

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

4° Congresso Nazionale

**Le micotossine
nella filiera agro-alimentare**

Istituto Superiore di Sanità
Roma, 11-13 giugno 2012

RIASSUNTI

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 0393-5620
ISTISAN Congressi
12/C3

Istituto Superiore di Sanità

4° Congresso Nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 11-13 giugno 2012. Riassunti.

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

2012, xi, 81 p. ISTISAN Congressi 12/C3

Il Congresso è giunto alla sua quarta edizione e mi è gradita l'occasione per ringraziare tutti i colleghi che nel passato hanno tributato a questo evento un nutrito consenso. Nel pensare a questa 4^a edizione, ho cercato anche di fare tesoro di alcune critiche, sempre costruttive, per cercare di migliorare i contenuti scientifici e l'organizzazione logistica del Congresso. Ritengo che dopo tanti anni sia necessaria un'analisi più pragmatica e più attinente alle varie realtà che interessano la filiera agro-alimentare rispetto ad argomenti di carattere generale, ormai del tutto acquisiti da parte degli operatori della filiera. Sarà pertanto dato ampio spazio sia alla presentazione di contributi scientifici che correlino la presenza delle micotossine nella dieta con specifiche patologie nell'uomo e negli animali, sia alla presentazione delle attività preventive e di controllo che sono state nel tempo acquisite e poi affinate dai vari comparti agro-alimentari. Infine, come tradizione, l'ultima giornata sarà dedicata alla diagnostica, a cui in ultima analisi sono demandate le verifiche dell'efficacia delle azioni di autocontrollo e controllo ufficiale.

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. Abstract book.

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

2012, xi, 81 p. ISTISAN Congressi 12/C3 (in Italian and in English)

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 (ISS, the 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.

Responsabili scientifici: Carlo Brera e Fernando Maurizi

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

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

Citare questo documento come segue:

Brera C, De Santis B, Debegnach F, Gregori E, Pannunzi E, Barea Toscan MC (Ed.). *4° Congresso nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 11-13 giugno 2012. Riassunti.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2012 (ISTISAN Congressi 12/C3).

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Egiziana Colletta e Patrizia Mochi*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.



INDICE

Programma	iii
Relatori	ix
Moderatori	x
Note per la consultazione	xi
Lecture plenarie e comunicazioni orali	1
Poster	43
Indice degli autori	79

PROGRAMMA

Lunedì 11 giugno 2012

08.00 Registrazione dei partecipanti

09.00 Indirizzo di benvenuto
Prof. Enrico Garaci
Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità

Prof. Armando Zingales
Presidente del Consiglio Nazionale dei Chimici

Dr. Umberto Agrimi
Direttore del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, ISS

Dr. Carlo Brera
Direttore del Reparto OGM e Xenobiotici di Origine Fungina, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, ISS

Tema della giornata
ANALISI DEL RISCHIO

Prima sessione
CORRELAZIONE TRA MICOTOSSINE E PATOLOGIE
NELL'UOMO E NEGLI ANIMALI

Moderatori: Carlo Brera, Marina Miraglia

Lecture plenarie

09.30 *Micotossine e sicurezza alimentare*
Romano Marabelli

10.00 *Scenario epidemiologico delle patologie potenzialmente correlate alle micotossine*
Marina Miraglia

10.30 *Risk assessment of mycotoxins*
Marco Binaglia

11.00 *Correlazione tra micotossine e patologie negli animali*
Amedeo Pietri

11.30 Intervallo

Comunicazioni orali

- 11.45 *Autismo e micotossine nella dieta: prime ipotesi*
Barbara De Santis
- 12.00 *Valutazione della esposizione alle micotossine in soggetti celiaci*
Francesca Debegnach
- 12.15 *Differenze nel comportamento residuale di ocratossina nel suino e nella gallina ovaioia*
Anna Zaghini
- 12.30 Discussione dei temi della sessione
- 13.00 Intervallo e sessione poster

Seconda sessione

SCENARI NAZIONALI DI VALUTAZIONE DEL RISCHIO

Moderatori: **Francesca Debegnach, Amedeo Pietri**

Lecture plenarie

- 14.15 *Il rischio aflatossine nei cereali in uno scenario europeo di cambiamento del clima*
Paola Battilani

Comunicazioni orali

- 14.45 *Organizzazione del controllo delle micotossine in Regione Emilia-Romagna*
Giorgio Fedrizzi
- 15.00 *Livelli accresciuti dei controlli ufficiali sui prodotti di importazione*
Carlo Donati
- 15.15 Intervallo
- 15.30 *Grano duro biologico e contaminazione da deossinivalenolo: risultati di un triennio di prove in diversi ambienti italiani*
Fabrizio Quaranta
- 15.45 *Micotossine negli alimenti - Controlli ufficiali in Piemonte 2002-2012*
Sara Coluccia

16.00 *Monitoraggio della contaminazione da micotossine in prodotti alimentari: attività 2008-2010 del Polo Alimenti ARPA Puglia di Bari*
Francesca Ferrieri

16.15 Discussione dei temi della sessione

Martedì 12 giugno 2012

Tema della giornata

GESTIONE DEL RISCHIO NELLA FILIERA AGRO-ALIMENTARE

Prima sessione

SISTEMI DI PREVENZIONE DEL RISCHIO

Moderatori: Corrado Fanelli, Fernando Maurizi

Letture plenarie

09.00 *Il tema micotossine nell'ambito del Piano Cerealicolo Nazionale*
Giovanni Di Genova

09.30 *Valutazione dei rischi agronomici derivanti dalla contaminazione da micotossine nel comparto cerealicolo*
Amedeo Reyneri

10.00 *Applicazione dei principi HACCP nel controllo delle micotossine nelle produzioni alimentari*
Daniela Maurizi

10.30 *MYCORED: un progetto europeo per la prevenzione del rischio di contaminazione da micotossine nelle filiere alimentari*
Antonio Logrieco

11.00 Intervallo

Comunicazioni orali

11.15 *La percezione del consumatore alla contaminazione da micotossine*
Agostino Macrì

11.30 *Tecniche di screening e conferma: il caso aflatossina M1*
Alberto Biancardi

11.45 *Sanità e sicurezza in mais: valutazione di genotipi italiani per qualità nutrizionale, resistenza a F. verticillioides e accumulo di fumonisine*
Carlotta Balconi

12.00 Discussione dei temi della sessione

Seconda sessione

CONTROLLO UFFICIALE ED AUTO-CONTROLLO: QUALE LIVELLO DI COMPLEMENTARITÀ?

Moderatori: Paola Battilani, Antonio Logrieco

Lecture plenarie

12.15 *An updated overview of legislative provisions about mycotoxins in food and feed*
Frans Verstraete

12.45 *Il ruolo del controllo ufficiale per la vigilanza e sorveglianza del problema micotossine nei prodotti alimentari*
Silvio Borrello

13.15 Intervallo e sessione poster

14.15 *Il ruolo del controllo ufficiale per la vigilanza e sorveglianza del problema micotossine nell'alimentazione animale*
Gaetana Ferri

Comunicazioni orali

14.45 *Autocontrollo nelle imprese alimentari: quale livello di interazione con il controllo ufficiale?*
Mario Piccialuti

15.00 *Micotossine nei cereali: esperienze di autocontrollo in impianti di stoccaggio siti nella Regione Emilia-Romagna*
Gianni Baccarini

15.15 *Risultati preliminari sulla dinamica di accumulo delle fumonisine libere e nascoste in mais durante la stagione colturale in relazione al cross-talk pianta patogeno*
Paola Giorni

15.30 *Effetti dei trattamenti post-raccolta sulla contaminazione da DON nei prodotti di frumento tenero biologico europeo*
Marina Carcea

15.45 Discussione dei temi della sessione

Mercoledì 13 giugno 2012

**Tema della giornata
ASPETTI DIAGNOSTICI**

**Prima sessione
NUOVI ORIZZONTI ANALITICI**

Moderatori: Michelangelo Pascale, Rosangela Marchelli

Letture plenarie

- 09.00 *Sviluppi diagnostici nell'analisi delle micotossine*
Angelo Visconti
- 09.30 *The role of EU-RL for control activity of mycotoxins*
Zoltan Kunsagi
- 10.00 *Il ruolo del Laboratorio Nazionale di Riferimento nelle attività di controllo delle micotossine*
Carlo Brera
- 10.30 Intervallo

Comunicazioni orali

- 11.00 *Aptameri a DNA: materiali innovativi per l'analisi delle micotossine*
Annalisa De Girolamo
- 11.15 *Sviluppo di biosensori per la determinazione di micotossine*
Lucia Mosiello
- 11.30 *Metodo LC-MS/MS per la valutazione residuale di Ocratossina A (OTA) e del suo metabolita Ocratossina α (OT α) nei tessuti animali*
Ivan Pecorelli
- 11.45 *Moniliformina nel mais: sviluppo di una metodica HPLC-MS/MS e prime indagini sulla diffusione nel quadriennio 2008-2011 in Piemonte*
Valentina Scarpino
- 12.00 *Micotossine mascherate nel grano duro: presenza, significato e destino metabolico*
Gianni Galaverna
- 12.15 *Fusariotossine negli alimenti zootecnici: applicazione della spettroscopia NIR-AOTF per l'analisi di screening dei sottoprodotti della molitura del frumento*
Pier Paolo Danieli

- 12.30 *Determinazione della patulina nel succo di mela*
Fausta Giuffrè
- 12.45 *Determinazione di zearalenone e suoi metaboliti in campioni di fluidi biologici*
Emanuela Gregori
- 13.00 Intervallo e sessione poster

Seconda sessione

IL CAMPIONAMENTO: UNA FASE ANCORA NON RISOLTA?

Moderatori: Barbara De Santis, Maurizio Monti

Lecture plenarie

- 14.00 *Il campionamento: quale strategia aziendale per una efficace azione di controllo delle produzioni?*
Maurizio Monti
- 14.30 *Aspetti pratici legati ad una corretta esecuzione delle procedure di campionamento*
Carlo Brera

Comunicazioni orali

- 15.00 *Ripartizione della contaminazione da aflatossine e fumonisine nella preparazione del campione*
Elena Pannunzi
- 15.15 *Difficoltà, limiti e criticità connesse con l'esecuzione dei campionamenti per ricerca micotossine in feeds importati*
Gabriele Gandini
- 15.30 Discussione dei temi della sessione e conclusioni finali

RELATORI

Baccarini Gianni	PIF Ravenna, Ravenna
Balconi Carlotta	CRA-MAC, Bergamo
Battilani Paola	Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza
Biancardi Alberto	IZS Lombardia e Emilia-Romagna, Brescia
Binaglia Marco	EFSA, Parma
Borrello Silvio	Ministero della Salute, Roma
Brera Carlo	Istituto Superiore di Sanità, Roma
Carcea Marina	INRAN, Roma
Coluccia Sara	Polo Alimenti, ARPA Piemonte, La Loggia, Torino
Danieli Pier Paolo	Università della Tuscia, Viterbo
Di Genova Giovanni	MIPAAF, Roma
De Girolamo Annalisa	ISPA, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari
De Santis Barbara	Istituto Superiore di Sanità, Roma
Debegnach Francesca	Istituto Superiore di Sanità, Roma
Donati Carlo	Ministero della salute, Roma
Fedrizzi Giorgio	IZS Lombardia e Emilia-Romagna, Bologna
Ferri Gaetana	Ministero della Salute, Roma
Ferrieri Francesca	ARPA Puglia, Bari
Galaverna Gianni	Università di Parma, Parma
Gandini Gabriele	PIF Ravenna, Ravenna
Giorni Paola	Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza
Giuffrè Fausta	Chem Service, Novate Milanese, Milano
Gregori Emanuela	Istituto Superiore di Sanità, Roma
Kunsagi Zoltan	EU-RL, Geel, Belgio
Logrieco Antonio	ISPA, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari
Macrì Agostino	Unione Consumatori, Roma
Marabelli Romano	Ministero della Salute, Roma
Maurizi Daniela	Gruppo Maurizi, Roma

Miraglia Marina	RIFOSAL, Roma
Monti Maurizio	ANTIM, Bologna
Mosiello Lucia	ENEA, Roma
Pannunzi Elena	Istituto Superiore di Sanità, Roma
Pecorelli Ivan	IZS Umbria e Marche, Perugia
Piccialuti Mario	AIDEPI, Roma
Pietri Amedeo	Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza
Quaranta Fabrizio	CRA-QCE, Roma
Reyneri Amedeo	Università di Torino, Grugliasco, Torino
Scarpino Valentina	Università di Torino, Grugliasco, Torino
Verstraete Frans	EFSA, Bruxelles, Belgio
Zaghini Anna	Università di Bologna, Bologna

MODERATORI

Battilani Paola	Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza
Brera Carlo	Istituto Superiore di Sanità, Roma
De Santis Barbara	Istituto Superiore di Sanità, Roma
Debegnach Francesca	Istituto Superiore di Sanità, Roma
Fanelli Corrado	Università di Roma Sapienza, Roma
Logrieco Antonio	ISPA, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari
Marchelli Rosangela	Università di Parma, Parma
Maurizi Fernando	Consiglio Nazionale dei Chimici, Roma
Miraglia Marina	RIFOSAL, Roma
Monti Maurizio	ANTIM, Bologna
Pascale Michelangelo	ISPA, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari
Pietri Amedeo	Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza

NOTE PER LA CONSULTAZIONE

Il presente libro raccoglie tutti i contributi presentati al Congresso. I lavori sono divisi in Letture plenarie, Comunicazioni orali e Poster.

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

Alla fine del volume è incluso un indice degli autori.

**Lecture plenary
and oral communications**

SCENARIO EPIDEMIOLOGICO DELLE PATOLOGIE POTENZIALMENTE CORRELATE ALLE MICOTOSSINE

Miraglia M. (a), De Santis B. (b), Brera C. (b)

(a) *Consorzio RIFOSAL, Roma*

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

A causa della elevata percentuale (25%) di diffusione delle micotossine nelle derrate alimentari, queste sostanze tossiche contaminano la dieta di una larga proporzione della popolazione del nostro pianeta, così che la correlazione tra micotossine e salute umana costituisce un problema generale, peraltro largamente ignorato e non. L'impatto sulla salute umana attribuibile alle micotossine è verosimilmente molto differente nelle diverse regioni del mondo, toccando in alcuni casi punte di particolare gravità. In molti paesi a basso reddito le micotossine sono presenti nell'alimentazione, spesso rappresentata esclusivamente da cereali, in maniera continuativa e ad alto livello. Nei paesi industrializzati, in virtù dei limiti di legge in vigore, ragionevolmente restrittivi, il consumatore può essere esposto in maniera cronica, ma solo a livelli bassi di micotossine. Nei paesi a basso reddito, nell'ultimo decennio, le ricerche epidemiologiche hanno avuto un notevole sviluppo, grazie anche alla disponibilità di biomarcatori. Fra i risultati più rilevanti è stato confermato il già noto ruolo dell'aflatossina B₁ (AFB₁) nello sviluppo del cancro al fegato, specialmente in individui infetti dal virus dell'epatite B o C. Un aspetto particolarmente interessante riguarda la correlazione AFB₁/crescita e AFB₁/immunomodulazione. Relativamente alla fumonisin B₁ numerosi studi epidemiologici in Sud Africa avevano da tempo evidenziato una correlazione fra Cancro Esofageo (CE) e mais contaminato ed anche in Italia è stata ipotizzata una correlazione tra elevato consumo di mais e CE. Nonostante i numerosi biomarcatori individuati per la fumonisin B₁, questa metodologia deve ancora essere perfezionata, anche se l'1-deossisnignina, di recente individuata, sembra essere molto promettente. Altri studi epidemiologici sono disponibili per altre micotossine, essenzialmente ocratossina A e deossinivalenolo. Nei paesi industrializzati, ed in particolare nell'Unione Europea, una robusta legislazione relativa ai limiti massimi tollerabili, basata essenzialmente su studi tossicologici su animali e sui margini di sicurezza, dovrebbe contribuire ad esercitare efficaci effetti preventivi. Va tuttavia rilevato che non sono state finora eseguite indagini epidemiologiche volte ad evidenziare quale sia il reale impatto sulla salute umana attribuibile al "paniere" delle micotossine presenti nei nostri alimenti. Solo recentemente sono state avviate ricerche e ottenuti risultati concreti sull'effetto delle micotossine nello stadio prenatale. Il consumo di mais contaminato da fumonisin B₁ da parte della madre è stato associato con difetti del tubo neurale nella popolazione ad alto consumo di mais. Di particolare rilievo è il progetto NewGeneris che, nell'ambito di una ampia valutazione della risposta del feto all'esposizione materna, studia anche l'effetto dell'esposizione al deossinivalenolo e all'AFB₁. Analogamente lo studio di Partanen accerta la capacità dell'AFB₁ di attraversare la barriera placentare. Rimangono assolutamente carenti studi

epidemiologici sui possibili effetti relativi alla cancerogenicità, nonché ad altri effetti tossici ancora meno studiati quali immunosoppressione, difetti della crescita e disturbi nella fase prenatale.

