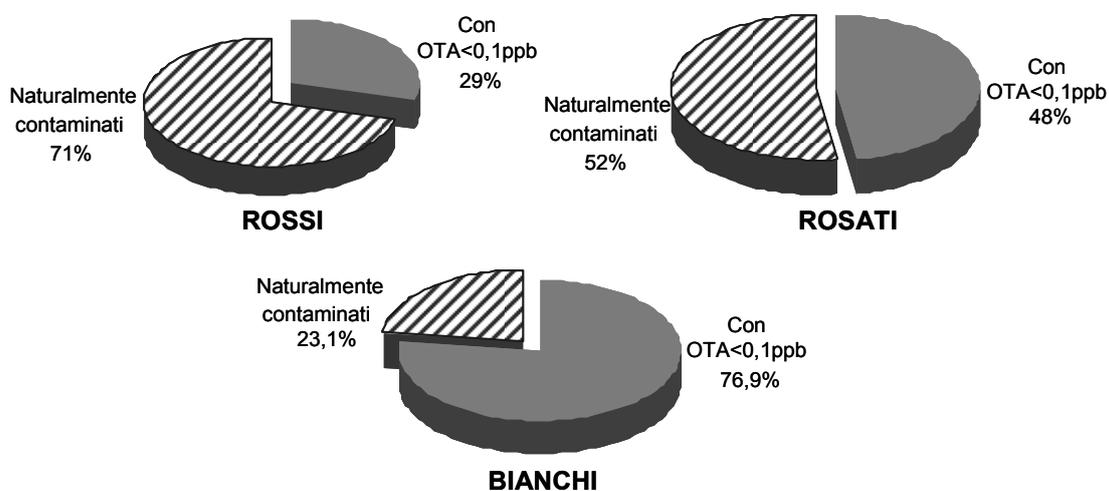


Figura 6. Distribuzione della contaminazione sui vini rossi, rosati e bianchi

La distribuzione dei livelli di contaminazione è riportata in Figura 7.

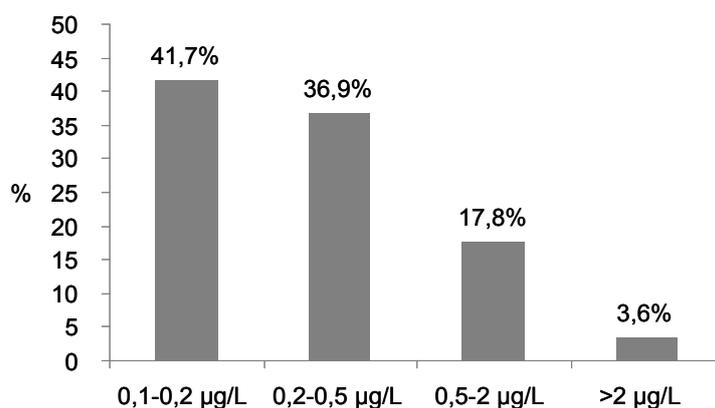


Figura 7. Distribuzione dei livelli di contaminazione nei campioni di vino

Nella maggior parte dei vini naturalmente contaminati sono stati riscontrati livelli di OTA inferiore a 0,5 µg/L. Più dell'80% dei campioni con livelli di contaminazione superiore a 0,5 µg/L sono vini rossi.

Il 3,6% dei campioni naturalmente contaminati ha presentato livelli di OTA superiore al limite di legge di 2 µg/L; in tutti questi casi l'intervallo di concentrazione fornito dall'incertezza di misura abbracciava il limite di legge pertanto ritenuti "conformi", in base a quanto indicato nel punto H.3. del Regolamento (CE) 401/2006 secondo cui: un campione viene ritenuto non conforme se il valore riscontrato supera il limite massimo "oltre ogni ragionevole dubbio", tenendo conto dell'incertezza di misura (4).

## **Frutta a guscio**

Limitato è stato il numero dei campioni di frutta a guscio (2,2%) monitorati i per la ricerca di aflatossine, così come prevede la normativa che fissa il limite per B1 e per le totali (3). I limiti di legge variano con la tipologia di frutta a guscio e, per la stessa matrice, sono diversi a seconda che il prodotto debba subire trasformazione, oppure sia destinato al consumo umano diretto. È dunque importante, al momento del campionamento, reperire tutte le informazioni relative alla destinazione d'uso in modo da applicare correttamente i tenori massimi e poter esprimere un altrettanto corretto giudizio di conformità. In assenza di una chiara indicazione attestante la destinazione d'uso, la normativa (Regolamento (CE) 1881/2006, art. 5) prevede che vengano applicati i tenori massimi più restrittivi, ossia quelli previsti per i prodotti destinati al consumo umano diretto.

Sebbene limitato il numero dei campioni di frutta a guscio monitorati, il 40% è risultato naturalmente contaminato da aflatossine ed è in questa categoria che sono state riscontrati campioni con valori di aflatossine di gran lunga superiori ai limiti di legge: il 20% dei campioni analizzati!

## **Caffè**

Una piccola percentuale di campioni monitorati (1,8%) è costituita da caffè torrefatto in cui è stata ricercata l'OTA. Il 12,5% dei campioni analizzati è risultato naturalmente contaminato ma con livelli non superiori a 0,5 µg/kg (il limite di legge fissato dalla normativa europea è di 5 µg/kg).

Su un numero ridotto di campioni di caffè crudo provenienti dal Messico e presentati dall'USMAF, non essendo previsto il limite comunitario è stato preso, come "valore guida" 8,0 µg/kg, quello stabilito dalla normativa nazionale, la Circolare n. 10 del 09/06/1999 che, sebbene superata, resta in vigore per quelle matrici o quelle micotossine non contemplate nel Regolamento CE.

## **Conclusioni**

Il monitoraggio nel triennio 2008-2010 ha riguardato, in larga misura, i prodotti all'importazione, soprattutto grano.

La matrice con più alti livelli di contaminazione e più elevata percentuale di non conformità è rappresentata dalla frutta secca.

L'OTA è la micotossina maggiormente riscontrata nei cereali e largamente diffusa nei vini, soprattutto in quelli rossi.

Dopo l'OTA, il DON è risultato essere la micotossina più diffusa nei campioni di grano analizzati.

A partire dal 2010 è diminuito il controllo dei prodotti all'importazione mentre è in aumento il numero dei campioni prelevati dalle ASL per il controllo ufficiale; il numero dei campioni rimane comunque limitato per le criticità legate alle complesse procedure di campionamento (4, 5).

È auspicabile un monitoraggio continuo ed esteso ad una più vasta tipologia di alimenti in modo da assicurare che i tenori delle micotossine nei prodotti alimentari vengano mantenuti a livelli accettabili sul piano tossicologico, ai fini della tutela della salute pubblica.

## Bibliografia

1. 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, 20 dicembre 2006
2. 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, 29 settembre 2007.
3. Europa. Regolamento (UE) n. 165/2010 della Commissione del 26 febbraio 2010 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 dell'Unione Europea* L 50/8, 27 febbraio 2010.
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, 9 marzo 2006
5. Europa. Regolamento (UE) 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, le mandorle di albicocche, la liquirizia e l'olio vegetale. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 52/32. 3 marzo 2010

# DETERMINAZIONE DELLA PATULINA IN SUCCO DI MELA

Fausta Giuffrè, Maria Claudia Torresani

Unità Alimentare, ChemService srl Controlli e Ricerche, Novate Milanese, Milano

## Introduzione

La patulina è un metabolita secondario prodotto da un numeroso gruppo di funghi del genere *Aspergillus*, *Penicillium* e *Byssosclamyces*. La sua presenza è soprattutto correlata alla contaminazione di un patogeno (*Penicillium expansum*) comunemente presente nella frutta, soprattutto nelle mele. Poiché la patulina è resistente ai processi industriali di lavorazione della frutta la si può riscontrare nei prodotti derivati.

A seguito di studi condotti sugli animali, la patulina ha mostrato immunotossicità, neurotossicità ed effetti dannosi sullo sviluppo del feto e del tratto gastrointestinale. Inoltre in vitro inibisce numerosi enzimi incluse anche la DNA polimerasi e la RNA polimerasi.

Scopo di questo lavoro è quello di mettere a punto un metodo che consenta di determinare questa micotossina in modo specifico, rapido, semplice e sensibile.

I metodi più utilizzati prevedono un'estrazione liquido/liquido e analisi in HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)/UV (276 nm) dell'estratto tal quale o purificato mediante colonnina SPE (*Solid Phase Extraction*). L'analisi condotta in succhi di mela torbidi o in purea di mela, solitamente genera un cromatogramma nel quale la presenza di picchi di matrice interferisce con la risoluzione del picco corrispondente alla patulina, anche dopo purificazione con le classiche colonnine SPE. Un altro interferente è l'idrossimetilfurfurale (*Hydroxymethylfurfural*, HMF) che si forma a seguito dei trattamenti termici ai quali sono sottoposti queste tipologie di prodotto. L'HMF ha un tempo di ritenzione (*Retention Time*, RT) vicino a quello della patulina e, se in concentrazioni elevate, può influenzare la risoluzione del picco della micotossina. Il metodo messo a punto prevede, dopo diluizione del campione in esame, una purificazione mediante l'utilizzo di colonne di polimeri ad impronta molecolare (*Molecularly Imprinted Polymers*, MIP) (R-BIOPHARM) e l'analisi in HPLC/DAD (*Diode Array Detector*) (276 nm).

Il principio su cui si basa questo tipo di purificazione è una reazione tipo chiave-serratura, simile a quella che si instaura tra anticorpo e antigene, dovuta all'impronta lasciata dalla molecola sul polimero durante la fase di sintesi del polimero stesso.

Dopo l'eliminazione delle componenti interferenti mediante opportuni eluenti, l'analita di interesse è recuperato dalla colonnina con un solvente appropriato.

Le analisi così condotte hanno portato ad ottenere buoni risultati sia per quanto riguarda i recuperi (i valori ottenuti rientrano nelle specifiche riportate nel Regolamento (CE) 401/2006 e aggiornamenti successivi (1) sia per quanto riguarda l'eliminazione/abbattimento dei picchi interferenti, soprattutto quello relativo all'HMF (Figura 1).

Inoltre, anche la colonna utilizzata per l'analisi in HPLC/DAD e il gradiente scelto hanno contribuito all'ottenimento di cromatogrammi con una buona risoluzione nella zona di interesse analitico.

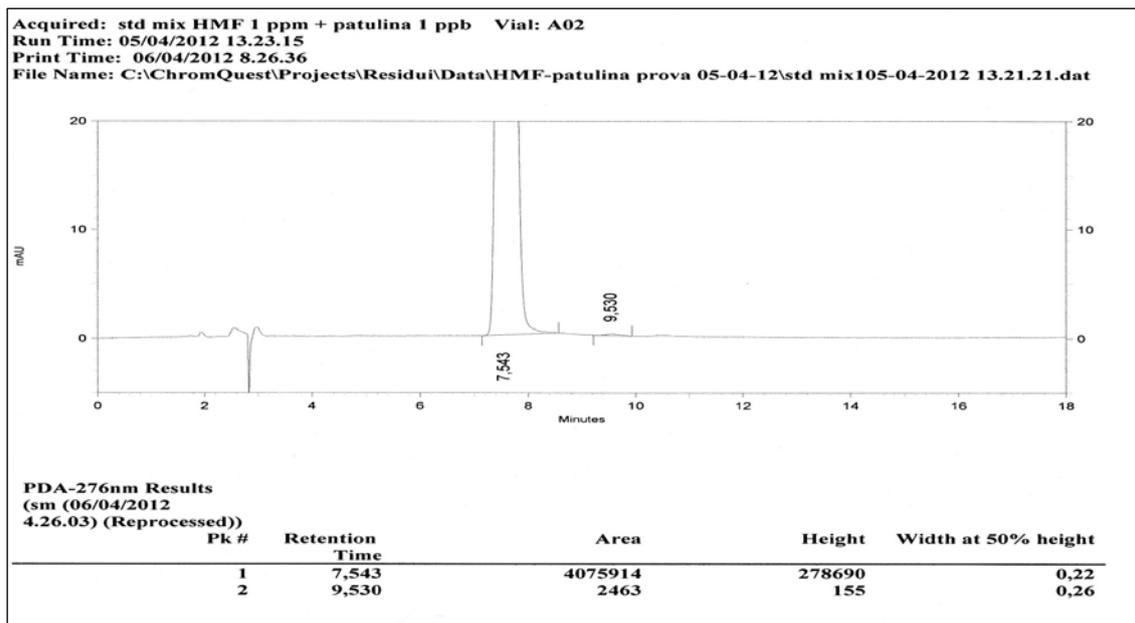


Figura 1. Cromatogramma HMF (1 mg/L; RT 7,54') Standard patulina (1 µg/L; RT 9,53')

Il metodo presentato è stato validato determinando il recupero a 3 livelli di contaminazione e la ripetibilità con 10 prove per ogni livello; sono stati poi calcolati la linearità compresa tra valori di 1 µg/L e 80 µg/L, il limite di rilevabilità, il limite di quantificazione, l'incertezza di misura, la precisione, l'accuratezza e il limite di ripetibilità.

## Materiali e metodo di analisi

A 5 g di campione, contaminati con la patulina e pesati in una provetta falcon da 50 mL, sono stati aggiunti 5 mL di una soluzione di acido acetico al 2% in acqua. Successivamente, mediante vortex, la soluzione è stata agitata per 20 secondi e centrifugata a 3000 rpm per 5 min. Dall'estratto così ottenuto sono stati prelevati 4 mL (equivalenti a 2 g di campione) e purificati mediante l'utilizzo di colonnine aventi fase stazionaria costituita da polimeri ad impronta molecolare EASIMIP®. La colonnina, condizionata con acetonitrile e lavata con acqua, è stata caricata con l'estratto e lavata mediante l'utilizzo dei seguenti solventi: bicarbonato di sodio all'1% in acqua, acqua ed etere etilico. Successivamente la tossina aggiunta è stata eluita con acetato di etile.

È importante evidenziare che il flusso di eluizione per tutti i solventi utilizzati deve essere tenuto a 1 mL al minuto, mentre a 0,5 mL al minuto durante la fase di caricamento del campione. Operando secondo queste condizioni la tossina viene trattenuta quantitativamente dal polimero di riempimento della colonnina EASIMIP®.

L'eluato è stato successivamente portato a secco mediante azoto in un bagno a secco termostato a 35-40°C per un tempo massimo di 20 minuti.

L'estratto secco è stato ripreso con 1 mL di acido acetico allo 0,1% in acqua, agitato con il vortex per 20 secondi e filtrato con filtri da 0,45 µm in vial per HPLC.

Il campione così ottenuto è stato analizzato in HPLC/DAD utilizzando le seguenti condizioni:

- Precolonna: Intersil ODS-3 - 5  $\mu$ m, 4 mm x 10 mm o (Hichrom) equivalente
- Colonna analitica: Intersil ODS-3V 5  $\mu$ m, 4,6 mm x 150 mm (Hichrom) o equivalente
- Fase mobile: Eluente A: Acqua:Acetonitrile:Acido Perclorico (95:5:0,1 v/v/v)  
Eluente B: Acetonitrile
- Gradiente
 

Tempo	% Eluente A	% Eluente B
0,0	100	0
15,0	100	0
15,1	20	80
18,0	20	80
18,1	100	0
27,0	100	0
- Velocità di flusso 1,0 mL al minute
- UV Detector 276 nm
- Temperatura precolonna e colonna a 30°C
- Volume iniettato 100  $\mu$ L

## Parametri di validazione e risultati

Sono stati determinati i seguenti parametri di validazione:

- *Selettività*

Sono stati analizzati un bianco di matrice, uno standard di patulina e uno standard di HMF: i risultati ottenuti hanno dimostrato che non ci sono interferenze in prossimità del picco della patulina.

Si sono anche analizzati un estratto di succo di mela torbido non purificato (Figura 2) e uno purificato (Figura 3): i cromatogrammi hanno rilevato l'efficacia della purificazione.

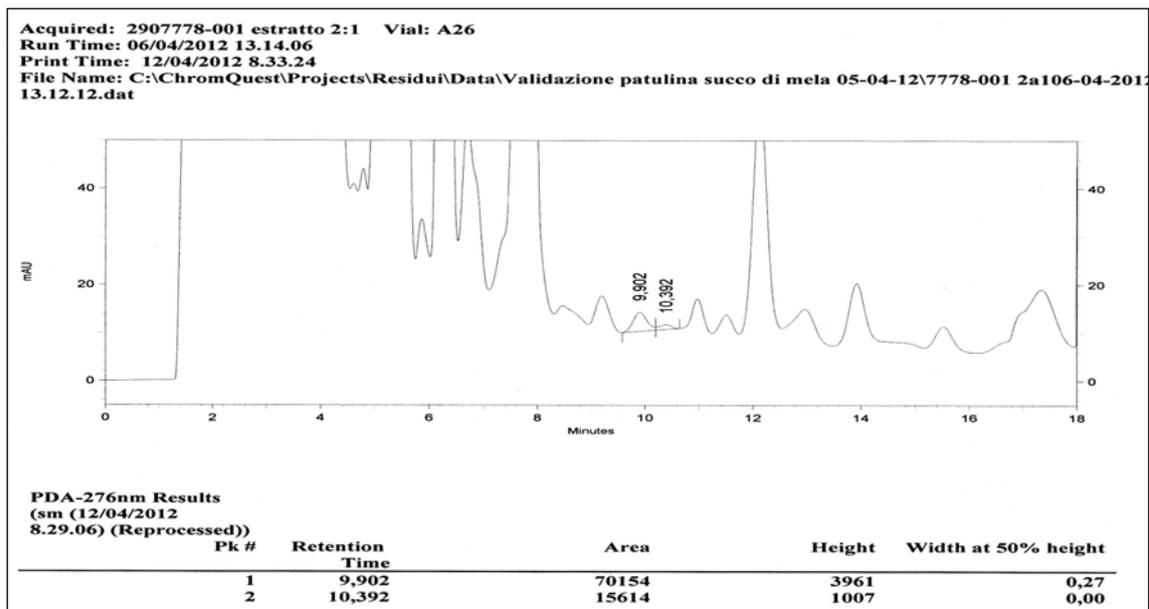


Figura 2. Cromatogramma di un estratto di succo di mela torbido non purificato

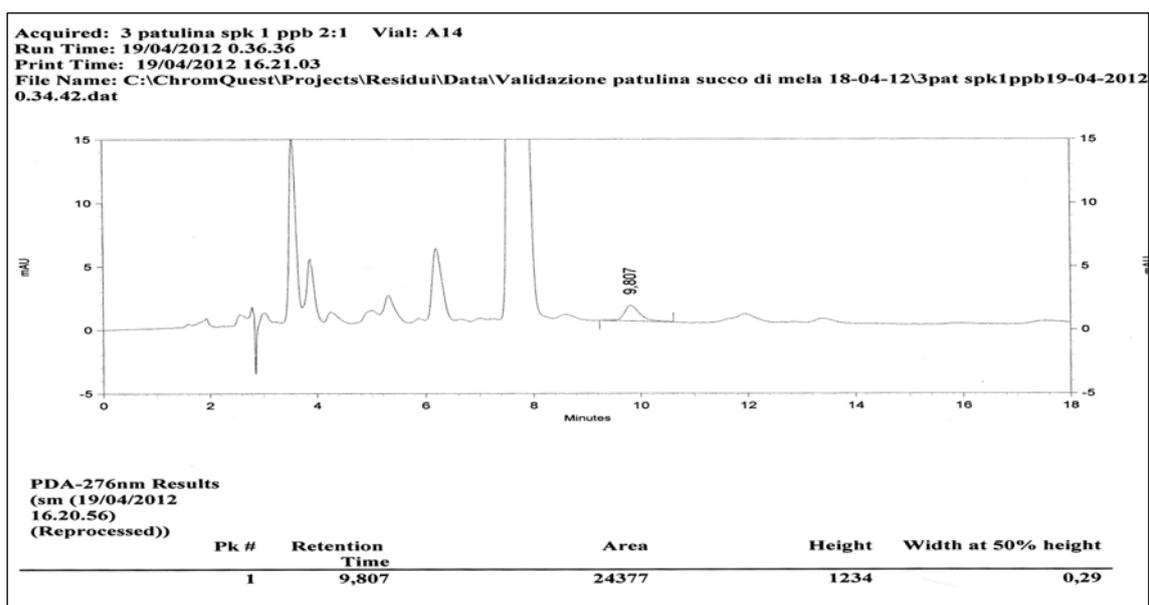


Figura 3. Cromatogramma di un estratto di succo di mela torbido purificato con EASIMIP

– *Recupero*

I recuperi sono stati calcolati su 3 livelli di contaminazione: 1, 10, 30 ng/g.

– *Ripetibilità*

Per ogni livello di contaminazione sono state effettuate 10 prove.

– *Linearità*

La retta di taratura è stata determinata utilizzando standard di patulina, diluiti in un estratto di matrice bianca, alle seguenti concentrazioni: 1,0 µg/L; 2,5 µg/L; 5,0 µg/L; 10,0 µg/L; 20,0 µg/L; 40,0 µg/L; 60,0 µg/L; 80,0 µg/L.

Dalla retta di taratura (Figura 4) sono stati calcolati i seguenti parametri:

- coefficiente di correlazione = 0,9999
- pendenza = 3397
- intercetta = -409.

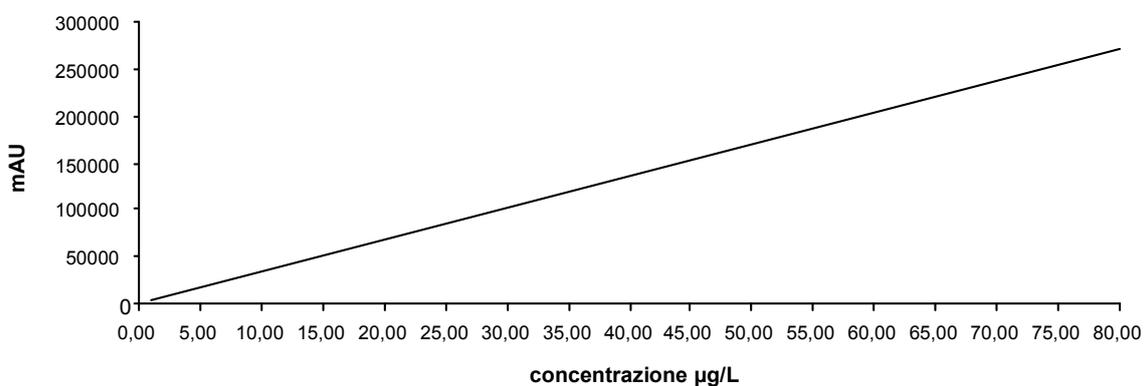


Figura 4. Retta di taratura della patulina

Successivamente sono stati determinati il limite di rilevabilità (*Limit of Detection*, LoD), il limite di quantificazione (*Limit of Quantification*, LoQ), la precisione, l'accuratezza, l'incertezza di misura, il limite di ripetibilità. Sia il LoD che LoQ sono risultati pari a 1 ng/g.

Nella Tabella 1 vengono riportati i parametri ottenuti sperimentalmente.

**Tabella 1. Parametri di validazione del metodo per livelli di fortificazione**

Parametro	1 ng/g	10 ng/g	30 ng/g
Recuperi	88,00%	78,00%	71,00%
Precisione	0,14	0,82	2,62
Incetezza di misura	± 0,30 ng/g	± 1,10 ng/g	± 3,30 ng/g
Limite di ripetibilità	0,44	2,62	8,55

## Conclusioni

I risultati conseguiti dalle prove di validazione sono stati valutati considerando i criteri di rendimento indicati nel Regolamento (CE) 401/2006 – Metodi di campionamento e analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari (1).

Il confronto tra tutti questi valori, riportato nella Tabella 2 conferma la bontà del metodo utilizzato e le buone prestazioni delle colonnine di purificazione EASIMIP nonché il raggiungimento dell'obiettivo: ricerca di un metodo specifico, rapido, semplice e sensibile per la determinazione della patulina in succo di mela.

**Tabella 2. Confronto criteri di rendimento per la patulina e risultati ottenuti sperimentalmente**

Tenore di patulina (ng/g)	RSDr%	Recupero %	RSDr % - Recupero % sperimentali
< 20	≤ 30	50-120	15,90 88,00 (livello = 1 ng/g) 10,48 78,00 (livello = 10 ng/g)
20-50	≤ 20	70-105	12,30 71,00 (livello = 30 ng/g)

Inoltre il valore di LoQ raggiunto dal metodo (1 ng/g) risulta 10 volte inferiore al limite di legge più basso riportato nel Regolamento (CE) 1881/2006 e aggiornamenti successivi (2) per gli alimenti per l'infanzia pari a 10 ng/g.

## 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, 9 marzo.
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, 20 dicembre 2006.

# DETERMINAZIONE DI ZEARALENONE E SUOI METABOLITI IN URINE BOVINE

Carlo Brera, Emanuela Gregori, Augusto Alberto Pastorelli, Maurizio Fiori, Paolo Stacchini, Barbara De Santis, Francesca Debegnach  
*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Introduzione

Lo zearalenone (ZEA), un lattone dell'acido resorcilico, è una micotossina prodotta dai funghi del genere *Fusarium*. È presente principalmente nei cereali, come mais, grano, orzo, e la sua presenza negli alimenti e nei mangimi rappresenta un potenziale rischio per la sicurezza alimentare e per il benessere animale.

Dagli studi *in vivo*, sia negli animali sia nell'uomo, sembra che il metabolismo dello ZEA sia influenzato da diversi fattori quali la specie animale, il sesso e l'età (1-6). È stato dimostrato, inoltre, che i metaboliti principali sono alfa-zearalenolo ( $\alpha$ -ZEA), il beta-zearalenolo ( $\beta$ -ZEA), l'alfa-zearalanolo (ZER), il beta-zearalanolo (TAL) (conosciuti rispettivamente come zeranolo e taleranolo) e infine lo zearalanone (ZAN). Lo ZEA e i suoi metaboliti esibiscono un'attività estrogenica e anabolizzante (ZER) in alcune specie animali e sono stati indicati come possibili cause di modificazioni puberali precoci (telarca) nei bambini (7-9). Si rende pertanto necessaria la disponibilità di metodiche analitiche atte a valutare il profilo metabolico completo di tale micotossina anche per poter discriminare tra presenza legata a contaminazione della filiera zootecnica e uso illegale di promotori di crescita.

In questo studio è stato sviluppato e validato un metodo in cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (*Liquid Chromatography – Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry*: LC-MS/MS) per la determinazione simultanea dello ZEA e dei suoi metaboliti in urine bovine. La validazione è stata condotta, utilizzando il software InterVal Plus, con l'approccio statistico alternativo proposto dalla Decisione 2002/657/CE (10) ed è stata effettuata in conformità a quanto stabilito dalla normativa comunitaria.

## Materiali e metodi

### Materiali e apparecchiature

I materiali di riferimento certificati per tutti gli analiti sono stati comprati dalla Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Germania), gli standard interni deuterati, ZER-D4 e TAL-D4, dal laboratorio comunitario di Riferimento (*European Union Reference Laboratory*, EU-RL) Rikilt (Wageningen, Paesi Bassi). I reagenti e i solventi, quali acetato di ammonio, l'enzima glucoronidasi-arilsulfatasi, il metanolo e l'acetonitrile sono stati forniti da Merck (Darmstadt, Germania) e da Carlo Erba (Milano, Italia). Le colonnine di immunoaffinità utilizzate sono state le EASI-EXTRACT® ZEAREALENONE della R-Biopharm Rhône LTD (Scozia, Regno Unito).

I campioni di urina sono stati forniti da un allevatore locale.

## Soluzioni dei materiali di riferimento

Per ognuno degli analiti e per gli standard interni sono stati pesati circa 2,00 ( $\pm 0,01$ ) mg in matraccio tarato e portati a volume con metanolo ottenendo una concentrazione finale di circa 0,2 mg/mL. Da questa sono state preparate le altre soluzioni di lavoro sempre in metanolo. Tutte le soluzioni preparate sono state conservate a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## Retta di taratura in matrice

Le rette di taratura sono state costruite partendo da 5 mL di un pool di urine bianche fortificato con gli analiti a diverse concentrazioni (0,5; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0 ng/mL); per la costruzione della retta è stato incluso anche lo zero.

L'apparecchiatura utilizzata è stata un sistema LC-MS/MS: HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*) Perkin Elmer Series 200, accoppiato con un triplo quadrupolo Applied Biosystems API 3000 con sorgente APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) Heated Nebulizer. Le condizioni operative dello spettrometro di massa sono riassunte in Tabella 1 mentre le condizioni cromatografiche sono state: gradiente lineare con fase mobile acetato di ammonio 0,1 mol/L, acetonitrile; velocità di flusso 0,2 mL/min, colonna Betasil C18 (Thermo electron (250x2,1 mm, 5 $\mu\text{m}$ ) a temperatura di  $40^{\circ}\text{C}$ .

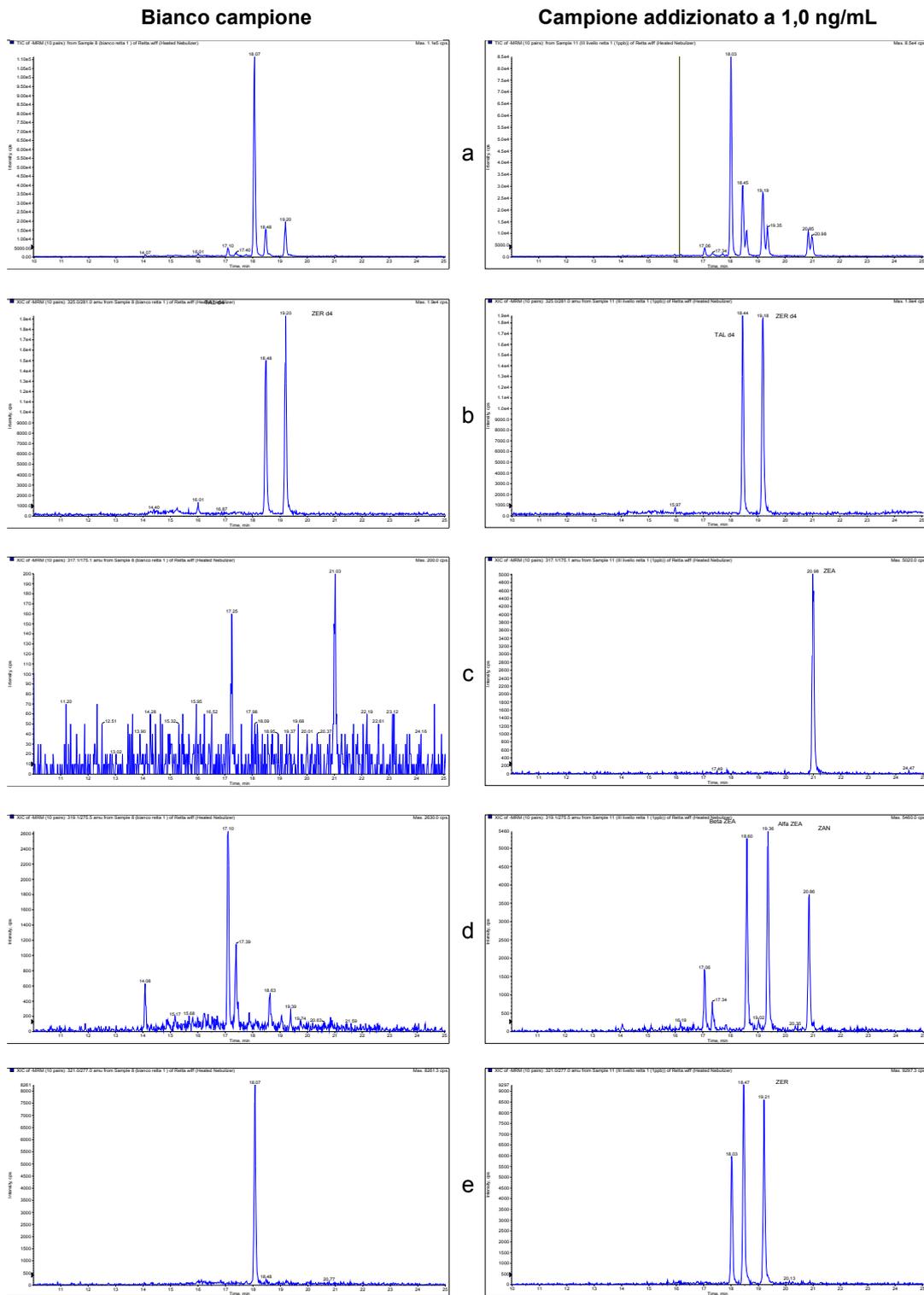
**Tabella 1. Condizioni operative dello spettrometro di massa per il metodo utilizzato**

Analiti	ione precursore (m/z) [M - H] <sup>-</sup>	ione prodotto (m/z)	Ce (eV)	Dp (V)
ZEА	317,0	131 175	-41	-35
$\alpha$ -ZEА	319,0	174 205	-33	-35
$\beta$ - ZEА	319,0	174 205	-33	-35
ZAN	319,0	205 275	-35	-3
TAL	321,0	277 303	-35	-60
ZER	321,0	277 303	-35	-60
ZER-D4	325,0	281	-33	-35
TAL-D4	325,0	281	-33	-35

## Metodo

I campioni di urina (5,0 mL) sono stati addizionati con 50  $\mu\text{L}$  della soluzione degli standard interni e poi filtrati (0,45  $\mu\text{m}$ ). In seguito sono stati diluiti con 5 mL di tampone acetato 1 mol/L a pH=5,2 e addizionati con 60  $\mu\text{L}$  dell'enzima  $\beta$ -glucuronidasi/arilsulfatasi e poi incubati per la deconiugazione. Dopo incubazione, i campioni riportati a temperatura ambiente sono stati purificati mediante colonnine di immunoaffinità. Dopo il caricamento del campione, le colonnine sono state lavate con 5 mL di acqua per due volte, e in seguito gli analiti sono stati eluiti con 3 mL di metanolo. L'eluato è evaporato sotto flusso di azoto e ripreso con 100  $\mu\text{L}$  di metanolo (utilizzando vial ad alto recupero) prima di essere iniettato nel sistema LC-MS/MS.

In Figura 1 sono riportati a titolo di esempio i cromatogrammi di un campione di urina bovina non contaminato (bianco) e di uno addizionato.



**Figura 1. Cromatogrammi LC-MS/MS di un campione di urine non contaminato (bianco) e di un campione addizionato: a) TIC; b) MRM standard interni deuterati; c) MRM di ZEA; d) MRM di  $\alpha$ -ZEA,  $\beta$ -ZEA e ZAN; e) MRM di ZER e TAL**

## Validazione

La validazione è stata effettuata in accordo alla Decisione 2002/657/CE utilizzando l'approccio *in-house* alternativo mediante il software InterVal Plus (quo data GmbH, Dresda, Germania). Il software permette lo sviluppo di un disegno sperimentale, che applicato consente di determinare contemporaneamente tutte le performances del metodo per una validazione completa, includendo anche la robustezza e la riproducibilità intra-laboratorio. L'applicazione del disegno sperimentale individuato dal software permette, inoltre, di valutare possibili effetti matrice, effetti delle condizioni analitiche e di campionamento.

Nel nostro studio, data la semplicità del metodo, sono stati selezionati quattro differenti "fattori di validazione", ognuno dei quali variabile su due livelli, nello specifico: l'operatore, le condizioni della deconiugazione in termostato, l'attesa prima dell'analisi cromatografica e la marca dei solventi. Nella Tabella 2 viene riportato il disegno sperimentale per le prove utili per l'intera validazione, per un totale di otto esperimenti che sono stati eseguiti tutti in otto giorni lavorativi.

**Tabella 2. Disegno sperimentale ottenuto dal software per il metodo utilizzato**

Corsa	Giorno	Operatore	Condizioni deconiugazione	Giorni prima dell'analisi cromatografica	Marca solventi
07	1	PT01	tutta la notte a 37°C	2	1
03	1	PT02	tutta la notte a 37°C	2	-1
05	2	PT01	4 ore a 50°C	2	-1
08	2	PT01	tutta la notte a 37°C	0	1
06	3	PT01	4 ore a 50°C	0	-1
04	3	PT02	tutta la notte a 37°C	0	-1
01	4	PT02	4 ore a 50°C	2	1
02	4	PT02	4 ore a 50°C	0	1

## Risultati

### Sviluppo del metodo

La semplicità e la tempistica della preparazione del campione insieme all'uso di standard interni deuterati per un'analisi quantitativa altamente ripetibile rappresentano alcuni dei vantaggi rispetto ai metodi già presenti in bibliografia (11-14).

### Identificazione

Il metodo presentato rispetta i criteri che devono essere soddisfatti per l'identificazione delle sostanze vietate (gruppo A tabella 1 del D.L.vo 158/2006) (15), secondo la Decisione 2002/657/CE: i 4 punti di identificazione, sono soddisfatti con l'identificazione di 1 ione precursore e 2 ioni prodotto; i rapporti tra gli ioni in termini di abbondanza percentuale rispettano i limiti di tolleranza previsti.

### Quantificazione

L'analisi quantitativa è stata effettuata impiegando le rette di taratura in matrice (pool di urine) costruite riportando i rapporti delle aree misurate dello ione prodotto selezionato e dello

standard interno in funzione delle loro rispettive concentrazioni, usando il modello di regressione lineare dei minimi quadrati. Le altre rette preparate dalle singole urine sono considerate come campioni di concentrazione sconosciuta e così quantificati.

Tutte le rette ottenute negli esperimenti mostrano dei coefficienti di correlazione più che soddisfacenti per tutti gli analiti ( $R^2 \geq 0,995$ ).

## Validazione

La validazione condotta con l'aiuto del software InterVal Plus comporta un numero di esperimenti minore di quello utile per una validazione classica secondo la Decisione 2002/657/CE con conseguente risparmio di ore/uomo e materiali. L'intera validazione è stata finalizzata in due settimane di lavoro.

