

MATERIALI DI RIFERIMENTO PER LA DETERMINAZIONE DI MICOTOSSINE E LA VALUTAZIONE DI CONTAMINAZIONI FUNGINE IN PRODOTTI ALIMENTARI

Rosanna Gatti, Ilaria Lamberti, Lucia Mosiello, Giovanna Zappa, Claudia Zoani
Dipartimento Biotecnologie Agroindustria e protezione della Salute, Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile (ENEA), Centro Ricerca Casaccia, Roma

Introduzione

Le nuove definizioni approvate dalla *International Organization for Standardization-Committee on Reference Materials* ISO-REMCO (1) e quelle riportate nella nuova edizione del Vocabolario Internazionale di Metrologia (VIM) (2), ampliano e chiariscono il campo di applicazione dei materiali di riferimento (*Reference Material*, RM) e dei materiali di riferimento certificati (*Certified Reference Material*, CRM). In particolare, al fine di ampliare il campo di applicazione dei RM alle indagini di tipo qualitativo, nella nuova definizione non compare più il concetto di “valore” attribuito alle specifiche proprietà del RM. Viene inoltre chiarito che “RM” è un termine generale, riferito a materiali da impiegare per diversi scopi (taratura, valutazione di un metodo di misurazione, assegnazione di valori a materiali, controllo di qualità) e viene sottolineata la stretta correlazione tra idoneità del RM e specifico scopo. Nella definizione di CRM il termine *value* viene mantenuto in associazione alle proprietà certificate, ma anche in questo caso è previsto un impiego nelle indagini qualitative, allargando il concetto di “valore” a caratteristiche come l’“identità” e la “sequenza”. Inoltre, rispetto alla precedente definizione di CRM, viene aggiunto l’aggettivo “metrologica” al termine “riferibilità” per evitare la confusione tra i due diversi significati del termine *traceability*: rintracciabilità di prodotto e riferibilità metrologica. Come sottolineato da Emons (3), il termine *Reference Material* (RM) non va quindi impiegato in contrapposizione al termine *Certified Reference Material* (CRM) con il significato di “RM non-certificato”, in quanto si tratta di un termine generale che indica una famiglia all’interno della quale si possono identificare diverse tipologie di materiali da impiegare con diversa finalità all’interno del processo di misurazione. La terminologia legata ai RM risente di una certa confusione dovuta al diffondersi nei vari settori applicativi di termini, diversi per l’ambito metrologico e per l’ambito dell’assicurazione di qualità, connessi spesso più alla finalità di utilizzo che non al tipo di RM. Alcuni esempi sono i seguenti: *Measurement standard*, *Reference standard*, *Analytical standard*, *Laboratory standard*, *Reference substance*, *Standard material*, *Proficiency Testing Material*, *Laboratory Reference Material*, *Laboratory Control Material*, *Quality Control Material*, *Calibration Material*.

In Figura 1 si riporta una rappresentazione grafica della famiglia dei RM (insieme A), nella quale si evidenziano le relazioni tra i sottogruppi dei CRM (sottoinsieme B), *Calibrant*-RM (sottoinsieme C) e *Matrix*-RM (sottoinsieme D) (4). I CRM, come risulta dalle definizioni ISO-REMCO e VIM, sono RM ($B \subset A$) caratterizzati mediante una procedura metrologicamente valida per una o più proprietà e accompagnati da un certificato che ne fornisce i valori, l’incertezza e la riferibilità metrologica.

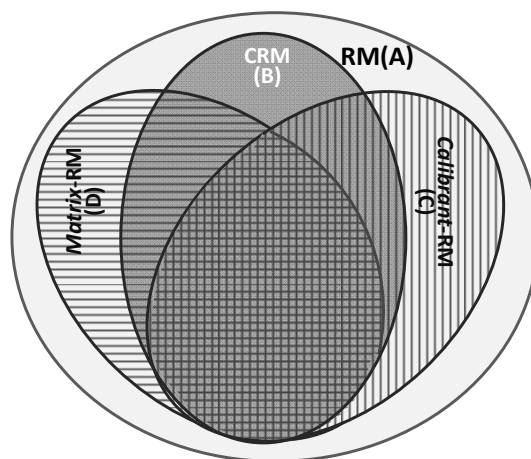


Figura 1. Famiglia dei materiali di riferimento

I *Calibrant-RM* sono RM ($C \subset A$) in cui il valore di una o più proprietà è metrologicamente riferibile, con un'incertezza idonea all'impiego per una specifica taratura (5) e quindi, a differenza dei CRM, possono anche non essere accompagnati da un certificato conforme ai requisiti della Guida ISO-REMCO 31 (6). I *Matrix-RM* sono materiali stabili e omogenei per una o più proprietà ($D \subset RM$), quanto più possibile simili – per composizione e stato chimico e chimico-fisico – ai campioni da analizzare, utilizzati in più fasi del processo di misurazione per diversi scopi, quali il controllo degli effetti-matrice, l'individuazione delle fonti di incertezza e i controlli di qualità (7). La gran parte dei CRM sono *Matrix-RM* ($B \cap D$), altrimenti si tratta di sostanze pure o miscele, impiegate per la taratura ($(B \cap C) - (B \cap C \cap D)$) o per indagini di tipo qualitativo ($B - (B \cap D) - (B \cap C)$).