RISK ASSESSMENT OF MYCOTOXINS

Binaglia M., Baert K., Thatcher N., Eskola M.

Unit on Contaminants in the Food Chain, European Food Safety Authority, Parma

Mycotoxins may cause many different adverse health effects such as induction of cancer and mutagenicity, as well as estrogenic, immunologic, gastrointestinal and kidney disorders. The European Food Safety Authority (EFSA) was recently asked by the European Commission, to assess the risks to human and animal health related to the presence of some specific mycotoxins in food or in both food and feed. These mandates were assigned to the Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM Panel). Recently, EFSA has published risk assessments on zearalenone in food, and risk assessments in relation to food and feed on *Alternaria* toxins, T-2 and HT-2 toxins, phomopsins and citrinin. Different approaches were undertaken by the CONTAM Panel for the risk assessment of these mycotoxins, depending on the available information on their occurrence and toxicity. An overview of the approaches used for the characterisation of exposure and hazard of the aforementioned mycotoxins is given and the opinion on T-2 and HT-2 toxins in food and feed is presented in detail. For the sum of the T-2 and HT-2 toxins, a total of 20,519 occurrence results were collected in food, feed and unprocessed grains. The highest concentrations were found in cereals, in particular in oats and oat products. For humans, a group Tolerable Daily Intake (TDI) of 100 ng/kg b.w. was established for the sum of T-2 and HT-2 toxins. Based on the available occurrence data, the chronic human dietary exposure to the sum of T-2 and HT-2 toxins was estimated to be below the TDI, and thus not of concern for human health. The risk assessment for the presence of T-2 and HT-2 in feed indicated a low risk of adverse effects for pigs, poultry, dogs and horses, and an unlikely risk for ruminants, rabbits and farmed fish. Limited data indicated that cat is amongst the most sensitive species to T-2 and HT-2 toxicity, but the data did not allow the risk assessment of adverse effects in comparison to the estimated exposure levels.

CORRELAZIONE TRA MICOTOSSINE E PATOLOGIE NEGLI ANIMALI

Pietri A., Bertuzzi T.

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

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

VALUTAZIONE DELLA ESPOSIZIONE ALLE MICOTOSSINE IN SOGGETTI CELIACI

Brera C., Di Ianni S., Debegnach F., Pannunzi E., Prantera E., De Santis B.
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

I soggetti celiaci presentano una intolleranza permanente al glutine che condiziona le loro abitudini alimentari che sono caratterizzate da maggiori consumi di prodotti a base di mais, riso e altri cereali, in sostituzione dei prodotti contenenti glutine abitualmente consumati dall'intera popolazione; pertanto, a causa di questo sbilanciato consumo di cereali particolarmente suscettibili alla contaminazione da micotossine, lo studio, condotto in collaborazione con l'Associazione Italiana Celiachia (AIC), si prefigge di stimare l'esposizione all'AFB1, OTA, FBs, al Deossinivalenolo (DON), allo Zearalenone (ZEA), ed alle tossine T-2 e HT-2 nei soggetti celiaci attraverso il consumo dei prodotti dietetici specificatamente destinati alla loro dieta. In particolare, questo studio ha avuto lo scopo di valutare l'esposizione di un gruppo di donne celiache in allattamento, utilizzando i dati di consumo riportati in schede alimentari. Inoltre si è progettato di stimare l'esposizione dell'intera popolazione dei soggetti affetti da morbo celiaco utilizzando i dati di consumo della popolazione italiana, per colmare la mancanza di tale informazione. Per effettuare lo studio di esposizione è stata predisposta una campionatura in siti di campionamento predeterminati e rappresentativi del territorio nazionale (farmacie, negozi specializzati e grande distribuzione). Sono stati raccolti 376 campioni dedicati ai celiaci. Su tali campioni è stato effettuato il dosaggio, con un metodo analitico validato in *house*, della aflatoxina B1, ocratossina A, Fumonisine (FBs), deossinivalenolo, Zearalenone (ZEA), T-2 e HT-2. Dalla combinazione dei dati di contaminazione dei campioni analizzati e dei dati di consumo per i prodotti alimentari esaminati (medio ed al 95ile) è stata effettuata una valutazione dell'esposizione alle micotossine sia delle donne celiache in allattamento che dell'intera popolazione affetta da morbo celiaco. In particolare, sono state considerate le fasce di età comprese tra i 3 e 9,9 anni, tra 10 e 17,9 anni e tra 18 e 65 anni. Gli scenari di esposizione (*upper and lower bound*) emersi da questo studio hanno delineato per tutte le micotossine analizzate una condizione di estrema tranquillità in tema di sicurezza alimentare, con contaminazioni di interesse solo nel caso delle FBs e dello ZEA. Pertanto, la valutazione della esposizione è stata effettuata solo per queste due micotossine; le donne celiache in allattamento hanno mostrato intervalli di esposizione ampiamente al di sotto dei valori soglia indicati dalla TDI; nella peggiore delle ipotesi (considerando il consumo al 95%ile per pasta e pane, rispettivamente), si è ottenuta una esposizione fino al 20% per le FBs e fino al 45% per lo ZEA del limite tossicologico soglia. Per l'intera popolazione, considerando i valori di consumo al 95%ile, esclusivamente per lo ZEA nella matrice pane, si sono ottenuti valori di esposizione più alti, che vanno dal 30% al 55% della TDI, per tutte le fasce di età, sia per i maschi che per le femmine.

DIFFERENZE NEL COMPORTAMENTO RESIDUALE DI OCRATOSSINA A NEL SUINO E NELLA GALLINA OVAIOLA

Sori F., Roncada P., Altafini A., Zaghini A.

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, Bologna

Introduzione. L'Ocratossina A (OTA), prodotta da diverse specie fungine del genere *Penicillium* ed *Aspergillus*, nel gruppo delle ocratossine risulta essere caratterizzata da elevata tossicità (nefrotossicità, immunotossicità, neurotossicità, teratogenicità). OTA è presente in numerosi prodotti vegetali, tuttavia può essere ritrovata a livello ematico, renale ed epatico di animali da produzione esposti alla tossina tramite l'alimentazione. Sia la tossicità che la cinetica risentono di notevoli differenze specie-specifiche. La valutazione di eventuali differenze nel comportamento residuale di OTA somministrata a suini e a galline ovaiole mediante diete sperimentalmente contaminate e la concomitante valutazione di possibili matrici da utilizzarsi come *marker* di esposizione, rappresentano le principali finalità della presente ricerca.

Materiali e metodi. Entrambe le sperimentazioni sono state autorizzate dal Ministero della Salute (DLvo 116/1992).

- Sperimentazione suini: 8 suini (peso medio di 30 kg) sono stati suddivisi in due gruppi sperimentali di quattro animali ciascuno. Al gruppo D1 è stata somministrata una dose giornaliera di 500 µg/kg di OTA per una durata totale di 15 giorni. I rimanenti quattro suini (gruppo D0) sono stati utilizzati come controllo.
- Sperimentazione galline ovaiole: 60 galline ovaiole (peso medio di 1,5 kg) sono state suddivise in 6 gruppi sperimentali da 10 animali ciascuno. Ai gruppi T7, T8 e T9 è stata somministrata una dose giornaliera di 200 ppb di OTA (oltre a livelli differenti di metionina, nell'ordine: 3,9 g/kg, 2,9 g/kg e 5,0 g/kg) per una durata totale di 60 giorni. Agli altri 3 gruppi sperimentali, per la medesima durata di tempo, è stata somministrata la sola metionina (3,9 g/kg, 2,9 g/kg e 5,0 g/kg). La ricerca di OTA è stata condotta sulle seguenti matrici: sangue (plasma), rene, fegato e bile utilizzando una metodica HPLC-FL, previa estrazione e purificazione del campione.

Risultati e discussione. L'integrazione con metionina (gallina ovaiole) non ha determinato nessun effetto sui livelli di OTA nelle matrici considerate. Le due prove sperimentali, pur con differenze legate ai dosaggi di OTA e alla durata del trattamento, mettono in luce considerevoli differenze tra le due specie considerate. Nel suino la matrice maggiormente interessata risulta essere il plasma (217,36±25,11 µg/kg), mentre rene, fegato e bile presentano livelli tra loro analoghi e molto più bassi (nell'ordine: 27,53±5,05 µg/kg; 21,86±3,59 µg/kg e 26,44±17,07 µg/kg). Al contrario, nella gallina ovaiole la maggior parte dei campioni di plasma e di fegato è risultata negativa; il rene presenta valori molto bassi (T7: 0,86±0,25 µg/kg; T8: 0,74±0,18 µg/kg; T9: 1,38±0,88 µg/kg), mentre la

bile, in maniera del tutto inattesa, è risultata la matrice con i più alti livelli di OTA (T7: 211,24±103,51 µg/kg; T8: 84,41±25,82 µg/kg; T9: 122,78±49,19 µg/kg).

Conclusioni. I risultati ottenuti confermano la grande variabilità specie-specifica per quanto riguarda la cinetica di OTA e, per quanto riguarda la gallina ovaioia, la bile potrebbe essere considerata un valido *marker* di esposizione alla tossina.

IL RISCHIO AFLATOSSINE NEI CEREALI IN UNO SCENARIO EUROPEO DI CAMBIAMENTO DEL CLIMA

Battilani P. (a), Toscano P. (b), van del Fels-Klerx I.H. (c), Moretti A. (d), Brera C. (e), Rortais A. (f), Camardo Leggieri M. (a), Tilemachos G. (f), Robinson T. (f)

(a) *Facoltà di Agricoltura, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

(b) *Istituto di Biotecnologie, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Firenze*

(c) *RIKILT, Institute of Food Safety, Wageningen, The Netherlands*

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

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

(f) *Emerging Risks Unit, European Food Safety, Parma*

Le previsioni di cambiamento del clima suggeriscono che nei prossimi anni si assisterà ad un innalzamento della temperatura e ad una alterata distribuzione delle piogge, con eventi più intensi nei periodi freddi e periodi siccitosi prolungati durante la primavera-estate. Queste condizioni potrebbero essere molto favorevoli per *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, i principali funghi produttori di aflatossine. Nel 2003, in occasione di un'estate particolarmente calda e secca sono stati effettivamente riscontrati problemi nelle produzioni maidicole e nella filiera. Allo scopo di stimare l'impatto del cambiamento del clima sullo sviluppo di *A. flavus* e sulla sintesi di Aflatossine (AFB₁) in mais, è stato sviluppato un modello meccanicistico, AFLA-maize che tiene conto della fenologia della pianta ed utilizza come *input* per le previsioni i dati meteorologici giornalieri. Questi sono stati generati su scala europea (griglia 50x50 Km) sulla base di un modello stocastico (*LARS-WG*), sono stati calibrati per le condizioni attuali, per comparazione con i dati giornalieri osservati per un decennio, e aggiustati per 2 scenari definiti da IPCC, A₂ and B₂. L'*output* del modello, I-AF, è un indice di rischio meteorologico per la contaminazione da AFB₁ alla raccolta. Il rischio di contaminazione è stato calcolato per le condizioni attuali e per i 2 scenari scelti, per una serie di 100 anni, ed i risultati sono stati utilizzati per l'analisi statistica ed il disegno di mappe di rischio. I risultati hanno evidenziato che nello scenario che prevede un aumento della temperatura di +2°C si prospetta un chiaro incremento del rischio di contaminazione da AFB₁ alla raccolta del mais in zone tipiche per questa coltura, quali Spagna, Italia e Balcani. La variazione delle fasi fenologiche della coltura, con un anticipo di 5-10 giorni della fioritura e della raccolta, non fa immaginare decise variazioni nella tecnica di coltivazione. L'incremento di +5°C suggerisce una situazione molto diversa, con un forte allargamento della zona di rischio per la contaminazione da AFB₁, soprattutto nel Sud-Est europeo, seppure con una diminuzione del rischio nelle aree precedentemente citate. In questo scenario si potrebbe assistere ad un allargamento della zona di coltivazione del mais e ad un notevole accorciamento del ciclo colturale. Queste previsioni confermano che il rischio di contaminazione da AFB₁ in mais è oggetto di preoccupazione e che, almeno in alcune aree europee, è ipotizzabile un aumento del rischio di esposizione sia per l'uomo che per gli animali.

LIVELLI ACCRESCIUTI DEI CONTROLLI UFFICIALI SUI PRODOTTI DI IMPORTAZIONE

Donati C.

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

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

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

Quaranta F. (a), Aureli G. (a), Belocchi A. (a), Melloni S.A. (b), D'Egidio M.G. (a)
(a) *Unità di Ricerca per la Valorizzazione Qualitativa dei Cereali, Consiglio per la Ricerca
e la Sperimentazione in Agricoltura, CRA-QCE, Roma*
(b) *Università Campus Biomedico, Roma*

Il Deossinivalenolo (DON) è la micotossina più frequentemente riscontrata in Europa sul frumento. La contaminazione in campo è causata da diverse specie di *Fusarium* che possono attaccare le piante durante la spigatura - maturazione latte, soprattutto se in queste fasi fenologiche persistono condizioni climatiche caldo-umide. La presenza più o meno massiccia di DON su frumento comporta perdite economico-produttive e qualitative, ma soprattutto l'aumento del rischio igienico-sanitario legato alla tossicità di questo tricotecene per gli animali e per l'uomo. La crescente richiesta internazionale di prodotti biologici potrebbe rappresentare un'opportunità per la valorizzazione delle produzioni negli ambienti più difficili, tipici della durogranicoltura italiana. L'impossibilità di ricorrere a fitofarmaci per il controllo e la difesa da funghi patogeni, ha però fatto ipotizzare che ci potesse essere un maggior rischio di contaminazione rispetto alla tecnica di coltivazione convenzionale. Studi più recenti hanno invece evidenziato risposte più favorevoli per le colture biologiche, contraddistinte da livelli di contaminazione da DON significativamente più bassi, grazie soprattutto alla maggiore attenzione verso le buone pratiche agronomiche che i disciplinari di coltivazione obbligano a realizzare. Visti però i risultati non sempre univoci presenti in letteratura, spesso frutto di sperimentazione in areali continentali e su frumento tenero, si è ritenuto opportuno indagare circa l'effettiva incidenza della contaminazione da DON sulla granella di frumento duro quando coltivato con metodo biologico in ambienti italiani, impiegando le stesse varietà in un confronto ripetuto per più anni. Le prove sono state condotte con la tecnica di coltivazione biologica nel triennio 2008-2010 in sei località, di cui tre dislocate nell'areale Centro-Nord e tre nell'areale Sud dell'Italia, impiegando in tutti gli ambienti le stesse sedici varietà di frumento duro di differente ciclo biologico. I risultati ottenuti hanno evidenziato livelli medi di contaminazione da DON generalmente contenuti (media triennale dei soli campioni positivi valutati con metodo ELISA: 319 µg/kg), con una maggiore presenza di micotossine nelle tre località dell'areale centro-settentrionale, dove si è registrata un'incidenza superiore al 90% negli anni più favorevoli allo sviluppo del DON (2008 e 2009). Al contrario, le tre località meridionali hanno confermato una presenza insignificante di micotossine con scarsissima incidenza percentuale di riscontri positivi e valori medi molto bassi, poco al di sopra della soglia di rilevamento del metodo pari a 18,5 µg/kg e con un valore massimo di scarsa preoccupazione (152 µg/kg). Per quanto riguarda le varietà è stato osservato un livello di contaminazione variabile che non sembrerebbe legato alla lunghezza del ciclo biologico, anche se alcune varietà sono risultate più contaminate di altre, con valori massimi che hanno superato 1.750 µg/kg, soglia fissata da Regolamento CE 1881/2006 per la granella di cereali non trasformati. La scelta varietale, in

attesa di nuovi genotipi migliorati specificatamente per la resistenza alle fusariosi, rimane fattore di minor peso nel contenimento della contaminazione da DON, almeno rispetto ad altri (anno, ambiente, tecnica colturale, quantità e interrimento dei residui della precessione), pur rimanendo comunque primario elemento di tecnica colturale capace di migliorare a costo zero rese, qualità e salubrità delle produzioni, soprattutto se di provata stabilità adattativa negli specifici areali di coltivazione.