In Tabella 3 sono riassunti i risultati della validazione. I valori di  $CC\alpha$  e di  $CC\beta$  sono in linea con le richieste dell'EU-RL competente "Recommended concentration" di 2,0 ng/mL. I recuperi, espressi come esattezza, variano dal 99 al 115 % per tutti gli analiti a tutti i livelli e anche la selettività/specificità è buona visto che non si sono registrati interferenti nell'analisi cromatografica.

I dati di ripetibilità intra-laboratorio sono compresi tra il 5 e il 15% per tutti gli analiti al limite di decisione  $CC\alpha$ .

La riproducibilità intra-laboratorio è minore del 20% per la maggioranza degli analiti, mentre si registrano valori più alti (~ 25 %) per zearalanone, alfa-zearalenolo e beta-zearalenolo alle concentrazioni minori del  $CC\alpha$ .

**Tabella 3. Risultati della validazione del metodo utilizzato (intervallo curva di taratura 0,500-5,000 ng/mL)**

Analita	$CC\alpha$	$CC\beta$	Recupero [%] al $CC\alpha$	RSD [%] al $CC\alpha$
ZEA	0,66	0,78	100,5	9,0
$\alpha$ -ZEA	0,85	1,17	101,5	15,1
$\beta$ -ZEA	0,73	0,99	102,8	15,3
ZAN	1,29	1,83	105,0	15,3
ZER	0,71	0,86	99,8	10,0
TAL	0,69	0,82	100,1	9,7

## Conclusioni

Il metodo proposto è di facile esecuzione e la sua validazione ha dato risultati più che soddisfacenti rispondendo pienamente ai requisiti stabiliti dalla Decisione 2002/657/CE e alle raccomandazioni dello EU-RL competente.

Dopo alcuni studi apparsi in letteratura (1-6,16), che hanno correlato la presenza di zeranolo in animali alimentati con mangime contaminato da ZEA, lo EU-RL ha deciso di estendere i controlli ufficiali riguardanti la Categoria A4 All. 1 D.L.vo 158/2006 allo zearalenone e a tutti i possibili metaboliti proprio per cercare di discriminare un trattamento illecito da una contaminazione delle filiera zootecnica da parte del fungo micotossigeno.

L'interpretazione dei risultati, comunque, appare difficoltosa e soggetta all'interpretazione personale dell'operatore in quanto non esistono ancora linee guida ufficiali adottate nel controllo ufficiale, sia in Europa sia in Italia, per la conformità di quei campioni che mostrano la copresenza di zeranolo e ZEA con i suoi metaboliti. In passato un progetto europeo "Natural

zeranol” ha cercato di stabilire un criterio quantitativo per distinguere la contaminazione da *Fusarium* spp. dall’uso non autorizzato di zeranolo e allo scopo ha formulato un modello matematico (16) applicabile, però, solamente alla matrice urina bovina, escludendo di conseguenza la sua applicabilità alle altre razze. La problematica resta quindi ancora aperta e risulta quindi auspicabile che l’Autorità Competente, i laboratori regionali e il Laboratorio Nazionale di Riferimento sui residui negli alimenti di origine animale individuino un criterio attendibile per valutare la conformità in modo tale da fornire alle strutture laboratoristiche operanti sul territorio uno strumento di intervento armonizzato.

## Bibliografia

1. Kleinova M, Zöllner P, Kahlbacher H, Hochsteiner W, Lindner W. Metabolic profiles of the mycotoxin zearalenone and of the growth promoter zeranol in urine, liver, and muscle of heifers. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2002;50(17):4769-76.
2. Kennedy DG, Hewitt SA, McEvoy JD, Currie JW, Cannavan A, Blanchflower WJ, Elliot CT. Zeranol is formed from *Fusarium* spp. toxins in cattle in vivo. *Food Additives and Contaminates* 1998;15(4):393-400.
3. Erasmuson AF, Scahill BG, West DM. Natural zeranol ( $\alpha$ -zearalanol) in the urine of pasture-fed animals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1994; 42:2721-5.
4. Zöllner P, Jodlbauer J, Kleinova M, Kahlbacher H, Kuhn T, Hochsteiner W, Lindner W. Concentration levels of zearalenone and its metabolites in urine, muscle tissue, and liver samples of pigs fed with mycotoxin-contaminated oats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002;50(9):2494-501.
5. Miles Co, Erasmuson AF, Wilkins Ai, Towers NR, Smith BL, Garthwaite I, Scahill BG, Hansen RP. Ovine metabolism of zearalenone to  $\alpha$ -zearalanol (zeranol). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1996;44:3244-50.
6. Migdalof BH, Dugger HA, Heider JG, Coombs RA, Terry MK. Disposition and metabolism in the female rat, rabbit, dog, monkey, and man. *Xenobiotica* 1983;13:209-21.
7. Zinedine A, Soriano JM, Moltò JC, Manes J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chemistry and Toxicology* 2007;45(1):1-18.
8. Minervini F, Dell’aquila ME. Zearalenone and reproductive function in farm animals. *International Journal of Molecular Science* 2008;9(12):2570-84.
9. Bandera EV, Chandran U, Buckley B, Lin Y, Isukapalli S, Marshall I, King M, Zarbl H. Urinary mycoestrogens, body size and breast development in New Jersey girls. *The Science of Total Environment* 2011;409(24):5221-7.
10. Italia. Decreto Legislativo 16 marzo 2006, n. 158. Attuazione della direttiva 2003/74/CE, concernente il divieto di utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze beta-agoniste nelle produzioni animali. *Gazzetta Ufficiale* n. 98 del 28 aprile 2006.
11. Wang S, Wang XH. Analytical methods for the determination of zeranol residues in animal products: a review. *Food Additives and Contaminates* 2007;24(6):573-82.
12. Schmidt K, Stachel C, Gowik P. Development and in-house validation of an LC-MS/MS method for the determination of stilbenes and resorcylic acid lactones in bovine urine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2008;391(4):1199-210.

13. Blokland MH, Sterk SS, Stephany RW, Launay FM, Kennedy DG, van Ginkel LA Determination of resorcylic acid lactones in biological samples by GC-MS. Discrimination between illegal use and contamination with fusarium toxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2006;384(5):1221-7.
14. Dusi G, Bozzoni E, Assini W, Tognoli N, Gasparini M, Ferretti E. Confirmatory method for the determination of resorcylic acid lactones in urine sample using immunoaffinity cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Chimica Acta* 2009;637(1-2):47-54.
15. Europa. Decisione n. 2002/657/CE della Commissione che attua la direttiva n. 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati. (Testo rilevante ai fini del SEE). *Gazzetta ufficiale delle Comunità Europee* L 221/8 17 agosto 2002
16. Launay FM, Ribeiro L, Alves P, Vozikis V, Tsitsamis S, Alfredsson G, Sterk SS, Blokland M, Iitia A, Lövgren T, Tuomola M, Gordon A, Kennedy DG. Prevalence of zeranol, taleranol and Fusarium spp. toxins in urine: implications for the control of zeranol abuse in the European Union. *Food Additives and Contaminates* 2004;21(9):833-9.

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

Veronica M.T. Lattanzio (a), Michele Solfrizzo (a), Stefania Della Gatta (a),  
Stephen P. Powers (b), Angelo Visconti (a)

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

(b) Vicam Group of Waters Technology Corp, Watertown, USA

## Introduzione

Il sistema di allarme rapido europeo (*Rapid Alert System for Food and Feed*, RASFF) vede le micotossine al primo posto tra i diversi contaminanti per numero di notifiche di superamento dei limiti massimi consentiti nelle derrate alimentari all'importazione. Tra le diverse categorie di prodotti monitorate, quella dei cereali e prodotti a base di cereali merita una particolare attenzione per la suscettibilità alla contaminazione simultanea di diverse micotossine (1). La Commissione Europea ha pertanto stabilito i livelli massimi ammissibili in cereali e prodotti derivati per tutte le principali micotossine ovvero aflatossine, ocratossina A, fumonisine, zearalenone e deossinivalenolo (2, 3), mentre i limiti per le tossine T-2 e HT-2 sono attualmente in discussione e saranno emanati a breve.

Per assicurare il rispetto della legislazione e per proteggere il consumatore, lo sviluppo di metodiche analitiche sensibili, robuste e affidabili per la determinazione di micotossine nelle varie matrici agroalimentari è in continua evoluzione (4). Negli ultimi decenni la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC, *High-Performance Liquid Chromatography*) è diventata la tecnica più ampiamente utilizzata per l'analisi delle micotossine sottoposte a regolamentazione in alimenti e mangimi. In questo contesto, l'utilizzo dello spettrometro di massa come rivelatore HPLC ne aumenta ulteriormente le potenzialità, offrendo la possibilità di ottenere determinazione quantitativa e conferma univoca in un'unica analisi. La diffusione di questa tecnica ha aperto inoltre la strada allo sviluppo di metodiche multi-residuali per la determinazione simultanea di micotossine appartenenti a diverse famiglie. Tuttavia, le recenti pubblicazioni in merito mettono in evidenza come queste metodiche non siano facili da sviluppare proprio in ragione delle diverse proprietà chimico-fisiche delle varie micotossine, che devono essere attentamente gestite in tutte le fasi della procedura analitica (5, 6). La fase più critica è rappresentata dalla ottimizzazione delle condizioni di estrazione, che deve garantire recuperi accettabili per tutti gli analiti in esame. In particolare, la principale difficoltà è costituita dalla coestrazione delle fumonisine insieme alle altre micotossine. Per questo motivo, la maggior parte dei metodi multi-residuali ad oggi pubblicati non include le fumonisine o riporta recuperi non accettabili per queste tossine (7-9). Per la purificazione degli estratti sono state testate differenti colonnine per estrazione in fase solida con differenti livelli di successo (8, 10). Alcuni autori optano invece per l'analisi degli estratti mediante iniezione diretta (7, 9). Tuttavia, omettere completamente la purificazione del campione si traduce generalmente in un consistente effetto matrice sulla ionizzazione degli analiti, che si ripercuote negativamente sulla sensibilità e sulla robustezza del metodo. Tali metodiche pertanto sono da considerarsi metodiche di screening.

Presso i laboratori dell'Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA)-CNR di Bari è stato recentemente sviluppato un metodo accurato e riproducibile per l'analisi simultanea di aflatossine (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2), ocratossina A (OTA), fumonisine (FB1, FB2), Tricoteceni (deossinivalenolo DON, tossina T-2, tossina HT-2) e zearalenone (ZEA) in mais (11). Il presente lavoro descrive l'estensione del metodo a frumento e orzo. Sono inoltre discussi i risultati di uno studio dettagliato dell'effetto matrice per tutte le undici tossine nei cereali in oggetto.

## Risultati e discussione

Per ottenere una elevata efficienza di estrazione per tutte le 11 micotossine, aventi differente polarità e struttura chimica, è stato sviluppato un nuovo approccio basato su una doppia estrazione con tampone fosfato a pH 7,4 e una miscela metanolo/tampone fosfato (70:30, v/v). Per la purificazione degli estratti sono state utilizzate nuove colonnine ad immunoaffinità (Myc6in1<sup>TM</sup>, VICAM) contenenti 6 diversi anticorpi per aflatossine, ocratossina A, fumonisine, Deossinivalenolo, Tossine T-2 e HT-2 e zearalenone. La separazione e rivelazione di queste micotossine sono state effettuate mediante cromatografia liquida-spettrometria di massa/massa (LC-ESI-MS/MS *Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry*). Per l'analisi cromatografica è stata utilizzata una colonna Gemini<sup>®</sup> C18 (150 mm × 2 mm, 5 µm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA), con una fase mobile binaria composta da metanolo e acqua contenenti acetato di ammonio 1 mM e acido acetico 0,5%. Per la rivelazione è stato usato uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo (QTrap<sup>®</sup> MS/MS system, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) operante in modalità MRM (*Multiple Reaction Monitoring*).

In Figura 1 è riportato un cromatogramma TIC (*Total Ion Current*) di un estratto di mais fortificato con le 11 micotossine a livelli di contaminazione pari a: 500 µg/kg DON; 2 µg/kg AFG2, AFB2; 6 µg/kg AFG1; 10 µg/kg AFB1; 500 µg/kg FB1; 250 µg/kg FB2; 100 µg/kg HT-2, T-2, ZEA; 20 µg/kg OTA). Le linee verticali indicano i periodi di inversione della polarità della sorgente ESI; mentre la linea indicata dalla freccia illustra i cambiamenti nella composizione della fase mobile.

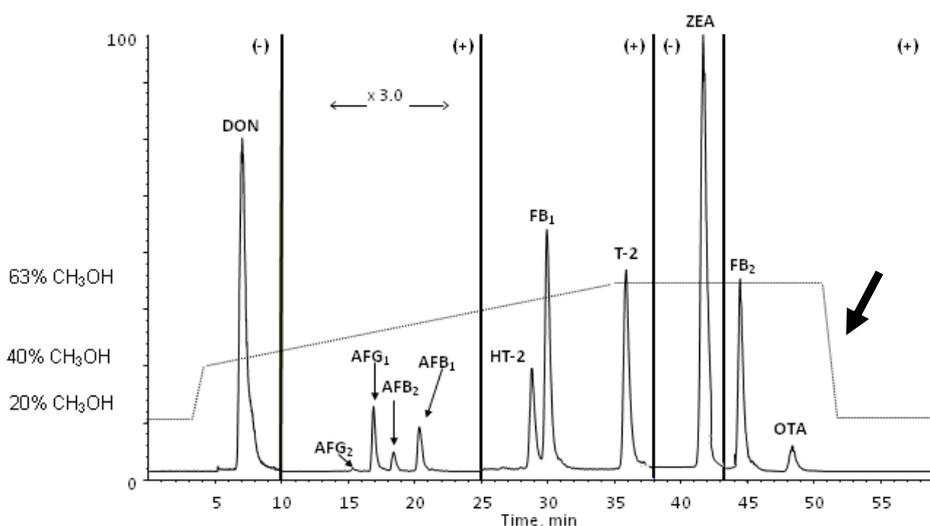
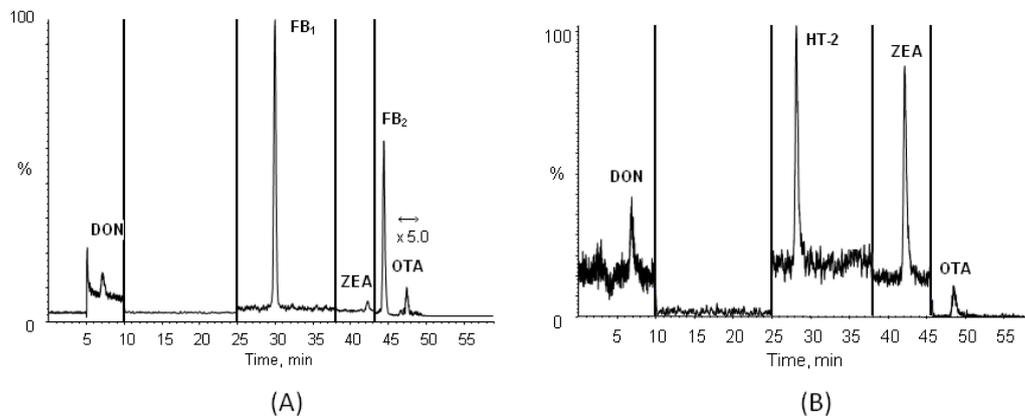


Figura 1. Cromatogramma (TIC) di un estratto di mais artificialmente contaminato

Le caratteristiche del metodo in termini di recuperi, ripetibilità e linearità sono state valutate in mais, frumento e orzo, a livelli di contaminazione intorno ai limiti di legge per ogni micotossina considerata. Le percentuali di recupero (valutate a tre livelli di contaminazione) variano da 64 a 103% in mais, da 60 a 91% in frumento e da 64 a 103% in orzo, con deviazioni standard relative (n. 3) inferiori al 13%. I limiti di rivelabilità (LoD, *Limit of Detection*) (calcolati a un rapporto segnale/rumore pari a 3) sono compresi tra 0,1 a 5,8 µg/kg in mais, 0,2 e 5,1 µg/kg in frumento e 0,1 e 2,4 µg/kg in orzo. I valori di recupero e di ripetibilità del metodo sono conformi ai criteri stabiliti dal CEN (*Comité Européen de Normalisation*) e riportati nel Regolamento (CE) 401/2006 (12) per l'accettazione di metodi analitici per la determinazione delle varie micotossine in esame. In Figura 2 sono infine riportati due esempi di cromatogrammi ottenuti dall'analisi di campioni di mais (A) e frumento (B) naturalmente contaminati.



**Figura 2. Cromatogrammi (TIC) di (A) un estratto di mais naturalmente contaminato da 5 µg/kg DON, 72 µg/kg FB1, 16 µg/kg FB2, 0,5 µg/kg ZEA e 0,3 µg/kg OTA e (B) un estratto di frumento naturalmente contaminato da 2,4 µg/kg DON, 55,2 µg/kg HT-2, 7,4 µg/kg ZEA e 1,6 µg/kg OTA**

Nell'ambito di questo lavoro, è stato inoltre valutato l'effetto matrice sulla ionizzazione degli analiti con un test statistico (*Student t test*) che determina la significatività della differenza di pendenza tra le rette di calibrazione ottenute con soluzioni standard preparate in fase mobile e in estratti di cereali purificati su colonna ad immunoaffinità. I risultati di questo studio hanno mostrato un effetto matrice statisticamente significativo in soli 4 casi su 29, ovvero per aflatoxine e OTA in estratti di mais e ZEA in estratti di orzo. In tutti gli altri casi invece l'effetto matrice era trascurabile. La calibrazione in matrice rimane pertanto necessaria per un'analisi quantitativa accurata. Considerando i limiti di rivelabilità sopra riportati si evince come la purificazione e la concentrazione del campione mediante colonne ad immunoaffinità consenta di ottenere una elevata sensibilità (LoD intorno a 1 µg/kg) anche utilizzando spettrometri di massa non di ultima generazione. Non trascurabili sono inoltre i vantaggi derivanti dall'iniezione di campioni molto puliti in termini di tempo di vita della colonna cromatografica e pulizia dell'interfaccia dello spettrometro di massa, che si traducono in una maggiore robustezza dell'intera procedura analitica.

## Conclusioni

La metodica analitica proposta è stata applicata con successo per la determinazione simultanea di aflatossine, ocratossina A e *Fusarium* tossine in mais, frumento e orzo. L'approccio sperimentale sviluppato, basato su una doppia estrazione con tampone fosfato e metanolo/acqua (70:30) e purificazione degli estratti mediante colonnine a immunoaffinità multi-anticorpo, consente la co-estrazione di tutte le 11 micotossine considerate con recuperi accettabili. Le caratteristiche del metodo in termini di recuperi e ripetibilità sono conformi ai criteri stabiliti dal Regolamento (CE) 401/2006 (12). Il metodo risulta inoltre sufficientemente sensibile per essere applicato all'analisi di cereali naturalmente contaminati e verificare in una singola analisi la conformità con i limiti massimi ammissibili stabiliti dalla legislazione vigente (2, 3) per aflatossine, OTA, DON, ZEA e fumonisine.

## Bibliografia

1. Health and Consumers Directorate-General of the European Commission. *The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Annual report 2008*. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities; 2009. Disponibile all'indirizzo: [http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2008\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2008_en.pdf); ultima consultazione 7/10/2009.
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, 20 dicembre 2006.
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 granturco e nei prodotti a base di granturco. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 255/14, 29 settembre 2007.
4. Shephard GS, Berthiller F, Dorner J, Krska R, Lombaert GA, Malone B, Maragos C, Sabino M, Solfrizzo M, Trucksess MW, van Egmond HP, Whitaker TB. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2007-2008. *World Mycotoxin Journal* 2009;2:3-21.
5. Zöllner P, Mayer-Helm B. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2006;1136:123-69.
6. Songsermsakul P, Razzazi-Fazeli E. A review of recent trends in applications of liquid chromatography-mass spectrometry for determination of mycotoxins. *The Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2008;31:1641-86.
7. Sulyok M, Berthiller F, Krska R, Schuhmacher R. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2006;20:2649-59.
8. Ren Y, Zhang Y, Shao S, Cai Z, Feng L, Pan H, Wang Z. Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2007;1143:48-64.
9. Spanjer MC, Rensen PM, Sholten JM. LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanuts, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. *Food Additives & Contaminants* 2008;25(4):472-89.
10. Sørensen LK, Elbæk TH. Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2005;820:183-96.

11. Lattanzio VMT, Solfrizzo M, Powers S, Visconti A. Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and Fusarium toxins by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity clean up. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2007;21:3253-61
12. Europa. Regolamento CE n. 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006. Metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale della Comunità Europee* L 70, 9 marzo 2006.

## SVILUPPI DIAGNOSTICI NELL'ANALISI DELLE MICOTOSSINE

Vincenzo Lippolis, Michelangelo Pascale, Angelo Visconti  
Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari

### Introduzione

Negli ultimi anni la determinazione analitica delle micotossine in prodotti alimentari è stata costantemente implementata grazie all'introduzione di tecnologie innovative che vengono applicate a più livelli e con differenti modalità. I metodi analitici per la determinazione di micotossine possono essere suddivisi in due grandi categorie, metodi convenzionali (principalmente di tipo cromatografico quali HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), GC (*Gas Chromatography*) e LC-MS (*Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*) e metodi rapidi o di screening di tipo immunochimico.

Recentemente tra i convenzionali sono stati sviluppati nuovi metodi di tipo cromatografico grazie alla disponibilità di sistemi cromatografici meno costosi e ad ultra-prestazioni (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC<sup>TM</sup>) che consentono una notevole riduzione dei tempi di analisi, elevata risoluzione e buona sensibilità. L'utilizzo della cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS) rappresenta ormai da alcuni anni l'approccio più utilizzato per la determinazione simultanea di micotossine in prodotti agro-alimentari. I metodi LC-MS per la determinazione quantitativa delle micotossine utilizzano generalmente spettrometri a multistadio (MS/MS) basati su analizzatori di massa a triplo quadrupolo e con modalità di acquisizione *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). Più recentemente l'impiego di spettrometri di massa sempre più sensibili e ad alta risoluzione (*High Resolution Mass Spectrometry*, HRMS), con elevata accuratezza di massa, permette l'analisi diretta degli estratti di matrici alimentari senza necessità di una fase preliminare di purificazione. I metodi LC-HRMS offrono inoltre prestazioni uniche per l'identificazione e la determinazione delle forme coniugate delle micotossine e dei loro metaboliti che possono contribuire alla tossicità globale dell'alimento e per le quali vi è una carenza di dati di incidenza. Nell'ambito dei metodi di screening, sono stati sviluppati vari saggi e metodi per la determinazione delle principali micotossine, in un'ampia varietà di formati basati su nuove tecnologie, quali l'immuncromatografia (*dipstick* e *lateral flow device*), la polarizzazione di fluorescenza (*Fluorescence Polarization*, FP), i biosensori ottici o elettrochimici, la spettroscopia infrarossa, e i metodi che usano recettori alternativi come polimeri sintetici o aptameri.

Di seguito vengono introdotti una serie di metodi innovativi per l'analisi di micotossine che sono stati sviluppati presso l'Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari del Consiglio Nazionale delle Ricerche di Bari, tra cui un metodo UPLC<sup>TM</sup> per la determinazione delle tossine T-2 e HT-2 in cereali, metodi LC-HRMS per la determinazione di micotossine in cereali e prodotti derivati, un *dipstick* per la determinazione simultanea di tossine di *Fusarium* in cereali e prodotti derivati, un immunosaggio basato sulla polarizzazione di fluorescenza per la determinazione di tossine T-2 e HT-2 in frumento, un metodo basato sulla spettroscopia infrarossa in Trasformata di Fourier per la determinazione di deossinivalenolo (DON) in frumento.

## Metodi LC-HRMS per la determinazione di micotossine

Nell'ambito degli spettrometri ad alta risoluzione (HRMS) la tecnologia Orbitrap™ risulta essere particolarmente interessante e appropriata all'analisi multi-micotossina. Recentemente sono stati introdotti analizzatori denominati Exactive™, con tecnologia Orbitrap™, nei quali è presente una cella di collisione in grado di generare la frammentazione attraverso l'applicazione di una *High-energy Collision Dissociation* (HCD). Gli ioni così generati sono introdotti nell'analizzatore Orbitrap™ per essere analizzati e per ricavare informazioni strutturali sui composti di interesse attraverso l'analisi dei relativi ioni frammento.

La tecnologia Orbitrap™, particolarmente adatta all'identificazione e caratterizzazione di analiti, è stata applicata alla determinazione quantitativa delle principali micotossine in cereali e prodotti derivati. In particolare, è stato sviluppato un metodo LC-HCD-HRMS per la determinazione simultanea di aflatossine (B1, B2, G1, G2), ocratossina A (OTA), zearalenone (ZEA), DON, T-2 e HT-2 in prodotti a base di cereali, quali farina di frumento, farina di orzo e crackers (2). Il metodo consente il monitoraggio dello ione pseudo-molecolare e di un frammento caratteristico (per ogni micotossina) con un accuratezza di massa compresa nell'intervallo 0,1-3,9 ppm. La procedura di preparazione del campione prevede l'estrazione mediante una miscela acetonitrile/acqua 84:16 (v/v) e successiva purificazione mediante colonne solid-phase extraction (SPE) a fase polimerica. I recuperi risultano superiori al 74% per le 9 micotossine determinate con RSD inferiori al 13% e LoD compresi nell'intervallo 0,5-3,4 µg/kg. È stato inoltre effettuato un confronto tra il metodo sviluppato e un metodo LC-MS/MS di riferimento, con spettrometro a triplo quadrupolo. Poiché non sono state osservate differenze significative nelle performance (LoD, recuperi, ripetibilità ed effetti matrice) dei due metodi è possibile affermare che il nuovo metodo LC-HCD-HRMS rappresenta una valida alternativa al ben consolidato metodo LC-MS/MS.

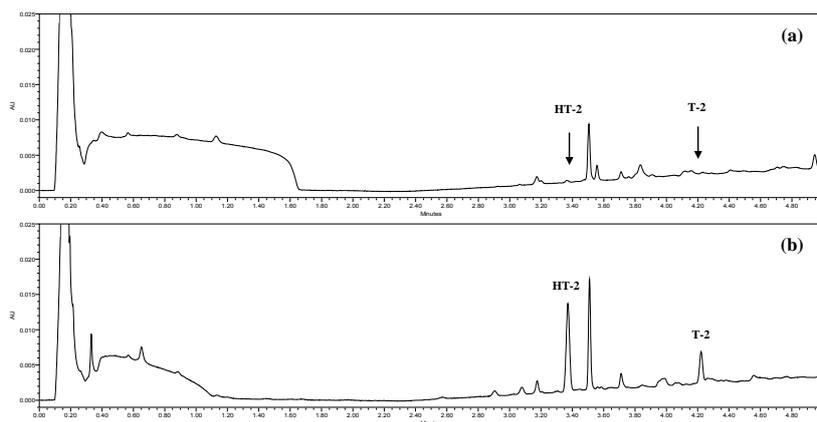
Al fine di monitorare l'effetto del processo di panificazione sulla presenza di DON, T-2 e HT-2 è stato messo a punto un metodo LC-HCD-HRMS per la loro identificazione e determinazione quantitativa (3). Il metodo prevede l'estrazione del campione mediante una miscela acetonitrile/acqua 84:16 (v/v) e successiva purificazione mediante colonne multifunzionali MycoSep®. Sono stati ottenuti LoD per T-2, HT-2 e DON rispettivamente di 7, 12 e 17 µg/kg, con un accuratezza di massa pari a 0,5 ppm. Il metodo sviluppato è stato successivamente applicato all'analisi di "pani modello" preparati a partire da semole contaminate dalle micotossine di interesse. La determinazione analitica DON, T-2, HT-2 ha evidenziato che la T-2 si idrolizza ad HT-2 durante la preparazione dell'impasto, mentre il contenuto di HT-2 e DON si riduce di circa il 20-30% nella fase di cottura del pane.

## Metodo UPLC™ per la determinazione delle tossine T-2 e HT-2

Le tossine T-2 e HT-2 vengono generalmente determinate mediante metodi gascromatografici, con l'uso di rivelatori a cattura di elettroni (*Electron Capture Detector*, ECD) o a spettrometria di massa (*Mass Spectrometry*, MS), e mediante metodi HPLC con rivelatore fluorimetrico (*Fluorescence Detector*, FLD). Sebbene l'uso di tali tecniche consente di raggiungere elevate sensibilità esse richiedono una fase preliminare di derivatizzazione per trasformare tali tossine in derivati volatili nei metodi GC e in derivati fluorescenti nei metodi HPLC. La derivatizzazione implica una serie di limitazioni dovute alla scarsa ripetibilità, linearità della risposta e alla laboriosità della stessa procedura. La recente disponibilità di

sistemi UPLC<sup>TM</sup> consente l'utilizzo di colonne con diametro particellare inferiore a 2 µm che determinano un notevole miglioramento delle caratteristiche cromatografiche in termini di risoluzione, sensibilità e di rapidità rispetto all'analisi HPLC.

È stato sviluppato un metodo UPLC<sup>TM</sup> per la simultanea determinazione di tossine T-2 e HT-2 in frumento e avena a livelli di µg/kg, senza la necessità di derivatizzazione, mediante detector a serie di fotodiodi (PDA) (1). Il metodo prevede l'estrazione del campione mediante una miscela metanolo/acqua 90:10 (v/v) e purificazione dell'estratto mediante colonnina ad immunoaffinità (IMA). L'analisi cromatografica UPLC<sup>TM</sup>/PDA, condotta alla lunghezza d'onda di 202 nm, richiede un tempo complessivo inferiore ai 5 minuti (Figura 1).



**Figura 1. Cromatogrammi relativi all'analisi UPLC<sup>TM</sup>/PDA di campioni di avena: (a) campione esente da contaminazione, (b) campione naturalmente contaminato (1030 µg/kg di HT-2 e 497 µg/kg di T-2). (figura tratta da Pascale et al., 2012 - Rif. 1; © 2012, con il permesso Elsevier)**

I recuperi medi del metodo risultano compresi nell'intervallo 87-96% con deviazioni standard relative inferiori al 7% per campioni di avena (calcolati a livelli 50-1000 µg/kg) e nell'intervallo 91-103% con RSD <5% per campioni di frumento (calcolati a livelli 25-100 µg/kg). Il limite di determinazione (*Limit of Detection*, LoD) del metodo, calcolato con un rapporto segnale/rumore 3:1, è di 8 µg/kg per entrambe le tossine. L'analisi comparativa del metodo UPLC<sup>TM</sup>/PDA con il metodo di riferimento HPLC/FLD (mediante derivatizzazione con 1-antrolnitrile) condotta su campioni naturalmente contaminati di avena e frumento ha mostrato una buona correlazione ( $r > 0,90$ ). Questi risultati dimostrano che il metodo sviluppato può essere applicato, in maniera accurata e sensibile, all'analisi di T-2 e HT-2 in campioni di avena e frumento, evitando la procedura di derivatizzazione e con ridotti tempi di analisi.

## Immunosaggio FP la determinazione delle tossine T-2 e HT-2

Gli immunosaggi basati sulla polarizzazione di fluorescenza (FP) sono saggi in fase omogenea che vengono sempre più frequentemente utilizzati come metodi di screening quantitativi per la determinazione di micotossine in matrici alimentari grazie ai relativi vantaggi

in termini di rapidità, semplicità d'uso e basso costo. Sebbene esistano immunosaggi FP per le principali micotossine regolamentate AFB1, ZEA, OTA, FB1 e DON in differenti matrici, non erano disponibili immunosaggi FP per T-2 e HT-2.

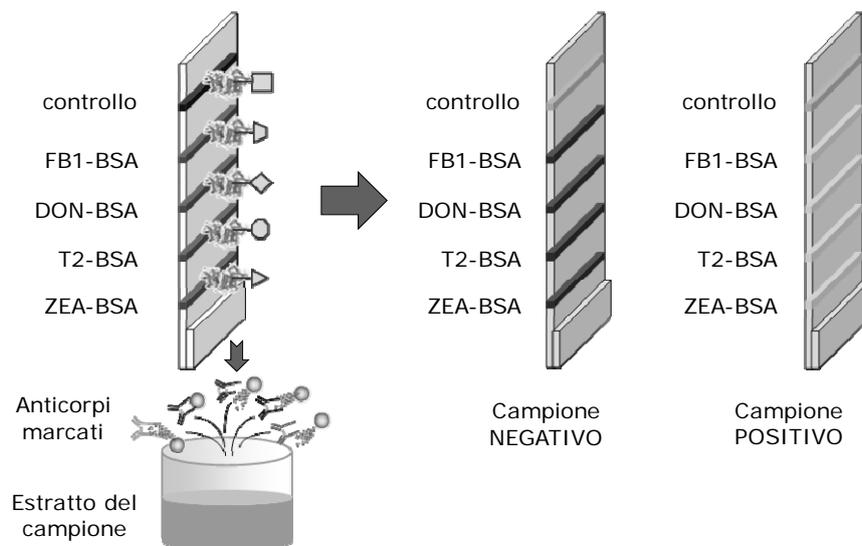
Recentemente è stato sviluppato un immunosaggio FP per la determinazione rapida e simultanea di T-2 e HT-2 (espressa come somma) in frumento (5). La procedura di preparazione del campione prevede l'estrazione con una miscela metanolo/acqua 90:10 (v/v) e, dopo diluizione con tampone, l'analisi diretta mediante l'immunosaggio sviluppato. Il tempo complessivo dell'intera procedura risulta inferiore a 10 minuti. I recuperi sono compresi nell'intervallo 89-103% con RSD inferiori all'8% e LoD di 8 µg/kg (espresso come somma di T-2 e HT-2). Pertanto l'immunosaggio FP ha prestazioni in linea con i criteri di accettabilità stabiliti dall'Unione Europea (6) per il controllo ufficiale di tali micotossine.

L'immunosaggio FP è stato validato per confronto con il metodo di riferimento (HPLC/FLD), mediante l'analisi di 45 campioni di frumento naturalmente o artificialmente contaminati da T-2 e HT-2, che ha mostrato una buona correlazione tra i risultati ottenuti ( $r=0,964$ ). Inoltre nessun falso positivo è stato osservato nell'analisi di 10 campioni di frumento esenti da contaminazione. I costi contenuti, la semplicità d'uso e la rapidità dell'analisi rendono tale saggio una valida alternativa ai più costosi e laboriosi metodi cromatografici di analisi per il monitoraggio della contaminazione da T-2 e HT-2 nel frumento.

## **Immunosaggio *multiplex dipstick* per la determinazione di tossine di *Fusarium***

I test immunocromatografici, nei formati *lateral flow device* o *dipstick*, rappresentano l'approccio ad oggi più utilizzato per lo screening rapido delle micotossine in prodotti agro-alimentari. In questi test il campione fluisce, per capillarità o per azione di una membrana assorbente, lungo una membrana analitica sulla cui superficie sono immobilizzati opportuni immunoreagenti. La determinazione, di tipo qualitativo (si/no) o semi-quantitativo, può essere visiva o coadiuvata da un apposito lettore portatile, spesso di tipo fotometrico. Sono stati sviluppati diversi *test strip* per la determinazione di micotossine in alimenti e mangimi e molti di essi sono ad oggi commercialmente disponibili. Uno dei principali limiti di tali sistemi consiste nella possibilità di analizzare una singola micotossina per test e ad oggi esistono solo due esempi di determinazione simultanea, quali la determinazione di DON e ZEA in frumento e di ZEA e OTA in mais.

È stato sviluppato un *multiplex dipstick* per la simultanea determinazione delle principali tossine di *Fusarium*, quali DON, ZEA, fumonisina B1 (FB1) e B2 (FB2), T-2 e HT-2 in frumento, avena e mais (4). Il prototipo di *dipstick* sviluppato è basato su un approccio competitivo indiretto ed è composto da 4 linee test (contenenti i coniugati micotossina-BSA) e una linea di controllo (Figura 2). Gli anticorpi marcati sono posizionati preventivamente in micropozzetti dove viene aggiunto l'estratto del campione. Sono stati sviluppati due diversi protocolli di estrazione, uno per frumento e avena (non contenenti fumonisine) e uno per il mais; entrambi prevedono l'uso di una miscela metanolo/acqua.



**Figura 2. Descrizione schematica del multiplex dipstick**  
(figura tratta da Lattanzio et al., 2012- Rif. 4; © 2012, con il permesso Elsevier)

Il *dipstick* sviluppato consente la determinazione semi-quantitativa delle micotossine con livelli di cut-off pari all'80% dei valori massimi ammissibili fissati dall'Unione Europea. I recuperi ottenuti per le matrici di interesse variano nell'intervallo 73-109% con RSD inferiori al 10%. Il *dipstick* è stato validato per confronto con analisi LC-MS/MS mostrando una percentuale di falsi positivi inferiore o uguale al 13% e nessun falso negativo. Considerando inoltre che l'analisi delle 6 micotossine viene completata in meno di 30 minuti essa rappresenta una valida alternativa, oggi commercialmente disponibile, per lo screening rapido di micotossine in cereali, di facile realizzazione e a basso costo.