Le diverse tipologie di RM, le funzioni che questi possono assolvere durante il processo di misurazione e i parametri di scelta, sono stati approfonditamente esaminati in un recente lavoro (4), dove viene sottolineato che l'idoneità di un RM per un determinato scopo deve essere valutata caso per caso e che la qualità di un RM è strettamente connessa allo specifico impiego e alle condizioni di utilizzo. Ad esempio l'omogeneità va valutata in relazione alla dimensione dell'aliquota analitica e la scelta tra *Matrix-RM* o sostanza pura per la taratura va effettuata tenendo conto delle potenziali interferenze di matrice e del contributo all'incertezza finale. In linea generale infatti le sostanze pure possono essere certificate con un metodo primario – o attraverso misure direttamente riferibili al Sistema Internazionale SI durante il processo stesso di preparazione (8) – e quindi il loro utilizzo nella taratura comporta un minore contributo all'incertezza, rispetto all'impiego dei *Matrix-CRM*, la cui certificazione avviene nella maggior parte dei casi attraverso l'analisi statistica dei risultati di un interlaboratorio.

Controlli per l'individuazione e la determinazione quantitativa di micotossine si rendono necessari lungo l'intera filiera agroalimentare e zootecnica; essi devono riguardare sia la produzione primaria che i processi agro-industriali e devono essere condotti su alimenti, bevande e mangimi, a livello di materie prime, prodotti intermedi e finali. Considerando la molteplicità degli analiti e la varietà delle matrici per stato fisico e composizione, l'effettuazione di questi controlli richiede una grande disponibilità di RM. Estremamente utili si sono rivelate le tecniche *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e *Real Time-PCR* per l'individuazione precoce e la quantificazione di specie fungine (9). Solo da pochi anni si stanno affrontando le problematiche

per questo settore e recentemente sono state pubblicate dall'EU-JRC IRMM¹ guide specifiche sull'impiego di RM nei test genetici (10) e sull'incertezza di misura nei test per OGM (11).

Produzione attuale di RM per la determinazione di micotossine

Per esaminare la produzione mondiale di RM sono state prese in considerazione la banca dati internazionale COMAR (*COde d'Indexation des MATériaux de Référence*) (12) realizzata in cooperazione tra alcuni Istituti Metrologici Nazionali e sostenuta da ISO-REMCO e la banca dati recentemente realizzata dal VIRM (*Virtual Institute for Reference Materials*) (13). La ricerca di specifici RM in queste banche dati risulta spesso non agevole. Le difficoltà derivano principalmente dal carattere generale di questi dataBase in quanto, considerando la produzione globale di RM/CRM per qualsiasi settore di attività, non prevedono l'utilizzo di criteri di ricerca ottimizzati per ciascun specifico settore. La banca dati COMAR consente una ricerca rigorosa delle sostanze chimiche certificate mediante nome o numero CAS, ma non permette ricerche per classi di sostanze chimiche, né consente ricerche incrociate analita/matrice. In considerazione delle difficoltà emerse nell'utilizzo di dataBase generali per gli RM, nel 2001 (14) è stata realizzata una banca dati specifica per il settore agroalimentare, che viene periodicamente aggiornata (15) consultando direttamente i cataloghi dei singoli produttori (IRMM¹, LGC², NIST³, IAEA⁴, MUVA⁵, NRC-CNRC⁶, RomerLabs[®]-Biopure⁷, NMI-NARL⁸, FAPAS^{®9}), oltre che le seguenti banche dati disponibili online: COMAR, IAEA, *Japanese RMs search*, VIRM. Pertanto, per esaminare la produzione attuale di RM per la determinazione di micotossine, è stata utilizzata la banca dati sviluppata dell'ENEA, aggiornata al settembre 2009. Da un esame comparato degli RM per micotossine risultanti nelle banche dati COMAR, VIRM ed ENEA (Tabella 1) è possibile effettuare le seguenti osservazioni:

- la banca dati COMAR non prende in considerazione, oltre ai produttori di RM-*Quality Control* come il FAPAS[®], il produttore di CRM RomerLabs[®]-Biopure;
- la banca dati del VIRM non prende in considerazione il produttore NARL e classifica come non-certificati i CRM RomerLabs[®]-Biopure.

Si evidenziano inoltre problematiche generali di aggiornamento a carico di COMAR e VIRM.

La produzione attuale di RM per la determinazione di micotossine nella filiera agroalimentare e zootecnica è di 137 CRM prodotti da IRMM (24 CRM), NARL (5 CRM) e RomerLabs[®]-Biopure (108 CRM), più 80 RM-*Quality Control* prodotti dal FAPAS[®]. Di questi 137 CRM, soltanto 21 sono *Matrix*-CRM, mentre i rimanenti 116 CRM sono sostanze per taratura in forma di: sostanze pure (21 CRM); soluzioni di sostanze pure in acetonitrile (48 CRM), acetonitrile/acqua (5 CRM) e cloroformio (1 CRM); soluzioni di sostanze pure *dried down* (22 CRM); soluzioni di sostanze pure marcate con isotopi stabili in acetonitrile (16 CRM) e acetonitrile/acqua (3 CRM).