MICOTOSSINE NEGLI ALIMENTI - CONTROLLI UFFICIALI IN PIEMONTE 2002-2012

Coluccia S.J., Alesso F., Bodda M., Ciacciarelli S., Delaini A., Pelligra S., Ricci F.
Polo Alimenti, ARPA Piemonte, La Loggia, Torino

La Regione Piemonte, attraverso le Aziende Sanitarie Locali, la Dogana di Torino Caselle e i carabinieri del NAS, in autonomia, hanno realizzato un vasto programma di controllo degli alimenti a rischio, sia alla produzione che al commercio. La ricerca analitica è affidata al Polo Alimenti dell'ARPA Piemonte. Dal 2010 il laboratorio ha eseguito controlli anche per conto di alcuni Uffici di Sanità Marittima e di Frontiera di altre regioni Italiane che operano secondo i criteri previsti dalla specifica normativa sui controlli all'importazione. Il numero di campioni analizzati è aumentato del 90% rispetto agli anni precedenti e, come conseguenza, è aumentata la percentuale di positività e irregolarità riscontrate. Tali risultati sono da riportare comunque al prelievo mirato di prodotti "a rischio" per tipologia e provenienza. I campioni analizzati nei dieci anni considerati sono circa 6.000. Gli alimenti indagati sono stati soprattutto cereali, frutta secca, vino, caffè, cacao, e i loro derivati; sono state ricercate, nelle varie matrici, una o più delle seguenti micotossine: aflatossine B₁, B₂, G₁, G₂, aflatossina M₁, ocratossina A, patulina, zearalenone, fumonisine B₁ e B₂, Deossinivalenolo, per un totale di oltre 25.000 determinazioni. Le positività riscontrate sono state numerose (~30% dei campioni) ma solo in pochi campioni (1-2%) la concentrazione di micotossine ha superato i limiti di legge. La quantità di risultati prodotti ci ha permesso di dare indicazioni utili per la pianificazione e la realizzazione dei controlli sul territorio regionale. Periodicamente viene infatti aggiornata l'elaborazione dei dati, sia a livello globale che, se rilevante, a livello specifico. I risultati possono essere quindi valutati in base a provenienza, tipologia e destinazione d'uso dell'alimento, oppure per tipo e numero di micotossine riscontrate. Negli anni è stato inoltre misurato l'impatto delle modifiche alla normativa sull'entità e gli esiti dei controlli; l'ottimizzazione delle tecniche analitiche adottate ha permesso la rilevazione di concentrazioni di micotossine sempre più basse sulle svariate tipologie di prodotti. Progressivamente è stata incrementata anche la quantità e il dettaglio delle informazioni registrate per ogni singolo campione, ciò ha reso più efficace e puntuale l'elaborazione dei dati. La nuova procedura standardizzata è inoltre anche allineata alle richieste di raccolta dati dell'EFSA.

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

Ferrieri F., Amenduni C., Battista N., Brunetti A., Corte G., Intini N., Leonetti F., Lo Greco F., Palma M., Santoro T., Fiume F.

Polo di Specializzazione Alimenti, ARPA Puglia, Bari

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

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

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

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

Reyneri A., Blandino M., Vanara F.

Dipartimento di Agronomia, Selvicoltura e Gestione del Territorio, Università degli Studi, Grugliasco, Torino

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

APPLICAZIONE DEI PRINCIPI HACCP NEL CONTROLLO DELLE MICOTOSSINE NELLE PRODUZIONI ALIMENTARI

Maurizi D.

Gruppo Maurizi S.r.l, Roma

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

MYCORED: UN PROGETTO EUROPEO PER LA PREVENZIONE DEL RISCHIO DI CONTAMINAZIONE DA MICOTOSSINE NELLE FILIERE ALIMENTARI

Logrieco A.

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

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

PERCEZIONE DEL CONSUMATORE ALLA CONTAMINAZIONE DA MICOTOSSINE

Dona M., Galardo S., Macri A.
Unione Nazionale Consumatori, Roma

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

TECNICHE DI SCREENING E CONFERMA: IL CASO AFLATOSSINA M1

Biancardi A., Aimo C., Piazza P., Piro R.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia

Il Regolamento CE n. 1881/2006 per il controllo della presenza di residui di aflatoxina M1 nel latte richiede metodologie analitiche sensibili, precise ed accurate. Le più diffuse sono basate su metodi normati: ISO 14675-2003 (metodo ELISA solitamente usato per analisi di *screening*) e ISO 14501-2007 (metodo IAC-HPLC impiegato per conferme e considerato tecnica di elezione). Per avere un dato oggettivo di affidabilità, sono stati confrontati i dati di controllo di qualità prodotti dal laboratorio nell'arco di 4 anni di attività. È stato sempre utilizzato lo stesso tipo di kit ELISA, avente unico fornitore e caratterizzato da prestazioni analitiche costantemente garantite e certificate. Per quanto riguarda la tecnica ELISA, sono stati raccolti 338 dati di accuratezza ottenuti nel periodo 2007-2010 utilizzando 7 diverse matrici di riferimento nell'intervallo da 11 a 69 ng/kg. I valori di z-score medio, ottenuti per ogni livello, vanno da un minimo di -0,22 ad un massimo di 0,08. Per quanto riguarda la tecnica IAC-HPLC, sono stati raccolti 151 dati di accuratezza ottenuti nello stesso periodo con 7 diverse matrici di riferimento nell'intervallo da 32 a 69 ng/kg. I valori di z-score medio, ottenuti per ogni livello, vanno da un minimo di -0,43 ad un massimo di 0,16. Dal confronto ANOVA delle due rette di correlazione tra le medie delle concentrazioni trovate *vs* le concentrazioni teoriche attese ($r^2=0,9968$ per ELISA; $r^2=0,9784$ per HPLC) non si evidenzia una differenza significativa tra i 2 metodi. Quindi si può anzitutto affermare che il metodo ELISA ha prestazioni analoghe al metodo di riferimento IAC-HPLC. Inoltre, da un'attenta valutazione dei risultati in termini di accuratezza (z-score; rette di correlazione) e precisione (CV%) si può aggiungere che il metodo ELISA è migliore del metodo IAC-HPLC. Questa apparentemente anomala conclusione è dovuta al fatto che nel metodo ELISA la manipolazione del campione è minima (il campione è centrifugato ed eventualmente diluito prima del test). Ciò comporta importanti e innumerevoli vantaggi quali velocità di analisi e costi ridotti, ma anche un'elevata produttività e soprattutto una minore probabilità di introdurre errori casuali e sistematici. Al contrario, il metodo HPLC comporta varie fasi, tra cui una purificazione e concentrazione mediante IAC; aumenta quindi la probabilità di introdurre errori, influenzando significativamente sulle caratteristiche di accuratezza e precisione. Inoltre il metodo è più dispendioso sia in termini di tempo che di costi e non si presta all'analisi di un numero elevato di campioni per seduta analitica. Tali risultanze possono essere particolarmente utili 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 ed accurati a qualsiasi livello di contaminazione, a patto di utilizzare un kit ELISA idoneo e di operare secondo ISO 17025. Queste conclusioni sono state applicate ad uno studio di monitoraggio su latte formulato per la prima infanzia usando unicamente la tecnica ELISA. I campioni (n=114) sono risultati negativi (<5 ng/kg) e ne è stata dimostrata la reale negatività mediante prove mirate ELISA, senza far ricorso al metodo HPLC.

SANITÀ E SICUREZZA IN MAIS: VALUTAZIONE DI GENOTIPI ITALIANI PER QUALITÀ NUTRIZIONALE, RESISTENZA A *F. VERTICILLIOIDES* E ACCUMULO DI FUMONISINE

Balconi C., Lanzanova C., Berardo N., Hartings H., Locatelli S., Panza L., Torri A., Alfieri M., Redaelli R.

Unità di Ricerca per la Maiscoltura, CRA-MAC, Bergamo

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

sviluppo anatomico, alcuni associati a stress biotico e caratterizzati da una sovraespressione in seguito ad attacco fungino.

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

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

Piccialuti M.

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

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

MICOTOSSINE NEI CEREALI: ESPERIENZE DI AUTOCONTROLLO IN IMPIANTI DI STOCCAGGIO SITI NELLA REGIONE EMILIA-ROMAGNA

Baccarini G. (a), Villani A. (b), Forapani S. (c), Spisni P. (d)

(a) Consorzio Quadra, Bologna

(b) AGER Borsa Merci, Bologna

(c) CAIP Bologna e Modena, San Giorgio di Piano, Bologna

(d) Terremerse Soc. Coop., Bagnacavallo, Ravenna

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

RISULTATI PRELIMINARI SULLA DINAMICA DI ACCUMULO DELLE FUMONISINE LIBERE E NASCOSTE IN MAIS DURANTE LA STAGIONE COLTURALE IN RELAZIONE AL CROSS-TALK PIANTA PATOGENO

Giorni P. (a), Gregori R. (a), Dall'Asta C. (b), Cirlini M. (b), Galaverna G. (b), Scala V. (c), Reverberi M. (c), Fanelli C. (c), Battilani P. (a)

(a) *Istituto di Entomologia e Patologia Vegetale, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

(b) *Dipartimento di Chimica Organica ed Industriale, Università di Parma, Parma*

(c) *Dipartimento di Biologia Ambientale, Università di Roma Sapienza, Roma*

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

EFFETTI DEI TRATTAMENTI POST-RACCOLTA SULLA CONTAMINAZIONE DA DON NEI PRODOTTI DI FRUMENTO TENERO BIOLOGICO EUROPEO

Carcea M. (a), Narducci V. (a), Abécassis J. (b), Samson M.F. (b), Thomsen I.K. (c), Celette F. (d), David C. (d), Dubois D. (f), Friedel J.K. (h), Hellou G. (e), Hiltbrunner J. (f), Gunst L. (f), Maeder P. (g), Mayer J. (f), Messmer M. (g), Peigné J. (d), Stolze M. (g), Schweinzer A. (h), Surboeck A. (h)

(a) INRAN, Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione, Roma

(b) INRA, Montpellier, Francia

(c) Aarhus University, Tjele, Danimarca

(d) ISARA, Lione, Francia

(e) ESA, Angers, Francia

(f) ART, Zurigo, Svizzera

(g) FiBL, Zurigo, Svizzera

(h) BOKU, Vienna, Austria

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

SVILUPPI DIAGNOSTICI NELL'ANALISI DELLE MICOTOSSINE

Visconti A.

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

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

THE ROLE OF EU-RL FOR CONTROL ACTIVITY OF MYCOTOXINS

Kunsagi Z.

Food Safety and Quality Unit, Institute for Reference Materials and Measurements, Joint Research Centre, European Commission, Geel, Belgium

The Regulation EC No 882/2004 nominates the Joint Research Centre as the European Union Reference Laboratory (EU-RL) for mycotoxins. It is established at the JRC Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) and works together with appointed National Reference Laboratories (NRLs) of the EU Member States. As result of the implementation of the Treaty of Lisbon, the term Community Reference Laboratory has changed into European Union Reference Laboratory (EU-RL). The EU-RL for mycotoxins aims to facilitate the implementation of European legislation related to monitoring of mycotoxins in food of plant origin and animal feed. The activities of the EU-RL concern all regulated mycotoxins in food and feed and those that are candidates for future regulation, such as T-2 & HT-2 toxin, and ergot alkaloids. The main tasks of the EU-RL for mycotoxins are: organising comparative testing studies with the NRLs, giving training and support to NRLs in analytical methods. Furthermore method development and validation for standardization and support to CEN is an important tasks. The presentation will give an overview of the activities EU-RL with examples. Key issues and drivers in the design and the evaluation of comparative studies (proficiency test as well as validation studies) are discussed.

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

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

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

Il Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, DSPVSA, è stato designato Laboratorio Nazionale di Riferimento per le Micotossine (LNR-Micotossine) dal Ministero della Salute, Autorità Competente in materia di sicurezza alimentare, in ottemperanza al Regolamento CE 882/2004 e, secondo quanto sancito dal Regolamento, copre tutti gli ambiti della normativa in materia di sicurezza alimentare e mangimistica. L'LNR-Micotossine collabora con il Laboratorio Europeo di Riferimento (EU-RL, Joint Research Centre, Geel, Belgio), coordina, nella sfera di competenza, le attività dei laboratori ufficiali, organizza test comparativi tra i laboratori nazionali ufficiali ed opera principalmente con la finalità di formare ed informare le strutture laboratoristiche del territorio nazionale. È inoltre compito dell'LNR-Micotossine lo sviluppo di attività legate alla valutazione del rischio da micotossine derivante dal consumo di alimenti e mangimi. Al fine di garantire prestazioni e risultati di laboratorio qualificati e riconosciuti in ambito nazionale e internazionale, l'LNR-Micotossine è gestito sulla base di una politica della qualità conforme alla norma UNI-CEI-EN-ISO/IEC 17025:2005, ed è accreditato con il n. 0779 da parte di ACCREDIA. Nell'ambito dello sviluppo di attività finalizzate alla diffusione di strumenti diagnostici utili ai fini del controllo ufficiale, l'LNR-Micotossine organizza *Proficiency Testing* (PT) tra i laboratori nazionali ufficiali assicurando un adeguato *follow-up* attraverso la distribuzione di *report* riassuntivi riportanti l'esito del PT e relativa trattazione statistica dei dati. Attraverso l'organizzazione di riunioni annuali con la rete dei laboratori del controllo ufficiale su tematiche di analisi e campionamento e la distribuzione di questionari finalizzati all'ottenimento di informazioni tecniche dai laboratori, l'LNR acquisisce gli elementi per l'organizzazione degli studi di validazione o PT in base alle priorità indicate dagli stessi laboratori. LNR-Micotossine nel biennio 2010-2011 ha organizzato due PT a supporto delle attività analitiche e di controllo qualità dei laboratori del controllo ufficiale: PT 2010, fumonisine in mais (partecipanti: 22 laboratori del Sistema Sanitario Nazionale, SSN, e 15 laboratori circuito degli LNR europei); PT 2011, aflatossine in arachidi e ocratossina A in paprica (21 laboratori SSN). I *report* dei citati PT sono disponibili nell'area riservata del sito web dell'LNR-micotossine (<http://www.iss.it/mico/>). Dietro il coordinamento dell'EU-RL Mycotoxins, il Laboratorio partecipa a *proficiency testing* e studi di validazione organizzati *ad hoc* per il *network* dei laboratori di riferimento. L'attività del 2010-2011 ha previsto la partecipazione a 2 PT (analisi di ocratossina A in farina di cereali, paprica e caffè verde e analisi di aflatossina B1 in alimenti per l'infanzia, farina di mais e mangime) e a uno studio di validazione (metodo in cromatografia liquida e rivelazione fluorimetrica per la determinazione di ocratossina A in alimenti a base di liquerizia). Dal canto suo, al fine di operare in conformità alla norma

UNI CEI EN ISO/IEC 17025 per l'assicurazione della qualità del dato analitico, il Laboratorio partecipa regolarmente ai programmi del FAPAS® (Central Science Laboratory, Sand Hutton, York, UK) per tutti i metodi accreditati. Il team del LNR ha predisposto una pagina web (<http://www.iss.it/mico/>) di interesse su temi di sicurezza di alimenti e mangimi e attività dell'LNR che contiene una area riservata dedicata alle strutture del Sistema Sanitario Nazionale dove sono accessibili informazioni sulla legislazione nazionale ed europea, documenti ufficiali, metodi, *report* di PT e pubblicazioni varie.

APTAMERI A DNA: MATERIALI INNOVATIVI PER L'ANALISI DI MICOTOSSINE

De Girolamo A., Schena R., Visconti A.