## Spettroscopia FT-NIR per la determinazione del DON

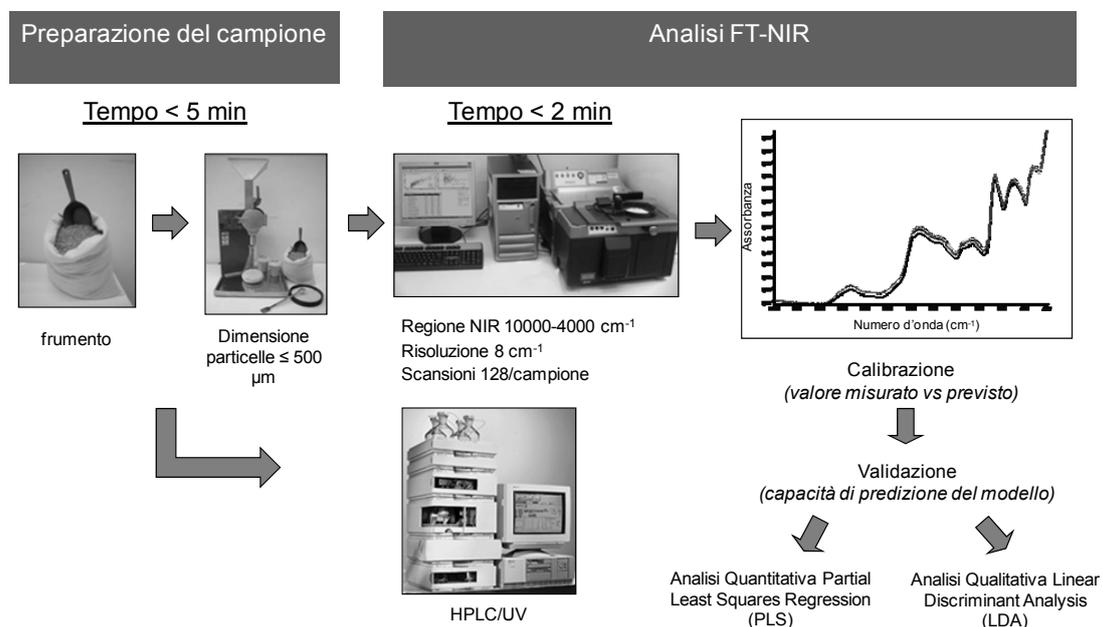
Tra i metodi di analisi non distruttivi la spettroscopia nel vicino infrarosso (*Near InfraRed*, NIR) è una delle tecniche maggiormente impiegate in campo agro-alimentare. Inoltre, la spettroscopia NIR in trasformata di Fourier (FT-NIR) ha il vantaggio, rispetto alla spettroscopia tradizionale, di analizzare simultaneamente e in maniera rapida tutte le frequenze dello spettro, migliorando così il rapporto segnale/rumore, l'accuratezza e la precisione nella discriminazione delle lunghezze d'onda.

È stato condotto uno studio preliminare al fine di valutare l'applicabilità della spettroscopia in riflettanza FT-NIR all'analisi semi-quantitativa di campioni di frumento a diverso contenuto di DON (7). I campioni in forma di cariossidi sono stati finemente macinati per ottenere una distribuzione granulometrica omogenea (< 500 µm) e analizzati mediante FT-NIR e parallelamente con un metodo di riferimento HPLC/UV (Figura 3).

Il modello statistico di regressione dei minimi quadrati parziali (PLS, *Partial Least Squares*) è stato applicato all'analisi di circa 150 campioni di frumento (set di calibrazione) naturalmente contaminati da DON nell'intervallo compreso tra 50 e 3000 µg/kg. Il potere predittivo del modello PLS sviluppato, testato su un set indipendente di circa 50 campioni (set di validazione)

di frumento a contenuto incognito di DON, ha dimostrato una “discreta” applicabilità della spettroscopia FT-NIR all’analisi di DON nel frumento. Il metodo è stato successivamente implementato sia includendo un numero maggiore di campioni di frumento che ampliando l’intervallo dei livelli di contaminazione. Lo studio complessivo è stato condotto su un totale di 465 campioni di frumento duro (233 in calibrazione e 232 in validazione) naturalmente contaminati da DON a livelli compresi tra 50 µg/kg e 16000 µg/kg, di differenti varietà e provenienti da diverse regioni italiane e annate agrarie. Il modello statistico PLS ha dimostrato una predizione “approssimativa” del contenuto di DON nei campioni testati.

Risultati migliori sono stati ottenuti con l’applicazione del modello statistico dell’analisi discriminante lineare (LDA, *Linear Discriminant Analysis*) per lo screening dei campioni di frumento sulla base del contenuto di DON. Il potere discriminante del modello LDA, espresso come % di campioni correttamente classificati, è risultato pari all’89% utilizzando un limite di cut-off pari a 1500 µg/kg, con un numero di falsi negativi e positivi rispettivamente del 7% e 4%.



**Figura 3. Schema di analisi ed elaborazione dati ottenuti mediante spettroscopia FT-NIR per il DON nel frumento**

In definitiva si può affermare che la spettroscopia FT-NIR può essere utilizzata per lo screening dei campioni di frumento duro a differente contenuto di DON. Inoltre, la rapidità di analisi, la quasi totale assenza di una fase di preparazione del campione e i costi relativamente contenuti fanno della spettroscopia FT-NIR un potenziale strumento di analisi in grado di implementare la fase di controllo delle materie prime.

## Conclusioni

Gli sviluppi tecnologici degli ultimi anni nell'analisi di micotossine hanno consentito lo sviluppo di un elevato numero di metodi analitici, a partire dai metodi HPLC, e ai più recenti metodi LC-MS, fino ai metodi rapidi basati principalmente su tecniche di tipo immunochimico.

I metodi di analisi recentemente sviluppati presso l'ISPA-CNR, basati su nuove tecniche quali l'UPLC<sup>TM</sup>, la LC-HRMS, il *multiplex dipstick*, la polarizzazione di fluorescenza, la spettroscopia FN-NIR sono esempi significativi di innovazione tecnologica applicati con successo all'analisi delle micotossine in matrici alimentari.

## Bibliografia

1. Pascale M, Panzarini P, 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.
2. Lattanzio VMT, Della Gatta S, Godula M, Visconti A. Quantitative analysis of mycotoxins in cereal foods by collision cell fragmentation-high-resolution mass spectrometry: performance and comparison with triple-stage quadrupole detection. *Food Addit Contam* 2011;10:1424-37.
3. Monaci L, De Angelis E, Visconti A. Determination of deoxynivalenol, T-2 and HT-2 toxins in a bread model food by liquid chromatography-high resolution-Orbitrap-mass spectrometry equipped with a high-energy collision dissociation cell. *J Chromatogr A* 2011;1218:8646-54.
4. Lattanzio VMT, Nivarlet N, Lippolis V, Della Gatta S, Huet AC, Delahaut P, Granier B, Visconti A. Multiplex dipstick immunoassay for semi-quantitative determination of *Fusarium* mycotoxins in cereals. *Anal Chim Acta* 2012;718:99-108.
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. *Anal Bioanal Chem* 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, 9 marzo 2006.
7. De Girolamo A, Lippolis V, Nordkvist E, Visconti A. Rapid and non-invasive analysis of deoxynivalenol in durum and common wheat by Fourier-Transform Near Infrared (FT-NIR) spectroscopy. *Food Addit Contam* 2009;26:907-17.

# APPLICAZIONE DEI PRINCIPI HACCP NEL CONTROLLO DELLE MICOTOSSINE NELLE PRODUZIONI ALIMENTARI

Daniela Maurizi  
Gruppo Maurizi srl, Roma

## Introduzione

Il processo evolutivo della sicurezza alimentare ha attraversato diversi momenti importanti caratterizzati da tappe fondamentali che hanno segnato dei cambi di direzione strategici per arrivare all'attuale impostazione. Prima dell'introduzione della Direttiva europea 93/43/CEE sull'igiene dei prodotti alimentari, la normativa aveva un approccio prevalentemente verticale e i controlli ufficiali un approccio ispettivo rivolto principalmente agli aspetti microbiologici delle materie prime e del prodotto. La citata direttiva comunitaria, che in Italia fu recepita con il DL.vo 155/1997, introdusse nell'ambito della sicurezza alimentare, un approccio proattivo attraverso una norma di tipo orizzontale che abbracciava virtualmente tutta la normativa verticale. In Italia, come negli altri paesi della Comunità Europea, si cominciò a parlare della metodologia HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*) (1) quale strumento necessario e indispensabile per spostare l'attenzione degli attori della filiera su tutte le fasi del processo produttivo. Questi primi anni di applicazione hanno contribuito a mettere in luce pregi e difetti di una direttiva e delle relative norme di recepimento dei diversi Stati membri, fino ad arrivare ad un'altra tappa importante che ha segnato il processo evolutivo della sicurezza alimentare in maniera indelebile e irreversibile. Nel 2002 la Comunità Europea emana il Regolamento CE 178/2002 "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". Questo regolamento e i successivi, arrivati per la maggior parte nel 2004, hanno dato vita a quel corpus normativo meglio noto con il nome di "Pacchetto Igiene" che ha avuto il merito di introdurre un metodo ancora più sistemico stabilendo il cosiddetto approccio "Dai Campi alla Tavola". Il nuovo "pacchetto" di norme porta quindi, non solo l'esperienza di un rodaggio durato quasi 10 anni, ma amplia il raggio di azione con l'obiettivo di un controllo di filiera in tutte le fasi del processo produttivo, a partire dalla produzione primaria, e ribadisce il controllo delle fasi critiche quale strumento di maggior efficacia per garantire il controllo sanitario degli alimenti.

In questo contesto il Gruppo Maurizi srl, evoluzione della Enoagrarria sas operante dal 1971, ha vissuto da protagonista, e continua a farlo, le diverse tappe di questo processo evolutivo al fianco dei propri clienti delle aziende alimentari. Il team di progettazione e sviluppo dell'area Sicurezza Alimentare del Gruppo Maurizi srl, studia e progetta sistemi HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*) che possano essere sempre più efficaci ed efficienti con l'obiettivo di garantire un elevato livello di sicurezza alimentare ma soprattutto, cercando di conciliare e ottimizzare il tempo, le risorse umane e quindi le risorse economiche.

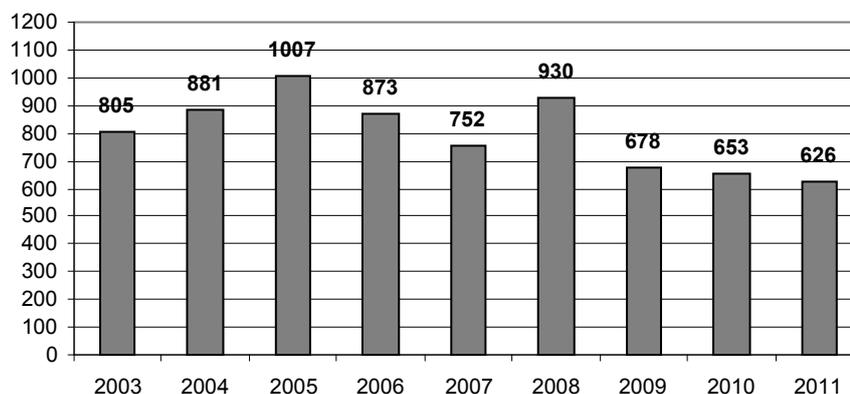
## Metodologia di lavoro ed esposizione dei risultati

Il gruppo di lavoro per la sicurezza alimentare del Gruppo Maurizi srl, nell'affrontare il pericolo micotossine nella progettazione dei diversi piani HACCP dei propri clienti, utilizza come punto di partenza le informazioni derivanti dal sistema di allerta comunitario (*Rapid Alert System for Food and Feed*, RASFF) e dalle normative che regolano questo settore. Da queste fonti, e in particolare dalla Relazione sul Sistema di Allerta comunitario 2011 pubblicato dal Ministero della Salute (2) è stato possibile ricavare dati relativi alla distribuzione del pericolo micotossine legato ai principali alimenti (Tabella 1) e la distribuzione dei Paesi considerati maggiormente a rischio in riferimento a specifiche derrate (es. Turchia, Iran, Brasile, India, Nigeria, Ghana, Egitto, Vietnam, Cina, ecc.). Questi ultimi dati sono stati ricavati principalmente dai riferimenti normativi (3-5) e dal portale RASFF (<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/index.cfm?event=notificationsList>).

**Tabella 1. Principali micotossine e loro distribuzione nelle derrate alimentari**

Micotossine	Distribuzione nelle derrate
Aflatossine	Granelle di cereali, arachidi, frutta a guscio, frutta secca, granturco, riso, spezie
Ocratossine	Cereali, caffè, legumi, frutta secca, vini, spezie, liquirizia
Patulina	Mele e prodotti derivati, succhi di frutta
Deossinivalenolo	Cereali e prodotti derivati
Fumonisine	Cereali e prodotti derivati
Zearalenone	Cereali e prodotti derivati, mais

Il numero delle allerte notificate al RASFF in questi ultimi anni (Figura 1) offre un quadro in netto miglioramento soprattutto a partire dal 2009 anno di introduzione di alcune norme specifiche di controllo effettuate ai confini dell'Unione Europea.



**Figura 1. Allerte (n.) per le micotossine in Europa (2003-2011)**

È importante sottolineare che la principale causa delle allerte sono le aflatossine (92% nel 2011, 95,3% nel 2010) e che la maggior parte delle allerte riguardano la frutta secca e snack (389 notifiche nel 2011, 486 nel 2010).

Nell'approccio allo studio e progettazione di un sistema HACCP oltre ai dati sopra citati è necessario tenere presente le condizioni di sviluppo delle micotossine ovvero la temperatura, l'acqua libera (*Water Activity, Aw*), l'umidità e naturalmente il tempo. Procedendo con l'analisi del pericolo, e relativa valutazione del rischio, per ogni fase di un processo produttivo, si possono decidere alcune azioni legate al processo tecnologico (es. tempo e temperatura di essiccazione) o ambientali (es. condizioni ambiente di stoccaggio) o azioni di controllo sul prodotto finale attraverso test rapidi. Nella nostra esperienza di consulenza abbiamo avuto modo di affrontare realtà produttive di diverse tipologie quale produzione pane e prodotto da forno, confezionamento spezie, imbottigliamento vino, produzione pasta secca, torrefazione caffè, produzione di prodotti a base latte.

Nella Figura 2 si offre un esempio di diagramma di flusso per la produzione di pistacchi. Tale sistema è riproducibile per qualsiasi produzione con le dovute differenze. Come evidenziato dalla Figura 2, all'inizio di un qualsiasi processo produttivo, ci sono le buone pratiche agricole (*Good Agricultural Practices, GAP*) che più di ogni altra hanno influenza sulla contaminazione iniziale della derrata alimentare e sul possibile sviluppo. Qualsiasi azione messa successivamente in atto, sia attraverso un controllo mirato e definito (*Critical Control Points, CCP*), sia come buone norme di lavorazione (*Good Manufacturing Practices, GMP*) ha poco impatto se la contaminazione iniziale è alta.

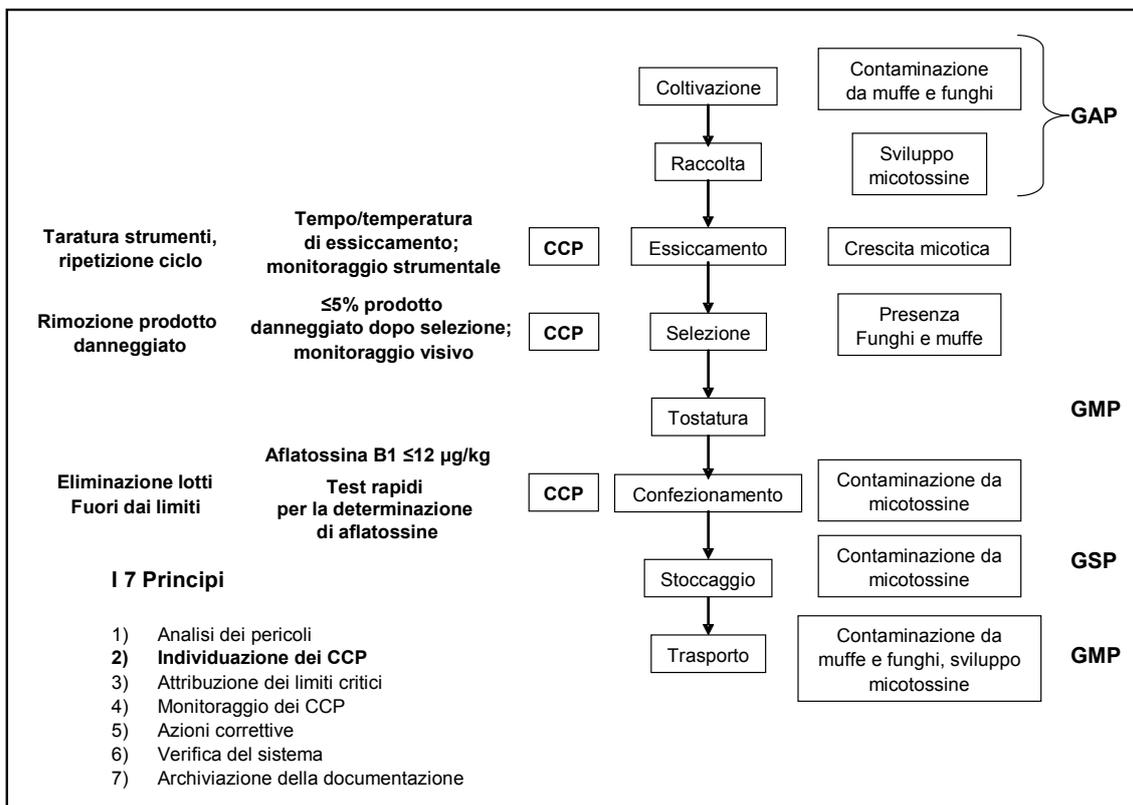


Figura 2. Produzione di pistacchi tostati: esempio schematico di applicazione del sistema HACCP

Quest'ultima considerazione, relativa alle materie prime e alla loro provenienza, è stata l'inizio di un approfondimento per l'applicazione della metodologia HACCP. Nella nostra pluriennale esperienza, infatti, ci siamo trovati a dover affrontare processi produttivi perfetti,

che non riuscivano a garantire un risultato nei limiti di legge consentiti, a causa di una eccessiva contaminazione della materia prima.

La nostra attenzione si è quindi spostata sempre di più a monte del processo produttivo, ovvero alla qualifica del fornitore e del relativo prodotto. Quando un'azienda alimentare deve valutare un fornitore e la sua materia prima, l'ufficio acquisti pensa alla sua convenienza economica mentre, l'ufficio produzione/qualità, pensa alle caratteristiche tecnologiche e anche alle garanzie che il fornitore è in grado di offrire quale valore aggiunto di quel prodotto. È possibile acquistare sempre al miglior prezzo, ma bisogna valutare l'esposizione che questa scelta può comportare per l'azienda, in termini di spese legate, sia al processo di controllo (es. analisi di laboratorio), che ad un eventuale impatto commerciale che può provocare un ipotetico ritiro dal mercato del prodotto finito se non addirittura un richiamo. Per quanto semplice e di immediata comprensione, questo concetto ha stentato ad essere tenuto nella giusta considerazione da parte dei responsabili acquisti per molto tempo. La nostra esperienza, anche nel campo delle certificazioni volontarie nell'ambito della sicurezza alimentare (*International Food Standard*, IFS; *British Retail Consortium*, BRC; *International Organization for Standardization*, ISO), ha dato un contributo fondamentale al nostro approccio sistemico sottoforma di sostegno al quale appellarsi per ottenere il risultato desiderato. La UNI EN ISO 22000:2005 *Sistemi di gestione per la sicurezza alimentare* (6) è una norma volontaria appartenente al sistema ISO al quale aderiscono 164 Paesi. Tale norma si è particolarmente diffusa nell'ambito della ristorazione collettiva. IFS version 6 *International Food Standard* (7) è una norma volontaria privata alla quale aderiscono i principali retailers francesi, tedeschi e italiani. BRC vs 6 *Global Standard for Food Safety* (8) è una norma volontaria privata alla quale aderiscono i principali retailers del mondo anglosassone. Si riportano i requisiti previsti dalle tre norme, in riferimento alla qualifica dei fornitori e materia prima, al fine di assicurare una valida analisi dei pericoli e una conseguente gestione del rischio:

– ISO 22000:2005

7.3.3.1. Tutte le materie prime, ingredienti e materiali a contatto con il prodotto devono essere descritti in documenti nella misura necessaria per eseguire l'analisi dei pericoli, inclusi i seguenti elementi:

- Caratteristiche biologiche, chimiche e fisiche
- Composizione degli ingredienti di formulazione compresi additivi e coadiuvanti tecnologici
- Origine
- Metodo di produzione
- Imballaggio e metodo di distribuzione
- Condizioni di immagazzinamento e vita di scaffale
- Preparazione e/o manipolazione prima dell'utilizzo o lavorazione
- Criteri di accettazione relativi alla sicurezza alimentare o specifiche dei materiali e degli ingredienti acquistati adatte per gli utilizzi previsti.

– IFS vs 6

4.4.4.1. L'azienda deve controllare i processi di approvvigionamento per assicurare che tutti i materiali e i servizi di provenienza esterna, che hanno impatto sulla sicurezza e qualità dei prodotti alimentari siano conformi ai requisiti

4.4.1.3. La procedura di approvazione e monitoraggio deve comprendere criteri di valutazione chiari come: audit, certificati di analisi, affidabilità del fornitore e reclami

4.2.1.2. Saranno disponibili e in atto specifiche relative a tutte le materie prime (ingredienti, additivi, materiali per il confezionamento, semilavorati). Le specifiche saranno aggiornate, prive di ambiguità, accessibili e conformi ai requisiti legali.

– *BRC vs 6*

- 3.5.1. L'azienda deve adottare un efficace sistema di approvazione e monitoraggio dei fornitori per garantire che tutti i potenziali pericoli associati alle materie prime siano adeguatamente valutati e gestiti per quanto riguarda la sicurezza, legalità e qualità del prodotto finito
- 3.5.1.1. L'azienda deve adottare una procedura documentata per la valutazione del rischio associato a ciascuna materia prima al fine di identificare potenziali pericoli. Si deve tener conto di: contaminazione da allergeni, corpi estranei, microbiologica, chimica. Deve essere tenuta in debita considerazione l'importanza di una certa materia prima per la qualità del prodotto finale. La valutazione del rischio deve costituire la base dei criteri di accettazione delle materie prime, delle analisi e delle procedure adottate per l'approvazione e il controllo dei fornitori
- 3.6.1 Le specifiche delle materie prime devono essere adeguate e dettagliate e conformi ai requisiti di sicurezza e legislativi. Tali specifiche devono includere le definizioni dei limiti che potrebbero influire sulla qualità o sicurezza del prodotto finale.

Come si può notare, dal confronto delle tre norme volontarie, c'è una puntuale richiesta di valutazione, e quindi di particolare attenzione, per tutte le materie prime attraverso diversi aspetti da considerare che, in ogni caso, non prescindono da una descrizione documentata delle stesse (schede tecniche o specifiche tecniche). I criteri di valutazione diventano quindi oggettivi, basati su informazioni messe a disposizione dal fornitore. Tali informazioni sono alla base dello studio dei pericoli di ogni sistema HACCP aziendale da cui scaturiscono i controlli più puntuali, come il ricevimento delle materie prime all'arrivo in azienda, sia in forme di controllo più ampie, come l'attività di audit presso il fornitore stesso o periodici controlli analitici volti alla verifica di quanto concordato attraverso la documentazione che accompagna la qualifica di un fornitore e del suo prodotto.

Indipendentemente dalla norma volontaria di riferimento che, come abbiamo detto, può essere un valido supporto, un sistema HACCP deve interrogarsi sui fornitori e sulle materie prime. Dovrà essere quindi valutata l'affidabilità del fornitore: possiede ad esempio una o più delle certificazioni volontarie che abbiamo citato? È disponibile a fornire, senza ritardi, le informazioni che gli vengono richieste? È disponibile a ricevere una visita (audit) in azienda per valutare la sua affidabilità? Analogamente dovrà essere valutata la materia prima: sono disponibili esaustive e dettagliate schede/specifiche tecniche? La materia prima proviene da un Paese a rischio? Il fornitore esegue periodiche analisi per la ricerca delle micotossine? È disposto a darne copia? Per ricevere risposte esaurienti a queste domande è stato necessario predisporre una procedura nei nostri sistemi HACCP che, partendo da un sistema di autocertificazione del fornitore con allegata la scheda tecnica del prodotto, porta alla sua qualifica. Ricordiamo che un'autocertificazione per essere valida, oltre a contenere tutti i riferimenti aziendali e l'ottemperanza a tutte le norme applicabili, deve essere timbrata e firmata in originale da persona di cui è indicata la funzione e che ne abbia l'autorità. Una scheda/specifica tecnica di un prodotto è la carta di identità e descrive non solo cosa l'azienda sta comprando, ma anche le garanzie che l'azienda è in grado di offrire sul quel prodotto: dichiarazioni cross contamination da allergeni, parametri analitici di ricerca e relativa frequenza e limiti (nel caso di nostro interesse le micotossine), origine della materia prima principale, ecc. Anche una scheda/specifica tecnica deve essere timbrata, datata e firmata per assumere una sua validità. Il concetto di validità che qui si evoca, è legato alla possibilità di far valere la documentazione ricevuta quale effettivo scarico di responsabilità in caso di necessità.

Questo sistema, apparentemente semplice, presenta delle problematiche legate soprattutto alla competenza di chi gestisce questi documenti, che sono:

- carenza di competenza da parte di chi gestisce la documentazione;
- frequente presenza di specifiche tecniche con scarse informazioni di natura più commerciale;
- scarsa competenza da parte di chi riceve richieste di autocertificazione o di specifiche tecniche;
- scarsa attenzione di chi archivia i documenti (modulo di autocertificazione, specifiche tecniche, analisi).

La risoluzione delle problematiche descritte si affronta con competenza e pazienza: solo la continua formazione delle persone coinvolte in questo processo porta alla fine al risultato atteso. Nella Tabella 2 è riportato uno schema di gestione delle problematiche.

**Tabella 2. Schema di gestione delle problematiche**

Documento	Problematica	Risoluzione
Modulo di autocertificazione	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mancato invio (spesso ci sono intermediari commerciali)</li> <li>• Invio con i soli dati aziendali</li> <li>• Invio senza firma e/o timbro</li> </ul>	“Educazione del fornitore”: Contatto telefonico per spiegare la richiesta e farsi mandare la documentazione corretta. Cercare di parlare con l giusto interlocutore. Non stancarsi nel ripetere la richiesta
Schede/ Specifiche tecniche	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mancato invio</li> <li>• Invio con informazioni carenti o non esaustive</li> </ul>	“Educazione del fornitore”: Contatto telefonico per spiegare la richiesta e farsi mandare la documentazione corretta. Cercare di parlare con l giusto interlocutore. Non stancarsi nel ripetere la richiesta
Certificati di analisi di laboratorio/ Rapporti di prova	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mancato invio</li> <li>• Invio con data superiore ad un anno</li> <li>• Invio di altri parametri rispetto a quelli richiesti</li> </ul>	Rinnovare la richiesta Contatto telefonico per spiegare la richiesta e farsi mandare la documentazione corretta Cercare di parlare con l giusto interlocutore.

## Conclusioni

Fermo restando il contributo delle GAP, il pericolo delle micotossine e relativo rischio, nelle aziende alimentari, può essere notevolmente abbattuto attraverso:

- accurato studio del proprio prodotto e delle singole materie prime che lo compongono
- sistematica e rigorosa qualificazione del fornitore
- Sistematica e rigorosa qualificazione della materia prima
- applicazione del sistema HACCP per ogni fase e definizione misure di controllo
- applicazione di un sistema di verifica e controllo dell’intero sistema

## Bibliografia

1. Joint FAO/WHO Food Standards Programme – Codex Alimentarius Commission. *Codex Alimentarius, Food hygiene basic texts*. Roma: FAO; 1997. Disponibile all’indirizzo <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/005/Y1579e/Y1579e.pdf>; ultima consultazione 10/10/12
2. Direzione Generale Igiene Sicurezza degli Alimenti e la Nutrizione. *Relazione sul Sistema di Allerta Comunitario 2011*. Roma: Ministero della Salute; 2011. Disponibile all’indirizzo:

[http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pubblicazioni\\_1681\\_allegato.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1681_allegato.pdf); ultima consultazione 10/10/12

3. Europa. Regolamento CE 1152/2009 e smi che stabilisce condizioni particolari per l'importazione di determinati prodotti alimentari da alcuni paesi terzi a causa del rischio di contaminazione d aflatoSSine e che abroga la decisione 2006/504/CE. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L 313*, 28 novembre 2009.
4. Europa. Regolamento CE 669/2009 e smi recante modalità di applicazione del Regolamento CE 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 504/2006/CE della Commissione. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L 194*, 25 luglio 2009.
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*, 20 dicembre 2006.
6. UNI EN ISO 22000:2005. *Sistemi di gestione per la Sicurezza Alimentare- Requisiti per qualsiasi organizzazione nella filiera alimentare*. Milano: Ente Nazionale di Unificazione; 2005
7. International Featured Standard. *IFS Food. Standard per gli audit dei fornitori di prodotto a marchio dei distributori. Versione 6*. Berlino: IFS Management GmbH; 2012.
8. BRC Global Standard for Food Safety, version 6. British Retail Consortium; 2011.

# CONFRONTO TRA MOLITURA A SECCO E AD UMIDO PER IL TRATTAMENTO DEL CAMPIONE DI LABORATORIO NELL'ANALISI DI OCRATOSSINA A E DEOSSINIVALENOLO IN FRUMENTO

Stefania Valenzano, Michelangelo Pascale, Vincenzo Lippolis, Angelo Visconti  
Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari

## Introduzione

L'ocratossina A (OTA) e il deossinivalenolo (DON) sono tra le micotossine quelle più frequentemente ritrovate nei cereali, e in particolare nel frumento, con documentata tossicità per l'uomo e gli animali (1). Al fine di ridurre il rischio di esposizione del consumatore a tali micotossine, l'Unione Europea ne ha stabilito i valori massimi ammissibili in diversi cereali e prodotti derivati (2).

Le procedure di campionamento per il controllo ufficiale dei livelli di tali micotossine nei cereali sono definite a livello comunitario dal Regolamento (CE) 401/2006 (3). In particolare, per lotti di cereali superiori a 20 t devono essere raccolti almeno 100 campioni elementari a formare un campione globale del peso di circa 10 kg (campione di laboratorio) che è rappresentativo dell'intero lotto. Il campione di laboratorio deve essere macinato finemente e accuratamente mescolato utilizzando un metodo che ne garantisca un'omogeneizzazione completa. Questa fase di preparazione del campione, specialmente per campioni in forma granulare come nel caso dei cereali, può influenzare in maniera significativa l'accuratezza e la precisione dell'analisi. L'analisi viene, infatti, condotta su una porzione di tale campione, generalmente compresa tra i 25 e i 100 g, assumendo che la concentrazione determinata in questa aliquota sia uguale a quella del campione di laboratorio. La preparazione del campione da sottoporre ad analisi, a partire dal campione di laboratorio, viene generalmente condotta mediante due differenti approcci: molitura a secco, dove alla fase di macinazione segue una di omogeneizzazione e molitura ad umido (*slurry*), dove macinazione e omogeneizzazione vengono realizzate simultaneamente utilizzando generalmente una quantità di acqua equivalente a quella del campione di laboratorio.

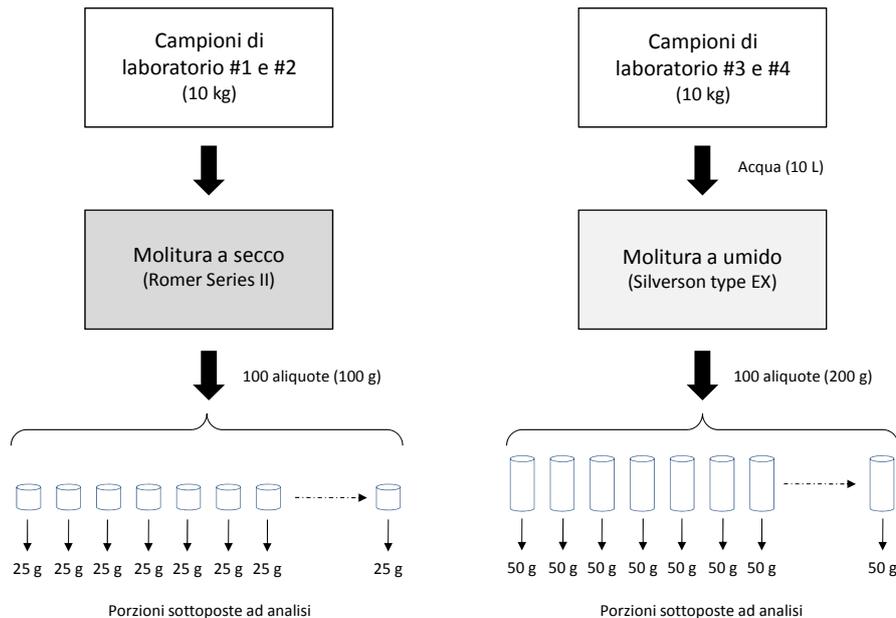
Lo studio condotto presso l'Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA) del CNR è stato finalizzato alla valutazione del migliore approccio di preparazione del campione, tra molitura a secco e molitura ad umido, nell'analisi di OTA e DON in campioni di frumento naturalmente contaminati (4).

## Materiali e metodi

Lo studio è stato condotto su campioni di frumento duro naturalmente contaminati da DON o da OTA, ottenuti secondo le modalità di campionamento previste dal Regolamento (CE) 401/2006 (3) a costituire dei campioni di laboratorio del peso di 10 kg ciascuno.

Al fine di valutare le condizioni più idonee di preparazione del campione da sottoporre ad analisi sono stati condotti due diversi esperimenti. Nel primo esperimento due campioni di

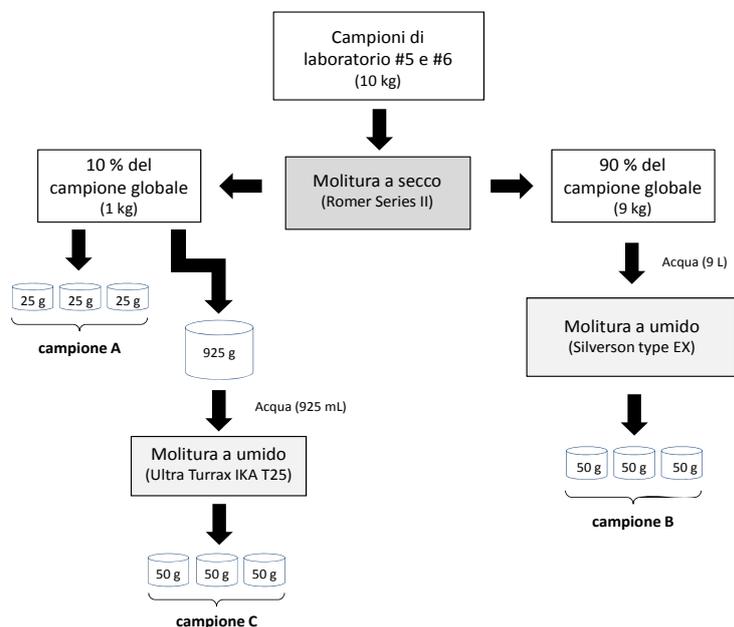
laboratorio contaminati rispettivamente da DON (campione 1) e da OTA (campione 2) sono stati macinati a secco con molino Romer Series II (Romer Labs Diagnostic GmbH, Austria) e, dopo un'accurata omogeneizzazione manuale del macinato, sono state preparate 100 aliquote del peso di circa 100 g da sottoporre ad analisi. Contestualmente, altri due campioni di laboratorio contaminati rispettivamente da DON (campione 3) e da OTA (campione 4) sono stati sottoposti a molitura ad umido con miscelatore ad alta azione di taglio Silverson EX (Silverson Machines LTD, UK) per 10 minuti, previa aggiunta di 10 L di acqua (rapporto 1:1). Dallo *slurry* ottenuto sono state preparate 100 aliquote del peso di circa 200 g da sottoporre ad analisi (Figura 1).



**Figura 1. Rappresentazione schematica della preparazione dei campioni - primo esperimento.**  
(Figura tratta da Lippolis et al., 2012 - Rif. 4; © 2012 by AOAC International)

La seconda prova sperimentale è stata condotta a partire da altri due campioni di laboratorio contaminati rispettivamente da DON (campione 5) e OTA (campione 6). Ciascun campione è stato sottoposto a macinazione a secco con molino Romer Series II in modo tale da ottenere, mediante un meccanismo di divisione del campione, due sottocampioni di grandezza differente, corrispondenti rispettivamente al 10% e al 90% del campione globale. Tale procedura riproduce le modalità operative di un laboratorio di analisi preposto al controllo e al ricevimento di un campione di laboratorio di 10 kg. Nel caso specifico l'analisi del contenuto di micotossina viene eseguita su aliquote (20-100 g) prelevate dalla porzione corrispondente al 10% del campione globale. Al fine di valutare l'applicabilità di tale procedura di preparazione del campione alla determinazione di DON e di OTA in frumento, sono stati confrontati i valori di contaminazione ottenuti analizzando tre aliquote (25 g) della porzione corrispondente al 10% del campione globale (campione A, Figura 2) e tre aliquote (50 g) dello *slurry* ottenuto in seguito ad omogeneizzazione con acqua (rapporto 1:1) della porzione corrispondente al 90% del campione globale (campione B, Figura 2). Inoltre, per poter calcolare il valore pesato della contaminazione da micotossina si è condotta un'analisi in triplicato anche della porzione residua del 10% del campione globale previa molitura ad umido (campione C, Figura 2).

Il contenuto di DON e di OTA è stato valutato sottoponendo tutte le aliquote ottenute ad analisi HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), previa purificazione degli estratti con colonne ad immunoaffinità (5, 6).