¹ EU-JRC-IRMM – Institute for Reference Materials and Measurements - <http://irmm.jrc.ec.europa.eu>

² LGC – Laboratory of the Government Chemist (UK) - www.lgc.co.uk/

³ NIST – National Institute of Standards and Technology (USA) - www.nist.gov

⁴ IAEA – International Atomic Energy Agency (Austria) - www.iaea.org/

⁵ MUVA Kempten (Germany) - www.muva.de

⁶ NRC-CNRC – National Research Council Canada - www.nrc-cnrc.gc.ca

⁷ RomerLabs[®]-Biopure (Austria) - www.romerlabs.com

⁸ NMI-NARL – Australian National Measurement Institute - www.measurement.gov.au

⁹ FAPAS[®] (UK) – The food and environment research agency - programma di controllo delle prestazioni sulle analisi degli alimenti - www.fapas.com

Tabella 1. Produzione di RM per micotossine riportata da diversi database

Database	IRMM	NARL	RomerLabs® Biopure	FAPAS®	Totale
COMAR	8 ST 16 <i>Matrix</i> -CRM	2 ST	–	–	10 ST 16 <i>Matrix</i> -CRM
VIRM	2 Sost. Taratura 13 <i>Matrix</i> -CRM*	–	33 ST	100 <i>Matrix</i> -RM(QC)*	35 ST 13 <i>Matrix</i> -CRM* 100 <i>Matrix</i> -RM(QC)*
ENEA	8 ST 16 <i>Matrix</i> -CRM	5 ST	103 ST 5 <i>Matrix</i> -CRM	80 <i>Matrix</i> -RM(QC)	116 Sost. Taratura 21 <i>Matrix</i> -CRM 80 <i>Matrix</i> -RM (QC)

ST: sostanze di taratura; QC: Quality Control

*- vengono riportati anche RM fuori produzione

In Tabella 2 viene riportata la produzione di sostanze pure distinguendo tra le diverse classi di micotossine. Sostanze per taratura sono disponibili prevalentemente per Aflatossine, Zearalenoni e Tricoteceni, in forma di soluzioni, soluzioni marcate e sostanze pure. Il NARL produce unicamente sostanze pure per la determinazione di Zearalenoni (5 CRM); l'IRMM produce soluzioni di sostanze pure per la determinazione di Aflatossine (7 CRM), Zearalenoni (1 CRM) e Tricoteceni (2 CRM); la RomerLabs®-Biopure produce una grande varietà di sostanze per taratura nelle diverse forme per tutte le classi di micotossine, comprendendo anche gli Alcaloidi dell'Ergot (12 CRM), Alternarioli (3 CRM) e micotossine minori (20 CRM).

Tabella 2. Produzione di sostanze per taratura (RM) per le diverse classi di micotossine

RM	AF	FUM	OCRA	PAT	ZEA	TRI	ERGOT	ALT	MICOM
Sostanze pure	4 BIO	1 BIO	1 BIO	1 BIO	5 NARL 1 BIO	7 BIO	–	–	1 BIO
Soluzioni di sostanze pure <i>semplici</i>	7 IRMM 5 BIO	4 BIO	3 BIO	1 BIO	1 IRMM 8 BIO	2 IRMM 15 BIO	–	–	9 BIO
<i>dried down</i> <i>marcate</i>	– 4 BIO	– 3 BIO	– 1 BIO	– 1 BIO	– 1 BIO	1 BIO 5 BIO	12 BIO –	3 BIO –	6 BIO 4 BIO

AF: Aflatossine; FUM: Fumonisine; OCRA: Ocratossine; PAT: Patulina; ZEA: Zearalenoni; TRI: Tricoteceni;

ERGOT: alcaloidi dell'Ergot; ALT: Alternarioli; MICOM: Micotossine minori;

BIO: Biopure - RomerLabs®-Biopure (Austria)

Per quanto riguarda i *Matrix*-CRM, IRMM e RomerLabs®-Biopure producono CRM per la determinazione di micotossine in cereali (10 CRM), legumi (3 CRM), prodotti lattiero-caseari (3 CRM), oli e grassi animali e vegetali (3 CRM), mangimi (2 CRM). In particolare sono disponibili CRM di mais certificati per Deossinivalenolo (DON), Zearalenoni (ZEA), Fumonisine B₁ e B₂ (FB₁, FB₂); frumento certificato Ocratossina A (OTA) e DON; arachidi certificate per Aflatossine B₁, B₂ e G₁ (AFB₁, AFB₂, AFG₁); latte certificato per Aflatossina M₁ (AFM₁); burro di arachidi certificato per AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂; mangime composto certificato per AFB₁, AFB₂, AFG₁.