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

L'elevata specificità di riconoscimento nei confronti delle micotossine rende gli anticorpi la principale classe di molecole leganti impiegate 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 nuovi leganti sintetici da utilizzare in alternativa agli anticorpi. Tra questi rientrano 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 ed affinità la molecola bersaglio. Recentemente sono stati riportati aptameri a DNA specifici per Ocratossina A (OTA), fumonisin B₁ e aflatoxina B₁. In particolare, l'aptamero specifico per OTA è stato impiegato in numerosi metodi di analisi di OTA, tuttavia solo alcuni di questi sono stati applicati all'analisi di matrici alimentari, ed in particolare all'analisi di OTA nei cereali. Presso i laboratori dell'ISPA-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 HPLC/FLD per la determinazione di OTA in estratti di frumento. Le prestazioni analitiche (precisione e recupero) del metodo rientrano nei criteri di accettabilità previsti dal Regolamento EU 401/2006. Inoltre, l'analisi comparativa di oltre 30 campioni di frumento naturalmente contaminati con OTA ha mostrato una buona correlazione ($r=0,990$) tra il metodo proposto e quello di riferimento che impiega colonnine ad immunoaffinità e HPLC/FLD. Recentemente, le colonnine aptameriche sono state ulteriormente ottimizzate ed integrate in un sistema diagnostico innovativo che impiega la fluorescenza risolta nel tempo per la determinazione di OTA in campioni di frumento, previa reazione con una soluzione fluorescente contenente terbio e aptamero. I tempi ridotti di analisi e l'uso di un lettore di piastre multipozzetto per la rivelazione finale della micotossina rendono tale metodo idoneo all'analisi parallela di numerosi campioni di frumento. Il metodo ha mostrato buone prestazioni analitiche in termini di precisione e recupero. L'affidabilità del metodo è stata inoltre dimostrata mediante analisi di materiale di riferimento di frumento naturalmente contaminato con OTA. I risultati ottenuti dimostrano che gli aptameri rappresentano una valida alternativa all'utilizzo degli anticorpi per l'analisi delle micotossine in prodotti alimentari.

SVILUPPO DI BIOSENSORI PER LA DETERMINAZIONE DI MICOTOSSINE

Spinella K., Vitali F., Mosiello L.

ENEA, Laboratorio UTAGRI INN, Centro della Casaccia, S. Maria di Galeria, Roma

I biosensori sono dispositivi analitici in grado di convertire un'attività biologica in un segnale (elettrico, ottico o acustico) misurabile, mediante la stretta integrazione di un elemento biologico sensibile con un sistema strumentale di trasduzione, acquisizione e analisi dei dati. Tali dispositivi sfruttano le caratteristiche di specificità, affinità e reattività di molte molecole biologiche naturali (anticorpi, enzimi, DNA) di legare selettivamente le specifiche molecole d'interesse e rappresentano da tempo una valida alternativa ai sistemi analitici convenzionali per l'identificazione ed il monitoraggio delle micotossine. Gli anticorpi policlonali o monoclonali rappresentano le molecole di affinità maggiormente utilizzate per la messa a punto di biosensori per le MTXs, ma grande attenzione viene recentemente dedicata al possibile utilizzo di molecole di affinità alternative agli anticorpi, come ad esempio gli aptameri. Gli aptameri, sviluppati mediante una procedura di selezione *in vitro* denominata SELEX sono oligonucleotidi di DNA *Single Strand* o di RNA di 15-60 paia di basi che legano con alta affinità le molecole *target*. Al fine di valutare la possibilità di sviluppare biosensori che utilizzano aptameri per le MTXs ed in collaborazione con il Prof. Tibor Hianik (Università Comenius, Bratislava) aptameri di DNA tiolati specifici per l'Ocratossina A (OTA) sono stati associati a due differenti sistemi di trasduzione e di misura. In una prima applicazione gli aptameri specifici per l'OTA sono stati immobilizzati mediante chemiassorbimento alla superficie di un elettrodo d'oro ed è stata misurata la Spettroscopia di impedenza elettrochimica (EIS), con la seguente modalità: una sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$ è stata utilizzata per la determinazione della resistenza al trasferimento di carica, (Rct), seguita dall'aggiunta di OTA. L'aumento di Rct si è rivelato direttamente proporzionale all'aumento della concentrazione di OTA nell'intervallo 0,1-100 nM [1]. È stato inoltre sviluppato un secondo biosensore per l'OTA basato sul metodo TSM (*thickness shear mode acoustic method*) utilizzando sempre DNA aptameri specifici per l'OTA biotinilati e immobilizzati sulla superficie di un cristallo di quarzo ed impiegando come trasduttore di segnale un sistema QCM (*Quartz Crystal Microbalance*), per il quale è stato dimostrato un limite di sensibilità di dosaggio di 200 nM.

METODO LC-MS/MS PER LA VALUTAZIONE RESIDUALE DI OCRATOSSINA A (OTA) E DEL SUO METABOLITA OCRATOSSINA A (OTA) NEI TESSUTI ANIMALI

Bibi R., Paoloni A., Fragassi A., Pecorelli I.

Laboratorio Contaminanti Ambientali, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

La presenza di Ocratoossina A (OTA) in campioni di tessuti ed organi di animali destinati al consumo umano può rappresentare un grave pericolo per il consumatore a causa delle sue riconosciute proprietà cancerogene, nefrotossiche, teratogene, immunotossiche e neurotossiche. Nonostante sia noto dalla letteratura che l'OTA possa contaminare i tessuti di animali monogastrici, quali suini e pollame, non esistono dati esaustivi sulla sua diffusione e sul suo metabolismo. Anche in relazione a quanto riportato in un parere del 2006 dall'EFSA è necessario acquisire ulteriori dati sulla presenza di OTA nei tessuti animali. A tale scopo è stato messo a punto e validato un metodo per la contemporanea determinazione di OTA e del suo metabolita OT α nei tessuti e organi (fegato, rene, muscolo) e nelle uova. Il metodo analitico consente la determinazione di OTA e di OT α a livelli uguali o superiori, rispettivamente, a 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (LOQ) e 2,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (LOQ), mediante purificazione con SPE e rilevazione in spettrometria di massa *tandem* triplo quadrupolo accoppiata alla cromatografia liquida (LC-MS/MS). Il metodo è stato utilizzato per verificare il *carry over* dell'OTA e dell'OT α nei tessuti di pollame. A tale scopo sono stati allevati due gruppi di polli da carne e due gruppi di galline ovaiole, alimentati entrambi, rispettivamente con una dieta contenete 0,005 mg/kg e 1,0 mg/kg di OTA al fine di simulare un'alimentazione a bassi e alti livelli di contaminazione. Ad intervalli regolari (t=0; t=15; t=30 e t=45 giorni) un certo numero di polli da carne (n=5) è stato sacrificato e gli organi sono stati espianati per effettuare le analisi. Analogamente, per le galline ovaiole, ad intervalli regolari (t=0; t=30; t=60; t=90 e t=120 giorni) un certo numero di animali (n=5) è stato sacrificato e gli organi sono stati espianati per effettuare le determinazioni analitiche. Durante tutte le fasi dell'allevamento, inoltre, sono stati prelevati un certo numero di uova (n=20 per periodo) con la medesima finalità analitica. Tutti i campioni di tessuto al tempo t=0 sono risultati negativi, permettendo di escludere qualsiasi pregressa contaminazione. Parimenti tutti i tessuti e le uova degli animali alimentati con mangime contaminato a 0,005 mg/g sono risultati negativi. Diversa è la situazione per ciò che concerne gli animali alimentati con mangime contaminato a 1,0 mg/g. In questo secondo caso non si sono evidenziate significative contaminazioni per le uova e i muscoli contrariamente al fegato e al rene dove si è rilevata la presenza di OTA e OT α al di sopra del LOQ. In entrambe le sperimentazioni, nei gruppi di animali trattati con il dosaggio superiore (1,0 mg/g di OTA nel mangime), la contaminazione raggiungeva un massimo nelle prime fasi di allevamento per poi decrescere progressivamente. Tale comportamento, evidenziatosi in animali profondamente differenti per destino e fase di ciclo produttivo, indica la possibilità che si instaurino processi di detossificazione dei quali sarebbe

interessante approfondire la presenza anche in specie differenti, quali il suino. I dati prodotti, inoltre, potranno servire da supporto al legislatore per l'individuazione di eventuali tenori massimi negli alimenti di origine animale.

MONILIFORMINA NEL MAIS: SVILUPPO DI UNA METODICA HPLC-MS/MS E PRIME INDAGINI SULLA DIFFUSIONE NEL QUADRIENNIO 2008-2011 IN PIEMONTE

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

Dipartimento di Agronomia, Selvicoltura e Gestione del Territorio, Università degli Studi, Grugliasco, Torino

La Moniliformina (MON) o acido 3-idrossiciclobut-3-ene-1,2-dione è una micotossina prodotta sui cereali da diverse specie di *Fusarium* e in particolare di *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. thapsinum* e *F. avenaceum*. Attualmente, dal punto di vista legislativo non sono stati definiti tenori massimi raccomandati per questa micotossina ma è in corso la richiesta di pareri all'EFSA sui rischi sanitari per gli esseri umani e gli animali relativi alla sua presenza in alimenti e mangimi. 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 indagare la diffusione nei nostri areali cerealicoli. A tal fine è stata messa a punto una metodica HPLC-MS/MS mediante strumentazione Varian 212-LC Chromatography Pump (Colonna: Merck, SeQuant, ZIC[®]-HILIC 100×2,1 mm, 3,5 µm, 100 Å)/ProStar 410 AutoSampler/310-MS TQ Mass Spectrometer. L'estrazione è stata eseguita utilizzando una miscela di aceto nitrile: acqua 84:16 (v/v) e la purificazione è stata condotta mediante l'impiego delle colonne di *clean-up* Mycosep[®] 240 Mon (Romer Labs[®]). 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). 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. I valori di recupero ottenuti per gli estratti di mais a quattro diversi livelli di concentrazione (3,72 µg/kg - 37,2 µg/kg - 372 µg/kg - 3.720 µg/kg) sono variati tra il 75 e il 91% (RSD% 3-19%). I valori dei limiti di rivelazione e quantificazione sono stati rispettivamente 0,93 µg/kg e 3,72 µg/kg. Nel quadriennio 2008-2011 sono stati analizzati con la metodica descritta complessivamente 76 campioni di granella di mais prelevati alla raccolta in provincia di Torino. La concentrazione di moniliformina è risultata in media pari a 1.067 µg/kg nel 2008 (*range*: 31-2401 µg/kg), 105 µg/kg nel 2009 (*range*: nd-484 µg/kg), 361 µg/kg nel 2010 (*range*: 65-899 µg/kg) e 75 µg/kg nel 2011 (*range*: nd-409 µg/kg). La percentuale di campioni positivi per ciascun anno è risultata variabile tra l'86 e il 100%, evidenziando una presenza diffusa di questa micotossina nel mais coltivato nell'areale preso in considerazione.

MICOTOSSINE MASCHERATE NEL GRANO DURO: PRESENZA, SIGNIFICATO E DESTINO METABOLICO

Galaverna G., Dall'Asta C., Tonelli A., Dall'Erta A., Dossena A.
Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università degli Studi, Parma

Studi recenti hanno dimostrato che, nelle derrate alimentari contaminate da micotossine, insieme alle forme native delle micotossine possono essere presenti composti strutturalmente correlati generati dal metabolismo della pianta. Questi derivati (micotossine coniugate o “mascherate”) mostrano un comportamento chimico differente, così da non essere identificate dai comuni metodi di analisi, anche se possono contribuire alla tossicità globale, esercitando una propria azione tossica o rilasciando la forma nativa della micotossina durante la digestione gastrointestinale. Questo fenomeno peculiare è legato in particolare alle micotossine prodotte da *Fusarium* (tricoteceni, zearalenone) ed è stato attribuito a meccanismi di detossificazione messi in atto dalla pianta per convertire i relativamente apolari tricoteceni e zearalenone in derivati più polari attraverso la coniugazione con zuccheri o gruppi solfato, al fine di compartimentalizzarli nei vacuoli, potenziando così la resistenza della pianta all'infezione. Zearalenone-4-glucoside e deossinivalenolo-3-glucoside sono stati identificati in frumento naturalmente contaminato da *F. graminearum* in quantità fino al 30% rispetto alla forma nativa. La fusariosi è attualmente la più importante patologia che colpisce la coltivazione del grano duro con importanti conseguenze sia per il mercato dei prodotti derivati sia per la salute del consumatore. La presenza di queste forme mascherate in più di 150 campioni di grano duro italiano è stata studiata mediante analisi LC/MS, prendendo in considerazione l'effetto di diversi fattori e della genetica delle diverse linee studiate sull'accumulo di micotossina, su piante contaminate naturalmente e artificialmente, per cercare di evidenziare un'eventuale correlazione con la resistenza alla patologia. È stata, inoltre, studiata la stabilità di queste forme mascherate alle condizioni di processo e alla digestione gastrointestinale simulata così come è stata valutata la tossicità verso alcune linee cellulari modello. Inoltre, esperimenti di *docking* molecolare in silico sono stati realizzati per chiarire alcuni aspetti di tipo tossicologico.

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

Danieli P.P. (a), Bellincontro A. (b), Chiavaioli A. (a), Pietri A. (c), Bertuzzi T. (c), Mencarelli F. (b), Bernabucci U. (a), Ronchi B. (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 Agraria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza*

In prospettiva dell'entrata in vigore dei limiti regolamentari per alcune micotossine negli alimenti zootecnici (e.g., ocratossina A, deossinivalenolo, tossina T-2), lo sviluppo di metodi speditivi per lo *screening* è un tema di ricerca di notevole interesse pratico-applicativo. L'obiettivo di tale contributo, pertanto, è stato lo sviluppo di modelli predittivi basati su acquisizioni spettrali di tipo *Near Infrared Reflectance* (NIR) per lo *screening* della contaminazione da fusariotossine nei sottoprodotti della molitura del frumento. In totale, 89 campioni di cruscame di grano tenero e duro (crusca, tritello e farinaccio), di varia provenienza, sono stati sottoposti ad acquisizione spettrale (per interattanza) mediante un sistema portatile NIR-AOTF (*Acousto Optical Tunable Filter*). Previo trattamento statistico e trasformazione, i dati spettrali NIR sono stati utilizzati per lo sviluppo di modelli calibrativi di regressione *Partial Least Square* (PLS). Per la calibrazione è stato impiegato un set di dati analitici ottenuti con metodo cromatografico (SPE/GC-MS) e relativi alla presenza nei campioni in studio di Deossinivalenolo (DON) (media \pm d.s.: 1.141 \pm 1.254 μ g/kg) e di tricoteceni totali (DON e altri tricoteceni del gruppo B: 1.258 \pm 1.326 μ g/kg). La validazione dei modelli NIR è stata condotta con il metodo *Internal Full Cross Validation*. In termini generali, l'ordinamento preliminare dei dati spettrali mediante *Principal Component Analysis* (PCA), ha suggerito di sviluppare calibrazioni senza distinzione tra i due tipi di grano o tra le categorie merceologiche. Il modello così sviluppato per il DON, ha restituito in calibrazione valori di R^2 ed errore standard (SEC) pari a 0,85 e 481 μ gDON/kg, rispettivamente. In predizione l' R^2 è risultato pari a 0,75 con un errore standard (SECV) di 623 μ gDON/kg. Risultati simili, sono stati ottenuti per il modello predittivo dedicato ai tricoteceni totali (R^2 pari a 0,85 in calibrazione e SEC pari a 518 μ g/kg; R^2 pari a 0,75 in predizione e SECV pari a 669 μ g/kg). Per confermare l'utilità applicativa della modellistica NIR sviluppata, l'incertezza di predizione è stata valutata alla luce delle performance di metodo prescritte dalla vigente normativa di settore. I risultati preliminari ottenuti, consentono di ravvisare nella tecnica NIR un potenziale predittivo utile per lo *screening* sistematico delle contaminazioni da tricoteceni in cruscami di frumento destinati all'alimentazione animale.