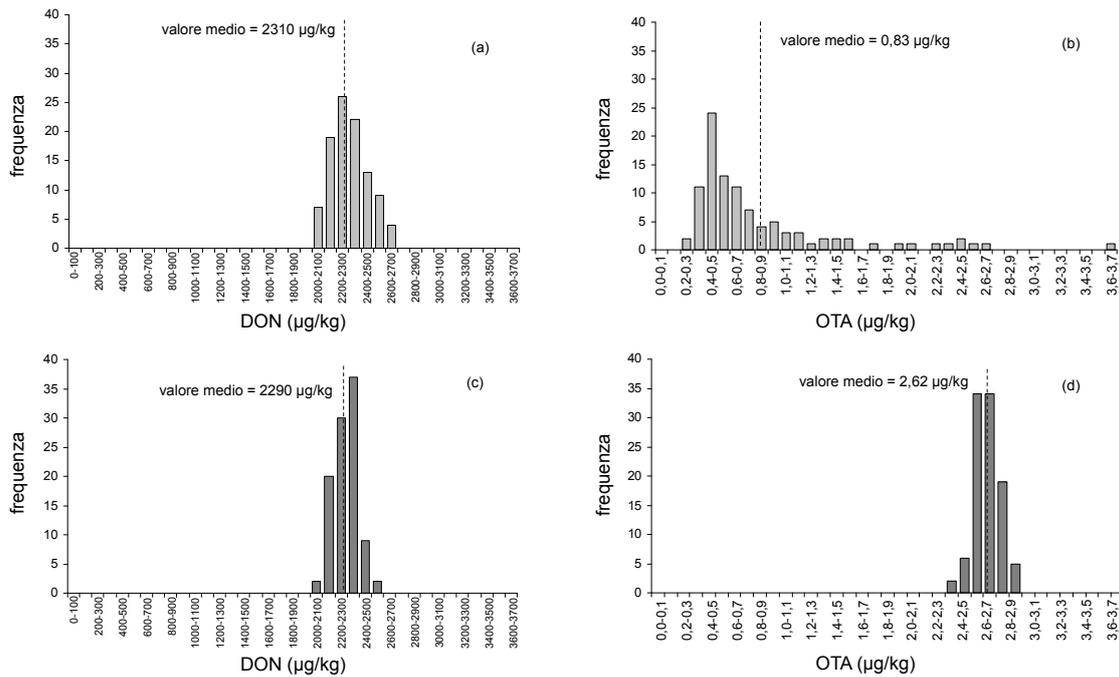
**Figura 2. Rappresentazione schematica della preparazione dei campioni - secondo esperimento.**  
(Figura tratta da Lippolis et al., 2012 - Rif. 4; © 2012 by AOAC International)

## Risultati e discussione

La Figura 3 mostra gli istogrammi delle distribuzioni di frequenza dei livelli di DON e OTA nelle aliquote ottenute per molitura a secco (Figure 3a e 3b) e per molitura ad umido (Figure 3c e 3d), relative al primo esperimento.

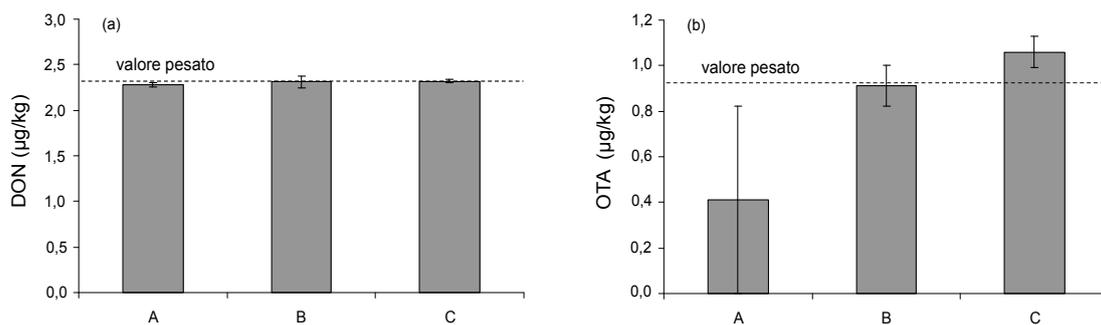
Applicando la procedura di molitura a secco si è osservato un valore medio di DON pari a 2310  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , con un coefficiente di variazione (CV) del 6,4% e mediana di 2290  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , mentre applicando la procedura di molitura ad umido il valore medio di DON è risultato pari a 2290  $\mu\text{g}/\text{kg}$  con CV del 4,6% e mediana di 2290  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . La buona ripetibilità dei risultati osservata con entrambe le modalità di preparazione del campione fa supporre che la contaminazione da DON nel campione di laboratorio, del peso complessivo di 10 kg, risulta omogenea tra le parti molite, indipendentemente dalla tipologia di molitura adottata.

Relativamente alla contaminazione da OTA, le aliquote ottenute per molitura a secco hanno evidenziato un valore medio di contaminazione pari a 0,83  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , con un'elevata variabilità dei risultati (CV = 75,2%) e una mediana di 0,60  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , mentre le aliquote ottenute per molitura a umido hanno presentato lo stesso valore di media e mediana pari 2,62  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , con una buona ripetibilità dei risultati (CV = 4,0%). Dalle analisi condotte si può evincere che la distribuzione di OTA nel campione macinato a secco risulta estremamente disomogenea, in accordo con quanto precedentemente riportato da Biselli *et al.* (7). L'uso della molitura a umido, tuttavia, consente di ridurre la variabilità associata alla natura eterogenea della contaminazione perché, convertendo la matrice in parti granulari più piccole, consente una migliore omogeneizzazione del campione (8).



**Figura 3. Distribuzione delle frequenze di contaminazione di DON (a, c) e di OTA (b, d) in campioni di frumento sottoposti a molitura a secco (a, b) e a molitura a umido (c, d). Le linee tratteggiate indicano i valori medi di contaminazione (Figura tratta da Lippolis et al., 2012 - Rif. 4; © 2012 by AOAC International)**

Con riferimento al secondo esperimento, in Figura 4 sono riportati i grafici relativi ai valori di contaminazione media delle due micotossine nel sottocampione corrispondente al 10% del campione globale ottenuto mediante molitura a secco (campione A) e nei due sottocampioni ottenuti mediante molitura ad umido della porzione corrispondente al 90% del campione globale (campione B) e della porzione residua del sottocampione A (campione C). In figura sono inoltre riportate le deviazioni standard, sottoforma di barre di errore, e i valori pesati di contaminazione ottenuti dalla media ponderale dei risultati ottenuti.



**Figura 4. Valori medi di contaminazione di DON (a) e OTA (b) riscontrati nella frazione del 10% del campione globale sottoposta a molitura a secco (campione A), nel 90% sottoposto a molitura a umido (campione B) e nella porzione residua della frazione del 10% del campione globale sottoposta a molitura a umido (campione C). Le linee tratteggiate indicano i valori pesati delle contaminazioni. Le barre di errore rappresentano i coefficienti di variazione percentuale. (Figura tratta da Lippolis et al., 2012 - Rif. 4; © 2012 by AOAC International)**

Analogamente a quanto già osservato durante il primo esperimento, l'accuratezza e la precisione dell'analisi condotta su un campione sottoposto a macinazione a secco sono diverse a seconda della micotossina testata.

Nel caso del DON, il campione preparato mediante molitura a secco (Figura 4a, campione A) e i campioni preparati mediante molitura ad umido della porzione corrispondente al 90% (Figura 4a, campione B) e della porzione residua del 10% (Figura 4a, campione C) presentano un valore medio di contaminazione pari a 2280, 2310 e 2320 µg/kg, rispettivamente. Tutti i valori di contaminazione ottenuti sono prossimi al valore pesato di 2310 µg/kg e i coefficienti di variazione percentuale risultano inferiori al 3% in tutti i casi considerati. Pertanto, si può affermare che le modalità operative normalmente adottate da un laboratorio di analisi preposto al controllo di un campione di laboratorio possono essere ragionevolmente applicate alla determinazione del DON in campioni di frumento.

Relativamente all'OTA, i campioni preparati mediante molitura ad umido della porzione corrispondente al 90% (Figura 4b, campione B) e della porzione residua del 10% (Figura 4b, campione C) presentano un valore medio di contaminazione pari a 0,91 µg/kg (CV = 10%) e 1,06 µg/kg (CV = 6%), rispettivamente, e prossimi al valore pesato di 0,92 µg/kg. Al contrario, il valore medio di contaminazione del campione preparato mediante molitura a secco (Figura 4b, campione A) risulta pari a circa la metà del valore pesato, ovvero 0,41 µg/kg, con un CV del 100%. L'elevata variabilità e la discrepanza rispetto al valore pesato sono un'ulteriore conferma che, nel caso dell'OTA, la molitura a secco mediante Romer Series II è una procedura fortemente soggetta ad errori che rischia di fornire un dato analitico non attendibile.

## Conclusioni

Due diversi approcci di preparazione del campione, molitura a secco e molitura a umido, sono stati confrontati per la determinazione di DON e OTA in frumento.

Nell'analisi del DON entrambe le procedure, applicate a campioni di laboratorio del peso di 10 kg, consentono di ottenere un dato analitico attendibile. Al contrario, nell'analisi dell'OTA la molitura a secco risulta inadeguata a causa dell'elevata disomogeneità della contaminazione e può fornire valori significativamente differenti rispetto al reale contenuto della micotossina. In tal caso quindi il ricorso alla molitura ad umido risulta indispensabile per l'ottenimento di risultati accurati e precisi e per minimizzare il rischio di non accettazione di una partita o sottopartita di frumento.

## Bibliografia

1. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *Evaluation of certain mycotoxins in food: fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. Geneva: WHO, 2002. (WHO technical report series ; 906)
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, 20 dicembre 2006.
3. 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, 9 marzo 2006.

4. Lippolis V, Pascale M, Valenzano V, Visconti M. Comparison of slurry mixing and dry milling in laboratory sample preparation for determination of ochratoxin A and deoxynivalenol in wheat. *J AOAC Int* 2012;95:452-8.
5. Neumann G, Lombaert GA, Kotello S, Fedorowich NN. Determination of deoxynivalenol in soft wheat by immunoaffinity column cleanup and LC-UV detection: interlaboratory study. *J AOAC Int* 2009; 92:181-9.
6. Entwile AC, Williams AC, Mann PJ, Slack PT. Liquid chromatographic method with immunoaffinity column cleanup for determination of ochratoxin A in barley: collaborative study. *J AOAC Int* 2000;83:1377-83.
7. Biselli S, Persin M, Syben M. Investigation of the distribution of deoxynivalenol and ochratoxin A contamination within a 26 t truckload of wheat kernels. *Mycotox Res* 2008;24:98-104.
8. Spanjer MC, Scholten JM, Kastrup S, Jorissen U, Schatzki TF, Toyofuku N. Sample comminution for mycotoxin analysis: dry milling or slurry mixing? *Food Addit Contam* 2006;23:73-83.

# MESSA A PUNTO DI UN IMMUNOSAGGIO BASATO SULLA POLARIZZAZIONE DI FLUORESCENZA PER LA DETERMINAZIONE DELLE TOSSINE T-2 E HT-2 NEL FRUMENTO

Stefania Valenzano, Vincenzo Lippolis, Michelangelo Pascale, Angelo Visconti  
Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari

## Introduzione

Le tossine T-2 e HT-2 sono tricoteceni prodotti da alcune specie di *Fusarium* (principalmente *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae* e *F. poae*) che, in condizioni ambientali favorevoli, possono colonizzare i cereali, in particolare avena, frumento, orzo e mais. Numerose indagini condotte in Europa hanno rivelato la presenza di questi contaminanti naturali in vari cereali e prodotti derivati destinati al consumo umano (1, 2). La tossina T-2 è il tricotecene con più elevata tossicità acuta e cronica in quanto è un potente inibitore della sintesi proteica e degli acidi nucleici ed ha attività ematotossica, immunosoppressiva e dermatotossica. La tossina T-2, *in vivo*, è rapidamente metabolizzata a tossina HT-2 che ha effetti tossici simili (1). La Commissione sui contaminanti nella catena alimentare (CONTAM) dell'EFSA (*European Food Safety Authority* – Autorità europea per la sicurezza alimentare) ha recentemente stabilito una TDI (*Tolerable Daily Intake*) di 100 ng/kg b.w. per la somma delle tossine T-2 e HT-2 (3). I livelli massimi ammissibili di queste tossine (espressi come somma) in cereali e derivati sono attualmente in discussione presso la Commissione Europea.

I metodi cromatografici (GC-ECD, *Gas Chromatography-Electron Capture Detector*; o MS, *Mass Spectrometry*; HPLC/FLD, *High Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detector*; o MS, UPLC<sup>TM</sup>-UV), comunemente utilizzati per la determinazione di queste tossine nei cereali, sono stati ampiamente riportati in letteratura (4-7). Sebbene questi metodi permettano un'accurata e precisa quantificazione delle tossine, essi richiedono generalmente la purificazione dell'estratto e lunghi tempi di analisi, sono costosi e non adatti per lo screening rapido dei materiali.

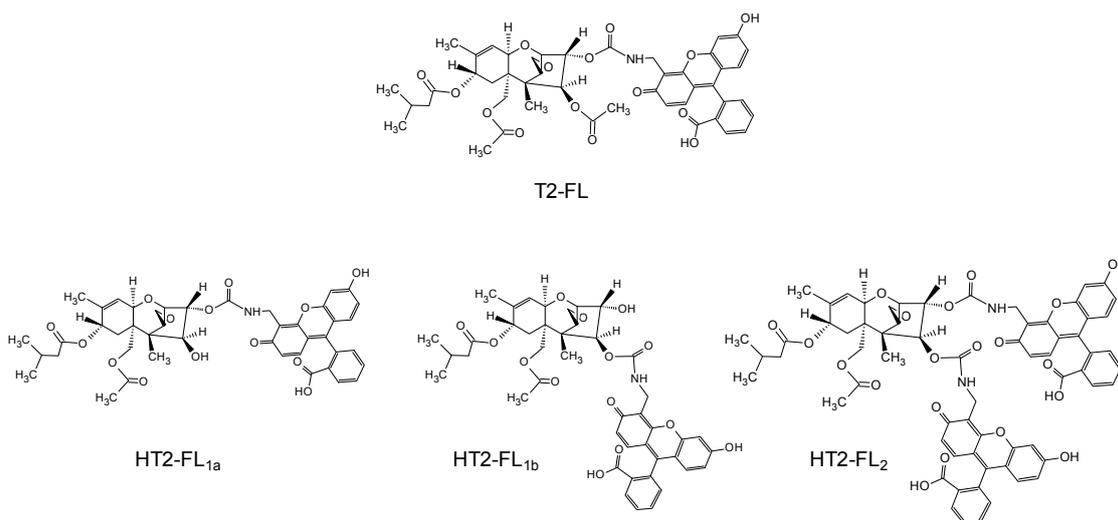
Gli immunosaggi basati sulla polarizzazione di fluorescenza (*Fluorescence Polarization*, FP) stanno ricevendo particolare attenzione per l'analisi di contaminanti chimici in matrici agroalimentari e ambientali grazie alla loro semplicità, rapidità e ai ridotti costi di analisi. La polarizzazione di fluorescenza è una misura dell'orientazione dell'emissione di fluorescenza ed è definita dall'equazione:  $P = (I_v - I_h) / (I_v + I_h)$ , dove  $I_v$  e  $I_h$  sono rispettivamente le intensità di fluorescenza misurate lungo l'asse verticale e orizzontale. La polarizzazione dipende dalla velocità di rotazione della molecola fluorescente in soluzione che a sua volta dipende dalla sua dimensione molecolare. Gli immunosaggi FP si basano sulla competizione in soluzione tra l'analita e un suo derivato fluorescente (tracciante) nei confronti di un anticorpo monoclonale specifico. Il tracciante, essendo una molecola di piccole dimensioni, ruota rapidamente in soluzione e genera bassi valori di polarizzazione. L'interazione tra tracciante e anticorpo genera un immunocomplesso di maggiore dimensione molecolare che, ruotando più lentamente, incrementa il valore di polarizzazione. La presenza di analita libero in soluzione riduce la quantità di anticorpo che può legare il tracciante e, di conseguenza, si ha un decremento del

valore di polarizzazione che pertanto risulta inversamente proporzionale alla concentrazione dell'analita.

La tecnica FP è stata applicata alla determinazione delle principali micotossine (aflatossine, ocratossina A, zearalenone, fumonisine e deossinivalenolo) in diverse matrici alimentari (8-13). Recentemente presso l'Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA) del Consiglio Nazionale delle Ricerche è stato sviluppato e validato un immunosaggio FP rapido, sensibile e affidabile per la determinazione del contenuto totale delle tossine T-2 e HT-2 in campioni di frumento (14).

## Risultati e discussione

Le sintesi dei traccianti, derivati fluorescenti delle tossine T-2 e HT-2, sono state condotte attraverso la reazione delle tossine con 4'-(aminometil)-fluoresceina previa attivazione con 1,1'-carbonildiimidazolo in accordo con quanto precedentemente riportato per la sintesi del coniugato fluorescente del deossinivalenolo (10). La reazione di sintesi ha condotto alla formazione di un unico derivato fluorescente della tossina T-2, denominato T2-FL, e di 3 derivati fluorescenti della tossina HT-2, ovvero due isomeri monosostituiti, arbitrariamente denominati HT2-FL<sub>1a</sub> e HT2-FL<sub>1b</sub>, e un prodotto disostituito, HT2-FL<sub>2</sub> (Figura 1).



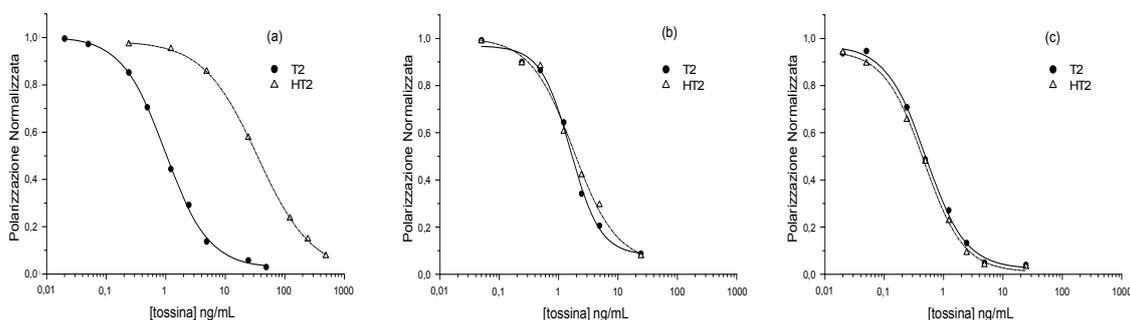
**Figura 1. Strutture chimiche dei coniugati fluorescenti della tossina T-2 (T2-FL) e della tossina H-T2 (HT2-FL<sub>1a</sub>, HT2-FL<sub>1b</sub> e HT2-FL<sub>2</sub>) (Figura tratta da Lippolis et al., 2011 - Rif. 14; per cortese concessione di Springer Sciences e Business Media)**

Dopo averne confermato l'identità mediante analisi LC-HRMS, i 4 traccianti sono stati opportunamente isolati e purificati mediante un sistema HPLC semi-preparativo.

La messa a punto dell'immunosaggio basato sulla polarizzazione di fluorescenza ha previsto lo studio delle interazioni dei 4 traccianti sintetizzati con 7 anticorpi monoclonali, 3 specifici per la tossina T-2 (cloni G10-E11, AK-T2 e 8H2) e 4 specifici per la tossina HT-2 (cloni H10-A10, C12-G8, D7-C11 e AK-HT2). In seguito all'interazione tracciante-anticorpo si verifica un

incremento del valore di polarizzazione che si esprime come  $\Delta P = mP_{\text{Mab}} - mP_{\text{Tracciante}}$ , dove  $mP_{\text{Mab}}$  rappresenta il valore del segnale di polarizzazione di fluorescenza della soluzione contenente il tracciante e l'anticorpo, mentre  $mP_{\text{Tracciante}}$  rappresenta il valore del segnale di polarizzazione di fluorescenza della soluzione contenente il solo tracciante. Sulla base dei valori di  $\Delta P_{\text{max}}$ , più elevati, sono state selezionate le combinazioni anticorpo-tracciante 8H2/T2-FL, H10-A10/HT2-FL<sub>1a</sub> e AK-HT2/HT2-FL<sub>1a</sub> per la realizzazione degli immunosaggi FP competitivi.

In Figura 2 sono riportate le curve di calibrazione relative ai saggi competitivi realizzati con soluzioni standard di tossine T-2 e HT-2 per ciascuna combinazione anticorpo-tracciante selezionata. Al fine di valutare la cinetica della competizione, la soluzione è stata periodicamente monitorata misurando la polarizzazione di fluorescenza nell'intervallo di tempo 15 s - 10 min.



**Figura 2. Curve di calibrazione ottenute con soluzioni standard di tossine T-2 e HT-2 per le combinazioni anticorpo-tracciante: a) 8H2/T2-FL, b) AK-HT2/HT2-FL<sub>1a</sub> e c) H10-A10/HT2-FL<sub>1a</sub>. (Figura tratta da Lippolis et al., 2011 - Rif. 14; per cortese concessione di Springer Sciences e Business Media)**

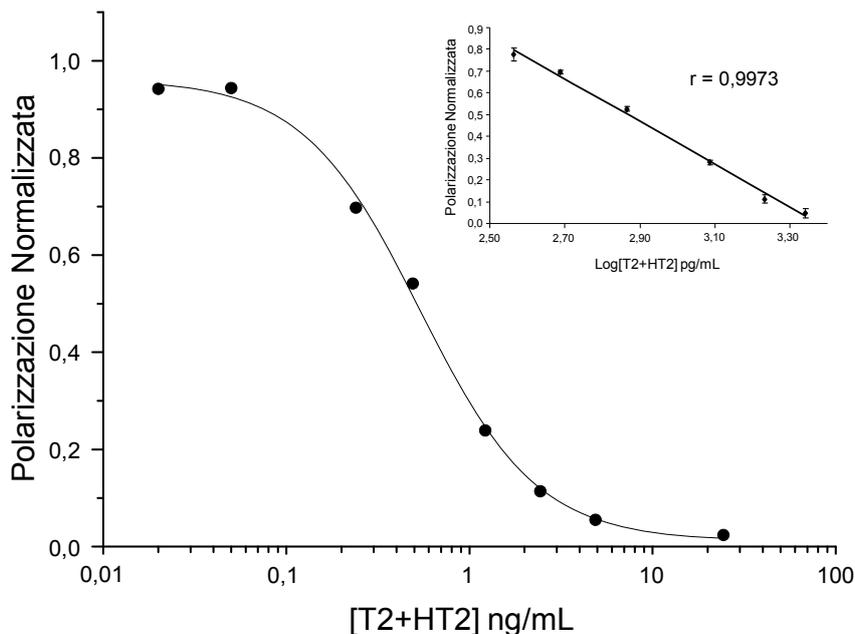
L'immunosaggio FP basato sulla combinazione anticorpo-tracciante 8H2/T2-FL (Figura 2a) mostra una bassa cross-reattività per la tossina HT-2 (2,8%,  $IC_{50} = 35$  ng/mL) rispetto alla tossina T-2 ( $IC_{50} = 0,98$  ng/mL) e questa differente selettività rende l'immunosaggio poco adatto a quantificare la somma delle due micotossine. Al contrario, la medesima cross-reattività per le tossine T-2 e HT-2 consente agli immunosaggi basati sulle combinazioni AK-HT2/HT2-FL<sub>1a</sub> (Figure 2b) e H10-A10/HT2-FL<sub>1a</sub> (Figure 2c) di quantificare adeguatamente la somma delle due tossine. Sulla base della sua migliore sensibilità, per l'ottimizzazione dell'immunosaggio FP è stata selezionata la combinazione H10-A10/HT2-FL<sub>1a</sub> ( $IC_{50[\text{H10-A10/HT2-FL}_{1a}]} = 0,54 \pm 0,04$  ng/mL vs  $IC_{50[\text{AK-HT2/HT2-FL}_{1a}]} = 1,61 \pm 0,22$  ng/mL).

Al fine di quantificare il contenuto complessivo delle due tossine, con la combinazione H10-A10/HT2-FL<sub>1a</sub> è stato realizzato un immunosaggio competitivo utilizzando soluzioni standard costituite da una miscela di pari concentrazione di tossine T-2 e HT-2 nell'intervallo di concentrazione 0,02-24,4 ng/mL (somma delle due tossine). È stata osservata una buona linearità della risposta (coefficiente di correlazione,  $r = 0,9973$ ) nell'intervallo 0,37-2,20 ng/mL con una valida ripetibilità dei risultati (coefficiente di variazione,  $CV < 10\%$ ;  $n = 3$ ) (Figura 3).

Studi condotti con micotossine strutturalmente analoghe alle tossine T-2 e HT-2 (diacetossiscirpenolo, neosolaniolo, nivalenolo, deossinivalenolo, 3-acetil-deossinivalenolo, 15-acetil-deossinivalenolo) e micotossine frequentemente ritrovate nei cereali (ocratossina A e

zearalenone) hanno evidenziato l'assenza di cross-reattività nei loro confronti a vantaggio di un'elevata specificità dell'immunosaggio FP nella determinazione delle tossine T-2 e HT-2.

Per applicare il metodo FP all'analisi di campioni di frumento è stato messo a punto un protocollo che prevede l'omogeneizzazione ad alta velocità (blending) del campione finemente macinato con una soluzione metanolo:acqua (90:10, v/v) per 2 minuti, la filtrazione su filtro di carta, la diluizione con H<sub>2</sub>O, l'ulteriore filtrazione su filtro a microfibra di vetro e l'analisi mediante immunosaggio FP, senza alcuna purificazione dell'estratto. Il tempo complessivo di analisi è risultato inferiore a 10 minuti.

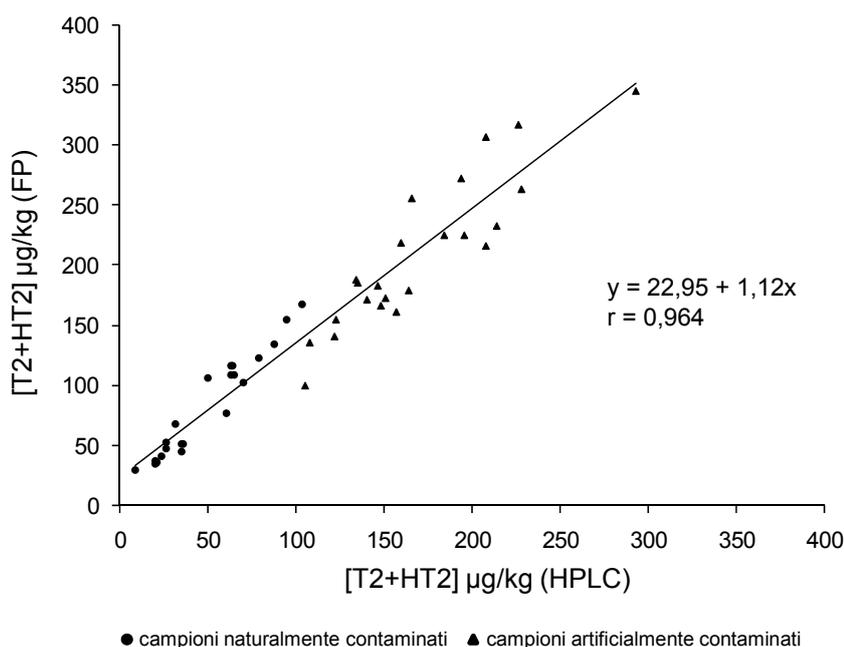


**Figura 3. Curva di calibrazione dell'immunosaggio FP che prevede l'uso della combinazione H10-A10/HT2-FL<sub>1a</sub> ottenuta con una miscela di pari concentrazione di tossine T-2 e HT-2 (esprese come somma). Nell'inserito è riportato il range di linearità del saggio. (Figura tratta da Lippolis et al., 2011 - Rif. 14; per cortese concessione di Springer Sciences e Business Media)**

Al fine di valutare la presenza di un possibile effetto matrice, la retta di regressione ottenuta con soluzioni standard di tossine T-2 e HT-2 è stata confrontata con rette di regressione ottenute aggiungendo alla soluzione da testare aliquote di estratti di frumento artificialmente contaminati nell'intervallo di concentrazione 0,37-1,71 ng/mL ed equivalenti a 3 diverse quantità di matrice (5, 10 e 20 mg). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata 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 aggiungendo 5, 10 e 20 mg di matrice. Inoltre, conducendo il saggio con 20 mg di matrice, è stato calcolato un limite di rivelabilità (LoD) pari a 8 µg/kg (somma delle due tossine) in frumento.

Per la valutazione dei valori di recupero di tossine T-2 e HT-2 da frumento, un campione esente da contaminazione è stato contaminato artificialmente a tre livelli, rispettivamente di 50, 100 e 200 µg/kg, in triplicato, e sottoposto ad analisi mediante immunosaggio FP. Sono stati

osservati valori di recupero medio del 96% con deviazioni standard relative minori dell'8%. La validazione del metodo FP sviluppato è stata, infine, realizzata analizzando 55 campioni di frumento duro, di cui 22 naturalmente contaminati nell'intervallo di concentrazione 10-100 µg/kg, 23 artificialmente contaminati nell'intervallo di concentrazione 100-300 µg/kg e 10 non contaminati. Gli estratti filtrati sono stati analizzati in parallelo mediante immunosaggio FP e metodo HPLC/FLD di riferimento (5). È stata osservata una buona correlazione (coefficiente di correlazione,  $r=0,964$ ) tra le concentrazioni di tossine T-2 e HT-2 ottenute con le due metodiche analitiche messe a confronto (Figura 4). Inoltre, i 10 campioni che dall'analisi HPLC sono risultati esenti da contaminazione, non hanno fornito nessun risultato falso positivo con l'immunosaggio FP confermando ulteriormente l'accuratezza del metodo sviluppato.



**Figura 4. Correlazione dei valori di tossine T-2+HT-2 ottenuti mediante immunosaggio FP e metodo HPLC di riferimento in campioni di frumento naturalmente (●) e artificialmente (▲) contaminati (Figura tratta da Lippolis et al., 2011 - Rif. 14; per cortese concessione di Springer Sciences e Business Media)**

## Conclusioni

Il metodo FP sviluppato per la determinazione del contenuto complessivo (somma) delle tossine T-2 e HT-2 in frumento risulta avere prestazioni in accordo ai criteri stabiliti dall'Unione Europea (15) in termini di rapidità (10 minuti), accuratezza (89-103%), precisione ( $\leq 8\%$ ), sensibilità (8 µg/kg) e intervallo di linearità (10-100 µg/kg) e comparabili a quelle relative al metodo HPLC/FLD. Inoltre, i costi contenuti, la semplicità d'uso e la rapidità dell'analisi lo rendono un utile strumento per il monitoraggio della contaminazione da tossine T-2 e HT-2 nel frumento quale valida alternativa ai più costosi metodi cromatografici di analisi.

## Ringraziamenti

Si ringrazia AGER - Fondazioni in Rete per la Ricerca Agroalimentare per il sostegno al progetto "From Seed to Pasta".

## Bibliografia

1. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *Evaluation of certain mycotoxins in food: fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. Geneva: WHO, 2002. (WHO technical report series ; 906)
2. *SCOOP Task 3.2.10. Collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states*. Brussel: DG-SANCO; 2003. Disponibile all'indirizzo: <http://www.ec.europa.eu/food/fs/scoop/task3210.pdf>; ultima consultazione 2/10/2012.
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. *The EFSA Journal* 2011;9:2481. Disponibile all'indirizzo: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2481.pdf>; ultima consultazione 2/10/2012.
4. Petterson H, Langseth W. *Intercomparison of trichothecene analysis and feasibility to produce certified calibrants and reference material*. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2002. (Project Reports EUR 20285/1)
5. Visconti A, Lattanzio VMT, Pascale M, Haidukowski M. Analysis of T-2 and HT-2 toxins in cereal grains by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr A* 2005;1075:151-8.
6. Lattanzio VM, Solfrizzo M, Visconti A. Determination of trichothecenes in cereals and cereal-based products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Addit Contam* 2008;25:320-30.
7. 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.
8. Nasir MS, Jolley ME. Development of a fluorescence polarization assay for the determination of aflatoxins in grains. *J Agric Food Chem* 2002;50:3116-21.
9. Maragos CM, Jolley ME, Plattner RD, Nasir MS. Fluorescence polarization as a means for determination of fumonisins in maize. *J Agric Food Chem* 2001;49:596-602.
10. Maragos CM, Plattner RD. Rapid fluorescence polarization immunoassay for the mycotoxin deoxynivalenol in wheat. *J Agric Food Chem* 2002;50:1827-32.
11. Maragos CM, Kim E. Detection of zearalenone and related metabolites by fluorescence polarization immunoassay. *J Food Prot* 2004; 67:1039-1043.
12. Lippolis V, Pascale M, Visconti A. Optimization of a fluorescence polarization immunoassay for rapid quantification of deoxynivalenol in durum wheat-based products. *J Food Prot* 2006;69:2712-9.
13. Zezza F, Longobardi F, Pascale M, Eremin SA, Visconti A. Fluorescence polarization immunoassay for rapid screening of ochratoxin A in red wine. *Anal Bioanal Chem* 2009; 395:1317-1323.
14. 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. *Anal Bioanal Chem* 2011;401:2561-71.
15. 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, 20 dicembre 2006.

# CONFRONTO TRA PERFORMANCE DI METODI DI SCREENING E DI CONFERMA PER L'ANALISI DI AFLATOSSINA M1 IN LATTE NATURALMENTE CONTAMINATO NELL'AMBITO DI *PROFICIENCY TEST*

Barbara Cini, Eva Perez  
Test Veritas srl, Padova

## Introduzione

I *proficiency test* sono degli ottimi strumenti per la verifica della qualità esterna delle performance dei laboratori, soprattutto se progettati in modo tale da rispecchiare le condizioni nelle quali vengono analizzati i campioni di routine, dove i materiali sono contaminati naturalmente e il valore ufficiale assegnato al campione viene dato solo da metodi di conferma. Il *proficiency test* "Progetto Trieste" ha organizzato dei test sulla ricerca dell'aflatossina M1 nel latte bovino contaminato naturalmente. Questo *proficiency test* prevede, contrariamente ad altri provider internazionali (es. FAPAS), una elaborazione dei risultati separata per metodiche di screening e di conferma. Dato che il valore assegnato deriva dai risultati ottenuti solo con metodiche di conferma, è stato possibile studiare l'adeguatezza dei metodi di screening rispetto a queste ultime.

## Risultati

Sono stati esaminati i risultati di 2 round sulle micotossine del "Progetto Trieste". In ciascun round sono stati distribuiti ai partecipanti 2 campioni di latte, con due diversi livelli di contaminazione di aflatossina M1.

In tutto sono stati raccolti 100 dati ottenuti con metodi di screening e 57 dati ottenuti con metodi di conferma.

"Progetto Trieste" assegna a ciascun risultato un valore di *z-score* (*z*) calcolato secondo la formula:

$$z = (x - X) / s.$$

dove: *x* è la concentrazione di analita riportata dal laboratorio

*X* è il valore assegnato

*s* è il valore target per la deviazione standard calcolato da  $bX$ ,

dove: *b* è RSD/100 (*Relative Standard Deviation*)

RSD viene calcolata attraverso l'equazione di Horwitz (1),  $RSD = 2^{(1-0.5 \log X)}$

La *performance* dei singoli laboratori è valutata secondo il seguente criterio:

- *satisfactory* → quando  $|z| < 2$
- *questionable* → quando  $2 < |z| < 3$
- *unsatisfactory* → quando  $|z| > 3$

Tra i metodi di screening, 76 risultati sono stati ottenuti con ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), 20 con *Lateral Flow*, 2 con fluorimetria e 2 con metodi non specificati.

L'80% ha ottenuto una valutazione "satisfactory", l'8% "questionable" e il 12% "unsatisfactory".

Tra i metodi di conferma, 46 risultati sono stati ottenuti con HPLC/FLD (*High Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detector*), 4 con HPLC/MS (Mass Spectrometry), 4 con HPLC/MS/MS, 2 con HPLC senza specificare il metodo di rilevazione e 1 con metodo di conferma non specificato. Il 93% ha ottenuto una valutazione "satisfactory" e il 7% "unsatisfactory".

Lo studio è proseguito tenendo conto solo dei dati quantitativi.

La Figura 1 mostra il valore assoluto di  $z$ -score ( $|z|$ ) per i principali metodi utilizzati. I diversi metodi di conferma sono considerati come un unico gruppo (HPLC); i metodi di screening sono rappresentati solo dagli ELISA.

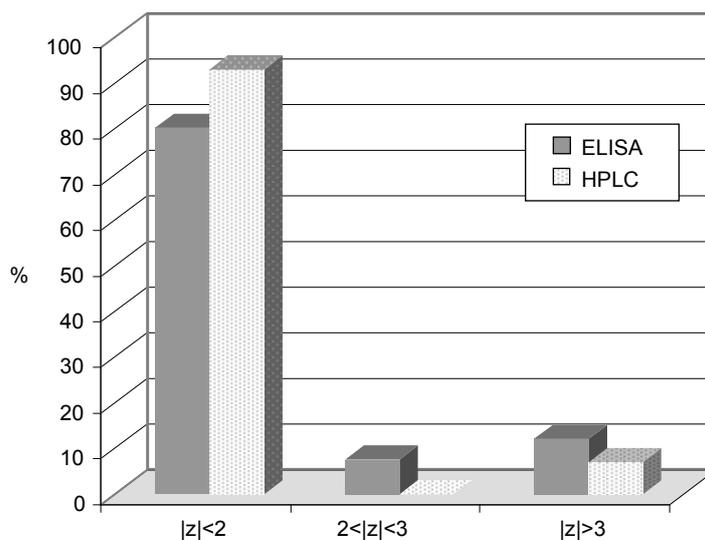


Figura 1.  $|z|$  per ELISA e HPLC dello studio

Si è voluto verificare se i metodi di screening avessero una tendenza a sovrastimare rispetto alla metodologia di conferma (HPLC). La Tabella 1 mostra le percentuali dei risultati con  $z$ -score negativo e positivo per ogni metodo.

Tabella 1. Percentuale di risultati con  $z$ -score positivo e negativo per ogni metodo

Metodo	n. risultati	$z$ -score negativo %	$z$ -score positivo %
ELISA	66	31,8	68,2
<i>Lateral Flow</i>	15	40,0	60,0
HPLC	57	49,1	50,9

Sono stati quindi, esaminati i dati *Lateral Flow* ed ELISA (Figure 2 e 3). Si precisa che la popolazione dei dati ottenuti con lateral flow è piuttosto esigua e non è stato quindi possibile riportare delle conclusioni.