In Tabella 3 si riporta un incrocio tra i valori soglia per il contenuto di micotossine stabiliti dalla normativa vigente per alimenti (16), alimenti per l'infanzia (17) e mangimi (18, 19) e la disponibilità di CRM. In particolare si evidenzia che, mentre la disponibilità attuale di sostanze

per taratura copre pressoché tutte le esigenze previste dalla normativa, sussiste una generale carenza di *Matrix-CRM* in considerazione delle specifiche esigenze di combinazione analita/matrice.

Tabella 3. Tabella di confronto tra la disponibilità di CRM (in matrice o sostanze pure) e l'esigenza normativa

Matrice	Aflatossine					Patulina	OTA	Fumonisine		ZEA	Tricoteceni			
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFM ₁			FB ₁	FB ₂		T-2	HT-2	DON	Altri
Alimenti per lattanti e prima infanzia														
Arachidi	3 - Burro di arachidi													
	1 - Farina di arachidi													
	2 - Farina di arachidi													
Frutta a guscio														
Cereali										1 - Farina di grano			2 - Farina di grano	
							1 - Farina di grano			2 - Farina di mais			2 - Farina di mais	
Spezie														
Latte					3 - Latte intero in polvere									
Mangimi	1 - Mangime composto													
	1 - Mangime composto													
Succhi, composte di frutta, ecc.														
Frutta secca														
Caffè														
Vino														
Pasta, pane, biscotti, ecc.														

Sostanze di taratura

Soluzioni di sostanze pure <i>dried down</i>														1
Soluzioni di sostanze pure	2	2	2	2	2	1	2	1	1	3	1	1	1	12
Soluzioni di sostanze pure MIX	2							1		1				
Soluzioni di sostanze pure marcate	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	2
Sostanze pure	1	1	1	1		1	1	1		2	1		1	5

Reg. CE 683/2004

Reg. CE 1881/2006 s.m.i.

DL.vo. 149/2004, Racc. CE/17/08/2006

Impiego di RM nella determinazione di micotossine

Al fine di individuare le tipologie di RM da impiegare nelle diverse fasi del procedimento analitico, in Figura 2 si riporta una schematizzazione della procedura analitica, considerando sia le tecniche cromatografiche che quelle immunochimiche e campioni sia solidi (es. cereali, frutta secca, mangimi) che liquidi (es. latte, vino, birra).

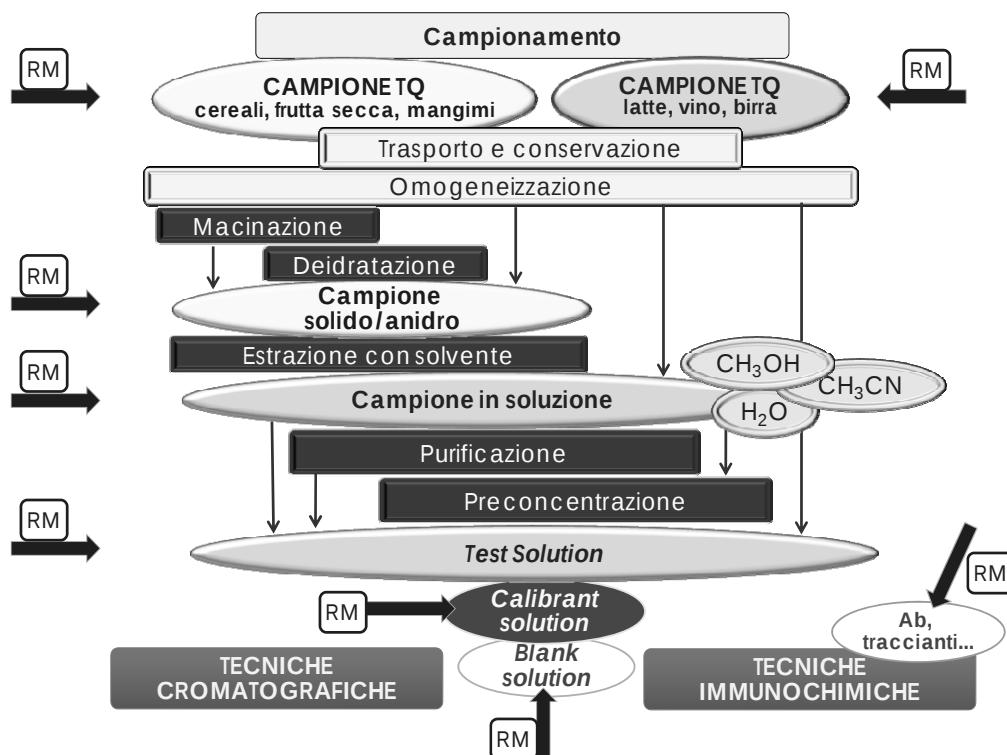


Figura 2. Schematizzazione della procedura analitica e impiego di RM nelle diverse fasi