DETERMINAZIONE DI ZEARALENONE E SUOI METABOLITI IN CAMPIONI DI FLUIDI BIOLOGICI

Brera C., Pastorelli A., Fiori M., Stacchini P., De Santis B., Debegnach F., Gregori E.
*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di
Sanità, Roma*

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. È stato dimostrato, inoltre, che i metaboliti principali sono alfa-zearalenolo, il beta-zearalenolo, l'alfa-zearalanolo, il beta-zearalanolo (conosciuti rispettivamente come zeranolo e taleranolo) e infine lo zearalanone. Lo ZEA e i suoi metaboliti esibiscono un'attività estrogenica e anabolizzante (alfa-zearalanolo) in alcune specie animali e sono stati indicati come possibili cause di modificazioni puberali precoci (telarca) nei bambini. 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 per la determinazione simultanea dello zearalenone e dei suoi metaboliti in urine animali e umane. La validazione è stata condotta, utilizzando il software InterVal Plus, con l'approccio statistico alternativo proposto dalla Decisione 657/2002/CE ed è stata effettuata in conformità a quanto stabilito dalla normativa comunitaria. È in corso l'estensione del campo di applicazione ad altre matrici alimentari e biologiche sia animali che umane, come muscolo e siero/plasma.

IL CAMPIONAMENTO: QUALE STRATEGIA AZIENDALE PER UNA EFFICACE AZIONE DI CONTROLLO DELLE PRODUZIONI?

Monti M.

ANTIM, Associazione Nazionale Tecnici Industria Molitoria, Bologna

I clienti utilizzatori e trasformatori di farine, indipendentemente dal tipo di impiego, richiedono ai molini un prodotto capace di soddisfare specifiche tecniche predefinite, ai massimi livelli igienico sanitari dettagliati nei capitolati, costante nel tempo e nelle differenti forniture, il tutto consegnato con puntualità. Tutti i molini operano per soddisfare queste richieste e pertanto il campionamento, omogeneizzazione e analisi del grano in arrivo al molino, e della farina che va in consegna, sono operazioni necessarie per poter esercitare un controllo efficace delle produzioni. La rappresentatività del campione che si sottopone ad analisi, il fatto che questo sia il più identificativo possibile del lotto che rappresenta, è la principale problematica da superare. Prenderò in esame i punti dove è possibile campionare all'interno di un molino, come farlo, dettagliando problematiche e possibilità, sia per quanto riguarda il grano in ingresso che la farina in stoccaggio e in uscita. Il campionamento dei prodotti è il mezzo per poter effettuare una efficace azione di controllo delle produzioni, ed è condizione necessaria ma non sufficiente per rispondere alle richieste dei clienti di farina precedentemente descritte. Occorre inserirlo in un contesto che preveda un'efficace analisi del rischio della materia prima in ingresso, un'accurata selezione dei fornitori, e un'attenta verifica prima degli scarichi, perché non è possibile, e nemmeno pensabile, effettuare analisi igienico sanitarie specifiche su tutti gli arrivi di grano al molino, ma è fondamentale effettuare un numero di analisi sufficienti per avere buona visione delle caratteristiche igienico sanitarie dei grani che si utilizzano. Per quanto riguarda le farine, occorre pensare alle miscele di grani mirando a obiettivi igienico sanitari non numericamente superiori alla metà di quelli da garantire e indicati nei capitolati: solo così la presa visione di risultati superiori alle attese, lascerà tempo e possibilità per le azioni correttive senza incorrere in pericolosi fuori standard. Questa misura consentirà altresì di superare i limiti di campionamento e le differenze analitiche fra laboratori accreditati sulla stessa analisi di due aliquote di prodotto prese da soggetti diversi in momenti diversi. Discorso del tutto simile per quanto riguarda le caratteristiche tecnologiche: mirare a obiettivi intermedi negli standard dettagliati nei capitolati, metterà al riparo da differenze analitiche di laboratori differenti. L'assenza e/o il contenimento su valori accettabili di non conformità tecnologiche e igienico sanitarie, sono lo strumento oggettivo per valutare l'efficienza delle misure intraprese per le azioni di controllo sulle produzioni che si immettono sul mercato.

ASPETTI PRATICI LEGATI AD UNA CORRETTA ESECUZIONE DELLE PROCEDURE DI CAMPIONAMENTO

Brera C., Debegnach F., Pannunzi E., Gregori E., Prantera E., De Santis B.
*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di
Sanità, Roma*

La contaminazione da micotossine negli alimenti e mangimi è riconosciuta sia in ambito scientifico sia legislativo come prioritaria in termini di sicurezza alimentare. 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 vengono definiti dalla Commissione Europea. Le autorità competenti, nell'ambito delle attività ufficiali di controllo in materia di alimenti, garantiscono l'attendibilità dei controlli delle conformità ai tenori massimi, adottando regolamenti specifici riguardanti le modalità di campionamento anche per assicurare che in tutta la Comunità siano adottati gli stessi criteri. 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, nonché infine nelle attività di autocontrollo per assicurare la massima aderenza delle transazioni tra gli operatori della filiera ai contratti di compravendita delle *commodities*. La necessità di adottare piani di campionamento *ad hoc* nasce dalla natura estremamente eterogenea della contaminazione delle micotossine in una derrata alimentare, che obbliga a 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, 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 sia di grandi dimensioni, siano mantenute in modo accurato nel campione globale prelevato. Nel caso delle micotossine, il campionamento casuale semplice o quello sistematico sono senz'altro quelli più adatti allo scopo. Entrambi possono essere effettuati in condizioni statiche o dinamiche. Il campionamento statico prevede prelievi in punti diversi di una massa costituente il lotto/partita con l'ausilio di opportune sonde. Il campionamento dinamico, invece, prevede prelievi a tempi diversi di una massa in movimento (manualmente o con campionatori automatici). Le componenti che implicano la maggiore variabilità in termini di attendibilità dei risultati analitici sono la varianza legata alla distribuzione della concentrazione della micotossina, la natura fisica del lotto da campionare, i siti di campionamento, le strutture dedicate alla effettuazione del campionamento e soprattutto la formazione del personale addetto alle procedure.

RIPARTIZIONE DELLA CONTAMINAZIONE DA AFLATOSSINE E FUMONISINE NELLA PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Brera C., Pannunzi E., Montepeloso E., Soricelli S., Debegnach F., Gregori E., Prantera E., De Santis B.

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

Il Regolamento comunitario n. 401/2006 stabilisce le metodiche di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. In particolare, per partite di cereali e prodotti derivati con peso iniziale uguale o superiore alle 30 tonnellate, è previsto che il campione globale abbia un peso di 10 kg. Questo garantisce che il sottocampionamento generi una partita la cui contaminazione da micotossine sia rappresentativa dell'intero lotto. Tuttavia l'analisi di laboratorio è successivamente eseguita su una piccola aliquota (generalmente dai 25 ai 50 gr.) del campione globale. Pertanto è necessario che questa sia a sua volta rappresentativa della contaminazione del *bulk*. È noto come le fumonisine e soprattutto le aflatoSSine siano distribuite in modo eterogeneo all'interno di una partita anche se di grado differente. In entrambi i casi, comunque, la eterogeneità della distribuzione, richiede che tutta la "filiera analitica" dal prelievo dei campioni incrementali, alla formazione del campione globale ed alla preparazione dell'aliquota test, sia caratterizzata dalla massima rappresentatività. Pertanto, per la formazione della aliquota test è necessario ricorrere ad una rigorosa omogeneizzazione del campione globale che può essere eseguita mediante o la macinazione o la miscelazione con acqua (*slurry*). L'efficacia dell'omogeneizzazione tramite macinazione è strettamente correlata alla granulometria del campione. Tale connessione è stata evidenziata, in termini di precisione e accuratezza, mediante l'analisi dell'aflatossina e della fumonisina in diversi sottocampioni formati a partire da un campione globale da 10 kg di mais in granella. Lo studio è stato condotto prelevando dal *bulk* in granella 10 sottocampioni da 25 g ciascuno. Il restante campione globale è stato successivamente macinato a due diverse granulometrie. Da ciascuno dei due materiali così ottenuti sono stati prelevati ulteriori 10 sottocampioni da 25 g. Il campione globale residuo è stato sottoposto a *slurry* e da questo sono state prelevate 10 aliquote da 50 g. Su ciascun sottocampione è stata eseguita una analisi quantitativa applicando un metodo multi-micotossina con rivelazione in UPLC-MS/MS. I risultati ottenuti hanno evidenziato, in modo più significativo per le aflatoSSine rispetto alle fumonisine, una diversificazione della variabilità delle concentrazioni delle micotossine esaminate strettamente dipendente dalle diverse granulometrie dei campioni da cui si preleva.

DIFFICOLTÀ, LIMITI E CRITICITÀ, CONNESSE CON L'ESECUZIONE DEI CAMPIONAMENTI PER RICERCA MICOTOSSINE IN *FEED* IMPORTATI

Gandini G. (a), Fadda P. (b), Peppi O. (b), Anichini L. (b)

(a) *UVAC Veneto ex DGSA Ministero della Salute Italia, Verona*

(b) *PIF Bologna ex DGSA Ministero della Salute Italia, Bologna*

La sicurezza dei mangimi deve essere garantita lungo l'intera filiera alimentare a partire dalla produzione primaria fino alla somministrazione agli animali destinati alla produzione di alimenti. È opportuno che i pericoli presenti a livello della produzione primaria, siano adeguatamente identificati e controllati al momento dell'importazione di materie prime destinate agli animali al fine di assicurare un elevato livello di protezione della salute umana e animale che rimane uno degli obiettivi fondamentali della legislazione comunitaria. Il porto di Ravenna, per la sua collocazione e la sua storia commerciale legata a importanti gruppi industriali del settore mangimistico e delle materie prime utilizzate a tale scopo, ha assunto nel tempo, anche grazie alla globalizzazione dei mercati, un ruolo di primo piano per l'intero comparto commerciale-produttivo. Il campionamento di tali matrici, eseguito all'atto della importazione da parte del personale del PIF, deve essere eseguito in modo tale da non inficiarne la validità giuridico-analitica. Vi sono diversi fattori che condizionano il campionamento che possono avere, fatto salvo il diritto degli operatori a richiedere comunque un ulteriore parere di esperti, come previsto dal Regolamento CE 882/2004, ricadute dirette sulla validità dello stesso così riassumibili:

- risorse- umane, materiali (attrezzature e strumenti) e economiche;
- situazione ambientale-luogo e territorio, clima, sicurezza e difficoltà accesso sito campionamento;
- modalità di scarico nave-continuo/discontinuo, mezzi scarico, cambio stive;
- personale- formazione e addestramento, mezzi di protezione individuale, preparazione, conservazione e trasporto.

L'esperienza acquisita negli anni dal PIF porto di Ravenna, connessa con il prelievo di campioni per il controllo ufficiale di alimenti per animali su grandi partite alla rinfusa, in ottemperanza a quanto disposto dal Regolamento CE 152/2009, ci da modo di evidenziare e portare all'attenzione degli interessati i limiti e le criticità correlate con le diverse fasi del campionamento tra le quali vanno annoverate:

- l'uso in contemporanea di benne e tramogge per lo scarico;
- il cambio di stiva per il bilanciamento e assetto della nave;
- l'interruzione dello scarico per cause contingenti;
- lo scarico in continuo senza sosta;
- i tempi prolungati di scarico legati alle quantità e modalità di scarico.

L'utilizzo di dispositivi meccanici (campionatore automatico), sulla base della nostra esperienza, ci permette di affermare che i limiti e le criticità sopra descritte vengono sensibilmente ridotti.

Poster

P1 FERTILIZZAZIONE MICROBICA DEL MAIS E PRESENZA DI MICOTOSSINE (PROGETTO AMICO)

Berardo N., Lanzanova C., Panza L., Valoti P., Mazzinelli G., Bossi A., Carrara M., Balconi C.
Unità di Ricerca per la Maiscoltura, CRA-MAC, Bergamo

I funghi Micorrizici Arbuscolari (MA), sono associazioni simbiotiche mutualistiche che si stabiliscono tra piante e funghi del suolo (*glomeromycota*). Le MA possono portare a diversi benefici per la pianta ospite, in particolare favorendo l'assorbimento di fosforo, aumentando la resistenza delle piante agli insetti e ai patogeni; la resistenza allo stress idrico e al contenuto eccessivo di sali. I funghi micorrizici inoltre, influenzano la struttura del suolo sia per l'apporto di biomassa delle ife fungine sia per l'effetto della *glomalina*, una proteina prodotta dai funghi stessi, che sembra avere un ruolo molto importante nella resistenza degli aggregati del suolo alla dispersione. Oltre ai funghi micorrizici, nel suolo sono presenti moltissimi altri microrganismi, che presiedono a numerose reazioni fondamentali per la vita delle piante influenzandone la capacità metabolica e quindi la fertilità. Gli inoculi microbici possono anche essere utilizzati come metodi alternativi per controllare alcune patologie delle piante e per ripristinare suoli degradati o contaminati. A fronte dei numerosi studi scientifici sui benefici potenziali apportati ai sistemi agricoli dagli inoculi microbici, la produzione di inoculi commerciali e la loro diffusione a colture di pieno campo, sono stati finora modesti e l'impatto della micorizzazione e dei biofertilizzanti microbici appare limitato alle coltivazioni biologiche e alle specie aromatiche. La tematica di ricerca affrontata nel Progetto AMICO consiste nell'utilizzo del consorzio microbico micorrizzato (Micosat F[®] CCS-Aosta) in sistemi foraggero-zootecnici al fine di:

- valutare in ambienti differenti per caratteristiche pedoclimatiche e culturali l'inoculo microbico utilizzato sulla produzione e composizione chimica del mais;
- valutare il valore nutritivo e il livello di accettabilità da parte degli animali degli effetti dell'inoculo utilizzato;
- misurare gli effetti dell'alimentazione micorrizzata sulla qualità aromatico-sensoriale e chimico-nutrizionale delle produzioni zootecniche.

All'interno del Progetto AMICO il CRA MAC si è occupato della scelta degli ibridi più idonei per le prove di micorizzazione su mais da granella e trinciato. Per la granella sono stati scelti gli ibridi PR32G44 (FAO 600), NK FAMOSO (FAO 500) e KERMESS (FAO 600), rispettivamente con media, alta e più bassa tolleranza allo stress idrico. Per il trinciato, gli ibridi scelti, tutti di classe FAO 700, sono stati P2023, NK ARMA e DKC6795, di cui non si hanno informazioni circa il loro comportamento in condizioni di stress idrico. La prova è stata condotta adottando uno schema sperimentale fattoriale *split/split/plot* con quattro ripetizioni, dove nella parcella principale è stato posto il fattore Regime Irriguo (irrigazione normale e stress idrico), nella sub-parcella il fattore Micorizzazione (trattato e non trattato) e nella sub-sub-parcella l'Ibrido. Verranno presentati i risultati preliminari relativi alle indagini condotte nel corso della campagna maidicola 2011.

La ricerca si è svolta nell'ambito del progetto AMICO SOSZOO finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali (Mipaaf).

P2 PROGETTO MICOPRINCEM: MICOTOSSINE NELLA CEREALICOLTURA ITALIANA

Berardo N., Lanzanova C., Torri A., Facchinetti F., Laganà P., Locatelli S., Mascheroni S., Balconi C.

Unità di Ricerca per la Maiscoltura, CRA-MAC, Bergamo

Le micotossine che si riscontrano con maggiore frequenza nella granella di mais sono: aflatossine prodotte da *Aspergillus flavus* e *parasiticus* e fumonisine prodotte da *Fusarium verticillioides*; 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. In questo ambito, il monitoraggio delle produzioni maidicole italiane, riguardo la contaminazione da micotossine riveste quindi un ruolo di notevole importanza. Numerosi paesi infatti hanno proposto da anni regolamentazioni per il controllo delle micotossine nei cibi e nei prodotti alimentari. Presso CRA-MAC, azioni di monitoraggio sono state condotte all'interno del progetto MICOCER (2006-2008) che aveva lo scopo di valutare e controllare la contaminazione di micotossine nelle produzioni cerealicole italiane. Questa indagine trova continuità nell'ambito del progetto MICOPRINCEM (2011-2013), dove la nostra Unità di Ricerca si è proposta di effettuare un monitoraggio su larga scala su campioni aziendali inseriti nella "rete di sperimentazione *on farm*", estesa a livello nazionale con 70 siti seminati con gli ibridi commerciali più diffusi. In aggiunta vengono monitorate partite commerciali provenienti da numerosi impianti di essiccazione-stoccaggio dove l'accumulo di tossine in post raccolta può essere importante. Al fine valutare la variabilità genetica disponibile ed 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*).