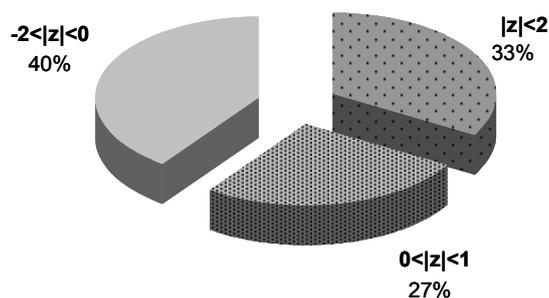


Figura 2. z-score con Lateral Flow (n. 15)

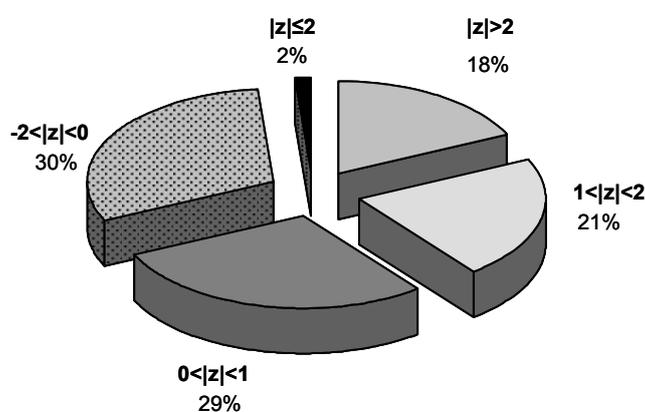


Figura 3. z-score ELISA (n. 66)

È stato quindi effettuato uno studio sulla precisione e l'accuratezza. Dai risultati di screening sono stati esclusi quelli ottenuti con lateral flow e con metodi non specificati (perché ritenuti non rappresentativi). Sono stati esclusi i dati outliers, individuati attraverso l'applicazione dei test di Grubbs (2), di Dixon (3) e del box-plot (4).

Come indicatore dell'accuratezza è stata presa in considerazione la media di  $|z|$ .

Come indicatore della precisione è stata presa in considerazione RSD. I risultati sono riportati nella Tabella 2.

Tabella 2. Analisi della precisione e dell'accuratezza, escludendo gli outlier

Valore assegnato (ng/kg)	media $ z $		RSD	
	ELISA	HPLC	ELISA	HPLC
11,11	1,32	0,50	29,7	15,8
13,54	1,15	0,75	30,7	23,1
34,34	1,05	0,52	21,3	16
52,91	0,88	0,60	26,0	17,6

Dettagli sull'accuratezza dell'ELISA a 52,91 ppt sono riportati nella Tabella 3.

**Tabella 3. Accuratezza ELISA a 52,91 ppt di contaminazione**

Media  z	Media z	Recupero medio (%)	SD del recupero (%)	Valore medio ELISA-valore assegnato(ppt)
0,88	0,16	104	27	2,13

## Conclusioni

Dei 157 risultati sotto esame, ottenuti con campioni naturalmente contaminati e quindi confrontabili con quelli della normale routine di laboratorio, l'85% sono "satisfactory"; quindi si intravede un margine di miglioramento nell'uso dei metodi, soprattutto per quanto riguarda lo screening (solo 80% "satisfactory").

A livelli di aflatoxina M1 vicini al limite di legge, l'ELISA ha dimostrato una accuratezza confrontabile all'HPLC. Per quanto riguarda la precisione, l'HPLC mostra in media una RSD minore rispetto all'ELISA, contrariamente a quanto riscontrato recentemente in altri *proficiency test* svolti prevalentemente a livello nazionale (Resoconto finale "Programma Damocle". Ring test aflatoxina M1 nel latte; settembre 2011) Questa discordanza potrebbe essere dovuta alla diversa natura della contaminazione dei materiale in studio.

Ad ogni modo, le RSD ottenute con l'ELISA sono conformi al regolamento (CE) n.401/2006 che riporta ad Horwitz e conseguentemente, per il livello di contaminazione da noi esaminato, considera accettabili RSD<sub>R</sub> minori del 70,44%.

Questo studio conferma l'importanza dell'uso di materiali contaminati naturalmente per la verifica della qualità delle analisi, sia attraverso una partecipazione costante a *proficiency test* (come "Progetto Trieste") sia attraverso l'uso di materiali con livello di contaminazione noto (materiali di riferimento in matrice oppure materiali da *proficiency test* commercializzati dopo la conclusione del round).

## Bibliografia

1. Horwitz W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. *Pure Appl Chem* 1988;60:855-64.
2. Chambers J, Cleveland W, Kleiner B, Tukey P. *Graphical methods for data analysis*. Wadsworth & Brooks/Cole Statistics/Probability Series; 1983.
3. Grubbs F. Procedures for detecting outlying observations in samples, *Technometrics* 1969;11(1):1-21.
4. Dean RB, Dixon WJ. Simplified statistics for small numbers of observations. *Anal Chem* 1951;23(4):636-38.

## **SVILUPPO DI UN *DIPSTICK MULTIPLEX* PER LA DETERMINAZIONE DELLE TOSSINE DI *FUSARIUM* IN CEREALI**

Noan Nivarlet (a), Veronica M.T. Lattanzio (b), Anne-Catherine Huet (c), Angelo Visconti (b), Vincenzo Lippolis (b), Stefania Della Gatta (b), Philippe Delahaut (c), Benoit Granier (a)  
(a) *UNISENSOR SA, Liège (Belgio)*  
(b) *Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari*  
(c) *Centre d'Economie Rural, Marloie (Belgio)*

### **Introduzione**

Le tossine di *Fusarium* si ritrovano frequentemente come contaminanti naturali in cereali, soprattutto mais e frumento, e prodotti derivati. Le principali tossine di *Fusarium*, per tossicità e per frequenza di contaminazione, sono deossinivalenolo (DON), tossine T-2 e HT-2, zearalenone (ZEA) e fumonisine B1 (FB1) e B2 (FB2). Per proteggere il consumatore dall'esposizione a queste micotossine attraverso l'assunzione di alimenti contaminati, la Commissione Europea ha stabilito limiti massimi ammissibili per DON, ZEA e fumonisine (somma di FB1 e FB2) in cereali e prodotti derivati, mentre i limiti massimi ammissibili per la somma di tossina T-2 e HT-2 sono al momento in discussione (1, 2).

Per verificare la conformità con i requisiti legislativi, oltre a metodiche validate per l'analisi quantitativa, principalmente basate su tecniche cromatografiche, si riscontra la crescente necessità di metodiche di screening rapido (3, 4). In questo contesto si rivelano particolarmente promettenti le metodiche basate sull'utilizzo di *Lateral Flow Devices* (LFD) o *strip test*, le cui caratteristiche e applicazioni nell'analisi rapida di micotossine in alimenti e mangimi sono state discusse da Krska & Molinelli (5).

La crescente disponibilità, registrata negli ultimi anni, di *strip test* commercialmente disponibili per la determinazione di micotossine riflette la richiesta di metodiche rapide e di facile utilizzo che consentano di identificare rapidamente derrate alimentari non conformi ai requisiti normativi. In alcuni casi l'interpretazione dei risultati è affidata a lettori portatili (fotometrici o fluorimetrici). Tuttavia la maggior parte degli *strip* commercialmente disponibili è dedicata all'analisi di singole micotossine.

Analogamente a quanto si riscontra per le metodiche cromatografiche, anche nel caso delle metodiche rapide esiste una forte tendenza allo sviluppo di metodiche multi-micotossina (6, 7). Nell'ambito del progetto europeo CONFIDENCE (FP7/2007-2013, grant agreement no. 211326) è stato recentemente sviluppato un *dipstick multiplex* per la determinazione simultanea delle principali tossine di *Fusarium*, ovvero DON, ZEA, somma di tossina T-2 e HT-2 somma di FB1 e FB2 (8).

Nel presente lavoro verrà descritto lo sviluppo di una metodica rapida per la determinazione semi-quantitativa delle tossine di *Fusarium* in frumento, avena e mais basata sull'utilizzo di tale *dipstick multiplex*, attualmente disponibile sul mercato.

## Risultati e discussione

Per lo sviluppo del metodo sono state selezionate le matrici frumento e avena per la determinazione di ZEA, DON, T-2/HT-2, e mais per la determinazione di ZEA, DON, tossine T-2/ HT-2 e FB1/FB2. I livelli target di *cut-off* per l'immunosaggio basato sul *dipstick multiplex* sono stati fissati a valori pari all'80% dei tenori massimi ammissibili previsti dalla Commissione Europea (Tabella 1). Poiché i livelli massimi per T-2 e HT-2 non sono stati ancora stabiliti è stato deciso di fissare i relativi livelli di *cut-off* a 400 µg/kg (corrispondente ad un tenore massimo previsto di 500 µg/kg).

**Tabella 1. Valori di IC<sub>50</sub> e rapporti di intensità Linea Test/Linea Controllo per ogni tossina in estratti di mais, frumento e avena esenti da contaminazione (bianchi) ed estratti di cereali artificialmente contaminati ai livelli di *cut-off* desiderati (i valori di rapporto in tabella derivano da 10 misurazioni)**

Matrice	IC <sub>50</sub> , µg/kg (valori di <i>cut-off</i> desiderati, µg/kg)			
	ZEA	T-2+HT-2	DON	FB1+FB2
Mais	200 (280)	600 (400)	1400 (1400)	1000 (3200)
Frumento	120 (80)	600 (400)	2100 (1400)	–
Avena	120 (80)	600 (400)	700 (1400)	–

	Rapporti linea Test/Linea Controllo misurati							
	bianchi		<i>cut-off</i>		bianchi		<i>cut-off</i>	
	media± DS*	media± DS*	media± DS*	media± DS*	media± DS*	media± DS*	media± DS*	media± DS*
Mais	2,4±0,2	<b>1,1±0,2</b>	2,6±0,2	<b>1,5±0,1</b>	2,2±0,2	<b>1,1±0,2</b>	1,7±0,2	<b>0,4±0,1</b>
Frumento	2,4±0,1	<b>1,4±0,1</b>	2,7±0,2	<b>1,5±0,1</b>	1,5±0,1	<b>0,8±0,1</b>	-	-
Avena	2,2±0,1	<b>1,4±0,1</b>	1,8±0,1	<b>1,3±0,1</b>	2,2±0,1	<b>1,0±0,1</b>	-	-

IC<sub>50</sub>: concentrazione di un inibitore enzimatico ( farmaco, tossina o veleno, ecc.) necessaria per inibire il 50% del bersaglio; – : non testati

L'immunosaggio sviluppato è basato su un approccio competitivo indiretto. Sulla membrana del *dipstick* sono posizionate quattro linee test, in cui sono immobilizzati i coniugati micotossina-BSA, e una linea di controllo. Una miscela di anticorpi marcati, ovvero anticorpi specifici per ZEA, DON, tossine T-2/HT-2, FB1/FB2 e l'anticorpo specifico per la linea di controllo, è depositata in forma liofilizzata in un micropozzetto. Dopo l'aggiunta dell'estratto del campione nel micropozzetto, ogni singolo anticorpo migra per capillarità sulla membrana attraversando le linee test e la linea di controllo.

Nel caso di campioni esenti da contaminazione (campione negativo) tutti gli anticorpi marcati legano le rispettive linee generando formazione di linee colorate. Nel caso invece di campioni contaminati (campione positivo) gli anticorpi marcati legano le rispettive tossine presenti nell'estratto e non possono legare le micotossine immobilizzate sulle linee test, che pertanto risultano non colorate. La presenza di colorazione nella linea di controllo dimostra la validità del test effettuato.

L'intensità di colore sviluppato alle linee test e di controllo viene misurata da un lettore ottico portatile. In Figura 1 è riportato lo schema del *dipstick multiplex* (4mycosensor) utilizzato nel corso di questo studio.

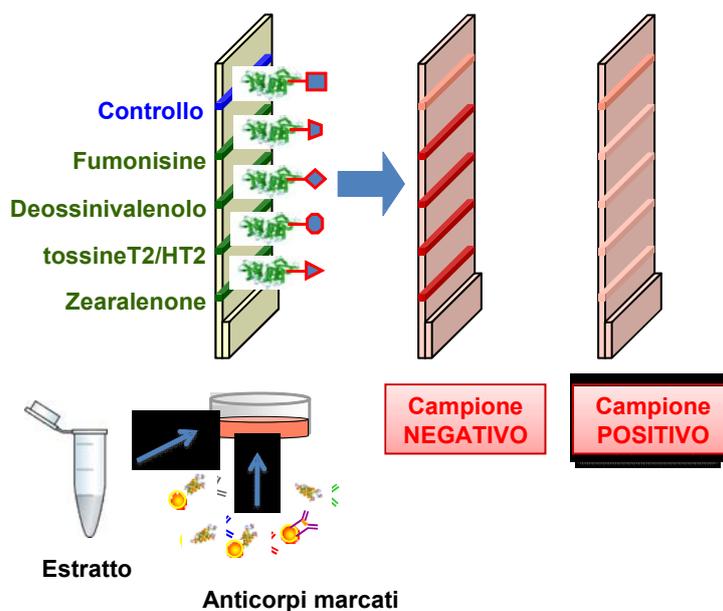


Figura 1. Schema del dipstick multiplex (4mycosensor)

## Sviluppo del protocollo di preparazione del campione

A causa delle difficoltà di co-estrazione delle fumonisine con le altre tossine, è stato necessario sviluppare due differenti protocolli di preparazione del campione per: a) frumento duro e avena (non contenenti fumonisine); b) mais (contenente fumonisine). Al fine di estrarre le micotossine di interesse, ovvero DON, ZEA, T-2/HT-2, da frumento e avena è stata utilizzata una miscela metanolo/acqua (80:20, v/v). Mentre per l'estrazione di DON, ZEA, T-2/HT-2 e FB1/FB2 da campioni di mais è stato sviluppato un protocollo di estrazione in due stadi, ovvero una estrazione con acqua seguita da una estrazione con una miscela metanolo/acqua (60:40, v/v). Infatti mentre DON, ZEA e tossine T-2/HT-2 vengono facilmente co-estratti con una miscela metanolo/acqua (o acetonitrile/acqua), contenenti una percentuale di solvente organico > 70%, l'estrazione delle fumonisine richiede un più elevato contenuto acquoso nella miscela di estrazione.

I recuperi e la ripetibilità della procedura di estrazione sono stati valutati mediante estrazione di campioni di frumento, avena e mais, artificialmente contaminati con le micotossine di interesse ai livelli target (*cut-off*). Gli estratti sono stati analizzati mediante iniezione diretta in un sistema LC-MS/MS, senza alcuna procedura di purificazione. Sono stati ottenuti soddisfacenti valori di recupero per tutte le micotossine testate in frumento, avena e mais, con valori compresi nell'intervallo 73% e 109% con deviazioni standard relative inferiori al 10%.

Infine, nella procedura di preparazione del campione è stato necessario introdurre uno stadio di diluizione dell'estratto con uno specifico tampone per ridurre la percentuale di solvente organico e renderlo quindi compatibile con gli anticorpi utilizzati nell'immunosaggio. Incrementando il fattore di diluizione, con conseguente diminuzione della percentuale di metanolo e della quantità di matrice nella porzione sottoposta ad analisi, l'intensità di colore delle linee test diventa gradualmente più simile a quella ottenuta nell'analisi del solo tampone, determinando un rapporto di intensità (linea Test/Linea di Controllo) prossimo ad 1. Sono stati

determinati fattori di diluizione ottimali di 1:20 per l'analisi di estratti di frumento e avena e di 1:10 per il mais. In entrambi i casi il risultante fattore di diluizione del campione sottoposto ad analisi è 1:100.

### **Determinazione dei livelli di *cut-off* in matrici reali**

Curve di calibrazione dell'immunosaggio in estratti di campioni di frumento, avena e mais, sono state costruite per poter determinare il relativo limite di determinazione, corrispondente al 50% di inibizione ( $IC_{50}$ ) del segnale relativo ad estratti esenti da contaminazione. La Tabella 1 riporta i valori di  $IC_{50}$  per singola tossina o gruppi di tossina in estratti di cereali confrontati ad i relativi valori target di *cut-off*. Per la maggior parte delle micotossine sono stati ottenuti valori di  $IC_{50}$  inferiori o uguali ad i livelli di *cut-off* desiderati. Segnali di inibizione leggermente inferiori al 50% sono stati osservati ai livelli target per ZEA in frumento e avena (40% di inibizione) e per T-2 e HT-2 in mais, frumento e avena (45% di inibizione in mais e frumento, 30% in avena).

Una percentuale di inibizione pari al 50% è necessaria nel caso di lettura visiva dello strip, mentre utilizzando il lettore ottico è possibile utilizzare  $IC_{40}$  o  $IC_{30}$  come valore di *cut-off*, semplicemente modificando le impostazioni del software del lettore. È ragionevole concludere quindi che la sensibilità desiderata è stata raggiunta per ogni tossina in tutti i cereali considerati.

### **Valutazione della cross-reattività dell'immunosaggio**

La cross-reattività degli anticorpi utilizzati per il dipstick studiata, nel corso di esperimenti preliminari mediante analisi ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), ha mostrato che essi hanno una cross-reattività trascurabile verso le micotossine strutturalmente differenti da quelle utilizzate per l'immunizzazione.

Inoltre, per DON e ZEA, è stata valutata la possibilità di avere falsi positivi determinati dalla contaminazione naturale dei cereali da parte dei relativi analoghi strutturali. La cross-reattività dei relativi anticorpi è stata testata nello specifico per 3-acetil-DON, 15-acetil-DON, DON-3-glucoside (per l'anticorpo anti-DON) e  $\alpha$ -zearalenolo,  $\beta$ -zearalenolo (per l'anticorpo anti-ZEA). La cross-reattività dell'immunosaggio è stata testata per confronto dei valori di  $IC_{50}$  ottenuti dalle curve di calibrazione costruite mediante soluzioni tampone. L'anticorpo anti-DON ha mostrato una cross-reattività del 100% per 3-acetil-DON, < 10% per 15-acetil-DON e 62% per DON-3-glucoside. L'anticorpo anti-ZEA ha mostrato invece una cross-reattività del 27% per  $\alpha$ -zearalenolo e nessuna cross-reattività per  $\beta$ -zearalenolo. Gli studi di cross-reattività hanno evidenziato quindi il rischio di avere falsi positivi principalmente determinati dalla presenza di contaminazione da 3-acetil-DON o DON-3-glucoside.

### **Interpretazione dei risultati derivanti dall'analisi di campioni naturalmente contaminati**

L'interpretazione dei risultati, nel caso si utilizzi il lettore ottico, è stata basata sul rapporto calcolato tra le intensità di segnale di ogni linea Test e linea di Controllo (rapporto T/C). Per classificare i campioni come positivi o negativi rispetto ad una concentrazione target, il rapporto T/C misurato nel campione incognito viene confrontato con il "rapporto *cut-off*" ovvero il rapporto T/C ottenuto in un campione contaminato a livello target. Il "rapporto *cut-off*" è stato pertanto determinato per tutte le micotossine in tutte le matrici considerate (frumento, avena e mais) come media di 10 misurazioni indipendenti di campioni contaminati ai livelli target.

Poiché il saggio è basato sul principio della competizione indiretta, i campioni in cui il rapporto T/C risulta minore del “rapporto *cut-off*” vengono classificati come positivi, mentre i campioni in cui il rapporto T/C risulta maggiore del “rapporto *cut-off*” vengono classificati come negativi.

L'applicabilità del metodo sviluppato è stata valutata analizzando un set di 15 campioni naturalmente contaminati (mais, frumento e avena). I risultati ottenuti hanno mostrato un buon accordo con le analisi effettuate mediante una metodica di conferma LC-MS/MS. In particolare, non sono stati osservati falsi negativi, mentre la percentuale di falsi positivi è risultata essere 7% per ZEA, 13% per la somma di T-2 e HT-2, e 13% per DON. Per le fumonisine non sono stati osservati falsi positivi.

## Conclusioni

Nel corso di questa attività di ricerca è stato sviluppato un *dipstick multiplex* per la determinazione simultanea delle principali tossine di *Fusarium*, quali ZEA, T-2+HT-2, DON e FB1+FB2 in frumento, avena e mais.

Nella fase di ottimizzazione del protocollo di preparazione del campione, oltre che raggiungere la sensibilità desiderata, sono stati conseguiti i seguenti risultati: i) co-estrazione di tutte le micotossine di interesse con soddisfacenti valori di recupero; ii) compatibilità dell'estratto con gli anticorpi utilizzati nell'immunosaggio; iii) protocollo finale rapido (tempo totale di analisi per le 6 micotossine pari a 30 minuti), a costo contenuto, di facile esecuzione e pertanto adatto agli scopi di screening *on-site* delle micotossine in cereali.

L'analisi di un set di campioni naturalmente contaminati e il confronto con una metodica di riferimento ha mostrato che il metodo sviluppato può costituire uno strumento utile per la valutazione rapida e simultanea della presenza/assenza delle 6 principali tossine di *Fusarium* a livelli prossimi a quelli definiti dall'Unione Europea (1, 2). Per tutte le micotossine testate è stata osservata un'accettabile percentuale di falsi positivi (compresa tra 0 e 13%), nonché la totale assenza di falsi negativi.

Inoltre, va sottolineato che l'interpretazione dei risultati nell'immunosaggio sviluppato è basata sul rapporto delle intensità linea Test/Linea Controllo, ovvero un valore numerico che permette un'obiettiva lettura dei risultati, a differenza dalle letture visive che dipendono dall'interpretazione personale dell'operatore.

## Ringraziamenti

La ricerca che ha prodotto questi risultati è stata finanziata nell'ambito del Settimo Programma Quadro della Commissione Europea (FP7/2007-2013, Grant agreement no. 211326).

## Bibliografia

1. 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, 20 dicembre 2006.
2. 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 granturco e nei prodotti a base di granturco. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 255/14, 29 settembre 2007.

3. Lattanzio VMT, Pascale M, Visconti A. Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals. *Trends Anal Chem* 2009;28:758-68.
4. Maragos CM, Busman M. Rapid and advanced tools for mycotoxin analysis: a review. *Food Addit Contam Part A* 2010;27:688-700.
5. Krska R, Molinelli A. Rapid test strips for analysis of mycotoxins in food and feed. *Anal Bioanal Chem* 2009;393:67-71.
6. Kolosova AY, De Saeger S, Sibanda L, Verheijen R, Van Peteghem C. Development of a colloidal gold-based lateral-flow immunoassay for the rapid simultaneous detection of zearalenone and deoxynivalenol. *Anal Bioanal Chem* 2007;389:2103-07.
7. Won-Bo S, Dzantiev BB, Eremin SA, Chung DH. One-step simultaneous immunochromatographic strip test for multianalysis of ochratoxin a and zearalenone. *J Microbiol Biotechnol* 2009;19:83-92.
8. Lattanzio VMT, Nivarlet N, Lippolis V, Della Gatta S, Huet AC, Delahaut P, Granier B, Visconti A. Multiplex dipstick immunoassay for semi-quantitative determination of Fusarium mycotoxins in cereals. *Anal Chim Acta* 2012;718:99-108.

## **AUTOCONTROLLO NELLE IMPRESE ALIMENTARI: QUALE LIVELLO DI INTERAZIONE CON IL CONTROLLO UFFICIALE?**

Mario Piccialuti

*Associazione delle Industrie del Dolce e della Pasta Italiane, Roma*

### **Missione dell'AIDEPI**

L'Associazione delle Industrie del Dolce e della Pasta Italiane (AIDEPI) si è costituita il 1° gennaio 2011 ed è nata dalla fusione di AIDI (Associazione delle Industrie Dolciarie Italiane) e UNIPI (Unione Industriali Pastai Italiani).

L'AIDEPI ha una rappresentatività dell'80% del mercato del dolce e della pasta. Il fatturato dei settori rappresentati è di 16 miliardi di euro, pari al 13,5% del totale della produzione alimentare e l'export è di oltre 4 miliardi di euro, pari a circa un quarto del totale nazionale alimentare.

La missione dell'Associazione si esplica fundamentalmente in quattro ambiti:

- Promuovere il continuo sviluppo di una cultura della qualità imprenditoriale non soltanto nei confronti del consumatore ma anche sul fronte della responsabilità sociale e dello sviluppo sostenibile, attraverso il coinvolgimento degli associati con workshop, seminari, giornate di formazione, linee guida di applicazione delle norme e tutti gli altri strumenti idonei a supportare le aziende associate.
- Rappresentare e divulgare i valori che le aziende associate esprimono: qualità e sicurezza dei prodotti industriali, tutela e valorizzazione della tradizione nazionale, trasparenza nella informazione al consumatore.
- Sostenere la capacità competitiva delle aziende attraverso la promozione di un quadro giuridico-normativo che consenta alle imprese italiane di operare, a livello produttivo e commerciale, in condizioni di parità con le aziende concorrenti di altri paesi, affrontando senza svantaggi i mercati esteri.
- Diffondere la conoscenza dei prodotti rappresentati all'estero

In ragione delle tipologie produttive, le aziende aderenti all'AIDEPI fanno parte di una o più dei seguenti gruppi merceologici:

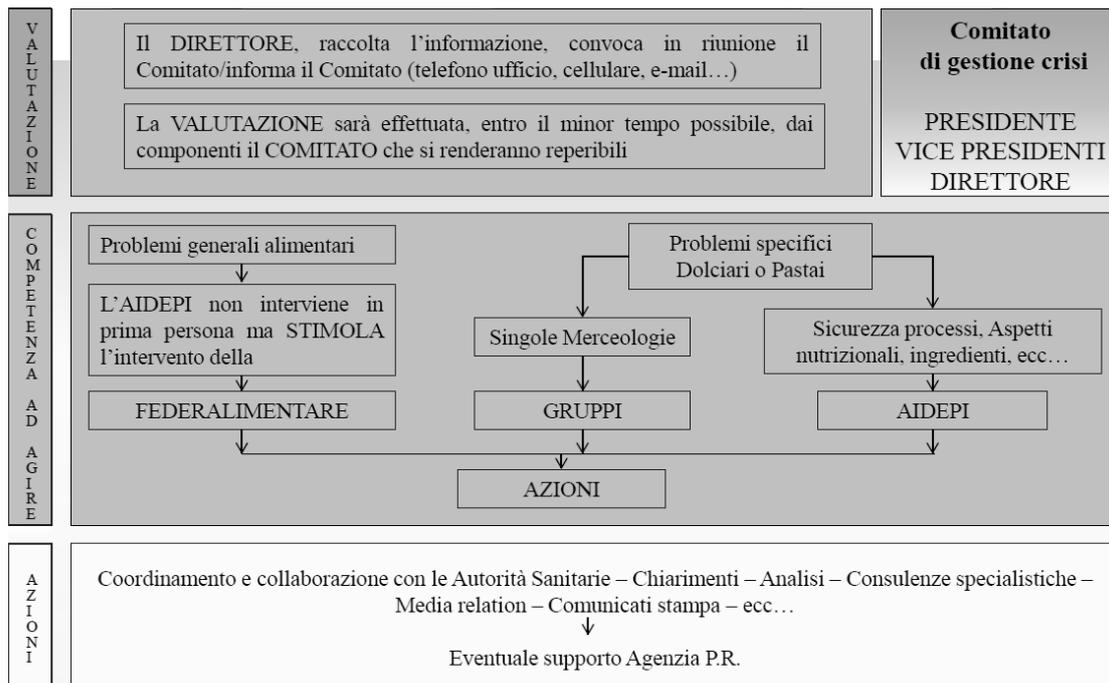
- Gruppo Pasta;
- Gruppo Confetteria;
- Gruppo Forno;
- Gruppo Gelati;
- Gruppo Cioccolato;
- Gruppo Cereali per la prima colazione.

L'Associazione ha inoltre un'articolazione di tipo orizzontale nei Comitati Tecnici di esperti aziendali per le diverse aree di competenza.

## Autocontrollo nelle imprese alimentari

L'introduzione negli anni '90 del principio dell'autocontrollo nella legislazione alimentare ha determinato il passaggio da un sistema di verifica a campione sul prodotto finito ad un sistema di controllo preventivo e costante sul processo produttivo, rappresentando un importante aspetto di innovazione, da un lato, perché responsabilizza maggiormente l'operatore, dall'altro, perché presuppone la collaborazione con l'Autorità pubblica di controllo.

La Figura 1 mostra la procedura adottata dall'AIDEPI per la gestione di crisi.



**Figura 1. Schema di gestione crisi adottato da AIDEPI**

L'Associazione ha sempre sostenuto nel corso degli anni un rapporto di cooperazione costante con le Amministrazioni Sanitarie attraverso la condivisione dei dati, delle conoscenze e delle criticità. Recentemente AIDEPI ha collaborato con Istituto Superiore di Sanità allo sviluppo di due progetti di ricerca sulle micotossine finalizzati alla valutazione dell'esposizione della popolazione italiana all'OTA dai prodotti di cacao e cioccolato e al DON da paste alimentari. I lavori, riscontrando livelli di contaminazione molto bassi sul mercato italiano, sono stati essenziali per la corretta gestione del rischio percepito.

Sulla base dell'esperienza acquisita l'AIDEPI auspica che, nell'ambito del lavoro di costante revisione della legislazione alimentare, vi sia la massima coerenza tra i limiti massimi riferiti alla materia prima e ai prodotti finiti.

## Attività associativa come strumento di prevenzione

L'AIDEPI è dotata di una struttura funzionale dedicata di informazione, formazione e consulenza in tutte le aree tematiche di interesse dell'industria dolciaria e pastaia.

In tema di sicurezza alimentare l'AIDEPI supporta le proprie aziende attraverso:

- monitoraggio e tempestiva informazione sull'evoluzione normativa nazionale, comunitaria e internazionale concernente il settore dolciario e pastaio e le legislazioni ad esso connesse pubblicazioni tematiche e workshop formativi in materie di specifico interesse;
- gruppi di lavoro partecipati da specialisti aziendali;
- allineamento della comunità associativa ai più alti standard qualitativi;
- promozione continua di una cultura della qualità imprenditoriale;
- rapporto di cooperazione costante con le Istituzioni sanitarie preposte;

L'Associazione, inoltre, conduce un costante lavoro di aggiornamento dei propri manuali, in linea con l'evoluzione normativa, e si occupa della preparazione di codici di autoregolamentazione, linee guida e manuali:

- Manuale di corretta prassi igienica e HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*) nella fabbricazione dei prodotti di gelateria, validato dal Ministero della Salute (2009)
- Aggiornamento Manuale di corretta prassi igienica e HACCP per i prodotti dolciari in collaborazione con Certiquality (per i settori: confetteria, cioccolato e prodotti da forno – Validato dal Ministero della Salute) (2007)
- Rintracciabilità dei materiali e oggetti a contatto con gli alimenti, GMP produttori di imballaggio (2007)
- Additivi nei prodotti dolciari (2006)
- Manuale per la valutazione del rischio esplosione nell'industria dolciaria (Atex 137) (2006)
- Manuale per la valutazione dei rischi di esplosione nell'industria di pastificazione (Atex 137) (2006)
- Linee guida sugli Allergeni (2005)
- Gestione dei Sottoprodotti dell'industria Dolciaria (2003)
- Rintracciabilità dei Prodotti Dolciari (2003)
- HACCP in ambiente ISO 9001:2000 (2003)
- Linee guida per l'applicazione della normativa in vigore in materia di produzione e commercializzazione delle paste alimentari (2002)
- Manuale di corretta prassi igienica e HACCP per i prodotti dolciari in collaborazione con Certiquality (per i settori: confetteria, cioccolato e prodotti da forno - Validato dal Ministero della Sanità) (1998)
- L'HACCP in ambiente ISO nel settore dolciario in collaborazione con Certiquality (1998)
- Linee guida per l'applicazione dei principi generali di igiene e del sistema HACCP nell'industria della pastificazione (1998)
- Manuale di corretta prassi igienica e HACCP per i gelati (1997).

L'AIDEPI si occupa della formazione dei suoi associati organizzando giornate formative per diffusione della *best practice* su temi scientifici di particolare interesse per le aziende:

- 2° workshop in materia di sicurezza giocattoli
- Workshop sulla sicurezza degli imballaggi alimentari lungo la filiera
- Workshop sul nuovo Regolamento 1169/2011 su informazioni al consumatore

- Workshop su “Valutazioni in ordine ai materiali d’imballaggio anche alla luce della recente allerta comunitaria su 4-metil-benzofenone”
- Workshop “Nuova Direttiva europea sulla sicurezza dei giocattoli”
- Workshop sulla presentazione del DUVRI: “Workshop sulla Gestione delle Interferenze nei Lavori in Appalto”
- Workshop su “Dichiarazioni di conformità dei materiali a contatto con i prodotti alimentari – Presentazione modelli condivisi”
- Workshop su Rintracciabilità dei materiali e oggetti a contatto con gli alimenti, GMP produttori di imballaggio con presentazione Linee Guida Atmosfere esplosive con presentazione della Guida ATEX
- Workshop Additivi nei prodotti dolciari
- Workshop “L’impiego di grassi nei prodotti dolciari”
- Workshop su materiali e oggetti a contatto con gli alimenti, marcatura degli imballaggi, norme tecniche CEN sugli imballaggi
- “Open Day “, giornata di approfondimento sulle merendine industriali
- Workshop Allergeni sull’etichettatura e la gestione degli allergeni con presentazione delle Linee guida sugli Allergeni
- Workshop Etichettatura focalizzato sulle nuove regole di etichettatura derivanti dalla Direttiva 2003/89/CE
- Workshop Sicurezza Alimentare con presentazione delle Linee Guida: “Gestione dei Sottoprodotti dell’industria Dolciaria”, “Rintracciabilità dei Prodotti Dolciari”, “HACCP in ambiente ISO 9001:2000”
- Workshop Il punto sugli Acidi Grassi Saturi e gli Acidi Grassi Trans.

## **Interazione con l’autorità sanitaria**

### **Manuali di corretta prassi igienica e HACCP**

L’AIDEPI è stata tra i primi comparti nel panorama alimentare italiano ad aver avuto nel 1998 la validazione da parte del Ministero della Salute della “Guida di corretta prassi igienica e HACCP dei prodotti dolciari”, che è risultato uno strumento metodologico di autocontrollo, da adattare alle singole realtà aziendali, finalizzato ad offrire agli associati utili suggerimenti per la fabbricazione di prodotti “igienicamente sicuri”.

### **Valutazione del rischio da micotossine**

L’AIDEPI ha sempre sostenuto nel corso degli anni un rapporto di cooperazione costante con le Autorità Sanitarie attraverso la condivisione dei dati, delle conoscenze e delle criticità.

Recentemente AIDEPI ha collaborato con Istituto Superiore di Sanità allo sviluppo di due progetti di ricerca sulle micotossine:

- 2009: “Valutazione dell’esposizione della popolazione italiana dell’ocratossina A nel cacao e nel cioccolato”
- 2011: “Valutazione dell’esposizione al Deossinivalenolo (DON) derivante dal consumo di pasta alimentare”

I lavori, riscontrando livelli di contaminazione molto bassi sul mercato italiano, sono stati essenziali per la corretta gestione del rischio percepito

## **Auspicio AIDEPI**

Sulla base dell'esperienza acquisita l'AIDEPI auspica che, nell'ambito del lavoro di costante revisione della legislazione alimentare, vi sia la massima coerenza tra i limiti massimi riferiti alla materia prima e ai prodotti finiti

# GRANO DURO BIOLOGICO E CONTAMINAZIONE DA DEOSSINIVALENOLO: RISULTATI DI UN TRIENNIO DI PROVE IN DIVERSI AMBIENTI ITALIANI

Fabrizio Quaranta (a), Gabriella Aureli (a), Andreina Belocchi (a), Mauro Fornara (a), Sahara Melloni (a, b), Pasquale Codianni (c), Giuliano Mazzieri (d), Antonella Petrini (e), Cristina Piazza (f), Luigi Tedone (g), Maria Grazia D'Egidio (a)

(a) *Unità di Ricerca per la Valorizzazione Qualitativa dei Cereali, Consiglio per la Ricerca e sperimentazione in Agricoltura, Roma*

(b) *Università Campus Biomedico, Roma*

(c) *Centro Ricerca Cerealicoltura, Consiglio per la Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura, Foggia*

(d) *Agenzia Servizi Settore Agroalimentare Marche, Ancona*

(e) *Centro Ricerche e Sperimentazione per il Miglioramento Vegetale "N. Strampelli", Tolentino, Macerata*

(f) *Azienda Sperimentale Stuard, S. Pancrazio, Parma*

(g) *Dipartimento di Scienze delle Produzioni Vegetali, Università di Bari, Bari*

## Introduzione

Nell'ultimo decennio si è verificata una forte crescita dell'agroalimentare biologico, passato da settore essenzialmente di nicchia a un più diffuso apprezzamento dei consumatori. Nel 2011 sono stati coltivati in Italia con metodo organico circa 1.100.000 ettari (fonte SINAB), di cui il 17% a cereali, in gran parte frumento duro poi trasformato in paste e pani a forte legame con il territorio. I prodotti biologici vengono sempre più associati dai consumatori a un livello qualitativo elevato e percepiti come più garantiti rispetto alla sicurezza d'uso. Il concetto di qualità si basa, infatti, su diverse caratteristiche, ma la priorità va agli aspetti igienico-sanitari della materia prima e dei prodotti finiti, con particolare attenzione all'assenza di sostanze estranee definite come "contaminanti" (1). Escludendo quelli appartenenti al gruppo dei fitofarmaci e fertilizzanti di sintesi, non consentiti in biologico, a destare preoccupazione rimangono i contaminanti di natura ambientale, come metalli pesanti e micotossine. Le micotossine sono metaboliti secondari di funghi filamentosi (muffe) e possono essere responsabili di fenomeni di tossicità acuta e cronica anche grave negli animali e nell'uomo, in relazione a vari fattori quali dose, organo interessato, età, ecc. (2). Allo stato attuale sono stati isolati e caratterizzati chimicamente oltre 300 tipi di micotossine (3-5), prodotte da generi diversi di funghi come *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp. e *Claviceps* spp. (6). Nei cereali la contaminazione fungina con produzione di micotossine può avvenire durante la coltivazione, come nel caso di miceti del genere *Fusarium* spp., oppure durante lo stoccaggio, come nel caso di *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. (7). Tale distinzione, tuttavia, non è da considerarsi netta in quanto la colonizzazione e la proliferazione dei funghi dipendono entrambi da fattori ambientali che condizionano, fra l'altro, la capacità degli stessi di produrre micotossine (8, 9). Fra le *Fusarium*-tossine prodotte e accumulate nella granella di frumento a seguito di attacchi di fusariosi della spiga, il deossinivalenolo (DON) è una delle più diffuse nei cereali a paglia (10-13). In particolare nel frumento, la produzione e l'accumulo di DON nella materia prima rappresentano il più importante rischio durante la coltivazione in campo che, però, può manifestarsi e/o aggravarsi anche durante la conservazione della granella, soprattutto quando il contenuto di umidità è superiore al 13% (14). Considerato che la normativa europea vieta espressamente la detossificazione dei prodotti alimentari contenenti

micotossine mediante trattamenti chimici e la miscelazione degli stessi con prodotti conformi ai tenori massimi consentiti (15), il più efficace controllo del rischio riguarda in primo luogo la prevenzione in campo. La fusariosi si diffonde soprattutto a causa dell'inoculo presente sui residui colturali infetti, quindi il loro abbattimento, sia con le lavorazioni del terreno che con le rotazioni colturali, è da considerarsi tra le buone pratiche agronomiche, ordinariamente previste nei disciplinari dell'agricoltura biologica. Studi recenti (16-20) hanno evidenziato risposte più favorevoli per le colture biologiche rispetto a quelle convenzionali. Visti però i risultati contrastanti presenti in letteratura (21-26) spesso frutto di ricerche in areali continentali su frumento tenero, si è ritenuto opportuno indagare sull'effettiva incidenza della contaminazione da DON sulla granella di frumento duro coltivato con metodo biologico in diversi ambienti italiani, mettendo in prova varietà comuni in un confronto ripetuto per più anni.