La necessità di RM può riguardare sia le fasi di trasporto, conservazione e omogeneizzazione, sia quelle di pretrattamento (macinazione, deidratazione, purificazione e preconcentrazione), sia la fase analitica propriamente detta (taratura, controlli di purezza e specificità dei reagenti, controlli delle interferenze). Mentre per le prime fasi sarebbero necessari RM quanto più simili (in termini di composizione, stato fisico, omogeneità, ecc.) al campione TQ, nelle fasi successive possono essere convenientemente impiegati differenti RM con caratteristiche simili a quelle degli intermedi di lavorazione del campione, quali ad esempio i materiali macinati anidri. Per ragioni di natura tecnico-economica la produzione di *Matrix*-RM riguarda quasi totalmente i materiali deidratati e omogeneizzati; ciò comporta una limitazione nelle possibilità di impiego di questi RM in quanto possono essere controllate soltanto le fasi analitiche successive all'ottenimento di un campione stabile e omogeneo (20). La possibilità di realizzare e impiegare RM di prodotti agroalimentari TQ è strettamente legata alle caratteristiche di stabilità e omogeneità del prodotto. In linea generale ciò è fattibile più per i prodotti trasformati che per la produzione primaria, in quanto in questo secondo caso i prodotti presentano caratteristiche di stabilità tali da richiedere l'utilizzo di tecnologie onerose per la

conservazione e il trasporto e, considerando la ridotta omogeneità, implicano una considerevole dimensione (in termini di massa o volume) della singola unità di RM. Nella fase analitica propriamente detta vengono per lo più impiegate sostanze pure, per motivi di disponibilità e di minor contributo all'incertezza finale, anche se non sempre questa scelta viene preceduta da un controllo dell'occorrenza di interferenze e quasi mai viene considerato il contributo all'incertezza derivante da questo controllo (21).

Per valutare/verificare le prestazioni di alcune fasi intermedie, sarebbe utile disporre di RM appositamente sviluppati, quali ad esempio:

- estratti preparati a partire da prodotti agroalimentari in condizioni analoghe a quelle impiegate nella procedura analitica, ripartiti in aliquote omogenee e certificati per il/i contenuto/i di micotossine da impiegare per la taratura e per il controllo delle interferenze
- prodotti agroalimentari con certificata assenza di contaminazione (prodotti naturali o opportunamente purificati), da utilizzare per controlli di processo e per la realizzazione di *spiked*-RM (con contenuto di micotossine certificato attraverso il processo di preparazione) da impiegare per la taratura e la verifica di interferenze.

Per quanto riguarda i metodi immunochimici, questi possono avvalersi, per le fasi procedurali in comune con i metodi cromatografici, della maggior parte dei *Matrix*-RM esistenti, così come possono utilizzare per la taratura le stesse sostanze pure. Questo settore necessita però di ulteriori RM per controllare alcuni specifici parametri influenti sulla qualità delle misure e in primo luogo sull'accuratezza dei risultati, quali ad esempio purezza, specificità e grado di affinità degli immunoreagenti o purezza e attività dei traccianti enzimatici.

Facilities ENEA per la preparazione di nuovi RM

Nell'ambito di diversi progetti nazionali e comunitari sono stati realizzati presso i centri di ricerca Trisaia e Casaccia dell'ENEA impianti dedicati alla preparazione di Materiali di Riferimento (22), realizzati in accordo alle indicazioni ISO-REMCO (23). L'impianto del C.R. Trisaia è specificatamente dedicato al settore agroalimentare; esso risulta costituito da tre linee per la preparazione di Materiali di Riferimento liofilizzati, di Materiali di Riferimento liquidi e di suoli agricoli ed è dimensionato per lotti di 1000 unità. L'impianto della Casaccia è stato progettato per studi su scala pilota, per effettuare studi di fattibilità o per realizzare piccole produzioni (lotti fino a 100 unità) o *custom*-RM.

In Figura 3 si riporta il diagramma a blocchi della linea liofilizzati con un esempio applicativo relativo alla preparazione di un RM di fragole liofilizzate. È possibile ottenere RM con un elevatissimo grado di omogeneità grazie all'impiego di più fasi di omogeneizzazione sia a umido che a secco e alla fase di macinazione condotta sul materiale liofilizzato. La possibilità di effettuare un deidratazione sotto vuoto finale del materiale già imbottigliato consente di ottenere RM con bassi valori di acqua libera ($a_w \leq 0,2$), a vantaggio della stabilità dei prodotti. Considerando l'alta igroscopicità dei liofilizzati, tutte le operazioni da effettuare su materiali anidri (omogeneizzazione a secco, setacciatura, macinazione, imbottigliamento) sono raggruppate in aree dedicate ed è possibile anche utilizzare una cabina mobile da posizionare sulle specifiche apparecchiature per operare sotto gas inerte.

L'impianto è dotato di un liofilizzatore a ripiani, con programmazione dei cicli termici e controllo della pressione, accessoriato con sistema di *stoppering* automatico che consente la chiusura dei flaconi sottovuoto o in atmosfera inerte. L'omogeneizzazione dei materiali umidi viene effettuata mediante l'impiego di un miscelatore a pale e può essere conseguita anche attraverso l'impiego dell'evaporatore rotante industriale ($V = 100$ L) di cui è dotato l'impianto.