Gli obiettivi del progetto sono quindi:

- definire e validare metodiche analitiche utili per la determinazione di micotossine nei cereali;
- individuare materiali resistenti alla fusariosi con ridotto accumulo di micotossine;
- valutare l'incidenza delle principali micotossine nelle fasi di stoccaggio e conservazione del mais.

Verranno presentati i risultati preliminari relativi alle indagini condotte nel corso della campagna maidicola 2011.

La ricerca si è svolta nell'ambito del progetto di ricerca MICOPRINCEM, finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali (Mipaaf).

P3 I RISCHI EMERGENTI: PRESENZA DI OCRATOSSINA A IN ALIMENTI “NON CONVENZIONALI”

Biancardi A., Aimo C., Cremaschini L., Piro R.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia

L'Ocratossina A (OTA) è una micotossina nefrotossica prodotta da specie tossinogene dei generi *Aspergillus* e *Penicillium*. 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 fonte di esposizione (circa 25%). È stato condotto uno studio di monitoraggio per valutare la presenza di OTA in caffè, vino e aceto. Per i campioni di vino è stato usato un metodo IAC-HPLC normato [OIV- Ed. 2009 (MA-E-AS315-10-OCHRAT)]. 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. La concentrazione minima rilevabile del metodo è 0,02 µg/kg per vino e aceto, mentre è 1 µg/kg per il caffè. La normativa vigente (Regolamento CE 1881/2006) stabilisce tenori massimi di OTA pari a 2 µg/kg per il vino, 5 µg/kg per il caffè torrefatto e 10 µg/kg per il caffè solubile. Per la matrice aceto non è previsto alcun limite di legge. Per quanto riguarda i campioni di caffè esaminati (n=104), il 95% è negativo ovvero <1 µg/kg. Il restante 5% è risultato >1 µg/kg; i valori riscontrati vanno da un minimo di 2,45 µg/kg ad un massimo di 6,35 µg/kg (un solo valore è risultato superiore al limite di 5 µg/kg). 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 che comportano una significativa riduzione del tenore di OTA eventualmente presente nelle materie prime. Per quanto riguarda i campioni di vino esaminati (n=122), l'84% è <0,02 µg/kg, mentre nel restante 16% è stata riscontrata la presenza di OTA tra 0,02 µg/kg e 1,5 µg/kg con un massimo di incidenza dell'8% nell'intervallo 0,021÷0,10 µg/kg. I vini rossi sono risultati più contaminati dei bianchi, e comunque tutti al di sotto del limite di tolleranza. 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/kg). Al contrario, solo il 10% dei campioni di aceto (non balsamico, balsamico e balsamico tradizionale per un totale di n=100) è risultato negativo ovvero <0,02 µg/kg. Nel 90% dei campioni è stata riscontrata la presenza di OTA tra 0,02 µg/kg e 2 µg/kg con un massimo di incidenza del 40% nell'intervallo 0,11÷0,50 µg/kg. 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.

P4 MONITORAGGIO DELLE CONTAMINAZIONI DI DON NEL FRUMENTO MEDIANTE UN NUOVO TEST RAPIDO QUANTITATIVO

Bianco E. (a), Diana F. (b), Paoluzzi E. (b), Rosar G. (b), Marzari R. (a)

(a) *Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi, Trieste*

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

La disponibilità di metodi di *screening* per la determinazione quantitativa del Deossinivalenolo (DON) nelle materie prime cerealicole è di fondamentale importanza al fine di monitorare la presenza di tale tossina, garantendo al consumatore di poterne limitare l'esposizione entro i limiti di concentrazione fissati dalla legislazione. Diversi metodi sono già impiegati dalle aziende del settore per il monitoraggio delle contaminazioni da micotossine e, in particolare, nel caso del frumento, delle contaminazioni da DON. Tra i metodi rapidi, il *Lateral Flow ImmunoAssay* (LFIA), si sta rapidamente diffondendo per le caratteristiche di rapidità e semplicità d'uso. D'altra parte, è anche noto che il LFIA non garantisce sempre la ripetibilità e riproducibilità proprie dei kit ELISA. Per tale motivo sono state studiate le caratteristiche di un prototipo di test quantitativo basato su tecnologia LFIA. In particolare, le *performance* sono state valutate su campioni di frumento tenero integrale (*Triticum aestivum*), un cereale significativamente affetto da attacchi di fusariosi responsabili della produzione di tossina. Il test è quantitativo nel *range* 125-5.000 µg/kg. La preparazione del campione prevede l'estrazione in acqua, la filtrazione e la diluizione in tampone. Il saggio si svolge in soli 5 minuti. Un lettore densitometrico permette poi di misurare in modo obiettivo il risultato. L'analisi di campioni di frumento tenero integrale con tenore di deossinivalenolo inferiore a 50 µg/kg ha permesso di constatare l'assenza di effetto matrice, pertanto non si è reso necessario adottare alcun *cut-off*. L'analisi di una serie di bianchi addizionati ha permesso di stabilire il limite di quantificazione a 250 µg/kg. L'accuratezza è stata valutata mediante addizionamento di bianchi a 500, 1.000, 1.500 e 2.000 µg/kg di DON. Il recupero medio è stato 98±12% su un totale di 20 determinazioni. L'analisi di un campione di riferimento naturalmente contaminato ha evidenziato un recupero medio del 102±24%. Il nuovo saggio si presenta quindi sufficientemente sensibile e preciso per i fini di monitoraggio delle contaminazioni di DON nel frumento.

PS VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE DELLA POPOLAZIONE ITALIANA AL DEOSSINIVALENOLO DERIVANTE DAL CONSUMO DI PASTE ALIMENTARI

Brera C., Bertazzoni V., Debegnach F., Pannunzi E., Gregori E., Prantera E., De Santis B.
*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di
Sanità, Roma*

Il Deossinivalenolo (DON) è una micotossina prodotta da alcune specie di *Fusarium*, principalmente da *F. graminearum*, *F. culmorum* e *F. cerealis*, e appartiene al gruppo dei tricoteceni di tipo B. La matrice alimentare più suscettibile alla contaminazione del DON è il grano e conseguentemente i suoi prodotti derivati, quali pasta, pane e altri prodotti da forno. Al fine di valutare l'esposizione della popolazione italiana al DON attraverso il consumo di pasta sono stati raccolti sul mercato nazionale, presso 4 catene della grande distribuzione, 472 campioni. Al fine di ottenere una campionatura rappresentativa sono stati presi in considerazione vari parametri quali ad esempio i diversi marchi aziendali, le quote di mercato e la tipologia ed il formato. I campioni raccolti sono stati analizzati con un metodo precedentemente validato. I risultati ottenuti mostrano che la contaminazione media di DON nei campioni analizzati (64,8 µg/kg) è ampiamente al di sotto del limite di legge (750 µg/kg), e che il 99% dei campioni non supera un valore di contaminazione pari al 50% del limite massimo tollerabile. Sulla base dei livelli di contaminazione ottenuti e sui dati di consumo riportati nell'ultimo studio condotto dall'Istituto della Nutrizione (INRAN - Istituto Nazionale per la Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione), sono state effettuate le stime di esposizione che hanno mostrato valori al di sotto della TDI (1.000 ng/kg pc/die) sia per la popolazione post infantile (3-9,9 anni) che per gli adulti (18-64,9 anni). Inoltre, per i bambini sono stati ipotizzati 3 diversi scenari: 1) contaminazione di DON media e consumo pari al 99^{ile}; 2) contaminazione di DON pari al limite di legge (750 µg/kg) e consumo medio; 3) contaminazione di DON pari al limite di legge (750 µg/kg) e consumo pari al 99^{ile}. Nel caso descritto dal primo scenario, l'esposizione al DON è risultata inferiore al valore della TDI, mentre negli altri due casi è risultata superiore al valore fissato dalla TDI, evidenziando situazioni critiche. Tuttavia, tali criticità sono state ottenute da stime di esposizione di scenari limite, infatti la valutazione dell'esposizione effettuata sulla base dei dati medi di contaminazione e di consumo è risultata del tutto rassicurante.

P6 VALUTAZIONE DEI PARAMETRI DI EFFICIENZA DI UN NUOVO METODO RAPIDO QUANTITATIVO PER LA DETERMINAZIONE DELLE MICOTOSSINE NEI CEREALI

Brera C. (a), Nigri A. (a), Debegnach F. (a), Pannunzi E. (a), Gregori E. (a), Prantera E. (a),
De Santis B. (a), Arletti P. (b), Gatti M. (b)

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

(b) *Generon Srl, Santa Maria di Mugnano, Modena*

L'analisi quali/quantitativa rappresenta il centro dell'intero processo di determinazione delle micotossine, come dimostrano i numerosi sforzi fatti negli anni passati per l'ottimizzazione di questo passaggio. Monitoraggi, valutazione dell'esposizione, controllo ufficiale e controllo di qualità aziendale sono tutte attività che richiedono metodi appropriati. Gli elementi principali da valutare sono il limite di quantificazione richiesto, il tempo di analisi, il numero di campioni da analizzare, la necessità di ottenere risposte rapide e non ultimo i costi associati. I metodi rapidi ed i metodi di *screening* devono essere facili da usare e veloci; solo soddisfacendo questi due requisiti, tali metodi consentono l'analisi di un elevato numero di campioni anche se, per avere una stima della attendibilità dei risultati ottenuti, è sempre raccomandabile eseguire un'analisi di conferma sui positivi. In questo studio sono stati valutati i parametri di efficienza di un nuovo metodo rapido, ovvero di un test immunocromatografico - *Lateral Flow Device* (LFD), per la determinazione delle micotossine nei cereali. In particolare, tali parametri sono stati valutati per il Deossinivalenolo (DON) nel grano e per le Fumonisine (FBs) nel mais. Per il DON, il medesimo campione naturalmente contaminato è stato impiegato per valutare la precisione e, tramite esperimenti di fortificazione, ovvero mediante l'aggiunta di opportune quantità di standard (*spiking procedure*), l'esattezza. Il test ha un campo di applicazione che varia tra 0,2 e 5 mg/kg e che può essere esteso fino a 10 mg/kg attraverso opportuna diluizione. Per la precisione è stato ottenuto un valore di deviazione standard relativa di ripetibilità (RSD_r) pari all'11%, mentre per l'esattezza l'intervallo del valore del fattore di recupero è risultato tra l'89% ed il 117%. Per le fumonisine, invece, sia la precisione che l'esattezza sono state valutate mediante l'analisi di un materiale di riferimento. Il test ha un campo di applicazione che varia da 0,20 a 6,0 mg/kg e che può essere esteso fino a 20 mg/kg attraverso opportuna diluizione. La RSD_r è risultata pari al 15%, mentre il valore del fattore di recupero, calcolato contro il valore assegnato al materiale di riferimento, è risultato pari all'80%. Sia per quanto riguarda i valori ottenuti per il DON, sia per quanto riguarda quelli relativi alle fumonisine, i valori ottenuti sono risultati soddisfacenti ed in linea con i criteri di rendimento riportati nel Regolamento CE 401/2006.

P7 CAMPIONATORI AUTOMATICI NELLE ATTIVITÀ DI AUTOCONTROLLO

Brera C. (a), Soricelli S. (a), Pannunzi E. (a), Nigri A. (a), Prantera E. (a), Grandi A. (b), Grandi F. (b), Castiglioni M. (b), De Santis B. (a)

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

(b) *FREERAY Srl, Valeggio sul Mincio, Verona*

Nella “filiera analitica” associata al controllo delle micotossine nei prodotti alimentari e negli alimenti zootecnici, il campionamento riveste senza dubbio l’importanza maggiore sia in quanto costituisce la maggiore fonte di errore nella valutazione finale della concentrazione sia perché comporta rilevanti implicazioni da un punto di vista operativo, economico e scientifico. La rilevanza che la fase di campionamento possiede nella attendibilità legata alla valutazione della concentrazione delle micotossine è strettamente correlata alla estrema eterogeneità con cui queste sostanze sono presenti in una derrata ed alla conseguente varianza associata alla loro distribuzione. In seguito a questa peculiare caratteristica, la ricerca di strumenti e di azioni che possano ridurre l’incertezza associata alla fase di campionamento è argomento sempre attuale ed in continua evoluzione. Pertanto, al fine di stimare l’attendibilità, espressa in termini di precisione ed esattezza, delle metodologie di campionamento per l’analisi del Deossinivalenolo (DON) in matrici cerealicole è stato approntato uno studio che ha previsto una valutazione comparativa tra campionamento manuale e campionamento effettuato con sistemi automatici. Lo studio ha preso in considerazione lotti di grano tenero e farina di grano tenero sui quali sono stati effettuati campionamenti in parallelo, in condizioni dinamiche secondo il seguente schema:

- campionamento effettuato con campionatori automatici secondo il Regolamento 401/2006;
- campionamento effettuato seguendo le procedure aziendali utilizzate in autocontrollo ed in condizioni manuali;
- campionamento effettuato come al punto 2 ma tra mite campionatori automatici.

Per la farina sono state effettuate 10 ripetizioni mentre per il grano 20. L’installazione dei campionatori automatici è stata effettuata in punti strategici all’interno di impianti industriali, presso il Molino Colombo (MC) ed il Molino Pivetti (MP). I valori ottenuti su tutte le matrici sono stati trattati con test statistico (t test) al fine di testare la significatività statistica delle differenze riscontrate nelle varie tipologie di campionamento. Per la farina, solo in tre delle 10 prove, e sul grano solo in una delle 20 prove, il test ha mostrato una differenza statisticamente significativa, ma deve essere considerato che queste differenze non possono considerarsi critiche ricadendo ampiamente nel medesimo ordine di grandezza senza quindi lasciare dubbi sulla destinazione d’uso del prodotto. Inoltre, tale apparente anomalia è da imputare alla estrema precisione dei campionamenti in automatico che di fatto ha reso l’intervallo di concentrazione critico, su cui basare il test, estremamente ristretto.

P8 VALIDAZIONE DI UN METODO PER LA DETERMINAZIONE CONTEMPORANEA DI MICOTOSSINE NEGLI ALIMENTI PER L'UOMO E PER GLI ANIMALI

Busico F., Mauti T., Berretta S., Neri B., Ubaldi A.

Direzione Operativa Chimica, Laboratorio Contaminanti, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma

Si descrive un metodo accreditato per la determinazione simultanea di aflatossine B1, B2, G1, G2, ocratossina A e zearalenone. Il metodo è applicabile agli alimenti per animali e alimenti per l'uomo e relativi prodotti alimentari 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, fruttasecca e cereali e relativi prodotti alimentari, spezie e miscele di spezie (*Capsicum spp*, *Piper spp*, noce moscata, zenzero, curcuma). L'intervallo di applicabilità è definito dai seguenti intervalli di concentrazione: aflatossina B1, B2, G1, G2 da 0,0014 a 0,050 mg/kg (al 12% di umidità) per gli alimenti per animali e da 0,375 a 30,0 µg/kg per gli alimenti per l'uomo; ocratossina A da 0,019 a 0,050 mg/kg (al 12% di umidità) per gli alimenti per animali e da 1,0 µg/kg a 50,0 µg/kg per gli alimenti per l'uomo, zearalenone al 12% di umidità da 0,034 a 3,00 mg/kg per gli alimenti per animali e da 34,0 µg/kg a 1.000 µg/kg per gli alimenti per l'uomo. Il metodo prevede, dopo estrazione con solvente, la purificazione su colonnine ad immunoaffinità ed analisi in HPLC con rivelatore fluorimetrico previa derivatizzazione post-colonna tramite sistema UVE™. La validazione ha interessato i parametri di prestazione selettività, linearità, limite di determinazione, limite di quantificazione, precisione (ripetibilità stretta, riproducibilità intra-laboratorio), incertezza di misura e recupero. Tutti i parametri di prestazione ottenuti sono rientrati nelle specifiche di prestazione previste dal Regolamento CE n. 401/2006. I parametri di prestazione del metodo sono stati determinati su cinque livelli di concentrazione compresi i LOQs, sia per gli alimenti per animali che per i prodotti alimentari ad uso umano. Il limite di determinazione (LOD) è stato verificato: negli alimenti per animali alle concentrazioni di 0,0005 mg/kg per l'aflatossina B1, 0,005 mg/kg per l'ocratossina A e 0,018 mg/kg per lo zearalenone; negli alimenti per l'uomo alle concentrazioni di 0,15, 0,1, 0,15, 0,1 µg/kg per le aflatossine B1, B2, G1, G2, 0,4 µg/kg per ocratossina A, e 18 µg/kg per lo zearalenone. La validazione è stata inoltre supportata dalla partecipazione a *proficiency test* FAPAS, con prestazioni accettabili in termini di valori di *zeta score*. L'evoluzione di tale metodo prevedrà l'estensione della sua applicabilità anche alla determinazione dell'ocratossina B, dell'ocratossina C e della metil-ocratossina A e successiva loro validazione.