## Materiali e metodi

Le prove sono state condotte nel triennio 2008-2010 in sei località rappresentative degli areali di coltivazione italiani che da molti anni partecipano alla Rete Nazionale di confronto varietale in biologico (27): S. Pancrazio (PR), Jesi (AN), Pollenza (MC), Campobasso, Foggia, Gravina Poggiorsini (BA). In tutti gli ambienti sono state impiegate le stesse sedici varietà di frumento duro di differente ciclo biologico fornite non conciate dalle ditte sementiere distributrici: le precoci (P) Ciccio, Svevo, Duilio, Neolatino e Saragolla; le medio-precoci (MP) Karalis, Anco Marzio, Simeto, Meridiano e Colosseo; le medie (M) Claudio, Vinci, Normanno e San Carlo, la medio tardiva (MT) Dylan e la tardiva (T) Cresco.

I campioni di granella ottenuti alla raccolta delle prove di campo sono stati macinati con mulino Cyclotec (PBI) con una griglia da 0,5 mm. I livelli di concentrazione di DON sono stati determinati con metodo immunoenzimatico ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), ampiamente utilizzato per rilevare la presenza di micotossine in varie matrici (28-30). Il test kit Ridascreen®-DON, R-Biopharm è stato eseguito con l'uso del preparatore automatico BRIO (SEAC) e del lettore per micropiastre SIRIO (SEAC). Il limite di sensibilità del metodo è pari a 18,5 ppb, con un intervallo di linearità fino a 500 ppb; il recupero di tossina nei cereali è compreso fra l'85% e il 110%. I risultati rappresentano il valore medio di analisi ripetute (n. 2; CV < 10%).

## Risultati e discussione

Dall'analisi dei campioni provenienti dalle località di prova è stato riscontrato un quadro generale caratterizzato da una contaminazione media da DON lontana dal limite massimo consentito di 1750 ppb (15) e (31), in particolare nelle tre località dell'Italia meridionale. L'incidenza (Tabella 1) di contaminazione da DON sono stati influenzati soprattutto dall'ambiente di coltivazione e, nell'ambito di questo, dall'andamento meteorologico delle singole annate.

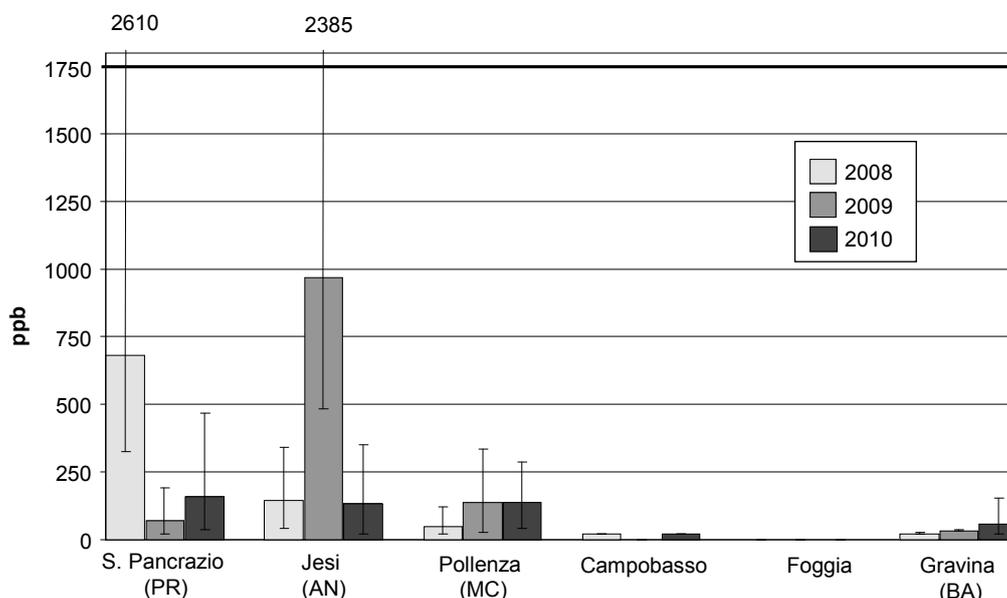
**Tabella 1. Campioni positivi alla contaminazione da DON: incidenza % nelle località di prova nel triennio 2008-2010**

Anno	S.Pancrazio (PR)	Jesi (AN)	Pollenza (MC)	Campobasso	Foggia	Gravina (BA)
<b>2008</b>	100	100	56	6	0	13
<b>2009</b>	38	100	94	0	0	6
<b>2010</b>	81	38	19	6	0	38

In tutti i tre gli anni si sono avute contaminazioni da DON molto basse al Sud, del tutto assenti a Foggia. Viceversa nelle tre località del Centro-Nord i riscontri sono stati maggiori soprattutto per quanto riguarda la percentuale di incidenza dei campioni positivi, anche se con valori solo sporadicamente elevati. A Jesi nel 2008 e 2009 è stata registrata la totale positività dei campioni analizzati, a cui però hanno corrisposto valori medi di contaminazione molto diversi, pari a 146 ppb nel 2008 e 971 ppb nel 2009.

A S. Pancrazio solo nel 2008 si è avuto un valore di contaminazione medio di un certo rilievo (682 ppb) associato ad un'incidenza percentuale di campioni positivi del 100%, mentre nei due anni successivi la contaminazione è risultata modesta sia come valori medi che massimi. Pollenza è stata tra le tre località del Centro-Nord quella con i valori medi di DON sempre inferiori a 150 ppb, particolarmente bassi nel 2008 (28 ppb) e nel 2010 (26 ppb).

Il limite di 1750 ppb è stato superato nei tre anni di prova solo da due singoli campioni, uno proveniente da S. Pancrazio (2610 ppb) e l'altro da Jesi (2385 ppb) (Figura 1).



**Figura 1. Valori medi, massimi e minimi della concentrazione di DON nei campioni positivi nelle località di prova nel triennio 2008-2010**

In un ambito di valori medi di DON sempre inferiori a 500 ppb, nella Figura 2 è evidenziato l'andamento della contaminazione nei tre anni di prova: il 2008 è risultato l'anno con un'incidenza maggiore di campioni positivi (47%) e un valore medio di DON di 313 ppb. L'anno successivo è stato registrato un valore medio di contaminazione un po' più elevato, pari a 476 ppb e un'incidenza di campioni positivi leggermente più bassa, pari al 40%. Con un valore medio di 125 ppb e un'incidenza del 30%, il 2010, grazie alle migliori caratteristiche climatiche dell'annata, è risultato l'anno meno favorevole alla contaminazione da DON.

Scendendo nel dettaglio delle sedici varietà in prova, rappresentate nella Figura 3 in ordine crescente di ciclo biologico, quattro di queste (Anco Marzio, Karalis, Saragolla e Vinci) hanno fatto registrare valori medi triennali inferiori a 250 ppb, le restanti cultivar valori medi inferiori a 500 ppb, ad eccezione di Simeto. Quest'ultima varietà, insieme a San Carlo, ha evidenziato una maggiore suscettibilità alla contaminazione, con valori massimi per entrambe superiori a 2000 ppb, anche se riconducibili ad un unico anno di prova in una sola località.

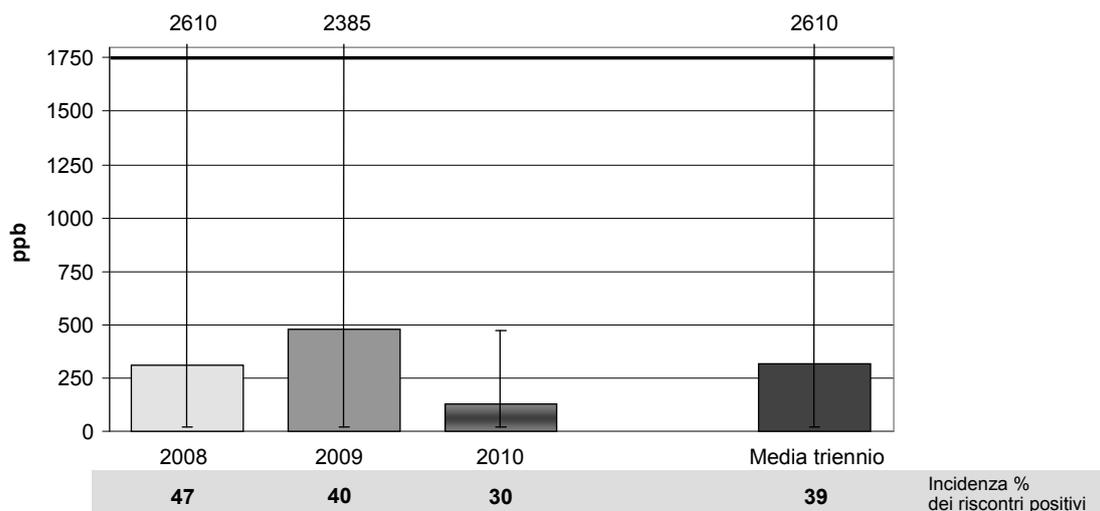


Figura 2. Valori medi, massimi e minimi della concentrazione di DON nei campioni positivi e incidenza % nei tre anni di prova

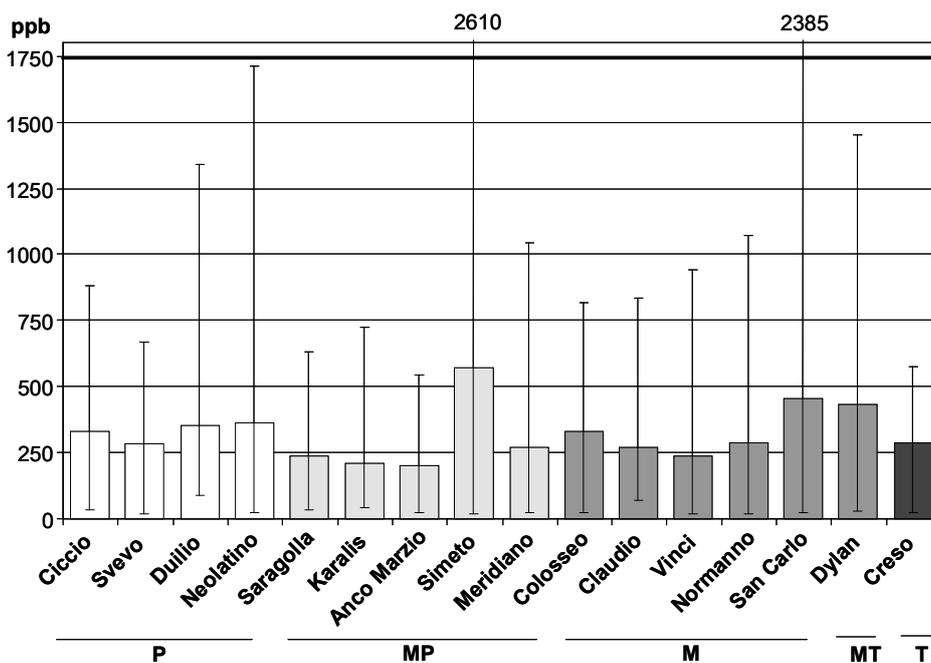


Figura 3. Valori medi, massimi e minimi della concentrazione di DON nei campioni positivi delle sedici varietà comuni nel triennio 2008-2010

Anche se con bassa significatività ( $r = -0.13^*$ ) è stata osservata una correlazione inversa tra lunghezza del ciclo alla spigatura e livello di contaminazione. Di fatto però non sembrano ancora disponibili varietà di frumento duro resistenti alla fusariosi della spiga (32) e quindi alla

possibile contaminazione da DON come si evince chiaramente dal dettaglio della Tabella 2, dove accanto ai valori di contaminazione medi e massimi viene indicato anche l'anno d'iscrizione al Registro varietale e la genealogia della cultivar. Poche e contraddittorie sono infatti le differenze tra varietà vecchie e nuove, precoci o tardive: tra le cultivar meno colpite troviamo Anco Marzio, medio precoce di recente costituzione e Creso, tardiva e selezionata circa 40 anni fa; tra le più sensibili, accanto a Simeto, medio precoce costituita negli anni '80, compaiono le varietà più recenti quali San Carlo e Dylan, di ciclo più lungo. Da notare che alcune varietà caratterizzate da livelli elevati di contaminazione risultano avere una genealogia comune che potrebbe spiegare la loro maggiore suscettibilità.

**Tabella 2. Genealogia e valori medi e massimi dei campioni risultati positivi alla contaminazione da DON nel triennio 2008-2010**

Varietà	Ciclo	Genealogia	Anno *	DON (ppb)				
				media positivi				max
				2008	2009	2010	triennio	
Anco Marzio	MP	popolazione Cimmyt	2003	265	308	66	201	542
Creso	T	CpB144 x [(Yt54-N10-B)Cp <sup>2</sup> 63Tc <sup>3</sup> ]	1974	246	331	288	288	576
Saragolla	MP	Iride x Linea PSB 0114	2004	170	391	140	239	629
Svevo	P	Linea Cimmyt x Zenit	1996	364	429	53	282	670
Karalis	MP	Grazia x CRAS_21-5	2002	277	214	98	208	726
Colosseo	M	Mutante Mexa x Creso	1995	358	474	139	328	816
Claudio	M	(Sel. Cimmyt35xDurango) x (IS193BxGrazia)	1998	219	466	20	268	834
Ciccio	P	F <sub>6</sub> (AppuloxValnova) x F <sub>5</sub> (ValfortexPatrizio)	1996	264	336	446	330	881
Vinci	M	Simeto x Armet	2002	378	224	53	239	943
Meridiano	MP	(Simeto x WB881) x (Plinio x F22)	1999	198	420	19	267	<b>1044</b>
Normanno	M	(Simeto x F22) x L35	2002	319	569	64	290	<b>1071</b>
Duilio	P	Cappelli x (AnhingaxFlamingo)	1984	181	700	184	354	<b>1340</b>
Dylan	MT	Neodur x Ulisse	2002	252	774	101	431	<b>1450</b>
Neolatino	MP	(Latino x Trinakria) x MG1433	2005	235	645	123	361	<b>1713</b>
San Carlo	M-MT	Grazia x Degamit	1996	343	1222	128	455	<b>2385</b>
Simeto	MP	Capeiti 8 x Valnova	1988	903	414	300	569	<b>2610</b>
Media				<b>311</b>	<b>495</b>	<b>139</b>	<b>319</b>	

\*anno di iscrizione al registro

## Conclusioni

I dati pluriennali di questo studio condotto in più ambienti di coltivazione italiani confermano che i livelli medi di contaminazione da DON nel grano duro biologico nazionale sono ben lontani dalle soglie di allarme, in particolare quelli delle produzioni meridionali.

Ad una media triennale del 39% di positività dei campioni, riscontrati quasi tutti al Centro-Nord, è corrisposta una media dei valori di contaminazione non preoccupante (319 ppb), anche se non bisogna certamente “abbassare la guardia”, visto che, soprattutto in alcuni ambienti pedoclimatici, impiegando varietà più sensibili in annate sfavorevoli potrebbero verificarsi pericolosi sforamenti dei livelli di sicurezza.

## Bibliografia

1. Europa. Regolamento (CEE) N. 315/93 del Consiglio dell'8 febbraio 1993 che stabilisce procedure comunitarie relative ai contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee* L 37, 13/2/1993.
2. Hussein HS, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 2001;167 (2):101-34.
3. Berthiller F, Sulyok M, Krska R, Schuhmacher R. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. *Int J Food Microb* 2007;119:33-7.
4. Galvano F, Piva A, Ritieni A, Galvano G. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. *J Food Prot* 2001;64:120-31.
5. Betina V. *Mycotoxins production, isolation, separation and purification. developments in food science*. Amsterdam: Elsevier; 1984.
6. Bennett JW, Keller NP. Mycotoxins and their prevention. In: Anke T (Ed.). *Fungal biotechnology*. Weinheim: International Thompson Publishing Company; 1997. p. 265-73.
7. Borreani G, Tabacco E, Cavallarin L. A new oxygen barrier film reduces aerobic deterioration in farm-scale corn silage. *J Dairy Sci* 2007;90:4701-6.
8. Rodrigues I, Naehrer K. Survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed. *Toxins* 2012;4(9):663-75.
9. Whitlow LW, Hagler WM, Diaz DE. Mycotoxins in feed. *Feedstuffs* 2010;15:74-84.
10. Visconti A, Pascale M. An overview on *Fusarium* mycotoxins in the durum wheat pasta production chain. *Cereal Chem* 2010;87 (1):21-7.
11. Foround NA, Eudes F. Trichothecenes in cereal grains. *Int J Mol Sci* 2009;10:147-73.
12. Miller JD. Mycotoxins in small grains and maize: old problems, new challenges. *Food Additives and Contaminants* 2008;25(2):219-30.
13. Terzi V, Morcia C, Faccioli P, Faccini N, Rossi V, Cigolini M, Corbellini M, Scudellari D, Delogu G. *Fusarium* DNA traceability along the bread production chain. *International Journal of Food Science & Technology* 2007;42(12):1390-6.
14. Pestka JJ, Smolinski AT. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *J Toxic Environ Health part B* 2005;8:39-69.
15. 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, 20 dicembre 2006.
16. 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; doi 10.1100/2012/973058.
17. Quaranta F, Amoriello T, Aureli G, Belocchi A, D'egidio MG, Fornara M, Melloni S, Desiderio E. Grain yield, quality and deoxynivalenol (DON) contamination of durum wheat (*Triticum durum* Desf.): results of national networks in organic and conventional cropping systems. *Italian Journal of Agronomy* 2010;5(4):361-74.
18. Edwards SG. *Fusarium* mycotoxin content of UK organic and conventional wheat. *Food Additives and Contaminants* 2009;26(4):496-506.
19. Vánová M, Klem K, Misa P, Matusinsky P, Hajslova J, Lancova K. The content of *Fusarium* mycotoxins, grain yield and quality of winter wheat cultivars under organic and conventional cropping system. *Plant Soil Environ*. 2008;54:395-402.

20. Pussemier L, Larondelle Y, Van Peteghem C, Huyghebert A. Chemical safety of conventionally and organically produced foodstuff: a tentative comparison under Belgian conditions. *Food Control* 2004;17:14-21.
21. Jestoi M, Somma MC, Kouva M, Veijalainen P, Rizzo A, Ritieni A, Peltonen K. Levels of mycotoxins and sample cytotoxicity of selected organic and conventional grain-based products purchased from Finnish and Italian markets. *Mol Nutr Food Res*. 2004;48:299-307.
22. Cirillo T, Ritieni A, Visone M, Cocchieri RA. Evaluation of conventional and organic Italian foodstuffs for deoxynivalenol and fumonisins B-1 and B-2. *J Agricult Food Chem* 2003;51:812-31.
23. Malmauret L, Parent-Massin D, Hardy JL, Verger P. Contaminants in organic and conventional foodstuffs in France. *Food Addit Contam* 2002;19:524-32.
24. Doll S, Valenta H, Danicke S, Flachowsky G. Fusarium mycotoxins in conventionally and organically grown grain from Thuringia/Germany. *Landbauforschung Volkenrode* 2002;52:91-6.
25. Schollenberger M, Jara HT, Suchy S, Drochner W, Muller HM. Fusarium toxins in wheat flour collected in an area in southwest Germany. *Int J Food Microbiol* 2002;72:85-9.
26. Berleth M. Mould spectrum and mycotoxins (deoxynivalenol and ochratoxin A) in grain samples from ecological and integrated cultivated sites. *Agribiological Research-Zeitschrift Agrarbiologie Agrikulturchemie Okologie* 1998;51:369-76.
27. Quaranta F, Belocchi A, Camerini M, D'egidio M, Fornara M, Pucciarmati S, Melloni S. Rese e qualità del grano duro per la coltivazione biologica: risultati del 9° anno della sperimentazione nazionale. *L'Informatore agrario* 2011;67(36):56-9.
28. Berthiller F, Crews C, Dall'Asta C, De Saeger S, Haesaert G, Karlowsky P, Oswald IP, Seefelder W, Speijers G, Stroka J. Masked micotoxins: A review. *Mol Nutr Food Res* 2012; doi 10.1002/mnfr.201100764.
29. Rodrigues I. and Naehrer K. Prevalence of mycotoxins in feedstuffs and feed surveyed worldwide in 2009 and 2010. *Phytopathologia. Mediterranea* 2012; 51: 175-92.
30. Zheng M.Z., Richard J.L., Binder J. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia* 2006; 161: 261-73.
31. Europa. Regolamento (CE) del 28 settembre 2007, n. 1126. Modifica del regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari per quanto riguarda le *Fusarium*-tossine nel granturco e nei prodotti a base di granturco. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 255/14, 29/9/2007
32. Bürstmayr H, Huber K, Alamari A, Steiner B, Schießl K, Bürstmayr M, Lemmens M. Breeding for Fusarium head blight resistance in wheat – update on the Fusarium research at IFA-Tulln. *Tag. der Ver. der Pflanz. und Saatgutkau. Österreichs* 2009:1-4.

# VALUTAZIONE DEI RISCHI AGRONOMICI DERIVANTI DALLA CONTAMINAZIONE DA MICOTOSSINE NEL COMPARTO CEREALICOLO

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

## Introduzione

La valutazione dei rischi da micotossine nelle filiere cerealicole nazionali passa attraverso l'esame dei seguenti principali aspetti:

- disponibilità di una buona conoscenza della diffusione dei contaminanti nella cereali-coltura;
- identificazione delle procedure per gestire il rischio nelle filiere;
- possibilità operativa di impiego di strumenti per contenere il rischio;

L'obiettivo finale è quello di partecipare come attori nell'ambito dei centri di decisione in materia di legislazione e, conseguentemente, di comunicare ampiamente e tempestivamente agli operatori del settore la situazione e permettere loro di adottare soluzioni e accorgimenti per ridurre la probabilità di incorrere in inaccettabili livelli di contaminazione (1).

## Conoscenza della diffusione delle micotossine

La contaminazione da micotossine è molto variabile in relazione all'andamento meteorologico nel corso del ciclo colturale e in particolare della campagna di raccolta e, in misura non secondaria, dell'agrotecnica e dell'ambiente colturale.

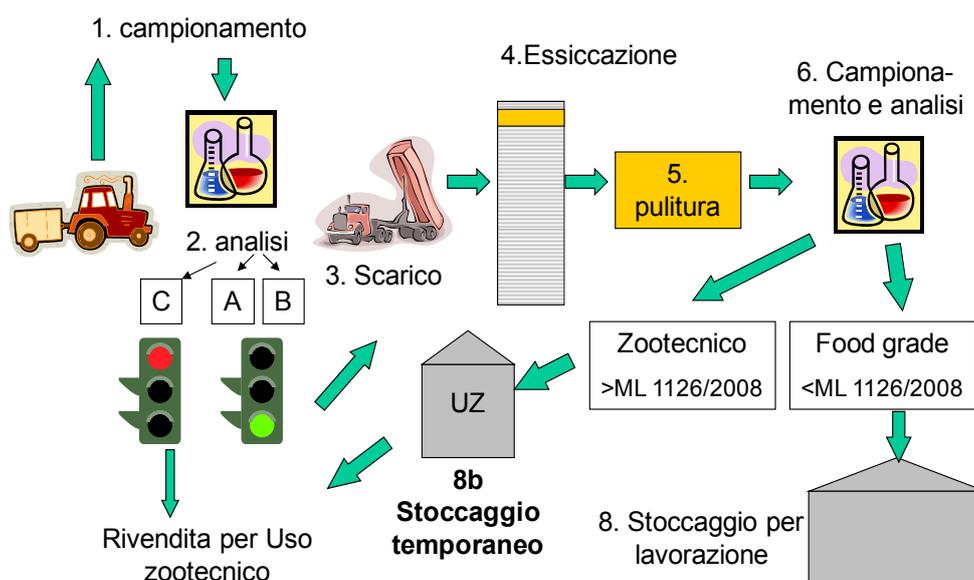
Il primo fattore determina le variazioni più evidenti perché hanno ricadute su larga scala e determinano anche forti vincoli di commercializzazione di intere aree produttive. Le conoscenze acquisite, soprattutto in questi ultimi dieci anni, permettono di individuare areali cerealicoli dove è maggiore o minore la probabilità di incorrere in elevate contaminazioni, considerando specifici cereali e contaminanti. Ad esempio nel caso del grano tenero e duro la contaminazione da deossinivalenolo (DON) è più frequente nelle regioni del Nord Italia, rispetto a quelle del Centro e, soprattutto, Meridionali.

L'importanza di specifici eventi meteorologici e di una loro concatenazione comporta una forte interazione tra l'annata meteorologica e la contaminazione dell'areale; pertanto il livello di criticità può essere diverso da zona a zona. Ad esempio la contaminazione da aflatossine è stata maggiore nel 2003 e nel 2012 soprattutto negli areali sud-orientali della Pianura padana. Tutto ciò determina la necessità di istituire una rete permanente e capillare di monitoraggio dei lotti, al fine di istituire una banca dati che possa servire a guidare la programmazione agraria e gli investimenti in strutture, attrezzature e procedure per prevenire o attuare la decontaminazione.

La conoscenza della diffusione deve però essere tempestiva per guidare le procedure per gestire il rischio e attivare quelle di emergenza. Inoltre una pronta disponibilità di dati permette anche di ridurre le ricadute negative in fase di commercializzazione limitando e definendo meglio gli ambiti del problema.

## Procedure per la gestione del rischio

L'introduzione del sistema HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*) presso i centri di stoccaggio ha indotto un mutamento importante nell'approccio degli operatori alla problematica dei contaminanti. Nella maggior parte dei centri di raccolta e stoccaggio, dove è più incisivo il controllo della qualità sanitaria dei cereali, sono da tempo state attuate una serie di procedure ordinarie e di emergenza per orientare le consegne dal campo e segregare in lotti distinti procedure con diversi gradi di contaminazioni. Un esempio frequente è quello riportato in Figura 1: in questo schema il controllo è effettuato con metodi rapidi su ogni consegna (carro) in annate ad alto rischio, o sulle prime consegne per fornitore in annate a basso rischio.



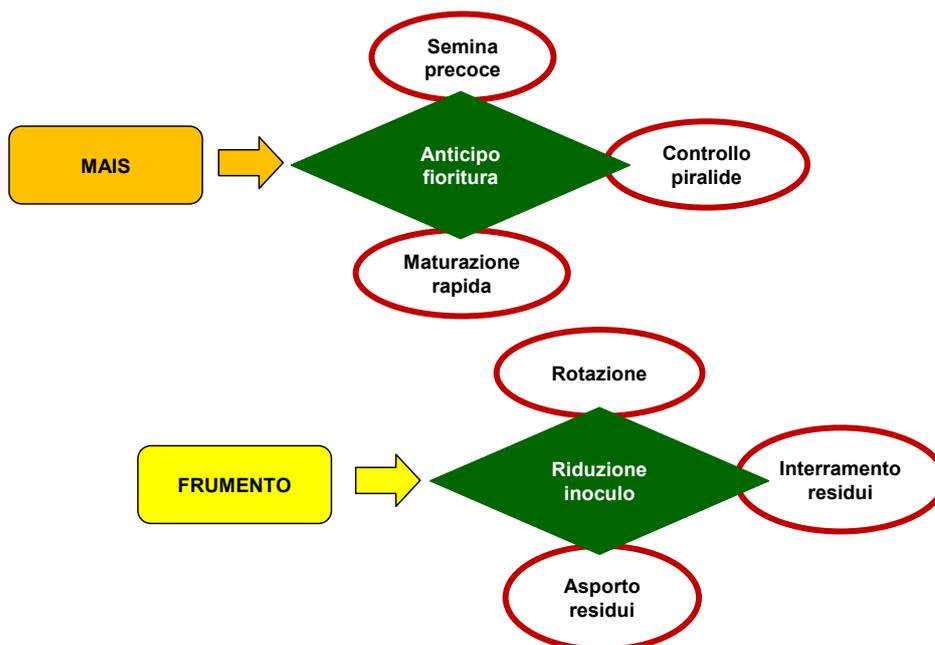
**Figura 1. Schema di controllo della contaminazione nel mais in arrivo presso un centro di essiccazione e stoccaggio al fine di segregare lotti adatti ad impieghi alimentari**

Tre sono i punti critici da affrontare con grande attenzione:

- il campionamento che specie per tossine male distribuite è l'aspetto più critico. In questo senso è nell'ordine da porre crescente attenzione a DON, T2-HT2, fumonisine, aflatossine. Pertanto alla ricezione è necessario investire in strumenti adeguati di campionamento e dotarsi di procedure rigorose;
- la necessità di imporre ai fornitori i tempi di attesa per lo scarico per permettere la preparazione del campione e per lo svolgimento dell'analisi;
- l'effettiva possibilità di segregare i conferimenti ad elevata contaminazione, impiegando o una fossa e un impianto di essiccazione dedicato, oppure la stessa linea utilizzata in momenti diversi, oltre che a strutture di stoccaggio diverse.

## Strumenti per contenere il rischio

Nelle ordinarie condizioni della cerealicoltura nazionale, dove le condizioni di stoccaggio sono adeguate, le tecniche agronomiche di campo sono gli strumenti più efficaci per contenere il rischio di elevate contaminazioni (2, 3). Tuttavia, in relazione alla coltura, e all'ecologia del fungo tossigeno le soluzioni sono diverse: a titolo di esempio per le fusarium tossine nel mais la chiave della prevenzione risiede nell'anticipo della fioritura e nel frumento nella riduzione dell'inoculo di *Fusarium graminearum* (Figura 2).



**Figura 2. Aspetti chiave per contenere tramite interventi preventivi agronomici lo sviluppo di *Fusarium*-tossine**

L'applicazione di tali soluzioni, in sinergia con la lotta diretta (fungicidi), non è sempre tecnicamente possibile ed economicamente sostenibile. In particolare, le contaminazione da aflatoossine nel mais sono così fortemente condizionate da fattori ambientali, dominanti su quelli tecnici, da rendere le misure preventive non sempre efficaci. La stesura di linee guida, inserite in disciplinari di produzione appare una necessaria ma non sufficiente premessa; infatti, occorre il rispetto di 2 condizioni: l'esclusione della coltura dalle condizioni ambientali più rischiose, almeno per le filiere più esigenti, e il rispetto rigoroso del disciplinare. Nei casi in cui queste 2 condizioni non potessero essere poste in atto occorre che procedure più stringenti siano predisposte per isolare tempestivamente i conferimenti a rischio presso i centri di raccolta.

## Conclusioni

Riguardo al rischio di contaminazioni elevate da micotossine, le recenti esperienze evidenziano che le produzioni nazionali di cereali sono ancora estremamente vulnerabili. La valutazione dei rischi agronomici ha recentemente permesso di individuare con chiarezza gli interventi preventivi e di lotta diretta formulando efficaci linee guida. Tuttavia le soluzioni attuabili si scontrano con una certa inerzia del settore ad attuare le pratiche se non quando impattano in situazioni critiche. In questo senso le soluzioni prospettate possono trovare l'auspicata efficacia solo se rigorosamente applicate in un contesto in cui le priorità organizzative e strutturali siano chiarite e condivise e, quindi, poste rapidamente in essere.

## Bibliografia

1. Barrier-Guillot B. Gestion du risque par les opérateurs. In: *4ème Colloque qualité sanitaire des cereales; Paris, 3 avril 2012*. p. 33-38.
2. Blandino M, Reyneri A, Vanara F, Tamietti G, Pietri A. Influence of agricultural practices on Fusarium infection, fumonisin and deoxynivalenol contamination of maize kernels. *World Mycotoxin Journal* 2009;2(4):409-18.
3. Blandino M, Vanara F, Reyneri A, Pascale M, Haidukowski M, Corbellini M, Scudellari D. Percorsi produttivi per prevenire la contaminazione da deossinivalenolo nel frumento tenero. In: Brera B, Miraglia M, Gregori E, Renzi V (Ed.). *3° Congresso nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare e zootecnica. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 28-30 settembre 2009. Riassunti*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2009. (ISTISAN Congressi 09/C6). p. 28

# SVILUPPO DI UN NUOVO SAGGIO ELISA PER LA DETERMINAZIONE DELLA TOSSINA T-2 AVENTE ELEVATA CROSS-REATTIVITÀ PER HT-2

Giulia Rosar, Francesco Gon, Francesca Diana  
Tecna srl, Area Science Park, Trieste

## Introduzione

La tossina T-2 e il suo metabolita HT-2 sono micotossine prodotte da diverse specie di funghi del genere *Fusarium*. I loro effetti tossici sono noti nell'uomo e nell'animale e comprendono inibizione della sintesi proteica, alterazione del sistema immunitario, inibizione dell'ematopoiesi (1-3).

Ad oggi non sono stati ancora stabiliti dalla Comunità Europea i tenori massimi per le due *Fusarium*-tossine. L'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (*European Food Safety Authority*, EFSA) ha recentemente ribadito che la tossina T-2 viene rapidamente metabolizzata in HT-2, la quale può rappresentare fino a due terzi della contaminazione totale, ed ha effetti tossici equivalenti alla forma non metabolizzata. Risulta pertanto di elevata importanza avere a disposizione dei metodi di analisi capaci di rilevare la presenza di entrambe le molecole anche in assenza di una normativa comunitaria in proposito.

Nel rapporto dell'EFSA si trova che l'esposizione dell'uomo a tali micotossine è largamente dovuta alla contaminazione di frumento e avena.

Il presente lavoro descrive lo sviluppo e la validazione di *Celer T2*, un nuovo saggio immunoenzimatico competitivo diretto per la determinazione quantitativa delle tossine T-2 e HT-2. L'obiettivo era mettere a punto un sistema diagnostico accurato particolarmente sui cereali maggiormente soggetti alla contaminazione delle due *Fusarium*-tossine, quali appunto frumento tenero e avena (4-7), sul mais, nonché sui mangimi, con un'attenzione particolare ai mangimi per polli, specie particolarmente sensibile agli effetti tossici delle tossine T-2 ed HT-2 (8-10).

## Materiali e metodi

### Saggio ELISA per la determinazione delle tossine T-2 e HT-2

*Celer T2* è un kit ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) competitivo diretto per la determinazione delle due tossine nei cereali e nei mangimi.

L'anticorpo policlonale anti-tossina T-2 è stato sviluppato in coniglio. Impiegando un particolare immunogeno è stato ottenuto un siero che presenta cross-reattività del 100% verso T-2 e del 72% per la tossina HT-2. Con tale anticorpo e un opportuno tracciante enzimatico è stato messo a punto un saggio ELISA con un range di calibrazione 0,025-1 ppm e una durata di venti minuti.

Il saggio viene effettuato su micropiastra di polistirene precedentemente adsorbita con anticorpi anti-tossine. Durante una prima incubazione avviene una competizione fra le molecole di T-2 o HT-2 libere contenute nelle soluzioni standard o nei campioni e il coniugato enzimatico per i siti di legame dell'anticorpo adsorbito alla micropiastra.

La fase di lavaggio che segue elimina tutto ciò che non si è legato in maniera specifica alla fase solida. Il legame dell'enzima all'anticorpo si rileva mediante l'aggiunta di una soluzione di substrato cromogeno incolore, il quale viene convertito dall'enzima in un prodotto di reazione colorato. Dopo aver bloccato la reazione enzimatica, l'assorbanza viene misurata con un lettore colorimetrico di micropiastre a 450 nm. I segnali di assorbanza (*Optical Density*, OD) ottenuti vengono trasformati in segnale relativo percentuale ( $OD/OD$  dello standard zero  $\times 100 = B/B_0\%$ ).

I risultati sono stati elaborati con il software Magellan (Tecan). Per la curva standard possono essere impiegate l'equazione "punto a punto", oppure la "cubic spline", senza significative differenze nei dosaggi.