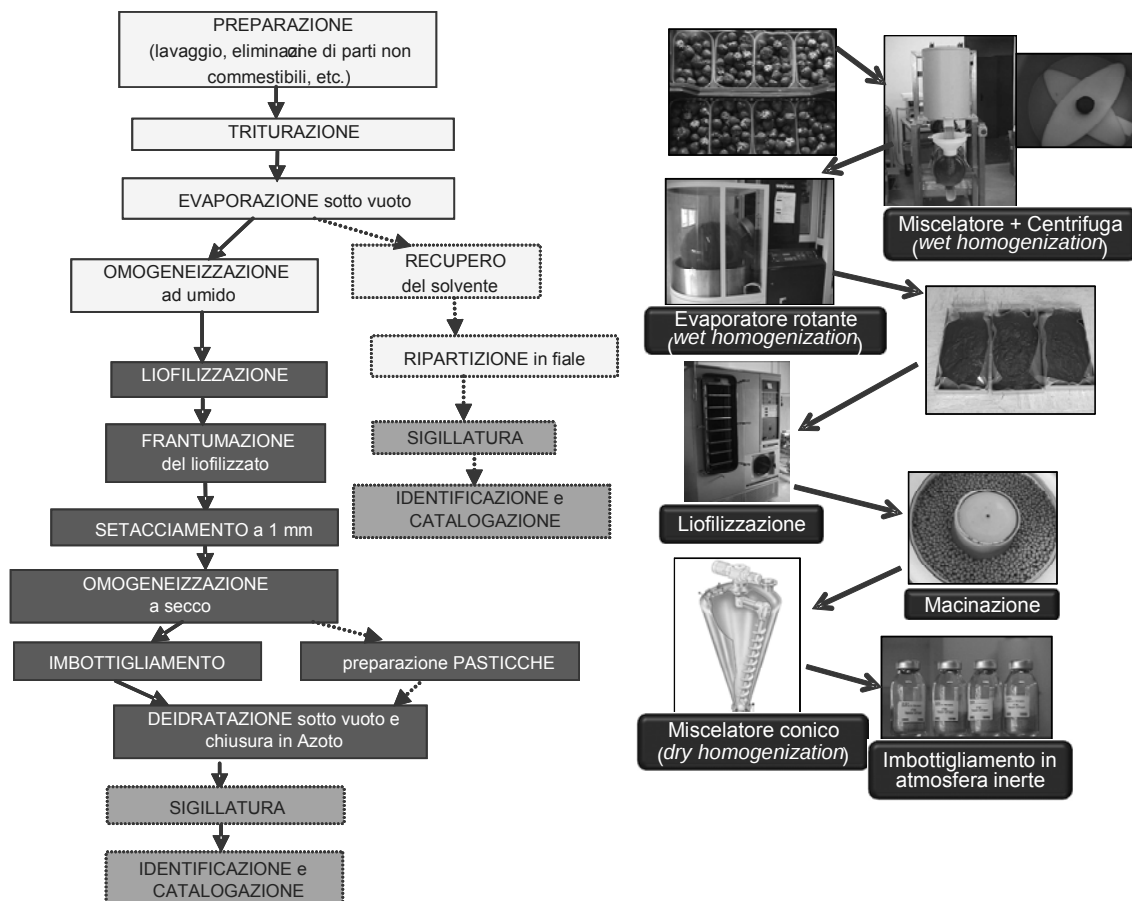


Figura 3. Diagramma a blocchi della linea di preparazione di liofilizzati dell'impianto Materiali di Riferimento ENEA con esempio di realizzazione di un RM di fragole liofilizzate

Detto evaporatore, equipaggiato con una sonda di temperatura interna al pallone e un gruppo refrigerante ausiliario (fino a -40°C), viene impiegato per effettuare una prima estrazione dell'acqua (e/o degli alcoli eventualmente presenti) – a bassa pressione e bassa temperatura – prima della fase di liofilizzazione. Ciò rappresenta una novità assoluta nelle procedure di preparazione di Materiali di Riferimento e consente di: ridurre il numero dei cicli di liofilizzazione con conseguente abbattimento dei consumi energetici e dei tempi esecutivi; migliorare l'efficacia del processo di liofilizzazione; di condurre una omogeneizzazione ad umido del materiale; recuperare l'estratto contenente, oltre l'acqua (o miscele idroalcoliche), le eventuali sostanze volatili condensate. L'omogeneizzazione a secco può essere effettuata attraverso l'impiego di miscelatori conici VRIECO-NAUTA[®] (volumi disponibili: 5, 10 e 240 L) o con un sistema di rotazione su due assi (planetario) che consente di evitare travasi di materiale, in quanto può operare con contenitori commerciali di diversi volumi e materiali. Per la macinazione dei materiali l'impianto è dotato di diversi sistemi con parti a contatto inerti o anti-contaminazione, che consentono la lavorazione di materiali di diverse caratteristiche meccaniche (durezza, friabilità, ecc.). Altri componenti dell'impianto sono: sistemi per il setacciamento dei materiali, sistemi per la ripartizione e l'imbottigliamento di liquidi o solidi, un apparato semiautomatico per la sigillatura delle fiale in vetro e una pasticcatrice automatica.