P9 IL CONTROLLO DELLA *FUSARIUM* HEAD BLIGHT (FHB) NEI CEREALI A PAGLIA: SFIDE E NUOVE OPPORTUNITA'

Causin R., Scopel C., Motta G., Stefenatti M., Mondin M.
*Dipartimento Territorio e Sistemi Agro-Forestali, TeSAF, Sezione Patologia Vegetale,
Gruppo di Lavoro Micotossine, GLM, Università degli Studi, Padova*

Il *Fusarium Head Blight* (FHB) è una malattia che in condizioni climatiche favorevoli ed in assenza di interventi di lotta, può causare nei cereali sia considerevoli perdite quantitative che di fattori nutrizionali e qualità tecnologica. Quando essa è sostenuta dalle diverse specie di *Fusarium* che possono attaccare la spiga, può comportare la contaminazione della granella da parte di micotossine, soprattutto tricoteceni, con conseguenze negative che si estendono anche ai prodotti di trasformazione, quali farine, pane, pasta, pizze e vari altri prodotti da forno. Per tali motivi la legislazione fissa dei limiti massimi nel contenuto di DON nei cereali e derivati destinati all'alimentazione umana e sono in discussione analoghe misure anche per le tossine T2 e HT2. Nel nostro Paese, nelle primavere fresche e umide, negli areali più settentrionali di coltivazione e specialmente per il grano duro, non è infrequente rilevare livelli di tricoteceni che si avvicinano e talvolta superano i citati limiti di legge. Oltre a ciò, la crescente disattenzione alla gestione dei residui colturali, che ha portato alla monosuccessione, all'avvicendamento tra graminacee o con soia, nonché alla tendenza alla minima lavorazione o alla semina su sodo, favorisce sempre più lo sviluppo dell'FHB. In questo quadro di scarsa attenzione alla prevenzione agronomica, la difesa appare sempre più basata sull'uso dei prodotti fitosanitari (p.f.). Ciò, oltre ad essere in netto contrasto con la Direttiva CE 2009/128, comporta conseguenze negative, sia di tipo ambientale, sia per il rischio d'incremento di ceppi di patogeni resistenti, che di tipo economico. In questa situazione, un'interessante possibilità di limitare l'uso dei p.f. può derivare dall'impiego di metodi di lotta biologica. Nel presente lavoro, vengono presentati i primi risultati sull'effetto del ceppo di *Trichoderma harzianum* INAT11 contro le infezioni di *Fusarium graminearum* su piantine di frumento tenero. L'antagonista distribuito nel terreno è stato in grado di colonizzare le radici delle plantule che, quando inoculate col patogeno, non hanno evidenziato sintomi per un periodo di 7 gg., mentre questi nel testimone non trattato comparivano con grande severità. La successiva analisi, tramite PCR quantitativa, dei trascritti di alcuni marcatori di resistenza (PAL, PR1 e PR4), ha permesso di formulare l'ipotesi che l'antagonista saggiato possa aver stimolato nel frumento una resistenza traslocabile contro *F. graminearum*.

P10 UTILIZZO DI UN SISTEMA AUTOMATIZZATO PER L'ESTRAZIONE DI AFLATOSSINE B1 B2 E G1 G2 E OCRATOSSINA A IN VARIE MATRICI ALIMENTARI

Coluccia S.J., Alesso F., Bodda M., Ciacciarelli S., Delaini A., Pelligra S., Ricci F.
Polo Alimenti, ARPA Piemonte, La Loggia, Torino

Il laboratorio del Polo Alimenti dell'ARPA Piemonte fornisce supporto analitico e tecnico-scientifico alle ASL e agli altri organi di vigilanza, per i controlli di alimenti e bevande, cosmetici ed altre matrici di interesse sanitario. Nell'ambito del controllo ufficiale esegue la ricerca di micotossine in matrici alimentari diverse per un totale di circa 4.000 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 su colonnine a immunoaffinità. Il laboratorio ha a disposizione sistema automatico Gilson GX-274 già modificato per la purificazione SPE 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 è stato validato per la determinazione di aflatoossine B e G e ocratossina A in numerose matrici alimentari, con una particolare attenzione per i prodotti destinati all'infanzia che rappresentavano spesso una criticità analitica con la procedura tradizionale. 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 s.m.i. 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.

P11 SVILUPPO E APPLICAZIONE DI UN METODO ELISA PER L'ANALISI DI OCRATOSSINA A IN CAMPIONI DI MANGIME

De Pace R., Franchino C., Vita V.

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

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 (IARC1993,WHO2002). L'effetto nefrotossico è stato dimostrato in tutti i mammiferi. 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 882/2004/CE ed a seguito della Raccomandazione della Commissione del 17 agosto 2006 sulla presenza di deossinivalenolo, zearalenone, ocratossina A, tossine T-2 e HT-2 e fumonisine in prodotti destinati all'alimentazione degli animali (2006/576/CE) 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. Nel presente lavoro vengono mostrati i risultati di uno studio di validazione per una metodica ELISA in accordo alla Decisione 2002/657/CE. I parametri considerati nello studio di validazione sono: specificità e verifica dell'errore β ; precisione e robustezza. I test statistici effettuati sono: ANOVA, Fisher e Student. I risultati ottenuti attestano che il metodo è specifico, robusto per tutti i parametri valutati e la precisione dimostra che i risultati sperimentali ottenuti sono concordi, ripetibili e riproducibili *intra* e *inter* laboratorio. Il metodo è tenuto sotto controllo sia mediante la costruzione di opportune carte di controllo con frequenza trimestrale, che con la partecipazione a *ring test* ed è stato recentemente accreditato da ACCREDIA. Dalle analisi finora effettuate su mangimi prelevati in maniera ufficiale dagli organi competenti, non si segnalano alti livelli di contaminazione, tuttavia, 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.

P12 CONTROLLI UFFICIALI DI MICOTOSSINE NEL GRANO DI PROVENIENZA COMUNITARIA ED EXTRACOMUNITARIA IN ENTRATA NEI PORTI PUGLIESI

De Pace R., Franchino C., Vita V.

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

L'Istituto Zooprofilattico di Puglia e Basilicata negli anni 2010, 2011 ed inizio 2012, come laboratorio accreditato ACCREDIA, ai sensi del Regolamento 882/2004 ha iniziato i controlli analitici delle principali micotossine, aflatossina B1, ocratossina A, DON e zearalenone su campioni di grano duro e tenero importati da paesi comunitari ed extracomunitari al fine di verificarne la contaminazione. I prelievi sono stati eseguiti dagli USMAF di Bari e Manfredonia. Le analisi delle principali micotossine nei campioni di grano duro e tenero, sono state eseguite utilizzando kit immunoenzimatici, validati in accordo alla Decisione 2002/657/CE del 12 agosto 2002, che attua la Direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati. I metodi immunoenzimatici utilizzati sono controllati periodicamente per verificarne il corretto funzionamento, attraverso carte di controllo e circuiti interlaboratorio. Il monitoraggio eseguito su 125 campioni di grano di provenienza comunitaria ed extracomunitaria analizzati ha evidenziato che il 95% dei campioni è inferiore ai limiti di legge definiti dai Regolamenti 1881/2006 e 1127/2007 per aflatossina B1, ocratossina A, DON e zearalenone mentre il restante 5% è positivo alle micotossine menzionate in percentuale diversa. I dati analitici riscontrati, sono abbastanza confortanti considerando che i grani esaminati sono materie prime, che, sottoposte ad ulteriori trattamenti fisici come la decorticazione e la stessa macinazione, subiscono un notevole abbattimento di eventuali residui di micotossine. Tuttavia è importante continuare l'attività di sorveglianza in maniera continua e costante per garantire la salvaguardia della salute dei consumatori da eventuali rischi di contaminazione.

P13 RUOLO DEGLI IBRIDI E DELLA LORO COMPOSIZIONE CHIMICA SULL'INFEZIONE DA *FUSARIUM* E LA PRODUZIONE E MASCHERAMENTO DI FUMONISINE

Dall'Asta C. (a), Falavigna C. (a), Galaverna G. (a), Battilani P. (b)

(a) Dipartimento di Chimica Organica ed Industriale, Università degli Studi, Parma

(b) Istituto di Entomologia e Patologia Vegetale, Università Cattolica del Sacro Cuore,
Piacenza

È stato organizzato uno studio allo scopo di indagare il ruolo degli ibridi nel patosistema mais-*Fusarium verticilloides*, con particolare attenzione per la presenza di fumonisine nella forma libera e mascherata. La ricerca, di durata biennale, si è svolta negli anni 2009-2010 in Emilia-Romagna. Sono stati campionati campi commerciali di mais naturalmente infetti includendo in totale 10 ibridi, 6 dei quali inclusi in entrambi gli anni, replicati in più campi, da un minimo di 2 ad un massimo di 16. Allo scarico della trebbia sono stati raccolti 100 campioni di 100 g per costituire un campione globale di 10 kg per ciascun campo. In tutti i campioni è stata valutata l'incidenza dei funghi, con particolare attenzione per quelli produttori di micotossine, la contaminazione da fumonisine, con HPLC, anche preceduta da una fase di idrolisi, e la composizione chimica, con particolare dettaglio riguardo alla frazione lipidica. I campioni di mais raccolti nel 2010 hanno mostrato una maggiore contaminazione da fumonisine rispetto al 2009, ma un'incidenza molto simile di *F. verticilloides*. Il mascheramento delle fumonisine è stato confermato in entrambi gli anni, con una minore quantità di forme mascherate nell'anno con contaminazione maggiore. La composizione chimica degli ibridi è stata correlata con i dati di contaminazione da fumonisina; i risultati hanno evidenziato un ruolo significativo degli acidi grassi, con una contaminazione maggiore negli ibridi con maggiore contenuto di acido linoleico e un mascheramento più elevato con un maggiore rapporto acido oleico su acido linoleico. Questi risultati costituiscono una buona base per spiegare la suscettibilità degli ibridi a *F. verticilloides* e alla contaminazione da fumonisine, anche nelle forme mascherate, non in relazione ad uno specifico ibrido, ma con criteri oggettivi.

P14 RELAZIONE TRA PRODUZIONE DI FUMONISINE ED ESPRESSIONE DEI GENI FUM IN *FUSARIUM VERTICILLIOIDES* IN DIVERSE CONDIZIONI AMBIENTALI

Fanelli F., Logrieco A., Mulè G.

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

Fusarium verticillioides è la principale produttore di fumonisine, un gruppo di micotossine che contamina i prodotti a base di mais della filiera agroalimentare, causando malattie per l'uomo e per gli animali. Lo studio dell'effetto delle varie condizioni ambientali sulla produzione di tossine è il punto di partenza per la formulazione di strategie volte a ridurre il rischio di contaminazione. Questo studio analizza e mette in relazione l'effetto di temperatura, attività dell'acqua (a_w), salinità e pH sulla crescita, la produzione di Fumonisina B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) e B₃ (FB₃), e l'espressione dei geni FUM1 e FUM21 in un isolato di *F. verticillioides* da mais. Il più alto tasso di crescita è stato misurato a 25°C, 0,998-0,99 di a_w , e 0-25 g l⁻¹ di NaCl. Le condizioni ottimali per la produzione di fumonisine sono risultate 30°C, 0,99 di a_w , 25 g l⁻¹ di NaCl e pH 5; tuttavia l'isolato ha mostrato una buona adattabilità e capacità di produrre discrete quantità di fumonisine in un ampio *range* di condizioni. L'espressione genica segue il profilo di produzione, ad eccezione della temperatura: l'attivazione genica più alta è stata rilevata a 15°, mentre il picco di produzione è a 30°. Possiamo quindi ipotizzare meccanismi di regolazione post-trascrizionale che intervengono nella modulazione della biosintesi di fumonisine.

P15 DETERMINAZIONE DELLA PATULINA IN SUCCO DI MELA

Giuffrè F., Torresani M.C.

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

La Patulina è un metabolita secondario prodotto da un numeroso gruppo di funghi del genere *Aspergillus*, *Penicillium* e *Byssoschlamys*. 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/UV (276 nm) dell'estratto tal quale o purificato mediante colonnina SPE. 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 (HMF) che si forma a seguito dei trattamenti termici ai quali sono sottoposti queste tipologie di prodotto. L'HMF ha un tempo di ritenzione 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 (MIP) (R-BIOPHARM) e l'analisi in HPLC/DAD (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 ed 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) sia per quanto riguarda l'eliminazione/abbattimento dei picchi interferenti, soprattutto quello relativo all'HMF. 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. 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 ed il Limite di Ripetibilità.

P16 STUDIO DI UN METODO ALTERNATIVO PER L'ANALISI DI AFB1 SUL MAIS IN CAMPIONI DI GRANDI DIMENSIONI

Lampis G.

Ser Ecotronics, Milano

“Aflaflesh” è un sistema computerizzato, nato dalla combinazione di un sistema di acquisizione dati con un sofisticato software di analisi di immagine. Il sistema consente di controllare un campione rappresentativo (5 kg) e determinare in esso la presenza di AFB₁, impiegando la fluorescenza generata dalle cariossidi contaminate quando queste sono illuminate con una radiazione UV. È nota da diversi anni la proprietà da parte di muffe del genere *Aspergillus* (*Aspergillus flavus* e aaa.) di produrre due metaboliti, che sono aflatossine (B1, B2, G1, G2) e acido coico (*kojick acid*). Quest'ultimo, che è un catabolita facente parte del *pathway* di produzione delle aflatossine, ha appunto la caratteristica di riemettere luce fluorescente in corrispondenza della banda del rosso e del verde quando viene investito da una radiazione UV. Il metodo di misura ha ovviamente richiesto uno studio di correlazione che permettesse di ottenere un'equazione di conversione in grado di convertire l'area (in pixel) della superficie emittente in ppb di AFB₁. Per ottimizzare l'impiego di questo sistema di controllo sono state attuate due fasi: è stato messo allo studio un totale di 80 campioni. Questi sono stati analizzati in HPLC in doppio e in Aflaflesh. È stato effettuato uno studio preliminare su 30 campioni per verificare la comparabilità dei risultati e quindi la possibilità di associare un'area emittente dovuta alla presenza di una contaminazione da AF con il numero di $\mu\text{g}/\text{kg}$ ottenuti con metodo ufficiale. Lo sviluppo reale, parte della presente ricerca, era correlare i valori in $\mu\text{g}/\text{kg}$ misurati da un laboratorio accreditato con il numero di pixel associati all'area contaminate riconosciuta dall'Aflaflesh. Per questo motivo sono stati analizzati 50 campioni. Lo strumento è stato calibrato a seguito di un'analisi statistica (regressione multilineare) che ha permesso di avere il controvalore in $\mu\text{g}/\text{kg}$ della concentrazione di aflatossine. I risultati sono stati verificati tramite un *ring test* effettuato con un numero di campioni (3) a differenti livelli di concentrazione inviati a 4 laboratori accreditati. Come risultato finale, l'analisi può essere effettuata in un tempo limitato (15 minuti per campione) senza l'assistenza di personale specializzato, con il vantaggio di poter analizzare un campione decisamente rappresentativo della quantità totale di prodotto.