## Campioni

Sono stati analizzati campioni granella integrale di mais, frumento tenero integrale e farina di frumento raffinata tipo "00", avena decorticata e mangimi per polli. In particolare, venti campioni negativi per ogni matrice ( $< 0,025$  ppm, HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) sono stati analizzati come tal quali (bianchi) o addizionati con diverse quantità di tossina T-2.

Sono stati inoltre utilizzati due materiali di riferimento naturalmente contaminati (Trilogy), un materiale di controllo naturalmente contaminato ("Progetto Trieste", PTS) e un materiale di controllo fortificato (FAPAS).

I campioni sono stati estratti per 3 minuti con una soluzione metanolica e successiva filtrazione (Whatman n. 1) e diluizione in acqua distillata.

## Kit di confronto

È stato impiegato un altro kit ELISA commercialmente disponibile, di tipo competitivo diretto, per la determinazione delle due tossine nei cereali e nei mangimi. Il saggio, della durata di dieci minuti complessivamente, consente di rilevare entrambe le tossine con cross-reattività del 100% nel range di dosaggio 0,025-0,25 ppm.

Il principio di saggio corrisponde a quello di *Celer* T2. L'assorbanza viene misurata con un lettore colorimetrico di micropiastre a 650 nm.

I segnali di assorbanza sono stati comunque trasformati in segnale di assorbanza relativo  $B/B_0\%$  ed elaborati con il software Magellan.

## Risultati

### Caratteristiche del saggio

La Figura 1 riporta la curva di taratura media del kit *Celer* T2 (31 sedute analitiche). Per ogni punto di calibrazione sono rappresentate anche le barre d'errore Y corrispondenti alle deviazioni standard dei valori di  $B/B_0$ . Si osserva che, nonostante la curva di taratura contenga metanolo e che il saggio si esegua in singola replica, non vi è significativa variabilità tra sedute in termini di posizionamento della curva.

Il kit è stato progettato per ottenere un dosaggio accurato di campioni naturalmente contaminati da entrambe le forme di tossina. La Tabella 1 riporta le cross-reattività verificate nell'ambito di tre sedute analitiche per le forme T-2 ed HT-2.

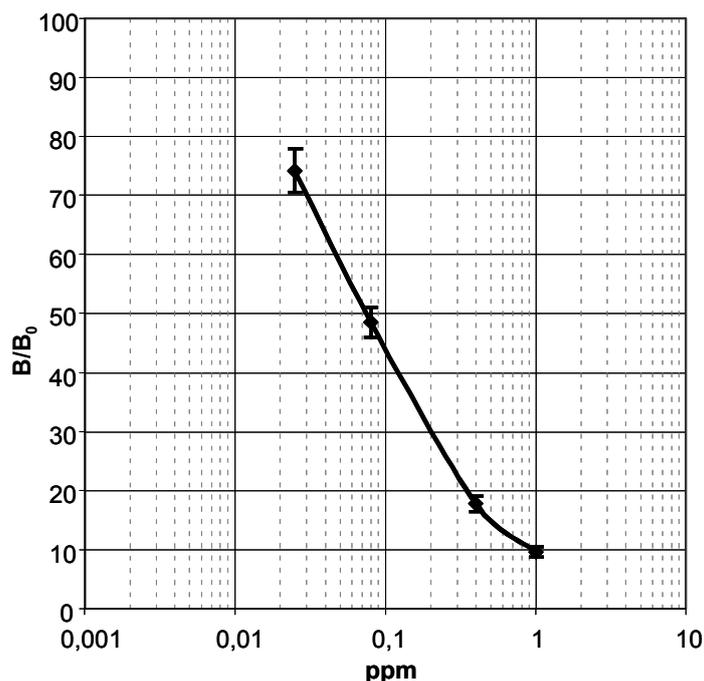


Figura 1. Curva di taratura media ottenuta per 31 sedute analitiche condotte con il kit Celer T2

Tabella 1. Cross-reattività media ottenuta nei confronti dei 2 metaboliti nell'ambito di 3 sedute analitiche

Analita	Cross-reattività media (%) ± SD
Tossina T-2	100
Tossina HT-2	72 ± 8

### Limite di rilevazione e specificità del saggio

Il limite di rivelazione (*Limit Of Detection*, LoD) è stato determinato analizzando venti campioni negativi per matrice e sottraendo dal valore medio dei B/B<sub>0</sub> 2 deviazioni standard (*Standard Deviation*, SD). Nella Tabella 2 sono riportate le concentrazioni corrispondenti ai LoD identificati e le percentuali di specificità ottenute per ciascuna matrice.

Tabella 2. Specificità del saggio valutata analizzando 20 campioni negativi per tipologia di matrice

Matrice	LoD (ppm)	Specificità %
Granella di mais	0,025	95
Frumento tenero integrale	0,025	100
Farina di frumento tenero raffinata	0,025	100
Avena decorticata	0,050	100
Mangime per polli	0,050	95

## Sensibilità del saggio

La sensibilità del kit *Celer* T2, intesa come limite di quantificazione (*Limit Of Quantification*, LoQ), è stata determinata verificando quale fosse la minor concentrazione di tossina T2 rilevabile dal saggio con una probabilità del 95%. I valori ottenuti sono riportati nella Tabella 3.

**Tabella 3. Sensibilità del saggio valutata aggiungendo 20 campioni negativi per tipologia di matrice**

Matrice	LoD (ppm)	Specificità %
Granella di mais	0,025	95
Frumento tenero integrale	0,025	100
Farina di frumento tenero raffinata	0,025	100
Avena decorticata	0,050	95
Mangime per polli	0,050	100

## Accuratezza e precisione

Tutte le matrici sono state addizionate a quattro livelli differenti di tossina T-2 nel range 0,1 e 1 ppm.

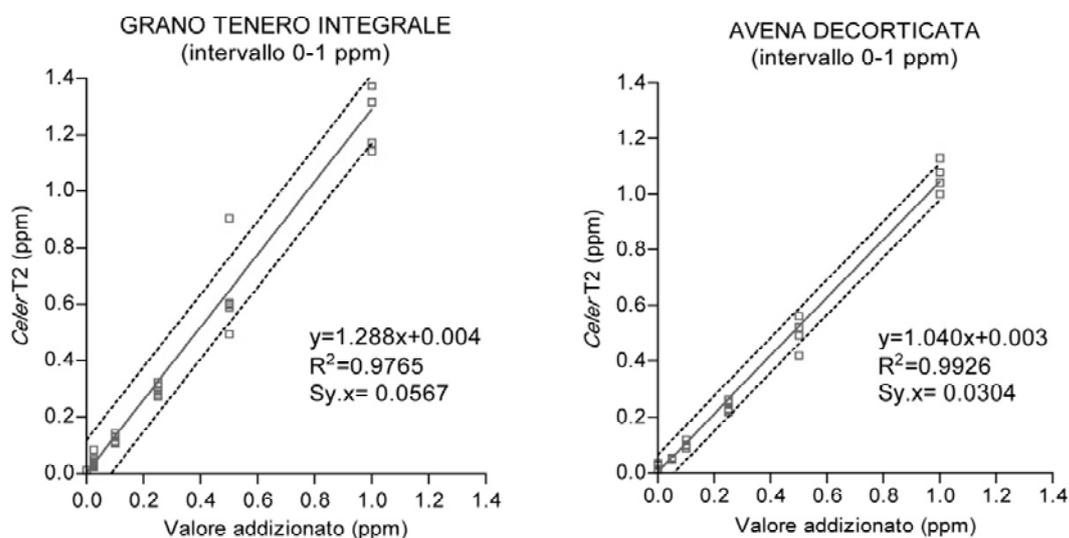
Ogni campione è stato implementato in tre repliche per la valutazione della variabilità intrasaggio. Gli esperimenti sono stati ripetuti in tre giornate diverse per la definizione della variabilità intersaggio.

La Tabella 4 mostra i recuperi medi ottenuti nel range di addizionamento, intesi come rapporti tra il risultato ottenuto con il kit e la concentrazione di tossina aggiunta al campione, e i Coefficienti di Variazione (CV), definiti per le sperimentazioni intra- e inter-saggio come rapporto tra deviazione standard e dose media ottenuta.

**Tabella 4. Accuratezza (recupero %) e precisione (CV%) del saggio per campioni addizionati con tossina T-2 a quattro livelli nel range 0,1-1 ppm**

Matrice	Recupero % (media $\pm$ SD)	CV% Intrasaggio (media di 4 livelli)	CV % Intersaggio (media di 4 livelli)
Granella di mais	109 $\pm$ 13 ( <i>n</i> = 20)	8	11
Frumento tenero integrale	125 $\pm$ 18 ( <i>n</i> = 20)	6	13
Farina di frumento tenero raffinata	116 $\pm$ 14 ( <i>n</i> = 20)	7	10
Avena decorticata	100 $\pm$ 9 ( <i>n</i> = 20)	7	9
Mangime per polli	113 $\pm$ 21 ( <i>n</i> = 40)	13	8

Dai dati ottenuti si possono ottenere le correlazioni tra il valore addizionato e quello ottenuto in ELISA. I grafici mostrati nella Figura 2 mostrano la correlazione lineare per la matrice frumento tenero e per l'avena decorticata:



**Figura 2. Grafici di correlazione lineare ottenuti per gli addizionamenti di tossina T-2 su frumento tenero integrale e avena decorticata**

## Trueness

Poiché l'addizionamento di concentrazioni note di tossina T-2 non è sufficiente a garantire l'applicabilità del kit ELISA nella routine dell'analisi di campioni naturalmente contaminati, sono stati acquisiti quattro diversi materiali di riferimento e di controllo. Tre sono naturalmente contaminati con entrambe le tossine (Trilogy TC970, Trilogy, MTC 9999D, r-Biopharm e PTS WH1143-1, Test Veritas), mentre l'ultimo è addizionato con T-2 ed HT-2 in rapporto tale da simulare una situazione naturale (T2261, FAPAS). Il confronto tra il risultato ottenuto in ELISA e i valori assegnati di contaminazione ai quattro materiali è riportato nella Tabella 5.

Ciascun campione è stato analizzato tre giorni differenti per la verifica della ripetibilità analitica. Ogni estratto è stato peraltro implementato in triplicato per l'ottenimento del CV intra-saggio.

**Tabella 5. Accuratezza (recupero %) e precisione (coefficiente di variazione, CV%) del saggio ottenuti analizzando materiali di riferimento (Trilogy) e di controllo (PTS, FAPAS)**

Codice	Valore assegnato (ppm)	Dosaggio medio $\pm$ SD (ppm)	Recupero % (media $\pm$ SD)	CV% Intra-saggio	CV% Inter-saggio
Granella di mais	T-2: 0,324	0,642 $\pm$ 0,043	87 $\pm$ 6	6	4
TRILOGY TC970	HT-2: 0,414				
Granella di mais	T-2: 0,264	0,643 $\pm$ 0,042	84 $\pm$ 5	2	7
TRILOGY MTC 9999D	HT-2: 0,523				
Grano tenero integrale	T-2: 0,045	0,131 $\pm$ 0,012	131 $\pm$ 12	3	11
PTS WH1143-1	HT-2: 0,055				
Avena	T-2: 0,164	0,359 $\pm$ 0,076	85 $\pm$ 18	4	10
FAPAS T2261	HT-2: 0,257				

## Confronto con analogo kit ELISA

A conclusione delle prove di validazione condotte su *Celer* T2, sono state messe a confronto le performance con quelle di analogo kit rapido disponibile sul mercato. Il confronto è stato condotto sulle matrici di interesse primario, ovvero frumento tenero integrale e avena, impiegando campioni bianchi e addizionati. Per l'avena è stato impiegato anche il materiale di controllo FAPAS.

Il confronto diretto di performance ottenuto è riportato nella Tabella 6.

**Tabella 6. Confronto diretto dei valori di dosaggio e i recuperi ottenuti analizzando in parallelo i medesimi campioni di frumento tenero e avena sui due dispositivi diagnostici**

Campione	Valore addizionato/ assegnato (ppm)	Confronto tra saggi ELISA analoghi	
		Dosaggio (ppm, media $\pm$ SD)	Recupero % (media $\pm$ SD)
Grano tenero integrale	Addizionamento T-2 0,100	<i>Celer</i> T2: 0,125 $\pm$ 0,014 Kit analogo: 0,073 $\pm$ 0,010	125 $\pm$ 14 73 $\pm$ 10
Avena decorticata	Addizionamento T-2 0,050	<i>Celer</i> T2: 0,053 $\pm$ 0,02 Kit analogo: 0,030 $\pm$ 0,005	107 $\pm$ 5 60 $\pm$ 10
Avena FAPAS T2261	Assegnato in Proficiency: T-2: 0,164 HT-2: 0,257	<i>Celer</i> T2: 0,359 $\pm$ 0,076 Kit analogo 0,583 $\pm$ 0,216	85 $\pm$ 18 138 $\pm$ 51

## Conclusioni

I risultati ottenuti nel corso della messa a punto e validazione del nuovo immunosaggio indicano che *Celer* T2 è un dispositivo diagnostico specifico, sensibile, preciso e accurato nell'analisi di campioni fortificati con tossina e di campioni naturalmente contaminati da entrambi i metaboliti tossici. Nel confronto con un analogo kit ELISA rapido, che presenta cross-reattività verso la tossina HT-2 maggiore, il *Celer* T2 si è dimostrato più accurato e più preciso: grazie ad una tempistica di saggio di dieci minuti più lunga, abbassa la variabilità inter-seduta e quindi l'incertezza della misurazione. Il range di dosaggio di *Celer* T2 è peraltro più ampio e permette di analizzare anche campioni più contaminati senza necessità di procedere con ulteriori diluizioni.

Si conclude che *Celer* T2 potrà rappresentare un rapido e affidabile metodo di screening per la rilevazione quantitativa delle tossine T-2 ed HT-2 nei campioni di cereali e mangimi.

## Bibliografia

1. D'Mello JPF, Placinta CM, Macdonald AMC. Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *An Feed Sci Tech* 1999;80:183-205.
2. Li Y, Wang Z, Beier RC, Shen J, De Smet D, De Saeger S, Zhang S. T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin: review of toxicity, metabolism, and analytical methods. *J Agric Food Chem* 2011;59(8):3441-53.
3. Kalantari H, Moosavi M. Review on T-2 toxin. *J Nat Pharm Prod* 2010;5(1):26-38.

4. Muller HM, Reimann J, Schumacher U, Schwadorf K. Natural occurrence of Fusarium toxins in oats harvested during five years in an area of southwest Germany. *Food Add Contam* 1998;15(7):801-6.
5. Langseth W, Rundberget T. The occurrence of HT-2 toxin and other trichothecenes in Norwegian cereals. *Mycopathologia* 1999;147(3):157-65.
6. Scudamore KA, Baillie H, Patel S, Edwards SG. Occurrence and fate of Fusarium mycotoxins during commercial processing of oats in the UK. *Food Addit Contam* 2007;24(12):1374-85.
7. Rabie CJ, Sydenham EW, Thiel PG, Lübben A, Marasas WF. T-2 toxin production by *Fusarium acuminatum* isolated from oats and barley. *Appl Environ Microbiol* 1986;52(3):594-6.
8. Wyatt RD, Hamilton PB, Burmeister HR. The effects of T-2 toxin in broiler chickens. *Poult Sci* 1973;52(5):1853-9.
9. Devegowda G, Murthy TNK. Mycotoxins: their effects in poultry and some practical solutions. *The mycotoxin blue book* 2005;25-56.
10. Sokolović M, Garaj-Vrhovac V, Simpraga B. T-2 toxin: incidence and toxicity in poultry. *Arh Hig Rada Toksikol* 2008;59(1):43-52.

# MONITORAGGIO DELLE CONTAMINAZIONI DI DEOSSINIVALENOLO NEL FRUMENTO MEDIANTE UN NUOVO TEST RAPIDO QUANTITATIVO

Elena Bianco (a), Francesca Diana (b), Elisa Paoluzzi (b), Giulia Rosar (b), Roberto Marzari (a)  
(a) Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste, Trieste  
(b) Tecna srl, Area Science Park, Trieste

## Introduzione

Il deossinivalenolo (DON) è un metabolita tossico prodotto da funghi appartenenti al genere *Fusarium* e che si ritrova prevalentemente in cereali quali frumento, orzo, avena, segale e mais (1).

La contaminazione da DON è variabile negli anni in quanto la crescita fungina è molto sensibile alle condizioni ambientali. La produzione di tossina aumenta, infatti, in risposta a basse temperature associate ad alti tenori di umidità (2). Dopo il raccolto la crescita fungina viene bloccata conservando i cereali a umidità inferiori al 13%; se questo non è possibile le muffe diffondono amplificando di molto la contaminazione iniziale (3).

Il DON determina una serie di disturbi che compromettono lo stato di salute e il rendimento produttivo degli animali, comportando anche danni di tipo economico. Pur non essendoci dei dati epidemiologici certi a proposito delle conseguenze per l'uomo in seguito ad assunzione di cibi contaminati con DON, gli effetti osservati sugli animali, soprattutto a carico del sistema immunitario, destano preoccupazione anche per la salute umana (4). La tossicità del DON risulta essere specie-specifica. Gli animali più sensibili sono i suini, in cui gli effetti tossici sono apprezzabili già a contaminazioni dei mangimi con 1000-2000 µg/kg di tossina (5). Al contrario, ruminanti e pollame tollerano concentrazioni di DON fino a 20000 µg/kg. Questa diversità di risposta ha comportato la necessità di distinguere i limiti di tossina negli alimenti in base alla specie cui questi sono destinati. In Europa la Raccomandazione 576/2006 (6) indica i valori di riferimento di DON per le materie prime e per i mangimi ad uso animale differenziati per specie, mentre il Regolamento CE 1226/2007 (7) della Commissione Europea fissa i tenori massimi di DON nei cereali grezzi e trasformati destinati all'alimentazione umana.

Il monitoraggio della contaminazione di DON nelle materie prime cerealicole richiede strumenti di *screening* rapidi e di semplice impiego, che si prestino ad un utilizzo da campo e che consentano di verificare che i tenori di tossina siano inferiori ai limiti posti dalla legge (8). Uno dei tipi di saggio maggiormente apprezzati come test di screening, grazie alle sue caratteristiche di facilità d'uso, velocità e basso costo è il *Lateral Flow ImmunoAssay* (LFIA).

Il presente lavoro vuole valutare le performance di un nuovo test quantitativo basato su tecnologia LFIA, denominato *EZ Flow DON*.

Le prestazioni del saggio sono state valutate in particolare su frumento tenero integrale (*Triticum aestivum*), cereale significativamente affetto da attacchi di *Fusarium*.

## Materiali e metodi

### Saggio LFIA per la determinazione del deossinivalenolo

*EZ Flow* DON è un LFIA competitivo per la determinazione quantitativa del DON. Sulla linea di test sono state immobilizzate molecole di DON, molecole che competono con la tossina eventualmente presente nel campione per i siti di legame dell'anticorpo specifico anti-DON legato al tracciante, rappresentato da particelle di oro colloidale. La quantità di anticorpo-oro colloidale che si lega sulla linea del test, e quindi l'intensità del colore, risulta inversamente proporzionale alla concentrazione di tossina presente nel campione. Sulla linea di controllo è stato immobilizzato un anticorpo specifico che riconosce gli anticorpi anti-DON coniugati all'oro. Lo sviluppo della linea di controllo è indicativo della validità del test eseguito.

### Campioni

Tutti gli esperimenti sono stati condotti su campioni di frumento tenero integrale. Per la determinazione della specificità sono stati impiegati materiali con tenore di DON inferiore a 50 µg/kg (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*). I campioni negativi sono stati addizionati con diverse quantità di DON per la determinazione del limite di quantificazione (*Limit Of Quantification*, LoQ), della precisione e dell'accuratezza del saggio. È stato infine analizzato un materiale naturalmente contaminato con concentrazione di DON determinata in *proficiency test* (Bipea, cod. 05-0631-0061, 2268 µg/kg di DON; range di accettabilità fornito dall'organizzatore: 1361-3175 µg/kg).

### Preparazione del campione e allestimento del saggio

I campioni di frumento sono stati macinati ed estratti per 3 minuti in rapporto 1:5 con acqua distillata e successivamente filtrati (carta Whatman n. 1) o lasciati sedimentare. Gli estratti sono stati quindi diluiti 1:10 con tampone di diluizione del saggio. Il test viene eseguito caricando 75 mL di campione nell'apposito alloggiamento della cassetta di plastica all'interno della quale è stata inserita la strip. Il risultato è stato letto dopo 5 minuti di sviluppo.

### Lettura ed elaborazione dei risultati

La lettura del risultato si effettuava inserendo il dispositivo *lateral flow* in un lettore densitometrico associato ad un software di elaborazione. Lo strumento analizza l'intensità delle linee di test (T) e di controllo (C) e ne calcola il rapporto. Il software interpola il rapporto T/C del campione in una retta di calibrazione di DON precedentemente memorizzata e calcola la corrispondente concentrazione di tossina nel campione, fornendo all'utilizzatore il risultato finale espresso in concentrazione.

## Risultati

### Intervallo di dosaggio

*EZ Flow* DON è un LFIA specifico per la determinazione quantitativa del DON nell'intervallo 125-5000 µg/kg. Nel grafico della Figura 1 sono rappresentati i limiti normativi vigenti in Europa per l'alimentazione sia umana che animale e l'intervallo di misura del saggio, intervallo che è estendibile a 500-20000 µg/kg mediante ulteriore diluizione degli estratti. *EZ Flow* DON si dimostra un metodo di *screening* adatto al monitoraggio del DON in tutti i campioni di cereali e mangimi, in quanto l'intervallo di dosaggio comprende tutti i tenori massimi previsti dalla legge.

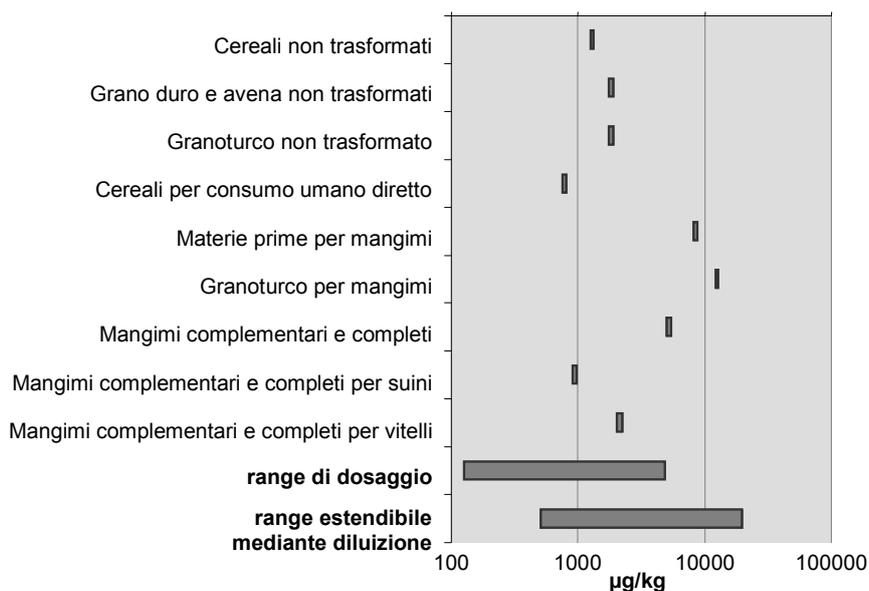


Figura 1. Confronto tra i livelli di interesse e l'intervallo di dosaggio di *EZ Flow* DON

### Specificità del saggio

10 campioni di frumento tenero integrale negativi (<50 µg/kg) sono stati analizzati al fine di verificare la specificità del saggio. Tutti i campioni avevano concentrazioni inferiori a 125 µg/kg, limite di rilevazione del saggio (*Limit Of Detection, LoD*); il saggio mostrava quindi una specificità del 100%. Non è stato pertanto necessario stabilire alcun limite di decisione o *cut-off*.

### Sensibilità del saggio

La sensibilità del saggio, intesa come limite di quantificazione (*LoQ*), è stata determinata verificando quale fosse la minore concentrazione di DON rilevabile dal saggio con una probabilità pari o superiore al 95%. I medesimi campioni utilizzati per i test di specificità sono stati addizionati a 250 µg/kg di deossinivalenolo. La totalità dei campioni risultava positiva e il *LoQ* è stato dunque posto a 250 µg/kg.

## Accuratezza e precisione del saggio

L'accuratezza del saggio, espressa in termini di recupero percentuale, e la precisione dei dosaggi, espressa in termini di deviazione standard relativa (Coefficiente di Variazione, CV%), sono state analizzate aggiungendo un campione di frumento a diversi livelli di DON (500, 1000, 1500 e 2000 µg/kg). La precisione del saggio è stata valutata in condizioni di ripetibilità implementando tre repliche del medesimo estratto di frumento.

Il CV in condizioni di ripetibilità è risultato sempre al di sotto del 25% (Tabella 1). La riproducibilità intra-laboratorio è stata valutata estraendo tre volte il medesimo campione di frumento addizionato ai livelli di 500 e 2000 µg/kg di DON. I risultati riportati nella Tabella 2 mostrano una variabilità di dosaggio indipendente dal livello di addizionamento, con valori di CV del 12%, indicando una elevata riproducibilità del saggio.

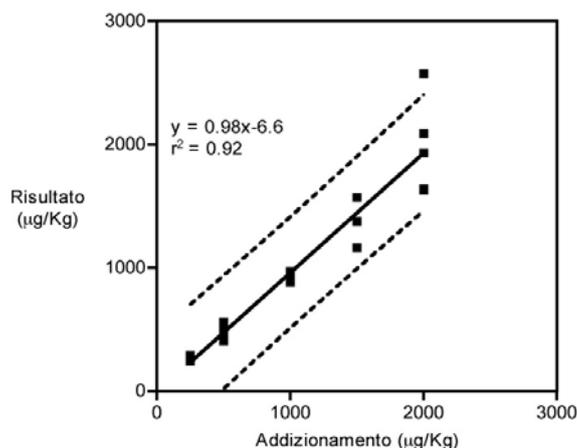
**Tabella 1. Accuratezza e precisione di EZ Flow DON in condizioni di ripetibilità**

Valore addizionato (µg/kg)	Risultato (µg/kg)	Dosaggio (µg/kg) (media ± SD)	Recupero % (medio ± SD)	CV %
500	490	487	97	16%
	409	±	±	
	562	77	15	
1000	884	937	94	5%
	957	±	±	
	971	47	5	
1500	1573	1372	91	15%
	1377	±	±	
	1165	204	14	
2000	1933	2046	102	24%
	1630	±	±	
	2574	482	24	

**Tabella 2. Accuratezza e precisione di EZ Flow DON in condizioni di riproducibilità**

Valore addizionato (µg/kg)	Risultato (µg/kg)	Dosaggio (µg/kg) (media ± SD)	Recupero % (medio ± SD)	CV %
500	562	496	99	12%
	476	±	±	
	450	59	12	
2000	1933	1888	94	12%
	2088	±	±	
	1642	226	11	

L'accuratezza media dei dosaggi sui campioni fortificati con DON nell'intervallo tra 250 e 2000 µg/kg è risultata del  $98 \pm 12\%$  ( $n. 16$ ). La correlazione fra concentrazione di tossina attesa e quella ottenuta con EZ Flow DON è rappresentata nella Figura 2.



**Figura 2. Correlazione lineare fra concentrazione di DON addizionata e quella rilevata da EZ Flow DON**

Il coefficiente angolare della retta è prossimo all'unità, indicando che non vi sono tendenze alla sovra- o sotto-stima dipendenti dal livello di addizionamento del campione.

### Verifica su campione di controllo naturalmente contaminato

Le prestazioni del saggio sono state valutate su un campione di frumento integrale naturalmente contaminato derivante da *proficiency test*. Sono state implementate tre repliche con il medesimo estratto per la determinazione della ripetibilità; per la riproducibilità intra-laboratorio sono state eseguite tre prove in tre giornate differenti, estraendo il campione ogni volta. I risultati raccolti sono riportati nella Tabella 3. Il recupero medio ottenuto su  $n = 5$  determinazioni è stato del  $102 \pm 24\%$ . I CV sia in condizioni di ripetibilità che di riproducibilità risultano inferiori al 20%.

**Tabella 3. Accuratezza e precisione di EZ Flow DON su frumento naturalmente contaminato**

Campione valore assegnato (range di accettabilità)	Ripetibilità			Riproducibilità		
	Dosaggio (µg/kg) (media ± SD)	Recupero % (media ± SD)	CV%	Dosaggio (µg/kg) (media ± SD)	Recupero % (media ± SD)	CV%
BIPEA 05-0631-0061 2268 µg/kg (1361-3175 µg/kg)	2,573±0,491	113±22	19%	1,951±0,234	86±10	12%

## Conclusioni

Lo studio effettuato su *EZ Flow DON* indica che questo dispositivo analitico da campo combina semplicità e rapidità senza compromettere la qualità delle performance. L'elevata specificità ( $LoD < 125 \mu\text{g/kg}$ ), la sensibilità a  $250 \mu\text{g/kg}$  di DON e l'intervallo di dosaggio ampio ne consentono l'utilizzo su tutte le matrici di interesse, nel rispetto dei limiti di legge

europei. Lo studio ha anche mostrato l'elevata accuratezza del dispositivo sia sul materiale addizionato che sul naturalmente contaminato, con un recupero medio del 98% e 102% rispettivamente. Nonostante la variabilità, soprattutto in condizioni di ripetibilità, sia superiore a quella ottenibile con altri sistemi di screening (es. kit ELISA) si ritiene che *EZ Flow* DON rappresenti un utile metodo per il controllo della contaminazione di DON nel frumento, da adottare in assenza di un laboratorio e di operatori che possano eseguire test più complessi.

## Bibliografia

1. Richard JL, Payne GA (Ed.) *Mycotoxins: Risk in plant, animal and human system*. Ames (Iowa): Council for Agricultural Science and Technology; 2003.
2. Grain Inspection, Packers & Stockyards Administration. *Grain fungal diseases & mycotoxin reference*. United States Department of Agriculture; 2006. Disponibile all'indirizzo: <http://www.gipsa.usda.gov/Publications/fgis/ref/mycobook.pdf>; ultima consultazione 04/10/12.
3. Whitlow LW, Hagler WM, Jr. *Mold and mycotoxin issues in dairy cattle: effects, prevention and treatment*. eXtension; 2010. Disponibile all'indirizzo: [http://www.extension.org/pages/Mold\\_and\\_Mycotoxin\\_Issues\\_in\\_Dairy\\_Cattle:\\_Effects,\\_Prevention\\_and\\_Treatment](http://www.extension.org/pages/Mold_and_Mycotoxin_Issues_in_Dairy_Cattle:_Effects,_Prevention_and_Treatment); ultima consultazione 04/10/12.
4. Rotter BA, Prelusky DB, Pestka JJ. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *Journal of Toxicology and Environmental Health* 1996;48:101-34.
5. Pestka JJ, Smolinski AT. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on human. *Journal of Toxicology and Environmental Health, part B* 2005;8:39-69.
6. Europa. Raccomandazione della Commissione del 17 agosto 2006, n. 576, 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* n. 229, 23 agosto 2006.
7. Europa. Regolamento della commissione del 28 settembre 2007, n. 1126. Modifica del 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* n. 255, 29 settembre 2007.
8. Zheng MZ, Richard JL, Binder J. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia* 2006;161:261-73.

# MONILIFORMINA NEL MAIS: SVILUPPO DI UNA METODICA HPLC-ESI-MS/MS E PRIME INDAGINI SULLA DIFFUSIONE NEL QUADRIENNIO 2008-2011 IN PIEMONTE

Valentina Scarpino, Massimo Blandino, Amedeo Reyneri, Francesca Vanara  
Dipartimento di Agronomia, Selvicoltura e Gestione del Territorio, Università degli Studi di Torino,  
Grugliasco

## Introduzione

La moniliformina o acido 3-idrossiciclobut-3-ene-1,2-dione è una micotossina a diffusione mondiale prodotta sui cereali da diverse specie di *Fusarium* e in particolare di *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. thapsinum* e *F. avenaceum* (1). La struttura chimica della moniliformina è riportata in Figura 1.

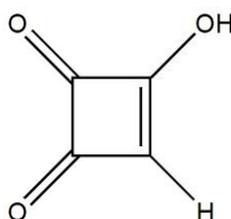


Figura 1. Struttura chimica della moniliformina

La moniliformina è stata per la prima volta isolata da Cole *et al.* (2) nel 1973 da una coltura di mais contaminato che identificarono erroneamente come *F. moniliforme*, da cui il nome moniliformina.

La moniliformina o acido semisquarico venne caratterizzata strutturalmente, chimicamente e spettroscopicamente per la prima volta da Springer *et al.* nel 1974 (3). Tale micotossina è una piccola molecola ionica avente peso molecolare pari a 98,0 (g mol<sup>-1</sup>) per l'acido libero (4). A causa del suo basso valore di pka (1,7) l'acido nella sua forma libera è instabile e per tale motivo in natura è presente prevalentemente sottoforma di sale di sodio o di potassio, solubili in acqua e in altri solventi polari.

È inoltre stato dimostrato che tale micotossina è tossica per diverse specie animali, tra cui principalmente specie aviarie quali galletti (LD<sub>50</sub> = 4,00 mg kg<sup>-1</sup>, dose orale) (2) e anatroccoli (LD<sub>50</sub> = 3,68 mg kg<sup>-1</sup>, dose orale) (5).

Attualmente, dal punto di vista legislativo non sono stati definiti tenori massimi raccomandati per questa micotossina ma è in corso la richiesta di pareri da parte dell'EFSA (*European Food Safety Authority*) sui rischi sanitari per gli esseri umani e gli animali relativi alla sua presenza in alimenti e mangimi (6). La moniliformina è quindi una delle tossine

emergenti per le quali è importante mettere a punto metodiche analitiche robuste e sensibili per la rilevazione, al fine anche di permettere studi sulla diffusione nei nostri areali cerealicoli.

Per tale motivo l'obiettivo di questo lavoro è stato lo sviluppo di una metodica HPLC-ESI-MS/MS (*High Performance Liquid Chromatography - Electron Spray Ionization - Mass Spectrometry*) utile ad una prima indagine sulla contaminazione da moniliformina negli areali maidicoli piemontesi nel quadriennio 2008-2011.

## Materiali e metodi

### Reagenti

Tutti i solventi impiegati per l'estrazione e l'analisi sono stati forniti da Sigma Aldrich (St. Louis, MO), o da VWR (Milano, Italia). I solventi impiegati per l'estrazione sono di tipo gradient grade, mentre quelli impiegati come eluenti per l'analisi HPLC-ESI-MS/MS sono di tipo LC-MS grade.

Lo standard di moniliformina è stato fornito da Sigma Aldrich (St. Louis, MO) sottoforma di sale di sodio da cui è stata preparata una "soluzione madre" a  $93 \mu\text{g mL}^{-1}$  di moniliformina in acetonitrile/acqua (84:16, v/v), conservata e stoccata a 4 °C. Questa "soluzione madre" è stata utilizzata per preparare le "soluzioni figlie" in acetonitrile/acqua (84:16, v/v), necessarie a costruire la retta di calibrazione.

### Estrazione e clean-up

Lo sfarinato di mais analizzato è stato estratto utilizzando una miscela di acetonitrile/acqua 84:16 (v/v) e la purificazione è stata condotta mediante l'impiego delle colonne di clean-up Mycosep® 240 Mon (Romer Labs®).

### Analisi HPLC-ESI-MS/MS

La metodica HPLC-ESI-MS/MS è stata condotta mediante strumentazione Varian 212-LC Chromatography Pump (Colonna: Merck, SeQuant, ZIC®-HILIC 100×2,1 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ , 100 Å) / ProStar 410 AutoSampler / 310-MS TQ Mass Spectrometer.

La corsa cromatografica in gradiente della durata di 17 minuti ha previsto l'uso di acetonitrile e formiato di ammonio 100 mM come eluenti ( $t_R$  moniliformina = 3,8 minuti). Il cromatogramma ottenuto è riportato in Figura 2.

Con l'impiego di un triplo quadrupolo si è proceduto alla rivelazione della moniliformina con la sorgente ESI 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.

Al fine dell'indagine, nel quadriennio 2008-2011 sono stati analizzati con la metodica descritta complessivamente 108 campioni di granella di mais prelevati alla raccolta in provincia di Torino (TO) e di Cuneo (CN) da campi aziendali e sperimentali.