Presso il Centro Ricerche Casaccia sono stati realizzati laboratori per condurre le prove di stabilità (sotto stress termico e luminoso), di omogeneità e di caratterizzazione chimica e chimico-fisica dei Matrix-RM ed è in corso di allestimento un laboratorio di metrologia chimica per la realizzazione di Calibrant-RM. Le *facilities* di irraggiamento presenti in Casaccia (reattore Triga e impianto Calliope) consentono l'impiego della tecnica di Analisi per Attivazione Neutronica (INAA) per gli studi di omogeneità, stabilità e caratterizzazione degli RM e per la sterilizzazione degli RM mediante raggi γ . Gli impianti realizzati, in considerazione dei materiali costruttivi, delle tecnologie e delle procedure impiegate, consentono di ottenere RM con caratteristiche d'eccellenza in termini di omogeneità e stabilità chimica e microbiologica. Gli impianti possiedono inoltre caratteristiche di unicità e introducono elementi di innovazione nella preparazione degli RM, quali, ad esempio, la possibilità di preparare *Double-Phase-RM* (DP-RM) e RM monouso.

Con gli impianti descritti sono stati realizzati diversi Materiali di Riferimento di interesse per il settore agroalimentare tra cui diversi prodotti alimentari liofilizzati (22,24) (funghi champignons, pomodori freschi e pelati in latta, fragole e broccolo) e un mangime per pesci (25). Nell'ambito di una collaborazione con il Laboratorio Comunitario di Riferimento per gli elementi chimici negli alimenti di origine animale presso l'ISS (CRL-ISS) sono stati preparati diversi RM liofilizzati (muscolo e fegato bovino, carne suina, latte, pesce) da impiegare nei circuiti interlaboratorio internazionali (26, 27, 28).

Nell'ambito delle attività riguardanti la qualità delle misure per la sicurezza degli ambienti di lavoro è stato recentemente condotto uno studio di fattibilità per la realizzazione di un RM di *toner* "a più dimensioni", ossia un RM da certificare per valori di proprietà chimiche (composizione chimica e/o contenuto di sostanze tossiche) e da accompagnare con valori di riferimento e/o di informazione per proprietà fisiche, chimico-fisiche e tossicologiche (29). L'utilizzo di questa nuova tipologia di RM potrebbe apportare notevoli vantaggi anche per il settore della sicurezza alimentare con particolare riguardo alla specifica problematica delle micotossine e pertanto sono in via di definizione studi di fattibilità anche per questo settore.

Bibliografia

1. ISO-REMCO GUIDE 30:1992/Amd.2008. *Terms and definitions used in connection with reference materials*. Geneva: International Organization for Standardization; 1992-2008.
2. JCGM 200:2008. *International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms*. VIM. 3rd ed. Sèvres Cedex: Bureau International des Poids et Mesures; 2008.
3. Emons H. The "RM family" – Identification of all its members. *Accreditation and Quality Assurance* 2006;10:690-1.
4. Gatti R, Sangiorgio P, Zappa G, Zoani C. Scelta e utilizzo dei materiali di riferimento per la qualità delle misure chimiche. In: *Atti del VI Mostra Congresso "Metrologia & Qualità", Torino, 7-9 aprile 2009*.
5. European Co-operation for Accreditation. *The selection and use of reference materials*. Paris: European Co-operation for Accreditation; 2003. (EA Guide 04/14 2003).
6. ISO-REMCO GUIDE 31:2000(E). *Reference materials - Contents of certificates and labels*. Geneva: International Organization for Standardization, Second edition, 2000.
7. Emons H. The use of reference materials in international reference measurement systems and for comparison of analytical data. In: Fajeli A, Belli M, U. Sansone U (Ed.). *Combining and reporting analytical results*. London: RSC publishing 2007, p. 205-15.