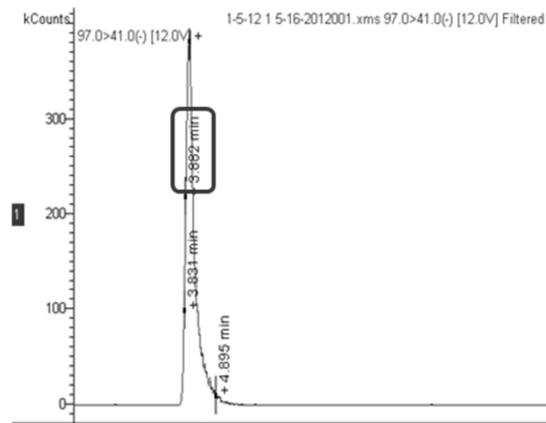


Figura 2. Cromatogramma e  $t_R$  della moniliformina

## Risultati e discussione

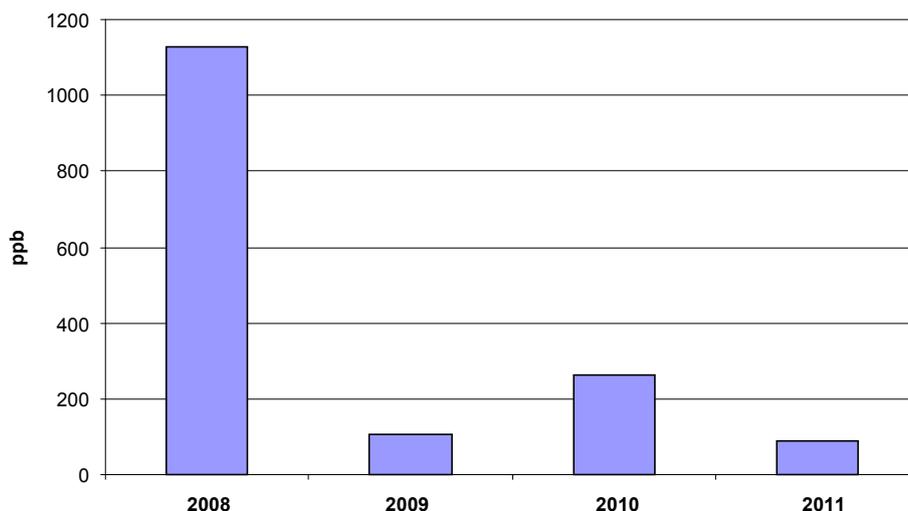
I valori di recupero ottenuti per gli estratti di mais a quattro diversi livelli di concentrazione ( $3,72 \mu\text{g kg}^{-1}$ ;  $37,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ ;  $372 \mu\text{g kg}^{-1}$ ;  $3720 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) sono variati tra il 75 e il 91% (RSD% 6-14%). I valori dei limiti di rivelazione (*Limit of Detection*, LoD) e quantificazione (*Limit of Quantification*, LoQ) sono stati rispettivamente  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$  e  $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Nei 108 campioni di granella di mais la concentrazione di moniliformina è risultata in media pari a  $1127 \mu\text{g kg}^{-1}$  nel 2008 (range: 33-2606  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ),  $106 \mu\text{g kg}^{-1}$  nel 2009 (range: < LoD – 527  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ),  $262 \mu\text{g kg}^{-1}$  nel 2010 (range: < LoD – 920  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) e  $89 \mu\text{g kg}^{-1}$  nel 2011 (range: < LoD – 409  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).

La percentuale di campioni positivi per ciascun anno è risultata variabile tra l'81 e il 100%, evidenziando una presenza diffusa di questa micotossina nel mais coltivato nell'areale preso in considerazione. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1. Moniliformina: risultati ottenuti dall'analisi HPLC-ESI-MS/MS di 108 campioni di granella di mais prelevati alla raccolta in provincia di Torino e di Cuneo (quadriennio 2008-2011)

Anno	Campioni (n.)	Provincia	Concentrazione media ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Range ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Positivi (%)
2008	16	TO	1127	33-2606	100
2009	16	TO	106	< LoD - 527	81
2010	40	TO, CN	262	< LoD - 920	98
2011	36	TO, CN	89	< LoD - 409	92

I risultati analitici evidenziano un'ampia variabilità di contaminazione attribuibile in primo luogo all'andamento meteorologico durante la maturazione e quindi all'agrotecnica quale l'epoca di semina e raccolta, l'ibrido e la difesa insetticida (Figura 3).



**Figura 3. Confronto relativo alla concentrazione di moniliformina nel quadriennio 2008-2011 in Piemonte**

## Conclusioni

Dai risultati ottenuti è possibile affermare che la metodica analitica sviluppata è risultata robusta, sensibile e utile per dimostrare la diffusa presenza della moniliformina negli areali maidicoli piemontesi. È da notare, infatti, che ca. il 90% dei campioni di mais analizzati è risultato positivo alla contaminazione da moniliformina.

Infine, data l'ampia variabilità dei dati ottenuti per i diversi anni sottoposti a questa prima indagine, si potrebbe ipotizzare che fattori variabili quali la piralide e le condizioni meteorologiche, possano essere importanti nel determinare la contaminazione da tale micotossina.

## Bibliografia

1. Sharman M, Gilbert J, Chelkowski J. A survey of the occurrence of the mycotoxin moniliformin in cereal samples from sources worldwide. *Food Addit Contam* 1991;8:459-66.
2. Cole RJ, Kirksey JW, Cutler HG, Doupnik BL, Peckham JC. Toxin from *Fusarium moniliforme* – effects on plants and animals. *Science* 1973;179:1324-6.
3. Springer JP, Clardy J, Cole RJ, Kirksey JW, Hill RK, Carlson RM, Isidor JL. Structure and synthesis of moniliformin, a novel cyclobutane microbial toxin. *J Am Chem Soc* 1974;96:2267-8.
4. Betina V. *Bioactive molecules, Vol.9: Mycotoxins-chemical, biological and environmental aspects*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1989.
5. Kriek NPJ, Marasas WFO, Steyn PS, Van Rensburg SJ, Steyn M. Toxicity of a moniliformin-producing strain of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* isolated from maize. *Food Cosmet Toxicol* 1977;15:579-87.
6. European Food and Safety Authority. *EFSA Request for a scientific opinion on the risks for public health related to the presence of moniliformin in feed and food*. Mandate M-2010-0312. Parma: EFSA; 2010.

# CONTAMINAZIONE DA MONILIFORMINA E FUMONISINE NEL MAIS: IL RUOLO DELLA PIRALIDE

Valentina Scarpino, Massimo Blandino, Amedeo Reyneri, Valentina Sovrani, Francesca Vanara  
*Dipartimento di Agronomia, Selvicoltura e Gestione del Territorio, Università degli Studi di Torino, Grugliasco*

## Introduzione

La piralide del mais (*Ostrinia nubilalis*) svolge un ruolo molto importante nel favorire l'infezione e lo sviluppo di *F. verticillioides* e *F. proliferatum* nella granella di mais. In particolare le larve di questo insetto svolgono un'azione di veicolo delle spore fungine e ne favoriscono la colonizzazione attraverso l'erosione della granella (1).

La principale conseguenza di questa infezione è il frequente ritrovamento di fumonisine su mais in Pianura Padana (2): in molte annate le produzioni possono presentare livelli di contaminazione che eccedono i limiti previsti dalla normativa comunitaria (4000 µg kg<sup>-1</sup> di fumonisin B1 + B2 per la granella non processata secondo il Regolamento (CE) 1126/2007.

Inoltre, tra le tossine emergenti per le quali è necessario acquisire maggiori informazioni, la moniliformina è oggetto di particolare attenzione in quanto è prodotta dallo stesso *F. proliferatum* insieme al *F. subglutinans*, frequentemente isolato sulla granella di mais in Nord Italia.

L'obiettivo di questo lavoro è stato la valutazione dell'influenza dell'attività della piralide sulla contaminazione da moniliformina e fumonisine.

## Materiali e metodi

La sperimentazione è stata condotta nel corso del triennio 2008-2010 presso il centro sperimentale dell'Università di Torino, sito a Carmagnola (TO).

In ogni anno sono stati confrontati l'infestazione naturale della piralide rispetto alla protezione dall'infestazione, ottenuta con il posizionamento di una rete entomologica su una struttura in acciaio a partire dalla fioritura della coltura per impedire l'ovideposizione degli adulti. Lo schema sperimentale adottato è stato a blocchi randomizzati con 8 ripetizioni e parcelle di 16 m<sup>2</sup>. Alla maturazione commerciale sono state prelevate 25 spighe per tesi, sulle quali sono stati effettuati i rilievi per la verifica dell'attacco di piralide e dalle quali è stato ottenuto il campione di granella per la valutazione della contaminazione da moniliformina e fumonisine (B1 + B2) mediante metodiche HPLC-MS/MS (*High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry*).

## Risultati e discussione

Le spighe raccolte nelle parcelle protette con reti entomologiche sono risultate esenti dagli attacchi di piralide, mentre quelle raccolte nelle parcelle soggette agli attacchi naturali dell'insetto hanno registrato un danno variabile, con estensione dal 10 al 25%. Il controllo

dell'infestazione ha ridotto anche la presenza di ammuffimenti sulle spighe, sia come numero di spighe colpite sia come estensione (Tabella 1).

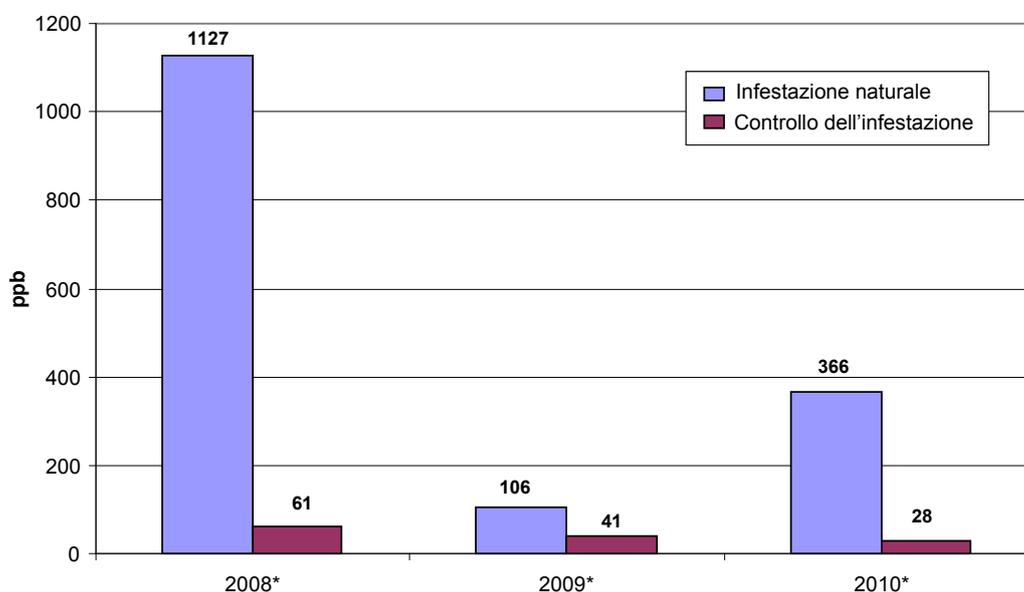
**Tabella 1. Effetto del controllo dell'infestazione della piralide (media triennio) (P < 0,001)**

Parametro	Infestazione naturale	Controllo infestazione
Incidenza ammuffimenti (%)	81	18
Severità ammuffimenti (%)	13	0,8
Incidenza piralide (%)	86	0
Severità piralide (%)	17	0
Fumonisina B1 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	2525	539
Fumonisina B2 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	1598	229
Fumonisina B1+B2 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	4123	768
Moniliformina ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	533	44

In tutti gli anni di sperimentazione, l'attività della piralide sulla spiga, se confrontata con le spighe prelevate in assenza di infestazione, ha determinato un significativo aumento della contaminazione da fumonisine. In media in assenza di danni causati dalle larve della piralide sulla spiga si è osservato un abbattimento di 5 volte del contenuto in fumonisine nella granella alla raccolta (vedi Tabella 1).

L'attività della piralide ha favorito significativamente la contaminazione da moniliformina. Nel triennio la media della contaminazione di questa tossina è stata di  $533 \mu\text{g kg}^{-1}$  e  $44 \mu\text{g kg}^{-1}$  rispettivamente in presenza e assenza di infestazione da piralide.

Il dettaglio dei 3 anni evidenzia come il controllo dell'insetto rende sempre molto basso il livello di questa micotossina. In presenza di infestazione naturale, la variabilità del contenuto di moniliformina è elevata, con i valori più alti registrati nell'anno in cui la presenza di piralide è stata più rilevante (Figura 1).



**Figura 1. Effetto del controllo dell'infestazione da piralide sulla contaminazione da moniliformina (\* p<0,001)**

Considerando nel complesso i dati raccolti nel triennio, l'analisi della correlazione conferma la relazione tra la severità dei danni causati dalla piralide sulla spiga e il contenuto sia in moniliformina ( $r = 0,694$ ,  $P < 0,001$ ) sia in fumonisine ( $r = 0,529$ ,  $P < 0,001$ ). Si evidenzia inoltre una correlazione positiva tra la contaminazione da moniliformina e fumonisine ( $r = 0,323$ ,  $P = 0,001$ ).

## Conclusioni

In conclusione i dati raccolti evidenziano che, come per le fumonisine, il controllo della moniliformina dipende principalmente dalla possibilità di ridurre l'attività trofica della piralide. Considerando la diffusione delle fumonisine nei nostri areali maidicoli e la correlazione esistente tra le due micotossine, ulteriori approfondimenti sono necessari per valutare il ruolo delle diverse agrotecniche sulla moniliformina per assicurarne un'adeguata prevenzione.

## Bibliografia

1. Alma A, Lessio F, Reyneri A, Blandino M,. Relationships between *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera Pyraustidae), crop technique and mycotoxin contamination of corn kernel in northwestern Italy. *International Journal of Pest Management* 2005;51(3):165-73.
2. Battilani P, Scandolara A, Barbano C, Pietri A, Bertuzzi T, Marocco A, Berardo N, Vannozzi GP, Baldini M, Miele S, Salera E, Maggiore T. Monitoraggio della contaminazione da micotossine in mais. *L'Informatore Agrario* 2005;6: 47-9.

# CONTAMINAZIONE DA DEOSSINIVALENOLO DELLE FRAZIONI DELLA DECORTICATURA DI GRANO TENERO

Valentina Sovrani, Massimo Blandino, Amedeo Reyneri, Valentina Scarpino, Francesca Vanara  
*Dipartimento di Agronomia, Selvicoltura e Gestione del Territorio, Università degli Studi di Torino, Grugliasco*

## Introduzione

La porzione corticale più esterna della granella dei cereali risulta essere quella in cui si concentrano contaminanti sintetici o naturali (1). Rispetto alla macinazione convenzionale, la decorticatura è un processo che permette, mediante abrasione, di rimuovere gradualmente le frazioni corticali mantenendo quelle di maggiore interesse nutrizionale (2).

L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare la contaminazione da deossinivalenolo (DON) e metalli pesanti (cadmio e piombo) in funzione della severità di decorticatura.

## Materiali e metodi

Tre varietà di frumento, provenienti da lotti omogenei coltivati in provincia di Alessandria nella campagna agraria 2009-2010, sono state sottoposte ad un processo di decorticatura progressiva utilizzando una decorticatrice da laboratorio (Mod. TM-05). Le varietà a confronto sono state Bolero, Bologna e Taylor. La decorticatura, applicata secondo la metodica utilizzata da Beta *et al.* (3), ha rimosso inizialmente il 5% del peso complessivo della granella, allontanando la corrispondente frazione più esterna (0-5%); la porzione di cariossidi rimanente è stata ulteriormente decorticata rimuovendo un ulteriore 5% del peso iniziale della granella (5-10%). Si è così proceduto secondo queste modalità fino ad ottenere 5 frazioni progressivamente più interne. Complessivamente sono stati analizzati 7 frazioni per ciascuna varietà: lo sfarinato integrale, le frazioni 0-5%, 5-10%, 10-15%, 15-20% e 20-25% e il rimanente 75% della granella corrispondente all'endosperma. Ciascun campione è stato analizzato per il contenuto in DON (metodica LC-MS) e cadmio e piombo (UNI EN 14083, 2003).

I dati sono stati elaborati mediante ANOVA (*Analysis of Variance*) e le medie confrontate con il test SNK.

## Risultati

La granella delle cv. Bolero e Taylor è risultata contaminata da DON, mentre i dati per la cv. Bologna sono risultati sotto i limiti di rilevazione sia per la granella intera sia per tutte le frazioni ottenute dalla decorticatura.

La contaminazione da DON è diminuita progressivamente dagli strati più esterni a quelli più interni (Figura 1): in media il contenuto in DON diminuisce di 49, 19, 9, 5 e 4 volte nelle frazioni 0-5%, 5-10%, 10-15% e 20-25% rispetto alla quota residua (25-100%).

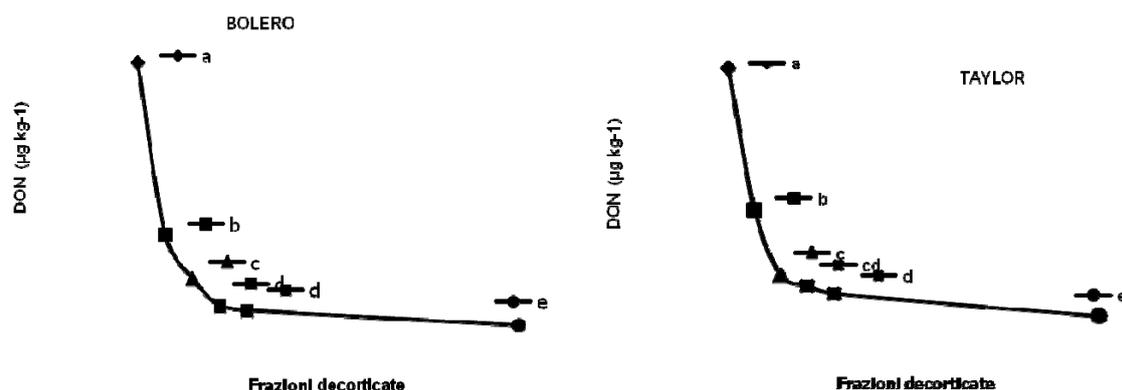


Figura 1. Contaminazione da DON nelle sottofrazioni ottenute a seguito di decorticazione in due varietà di frumento tenero. Lettere diverse indicano differenze altamente significative ( $p < 0,001$ )

In media il 64% della micotossina presente nella cariosside è stata trovata nelle frazioni 0-5% e 5-10%, confermando i risultati ottenuti da Cheli *et al.* e Lancova *et al.* (1, 4).

Tra i metalli pesanti, il piombo non è stato mai ritrovato al di sopra del limite di detenzione in nessuna delle frazioni analizzate, mentre il cadmio è stato ritrovato solo nella frazione più esterna (0-5%) delle cv. Bologna e Taylor (Tabella 1).

Non sono stati riscontrati residui di fitofarmaci nella granella intera e in nessuna delle frazioni considerate.

Tabella 1. Contenuto di cadmio ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) nelle sottofrazioni ottenute a seguito di decorticazione di tre varietà di frumento tenero

Frazioni decorticate (%)	Bolero	Bologna	Taylor
0-5	<0,05	0,05	0,07
5-10	<0,05	<0,05	<0,05
10-15	<0,05	<0,05	<0,05
15-20	<0,05	<0,05	<0,05
20-25	<0,05	<0,05	<0,05
Residuo 25-100	<0,05	<0,05	<0,05

## Conclusioni

La presenza di contaminanti quali DON e metalli pesanti, appare quindi concentrarsi negli strati periferici, in particolare in quelle frazioni comprese tra lo 0 e il 10%.

L'inserimento di una decorticatrice negli impianti molitori, con l'obiettivo di rimuovere le frazioni corticali più esterne della granella (circa 10% in peso della granella totale) può quindi contribuire a ridurre significativamente il rischio di contaminazione delle farine da DON e metalli pesanti.

## Bibliografia

1. Cheli F, Campagnoli A, Ventura A, Brera C, Berdini C, Palmaccio E, Dell'Orto V. Effects of industrial processing on the distribution of deoxynivalenol, cadmium and lead in durum wheat milling fractions. *LWT-Food Science and Technology* 2010;43:1050-7.
2. Bottega G, Caramanico R, Lucisano M, Mariotti M, Franzetti L, Pagani MA. The debranning of common wheat (*Triticum aestivum* L.) with innovative abrasive rolls. *Journal of Food Engineering* 2009;94:75-82.
3. Beta T, Nam S, Dexter JE, Sapirstein HD. Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal Chemistry* 2005;82:390-3.
4. Lancova K, Hajslova J, Kostelanska M, Kohoutkova J, Nedelnik J, Moravcova H, Vanova M. Fate of trichothecene mycotoxin during the processing: milling and baking. *Food Additives and Contaminant* 2008; 25:650-9.

# VALIDAZIONE DI UN METODO PER LA DETERMINAZIONE CONTEMPORANEA DI MICOTOSSINE NEGLI ALIMENTI PER L'UOMO E PER GLI ANIMALI

Fabio Busico, Tabita Mauti, Sesto Berretta, Bruno Neri, Alessandro Ubaldi  
Direzione Operativa Chimica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma

## Introduzione

Le micotossine (aflatossine, ocratossine, tricoteceni, zearalenone, ecc.) sono molecole tossiche prodotte dal metabolismo secondario di alcuni funghi (*Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., ecc.) in opportune condizioni di temperatura e di umidità, con conseguente contaminazione di derrate alimentari, mangimi, foraggi, ecc.

Le aflatossine sono derivati difuranocumarinici, a basso peso molecolare (< 500 unità di massa atomica). Fra le 18 aflatossine finora isolate, cinque sono considerate tossicologicamente rilevanti sia per diffusione che per tossicità: l'aflatossina B1, l'aflatossina B2, l'aflatossina G1, l'aflatossina G2 e l'aflatossina M1, metabolita idrossilato dell'aflatossina B1. Le aflatossine appartenenti al gruppo B sono bifuranocumarine fuse con un anello ciclopentenonico, a differenza delle aflatossine G nelle quali è presente l'anello  $\beta$ -lattionico. Le prime sono naturalmente fluorescenti blu (B-blue, blu fluorescenti), le seconde verdi (G-Green, verde fluorescenti), quando vengono irradiate con luce ultravioletta di 360 nm.

L'ocratossina A (OTA) è una micotossina, prodotta da specie dei generi *Aspergillus* e *Penicillium*, quali *A. ochraceus* e *P. viridicatum*, che si ritrova principalmente nei cereali, nel caffè, nella frutta secca e nel vino. Se consumata, l'OTA si accumula nei reni e risulta particolarmente tossica per tale organo. Le intossicazioni principali causate dall'OTA negli allevamenti zootecnici sono la nefropatia dei suini, segnalata nei Paesi del nord-Europa e nei Balcani, e la nefropatia aviaria, diffusa invece nell'America del Nord, entrambe associate al consumo di cereali contaminati da OTA. In dosi diverse può risultare anche immunotossica, cancerogena e genotossica e ad alte concentrazioni può causare comparsa di epatiti, enteriti e necrosi del tessuto linfatico.

Lo zearalenone è un lattone dell'acido resorcilico non dotato di tossicità acuta che a basse concentrazioni manifesta attività anabolica e uterotrofica, mentre a concentrazioni più elevate determina attività di tipo estrogeno.

Al consumo di alimenti e mangimi contaminati da micotossine, da parte dell'uomo e degli animali, è associata l'insorgenza di patologie (micotossicosi) con effetti avversi sia per la salute (neoplasie epatiche, danni renali, ecc.), che per le produzioni agrozootecniche.

La Commissione Europea ha stabilito diversi Limiti Massimi (LM) o valori di riferimento in funzione delle matrici considerate, sia per l'alimentazione umana, riportati nell'allegato del Regolamento (CE) n. 1881/2006 integrato dal Regolamento (UE) n.165/2010, dal Regolamento (UE) n. 105/2010 e dal Regolamento (CE) n. 1126/2007 (frutta a guscio, frutta secca, cereali e relativi prodotti alimentari, spezie e miscele di spezie *Capsicum* spp, *Piper* spp, noce moscata, zenzero, curcuma) che per l'alimentazione animale, riportati nel Regolamento (UE) 574/2011 e nella Raccomandazione 2006/576/CE.

Il lavoro svolto nel nostro laboratorio ha previsto la validazione del metodo utilizzato per la determinazione simultanea delle aflatossine B1, B2, G1, G2, OTA e zearalenone. La validazione del metodo è stata eseguita facendo riferimento alle indicazioni riportate nelle Decisione 2002/657, relativamente ai parametri di precisione (ripetibilità stretta, riproducibilità intralaboratorio), accuratezza in termini di recupero %, LoD (*Limit of Detection*), LoQ (*Limit Of Quantification*), e alla guida EURACHEM/CITAC per la stima dell'incertezza di misura integrata dalla partecipazione a circuiti interlaboratorio nazionali e internazionali, come suggerito nella norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025. Il metodo validato nel laboratorio prevede la determinazione delle aflatossine B1, B2, G1, G2, OTA e zearalenone previa loro estrazione con solvente, purificazione su colonnine ad immunoaffinità (1) e determinazione in Cromatografia Liquida ad alta pressione con rivelatore fluorimetrico HPLC/FLD (*High Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detector*) e derivatizzazione post-colonna con derivatizzatore fotochimico UVE™ (2).

## Materiali e metodi

### Estrazione e purificazione del campione

L'aliquota rappresentativa del campione è stata finemente macinata e omogeneizzata e ne sono stati pesati 25 g con la precisione di  $\pm 0,1$  g in una beuta a tappo smeriglio e addizionati di 100 mL di metanolo al 80%, estraendo per 10 min sull'agitatore orizzontale. Dall'estratto ottenuto, filtrato con un filtro di carta o con un filtro monouso per solventi, sono stati prelevati 20 mL, nel caso degli alimenti per animali, o 40 mL, nel caso degli alimenti per l'uomo, diluiti rispettivamente con 40 o con 80 mL di acqua per HPLC, centrifugando all'occorrenza.

Contestualmente, dalla colonnina ad immunoaffinità, una volta che ha raggiunto la temperatura ambiente, è stato rimosso il tappo e il sigillo è la si è collegata all'apparecchiatura box per colonne sottovuoto SUPELCO-VISIPREP™.

Sono stati caricati 20 mL (20 mL equivalgono ad 1 g di campione di alimento per animali) o 40 mL (40 mL equivalgono a 2 g di campione di alimento per l'uomo) di estratto diluito percolandoli, attraverso la colonnina, con un flusso di 1 goccia al secondo facendo attenzione a non mandare completamente la colonnina a secco e lavandola successivamente con 20 mL di acqua per HPLC a un flusso di 1-2 gocce al secondo. La colonnina è stata sottoposta per alcuni secondi ad un leggero flusso d'aria e il campione eluito per gravità con 1,5 mL di metanolo per HPLC, in una vial per HPLC. La colonnina è stata eluita ulteriormente per gravità, con 1.5 mL di soluzione di acido acetico allo 0,1%, rimuovendo il liquido residuo dalla colonna con un flusso di aria e riunendo l'eluato acetico con l'eluato metanolico in una vial per autocampionatore per poi eseguire la determinazione in HPLC iniettando 50  $\mu$ L di estratto purificato.

### Analisi in HPLC

L'analisi in HPLC è stata eseguita con un rivelatore fluorimetrico, utilizzando un derivatizzatore post colonna UVE™ della LC Tech, e una colonna cromatografica Waters Symmetry C18 15 cm (lunghezza) x 4,6 mm (diametro interno) x 3 mm (diametro delle particelle). Le condizioni utilizzate nell'analisi sono riportate nelle Tabelle 1 e 2.

Tabella 1. Impostazioni cromatografiche

Step	Flusso (mL/min)	Metanolo (%)	Acetonitrile (%)	Ac.Acetico (%)	Tempo (min)
0	1	25	15	60	0
1	1	25	15	60	12
2	1	10	50	40	14
3	1	10	15	40	30
4	1	25	15	60	30,01

Tabella 2. Impostazioni del rivelatore fluorimetrico

Analita	$\lambda$ Eccitazione (nm)	$\lambda$ Emissione (nm)	Gain	Tempo di ritenzione (min)
Aflatossina B1, B2, G1 e G2	365	455	11	18
Zearalenone	276	460	15	22
OTA	330	460	12	30

## Validazione del metodo

Il metodo di prova è stato validato sia mediante studio intra-laboratorio che partecipazione a proficiency test, secondo quanto suggerito dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 (3). Nello studio intra-laboratorio sono state considerate le matrici riportate dalla normativa vigente nel campo degli alimenti sia destinati all'uomo che destinati agli animali. Per la determinazione dei limiti di rilevabilità (LoD) e di quantificazione (LoQ) sono state analizzate varie tipologie di mangimi composti e materie prime, come avena, orzo e mais. Anacardi, arachidi, mandorle, nocciole, noci, pepe, pinoli, pistacchi, riso e uva sultanina sono state le matrici testate nel campo dell'alimentazione umana. Per valutare il LoD e il LoQ è stato seguito l'approccio IUPAC valutando almeno 10 misurazioni del segnale di bianchi campione calcolando la media del segnale del bianco e il suo scarto tipo in termini di concentrazione. Il valore del bianco aumentato di: 3 volte il suo scarto tipo, è stato considerato rappresentare il LoD ; 10 volte il suo scarto tipo, è stato utilizzato per calcolare il LoQ. Si è proceduto all'analisi di sei replicati addizionati al precedente valore di LoQ calcolato per misurare lo scarto tipo relativo, a verifica della compatibilità con i criteri di accettabilità previsti della normativa vigente in termini di rendimento dei metodi di analisi.

La ripetibilità è stata valutata effettuando 6 replicati ad ogni livello di fortificazione per ciascun analita. Tali livelli sono stati scelti in funzione dei limiti massimi consentiti per gli analiti nelle matrici considerate, come riportato nella Tabella 3.

La riproducibilità intra-laboratorio è stata calcolata analizzando, con operatori diversi, 6 replicati ad ogni livello di fortificazione e ripetendo le analisi in 2 diverse sessioni analitiche ad intervallo di un mese. La specificità è stata determinata effettuando l'analisi sulle citate matrici risultate non contaminate e utilizzate per la verifica del LoQ e del LoD. Sono stati determinati anche i parametri di prestazione del metodo relativi alla sua esattezza, in termini di recupero, e alla stima della sua incertezza di misura estesa, applicando il metodo di calcolo di tipo metrologico che ha considerato tutti i diversi contributi all'incertezza derivanti dalla diverse fasi operative del metodo (4). Le componenti valutate sono state: il contributo relativo alla ripetibilità, il contributo relativo alla taratura dello strumento, il contributo relativo alla taratura della bilancia, il contributo relativo ai volumi, il contributo dato dall'accettabilità della concentrazione dello standard di taratura e il contributo del recupero. L'incertezza estesa è stata calcolata considerando un fattore di copertura K pari a 2.

**Tabella 3. Livelli di fortificazione per gli alimenti per uomo (au) e per gli animali (aa) (in mg/kg)**

Fortificazione??	Aflatossine B1, B2,G1,G2	OTA	Zearalenone
Livello 1 (au)	0,375 (LoQ)	1,0 (LoQ)	34 (LoQ)
Livello 1 (aa)	0,0014 (LoQ)	0,019 (LoQ)	0,034 (LoQ)
Livello 2 (au)	14	2,0	-
Livello 3 (au)	5,0	19	100
Livello 3 (aa)	0,005	0,05	0,100
Livello 4 (au)	10	50	500
Livello 4 (aa)	0,010	0,10	0,500
Livello 5 (au)	20	100	1000
Livello 5 (aa)	0,020	0,25	1,00
Livello 6 (au)	50	250	3000
Livello 6 (aa)	0,050	0,50	3,00
Livello 7 (au)	-	500	-

## Risultati

La validazione del metodo ha permesso di stabilire i criteri di rendimento e di verificarne la conformità, dove possibile, con la normativa vigente.

Sono riportati nella Tabella 4 i valori di precisione, esattezza, limite di ripetibilità (LR), incertezza estesa % per due ripetizioni, LoQ\* per gli alimenti per gli animali e nella Tabella 5 per gli alimenti per l'uomo.

**Tabella 4. Valori dei parametri di rendimento del metodo per gli alimenti per animali**

Micotossina	Concentrazione mg/kg	Ripetibilità			Riproducibilità intralaboratorio			Esattezza	Incertezza
		Media	CV %	LR	Media	CV %	LR	Recupero %	Estesa %
Aflatossina B1	0,0014*	0,0016	2,24	0,0003	0,0015	4,54	0,0002	108	17,2
	0,0050	0,0048	2,51	0,0004	0,0048	2,28	0,0003	96,6	12,1
	0,0100	0,0104	4,30	0,0016	0,010	5,81	0,0018	99,7	14,2
	0,0200	0,0199	2,49	0,0018	0,019	2,64	0,0016	98,1	12,2
	0,0500	0,046	4,92	0,0082	0,045	3,95	0,0057	91,5	13,1
Ocratossina A	0,019*	0,019	6,89	0,005	0,018	6,51	0,004	98,0	25,2
	0,050	0,052	4,66	0,002	0,049	5,96	0,009	99,6	14,4
	0,100	0,098	1,10	0,004	0,098	4,59	0,014	98,3	13,4
	0,250	0,22	1,03	0,037	0,22	3,53	0,024	88,4	12,7
	0,500	0,52	2,07	0,040	0,52	3,35	0,056	106	12,7
Zearalenone	0,034*	0,038	4,57	0,006	0,037	5,04	0,006	111	22,1
	0,100	0,11	1,73	0,007	0,11	3,06	0,010	109	16,8
	0,500	0,50	1,60	0,030	0,48	4,74	0,072	97,3	14,0
	1,000	1,02	6,17	0,230	0,99	5,35	0,167	99,6	13,6
	3,000	2,78	6,63	0,672	2,84	8,61	0,77	94,8	12,6

Tabella 5. Valori dei parametri di rendimento del metodo per gli alimenti per gli uomini

Micotossina	Concentrazione mg/kg	Ripetibilità			Esattezza	Incertezza
		Media	CV %	LR	Recupero %	Estesa %
Aflatossina B1	0,375*	0,350	8,26	0,105	93,4	25,0
	1,25	1,22	2,66	0,118	97,5	12,8
	2,50	1,95	6,01	0,427	78,4	14,9
	5,00	4,07	4,55	0,674	81,4	13,9
	12,5	10,2	1,22	0,455	81,7	12,3
Aflatossina B2	0,375*	0,295	12,6	0,135	78,6	32,0
	1,25	1,25	2,79	0,128	100	12,8
	2,50	2,08	8,18	0,620	83,4	16,8
	5,00	4,22	3,54	0,543	84,3	13,2
	12,5	10,5	7,76	2,98	84,4	16,4
Aflatossina G1	0,375*	0,385	11,9	0,166	103	31,0
	1,25	1,22	3,02	0,134	97,4	15,3
	2,50	1,83	2,88	0,192	73,2	13,1
	5,00	4,32	4,16	0,656	86,5	13,7
	12,5	11,3	3,79	1,68	90,4	13,5
Aflatossina G2	0,375*	0,355	6,43	0,083	94,6	25,7
	1,25	1,06	6,77	0,262	85,2	15,6
	2,50	1,69	1,94	0,119	67,5	13,3
	5,00	4,41	3,58	0,575	88,2	14,0
	12,5	7,97	3,59	1,04	63,7	14,0
Ocratossina A	2*	2,35	8,46	0,722	117	22,7
	5	4,89	1,18	0,211	97,9	15,6
	10	7,31	0,844	0,224	73,1	13,3
	20	14,0	4,56	2,32	70,1	14,7
	50	38,9	4,44	6,78	77,8	14,6
Zearalenone	34*	37,7	5,04	5,91	111	16,8
	50	41,1	4,93	7,36	82,2	14,8
	100	68,8	3,90	10,4	73,6	13,1
	200	148	4,81	25,9	74,2	13,7
	400	297	3,24	35,0	74,4	12,7

Allo scopo di controllare le prestazioni del metodo il laboratorio ha partecipato annualmente ai circuiti interlaboratorio organizzati da FAPAS®, ottenendo i *z-score* riportati in Tabella 6.

Tabella 6. Risultati riportati nei Test Interlaboratorio FAPAS (*z-score*)

Micotossina	2009	2010	2011
Aflatossina B1	-1,3	-0,4	0,3
Aflatossina B2	-0,6	-0,7	0,5
Aflatossina G1	-1,1	-1,2	1,0
Aflatossina G2	-0,8	-1,1	0,6
Ocratossina A	0,8	-1,0	0,3
Zearalenone	-1,7	-	1,5

## Conclusioni

La validazione del metodo è stata eseguita facendo riferimento alle indicazioni riportate nella Decisione 2002/657/CE, relativamente ai parametri di precisione (ripetibilità stretta, riproducibilità intralaboratorio), accuratezza in termini di recupero %, LoD, LoQ, e alla Guida EURACHEM/CITAC per la stima dell'incertezza di misura. Tutti i parametri determinati per gli alimenti per l'uomo hanno soddisfatto i requisiti minimi di rendimento previsti dal Reg. CE n. 401/2006. Tale Regolamento è stato preso a riferimento anche per valutare gli indici di rendimento del metodo ottenuti negli alimenti per animali, stante la mancanza specifica di riferimenti per questa tipologia di matrice. L'attività di validazione non ha preso in considerazione la caratterizzazione dei citati parametri di prestazione per la aflatoxine B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> negli alimenti per animali in quanto tali contaminanti non sono contemplati nella normativa vigente nel settore dell'alimentazione animale. Il metodo è risultato applicabile anche a matrici di maggiore criticità quali le spezie (paprica, pepe, ecc.). I risultati ottenuti dalla partecipazione a Proficiency Test hanno confermato l'adeguatezza delle prestazioni del metodo (*z-score* sempre compresi fra  $\pm 2$ ). Il metodo, accreditato presso l'IZSLT di Roma da ACCREDIA, è utilizzato nell'ambito del Controllo Ufficiale dei prodotti alimentari e dei prodotti destinati all'alimentazione animale.

## Bibliografia

1. Manuale delle istruzioni VICAM delle colonnine d'immunoaffinità. *AOZ HPLC Instruction manual*, 1 novembre 2004
2. Göbel R, Lusky K. Simultaneous determination of aflatoxin, ochratoxin A, zearalenone in grains by new immunoaffinity column/liquid chromatography. *Journal of AOAC International* 2004;87(2):411-6.
3. Norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005. *Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura" definisce i requisiti gestionali e tecnici per conseguire, da parte dei Laboratori, l'accreditamento delle prove e tarature eseguite*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione ; 2005.
4. Ellison SLR, Rosslein M, Williams A (Ed.). *EURACHEM/CITAC Guide. Quantifying uncertainty in analytical measurement*. II edition. EURACHEM/CITAC; 2000.
5. Europa. Decisione della Commissione del 12 agosto 2002 che attua la direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee* L 221/8, 17 agosto 2002.
6. Associazione per l'Unificazione nel Settore dell'Industria Chimica. *Linee guida per la convalida di metodi analitici nei laboratori chimici - Criteri generali*. Milano: UNICHIM; 2011. (Manuale Unichim 179/0).

*Stampato da Ugo Quintily SpA  
Viale Enrico Ortolani 149/151, 00125 Roma*

*Roma, ottobre-dicembre 2013 (n. 4).*