8. Gatti R, Sangiorgio P, Zappa G, Zoani C. Some considerations on certification of monoelemental Reference Solutions. In: *Atti del Workshop "Traceability to support CIPM MRA and other international arrangements", Torino (Italy), 6-7 November 2008*.
9. Niessen L. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology* 2007;119:38-46.
10. Gancberg D, Corbisier P, Schimmel H, Emons H. *Guidance document on the use of reference materials on genetic testing*. Luxembourg: European Communities; 2008. (EUR 23256 EN- 2008).
11. Trapman S, Burns M, Broll H, Machartur R, Wood R, Zel J. *Guidance document on Measurement Uncertainty for GMO Testing Laboratories*. Luxembourg: European Communities; 2009. (EUR 22756 EN2- 2009).
12. COMAR. *International database for certified reference materials*. Disponibile all'indirizzo: www.comar.bam.de; ultima consultazione 14/9/10.
13. VIRM. *Reference Material database*. Disponibile all'indirizzo: www.virm.net; ultima consultazione 14/9/10.
14. Del Monte MG, Troisi L, Zappa G. *Reference materials for agrofood*. Roma: Rapporto tecnico ENEA n.7/INN – 2000.
15. Carconi P, Gatti R, Zappa G, Zoani C. I materiali di riferimento per il settore agroalimentare: stato attuale e necessità. In: *Atti del V Congresso "Metrologia & Qualità", Torino, 14-16 marzo 2007*.
16. Unione Europea. Regolamento CE 683/2004 della Commissione del 13 aprile 2004 che modifica il regolamento CE n. 446/2001 per quanto riguarda le aflatossine e l'ocratossina A negli alimenti per lattanti e prima infanzia. *GUCE* L 106, 15 aprile 2004.
17. Unione Europea. Regolamento (CE) n.1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *GUCE* L 364, 20 dicembre 2006.
18. Italia. Decreto legislativo 149/2004. Attuazione delle direttive 2001/102/CE, 2002/32/CE, 2003/57/CE e 2003/100/CE, relative alle sostanze e ai prodotti indesiderabili nell'alimentazione degli animali. *Gazzetta Ufficiale* n. 139, 16 giugno 2004
19. Unione Europea. Raccomandazione CE 17/08/2006. Presenza di Deossinivalenolo, Zearalenone, Ocratossina A, tossine T-2 e HT-2 e Fumonisine in prodotti destinati all'alimentazione degli animali. *GUCE* L 229, 23 agosto 2006.
20. Carconi P, Gatti R, Zappa G, Zoani C. A systematic approach in the evaluation of uncertainty in analytical chemistry – application to ICP-AES analysis. In: Fajeli A, Belli M, Sansone U (Ed.). *Combining and reporting analytical results*. London: RSC publishing; 2007. p. 161-7.
21. Carconi P, Gatti R, Zappa G, Zoani C. L'incertezza delle misure chimiche per la qualità e la sicurezza dei prodotti alimentari: individuazione delle fonti e applicazione delle procedure di calcolo. In: *Atti del V Congresso "Metrologia & Qualità", Torino, 14-16 marzo 2007*.
22. Adriani A, Amico A, Carconi P, Gatti R, Palazzo S, Portaro N, Sangiorgio P, Troisi L, Zappa G. *Preparazione di materiali di riferimento agroalimentari. Primi risultati e valutazioni*. Roma: ENEA; 2004. (RT/2004/22/BIOTEC).
23. ISO-REMCO Guide 34:2000 *General requirements for the competence of reference material producers*. Geneva: International Organization for Standardization, Second edition, 2000 (Cor 1:2003.).
24. Gatti R, Zappa G, Zoani C. Preparazione di un materiale di riferimento da utilizzare per misure del contenuto di sostanze nutriceutiche in prodotti alimentari. In: *Atti del V Congresso "Metrologia & Qualità", Torino, 14-16 marzo 2007*.

25. Diletti G, Scortichini G, Gatti R, Zappa G, Zoani C. Preparazione di un materiale di riferimento per l'analisi di PCDDs e PCDFs negli alimenti zootecnici. In: *Atti del V Congresso "Metrologia & Qualità", Torino, 14-16 marzo 2007*.
26. Senofonte O, Giordano R, Ciaralli L, Ciprotti M, Pino A, D'Amato M, di Gregorio M, Costantini S, Carconi P, Gatti R, Palazzo S, Zappa G, Zoani C. Preparazione di materiali di riferimento e loro utilità nei circuiti interlaboratorio per i Laboratori Nazionali di Riferimento della UE. In: *Atti del V Congresso "Metrologia & Qualità", Torino, 14-16 marzo 2007*.
27. Carconi P, Gatti R, Zappa G, Zoani C, Costantini S, Senofonte O. ENEA resources for Reference Materials production to support food quality and safety. Co-operation with the Community Reference Laboratory for chemical elements in food of animal origin (CRL-ISS). In: *Proceedings of the Scientific Symposium EFSA - University of Parma Food Safety and Quality, Nutrition and Nano-Technology - Parma 4 ottobre 2007*.
28. Ciaralli L, Giordano R, Senofonte O, Colabucci A, D'Amato M, D'Ilio S, Zappa G, Palazzo S, Di Gregorio M, Costantini S. Experiences of the Community Reference Laboratory for chemical elements in food of animal origin in the preparation of test materials for proficiency testing. In: Brookman B, Menditto A, Patriarca M (Ed.). *6th Workshop. Proficiency Testing in Analytical Chemistry, Microbiology and Laboratory Medicine: Current Practice and Future Directions. Rome, Italy, October 5-7, 2008. Abstract book*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2008 (ISTISAN Congressi 08/C8). p. 29-30.
29. Zappa G, Carconi P, D'Alessio A, Di Bonito R, Gatti R, Mosiello L, Zoani C. Feasibility study for the development of a toner-Reference Material. *Measurement* 2009;42:1491-6.