P17 PROFILO DI PRODUZIONE DELLE FUMONISINE B, A, C E MASCHERAMENTO IN *FUSARIUM VERTICILLIOIDES* A DIVERSE CONDIZIONI ECOLOGICHE

Lazzaro I. (a), Falavigna C. (b), Dall'Asta C. (b), Proctor R. (c), Galaverna G. (b), Battilani P. (a)
(a) *Istituto di Entomologia e Patologia Vegetale, Università Cattolica Sacro Cuore, Piacenza*
(b) *Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università degli Studi, Parma*
(c) *US Department of Agriculture, ARS, NCAUR, Peoria, Illinois, USA*

In questo lavoro è stata studiata la produzione di fumonisine B-A-C, le fumonisine mascherate e parzialmente idrolizzate in tre ceppi di *Fusarium verticillioides*, messi in cultura a 25°C ed incubati per 21-30-45 giorni su substrato liquido ME (*Malt Extract*) con acqua libera (a_w) 0,995-0,990. Tutti i ceppi hanno prodotto fumonisine A-B-C a tutte le condizioni studiate, in particolare la produzione dei tre analoghi ha seguito un *trend* simile in ogni ceppo, con fumonisina B >> fumonisina C > fumonisina A. La dinamica di produzione delle fumonisine A-B-C è stata influenzata significativamente da tutti i fattori considerati (ceppo- a_w -tempo di incubazione) e dalla loro interazione. L'acqua libera $a_w=0,990$ ha favorito la produzione di fumonisine nei ceppi ITEM 10026 e 10027; con un massimo di produzione a 30 giorni per ITEM 10027 e ITEM 1744, e a 45 giorni per ITEM 10026. Un pH acido (attorno a 5) sembra favorire la produzione di fumonisine (ITEM 10026 e ITEM 10027), mentre con pH alcalino la produzione di fumonisine è stata minore o nulla (ITEM 1744). Tale incremento di pH sembra essere correlato con una maggiore produzione di micelio fungino. Le forme parzialmente idrolizzate sono state rilevate solo per le fumonisine B, e solo nei ceppi ITEM 10026 e ITEM 10027. Le fumonisine nascoste non sono state rilevate in alcuna coltura di *F. verticillioides* cresciuta su ME. In una ulteriore prova in cui i tre ceppi di *F. verticillioides* sono stati inoculati su un substrato a base di polenta di mais sono state trovate le forme mascherate; ciò suggerisce che il fenomeno di mascheramento possa avvenire solo su matrici complesse.

P18 MESSA A PUNTO DI UN IMMUNOSAGGIO BASATO SULLA POLARIZZAZIONE DI FLUORESCENZA PER LA DETERMINAZIONE DELLE TOSSINE T-2 E HT-2 NEL FRUMENTO

Lippolis V., Pascale M., Valenzano S., Visconti A.

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

Le tossine T2 e HT2 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 infatti la presenza di queste tossine in vari cereali e prodotti derivati destinati al consumo umano. Queste micotossine hanno effetti tossici acuti sui mammiferi e la tossina T2 è stata dimostrata essere un potente inibitore della sintesi delle proteine, della sintesi di DNA e RNA, ed indurre effetti ematotossici, immunosoppressivi e dermatossici. La tossina T2, *in vivo*, è rapidamente metabolizzata a tossina HT-2 che ha mostrato avere effetti tossici simili. Per questa ragione la Commissione sui contaminanti nella catena alimentare (CONTAM) dell'EFSA (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 T2 e HT2. I livelli massimi ammissibili di queste tossine (come somma) in cereali e derivati sono attualmente in discussione presso la Commissione Europea. I metodi comunemente utilizzati per la determinazione di queste tossine nei cereali sono metodi cromatografici (GC-ECD o MS, HPLC-FD o MS, UPLC-UV). Sebbene questi metodi permettano un'accurata e precisa quantificazione delle tossine anche a bassi livelli, essi richiedono una 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 (FP) stanno ricevendo particolare attenzione per l'analisi di contaminanti in matrici agroalimentari ed ambientali grazie alla loro semplicità e rapidità e ai ridotti costi di analisi. Nei laboratori dell'ISPA-CNR, recentemente, è stato messo a punto un immunosaggio FP per la determinazione delle tossine T2 e HT2 in campioni di frumento. L'immunosaggio si basa sulla competizione tra le tossine T2 e HT2 e un derivato fluorescente della tossina HT-2 (opportunamente sintetizzato e caratterizzato) per un anticorpo monoclonale specifico per la tossina HT2. L'anticorpo utilizzato ha mostrato avere una *cross*-reattività del 100% anche nei confronti della tossina T2 e nessuna *cross*-reattività con altre micotossine comunemente ritrovate nel frumento. Il metodo prevede l'estrazione del campione con una soluzione metanolo:acqua (90:10, v/v), filtrazione e determinazione del contenuto della somma delle tossine mediante immunosaggio FP. Il valore della polarizzazione di fluorescenza, misurato per l'estratto del campione sottoposto ad immunosaggio, risulta essere inversamente proporzionale al contenuto delle tossine. Il limite di quantificazione del metodo è risultato di 8 µg kg⁻¹ per la somma delle tossine, con un tempo complessivo di analisi inferiore a 10 minuti. I recuperi medi, ottenuti nell'intervallo 50-200 µg kg⁻¹, sono

del 96% con deviazioni standard relative minori dell'8% (n=4). Uno studio comparativo, effettuato su 45 campioni di frumento naturalmente e artificialmente contaminato con tossine T2 e HT2, tra il metodo FP sviluppato presso l'ISPA e un metodo HPLC di riferimento, ha mostrato una buona correlazione tra le concentrazioni delle tossine (somma) ottenute con le due metodiche analitiche (coefficiente di correlazione, $r=0,964$). Questi risultati indicano che il metodo FP può essere utilizzato per un rapido e affidabile monitoraggio della contaminazione da tossine T2 e HT2 nel frumento e come alternativa ai più costosi metodi cromatografici.

Si ringrazia AGER - Fondazioni in rete per l'agroalimentare per il sostegno al progetto "From Seed to Pasta".

P19 DAL SEME ALLA PASTA – FILIERA DI RICERCA INTEGRATA PER LA PRODUZIONE DI GRANO DURO DI ALTA QUALITÀ

Massi A. (a), Tuberosa R. (b), Morgante M. (c), Lafiandra D. (d), Ammar K. (e), D'Egidio M.G. (f), Pascale M. (g), Galaverna G. (h), Piffanelli P. (i)

(a) *PSB, Società Produttori Sementi SpA, Bologna*

(b) *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, DiSTA, Università degli Studi, Bologna*

(c) *IGA, Istituto di Genomica Applicata, Udine*

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

(e) *International Maize and Wheat Improvement Center, CIMMYT, El Batan, Messico*

(f) *Unità di Ricerca per la Valorizzazione Qualitativa dei Cereali, Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, CRA-QCE, Roma*

(g) *Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, ISPA, Consiglio Nazionale delle Ricerche, CNR, Bari*

(h) *Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università degli Studi, Parma*

(i) *Fondazione Parco Tecnologico Padano, PTP, Lodi*

Il Progetto “Dal seme alla pasta” è un progetto nazionale finanziato da 13 Fondazioni bancarie per la ricerca scientifica in campo agroalimentare (progetto AGER - Fondazioni in rete per l'agroalimentare) che nasce con l'obiettivo di favorire la produzione di grano duro italiano di alta qualità attraverso un complesso di azioni efficaci lungo la filiera della pasta sui diversi fattori che concorrono a determinare la qualità e la sicurezza alimentare del grano duro e dei suoi derivati. Il progetto, che è iniziato nel 2009 e terminerà nel 2013, prevede un'azione multidisciplinare, dalla genetica all'agricoltura sostenibile, dalla caratterizzazione qualitativa e valorizzazione della materia prima al controllo delle micotossine, finalizzata all'ottenimento di una materia prima sicura per il consumatore e di qualità. Il progetto prevede le seguenti principali attività:

- Area genetica e genomica: sviluppo di una piattaforma di genotipizzazione basata su polimorfismi di tipo SNP; identificazione e mappaggio di geni/QTL per la resistenza a fitopatie (inclusa la fusariosi); produttività e caratteri qualitativi e morfo-fisiologici correlati;
- Miglioramento genetico e sostenibilità: selezione assistita da marcatori molecolari per resistenza a fitopatie e caratteri qualitativi; selezione su base fenotipica per resistenza alla fusariosi, efficienza nell'uso di azoto e dell'acqua;
- Qualità alimentare: caratterizzazione della materia prima e messa punto di tecniche di lavorazione più idonee alla sua valorizzazione; sviluppo di alimenti funzionali (modifica della composizione gluteninica, sviluppo di genotipi con elevato contenuto di amilosio e fibra alimentare, identificazione di genotipi a ridotto potenziale allergenico);

- Sicurezza alimentare: studio e controllo delle micotossine libere e coniugate (micotossine nascoste) in frumento duro, con particolare riferimento al deossinivalenolo e tossine T-2 e HT-2; messa a punto di metodi analitici rapidi ed affidabili in grado di agevolare la selezione e il controllo della materia prima.

P20 DETERMINAZIONE MULTIRESIDUALE DI MICOTOSSINE SU AMPIO SPETTRO DI MATRICI ALIMENTARI

Merlo V. (a), Pellegrino L. (a), Tallone L. (a), Parizia E. (a), Boi C. (b)
(a) *Divisione Ricerca & Sviluppo, Eurofins Chemical Control, Cuneo*
(b) *Divisione Contaminanti, Eurofins Chemical Control, Cuneo*

Negli ultimi anni si è osservato un sempre maggiore numero di segnalazioni del sistema rapido di allerta comunitario (RASFF) relative alla presenza di micotossine in derrate alimentari. La normativa relativa alle micotossine risulta piuttosto articolata e in continua evoluzione e vista l'elevata tossicità delle micotossine sono stati fissati limiti legali specifici su una vasta gamma di matrici. Da qui nasce l'esigenza di avere metodi per la determinazione di micotossine sempre più rapidi, sensibili, affidabili e di facile applicazione su un numero elevato di matrici. Per tale motivo è stata sviluppata una nuova metodica multiresiduale per la determinazione di 20 differenti micotossine con una tecnica combinata HPLC-MS/MS e GC-MS applicabile ad un ampio numero di matrici alimentari. La nuova metodica permette di contenere i costi ma soprattutto di ridurre i tempi di analisi, coniugando le caratteristiche di rapidità di un metodo multiresiduale con quelle di accuratezza e selettività tipiche delle determinazioni con rivelatori di massa. Tra le micotossine determinabili risultano le aflatoossine B&G, Ocratossina A (OTA), fumonisine, zearalenone e numerosi tricoteceni. La metodica è validata su un elevato numero di matrici quali, ad esempio, cereali e derivati, semi oleaginosi, caffè verde.

P21 MULTIPLEX LATERAL FLOW IMMUNOASSAY FOR *FUSARIUM* TOXINS IN CEREALS

Nivarlet N. (a), Lattanzio V.M.T. (b), Huet A.C. (c), Visconti A. (b), Lippolis V. (b), Della Gatta S. (b), Delahaut P. (c), Granier B. (a)

(a) *UNISENSOR S.A., Zoning Industriel du Dossay, Liège, Belgium*

(b) *Institute of Sciences of Food Production, ISPA, CNR, Bari*

(c) *Département Santé, Centre d'Economie Rurale, CER Groupe, Marloie, Belgium*

Fusarium species are plant pathogens commonly associated with cereals that, under favourable environmental conditions, can produce several secondary toxic metabolites. *Fusarium* toxins are widely distributed in the food chain in the EU and the major sources for their dietary intake are cereal products, mainly based on wheat and maize. The major *Fusarium* toxins found in cereals and cereal-based products that can be harmful to both human and animal health are Deoxynivalenol (DON), T-2 toxin (T-2), HT-2 toxin (HT-2), Zearalenone (ZEA) and Fumonisins (FB₁, FB₂). To protect human health from exposure to these mycotoxins, the European Commission has recently established regulatory limits for DON, ZEA and fumonisins (sum of FB₁ and FB₂) in cereals and cereal-based foods and feeds, while permissible levels of T-2 and HT-2 are under discussion (EC Regulations No 1881/2006 and 1126/2007). In the framework of the European project "CONFIDENCE" (FP7), rapid multiplex dipsticks allowing the detection of six *Fusarium* mycotoxins (DON, T-2, HT-2, ZEA, FB₁ and FB₂) were developed for maize, wheat, oat and barley. The efficiency of one single extraction protocol for the different cereals of interest and the performances of this multiplex dipstick in detecting simultaneously not less than six toxins in spiked and in naturally contaminated matrices will be demonstrated. The originality of this new rapid test is the possibility to detect 6 mycotoxins in one single experiment of 20 minutes at 80% of their MRLs (extraction time excluded) in raw cereals. This semi-quantitative test gives a negative or positive type-response compare to a cutoff of 1,400, 280, 400 and 3,200 µg/kg respectively for DON, ZEA, T-2/HT-2 and FB₁/FB₂ in maize and 1,400, 80 and 400 µg/kg for DON, ZEA, T-2/HT-2 in wheat and oats. Good agreements between dipstick results and LC-MS/MS measurements have been established. Finally, the multiplex dipstick validation results for maize and wheat collected by the ANOVA method will be presented. Information on the share of the variability sources such as day, matrix and repeatability on the total variability will be given. The rate of false positive results for blank matrices has been calculated and finally (test line/control line) cutoff ratios have been determined.

P22 CONFRONTO TRA MOLITURA A SECCO E MOLITURA AD UMIDO (SLURRY) PER IL TRATTAMENTO DEL CAMPIONE DI LABORATORIO NELL'ANALISI DI OCRATOSSINA A E DEOSSINIVALENOLO IN FRUMENTO

Pascale M., Lippolis V., Valenzano S., Visconti A.
*Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, ISPA, Consiglio Nazionale delle Ricerche,
CNR, Bari*

L'Ocratossina A (OTA) ed il Deossinivalenolo (DON) sono tra le micotossine quelle ritrovate più frequentemente nei cereali, ed in particolare nel frumento, con documentata tossicità per l'uomo e gli animali. 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. Le procedure di campionamento per il controllo ufficiale dei livelli di tali micotossine nei cereali sono definite a livello comunitario dal Regolamento CE n. 401/2006. In particolare, per lotti di cereali superiori a 20 t, devono essere raccolti campioni elementari (fino a 100 campioni) 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 ed i 100 g, assumendo che la concentrazione determinata in questa aliquota sia uguale a quella del campione di laboratorio. La preparazione del campione 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 un volume di acqua uguale al peso del campione di laboratorio. Lo studio condotto presso l'ISPA 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 naturalmente contaminati di frumento. È stata determinata la distribuzione della contaminazione di OTA e DON in 4 campioni di laboratorio del peso di circa 10 kg di frumento (ottenuti secondo il Regolamento CE n. 401/2006), analizzando tutte le 100 porzioni in cui ogni singolo campione è stato suddiviso dopo aver applicato la procedura di molitura a secco o di molitura ad umido. È stata osservata una buona ripetibilità dei risultati ottenuti per l'analisi di DON, sia per campioni sottoposti a molitura ad umido (media 2.290 µg/kg, deviazione standard relativa RSD 4,6%, mediana 2.290 µg/kg), sia sottoposti a molitura a secco (media 2.310 µg/kg, RSD 6,4%, mediana 2.290 µg/kg). Nell'analisi di OTA è stata ottenuta una RSD pari al 4,0% per la procedura di molitura ad umido (media 2,62 µg/kg, mediana 2,62 µg/kg), mentre per i campioni originati

dalla procedura di molitura a secco è stata osservata una distribuzione disomogenea della contaminazione, con concentrazioni di OTA comprese tra 0,27 e 3,63 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (media 0,83 $\mu\text{g}/\text{kg}$, RSD 75,2%, media 0,60 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Questo studio dimostra che mentre per l'analisi del DON è possibile utilizzare entrambe le procedure di preparazione del campione, nell'analisi dell'OTA l'utilizzo della molitura ad umido consente di ottenere risultati accurati e precisi e di minimizzare il rischio di non accettazione di una partita o sottopartita di frumento.

P23 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*

Perez E., Cini B.
Test Veritas Srl, Padova

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, in seguito ai quali ha raccolto dettagliate informazioni sui diversi metodi analitici usati dai partecipanti. Inoltre, questo *proficiency test* prevede una elaborazione dei risultati separata per metodiche di *screening* e di conferma e il valore assegnato deriva dai risultati ottenuti solo con questi ultimi. Di conseguenza è stato possibile effettuare uno studio comparativo tra metodiche strumentali e metodiche di *screening* (ELISA e *lateral flow*), nonché analisi dettagliate delle diverse *performance* ottenute con le metodiche strumentali tenendo conto delle diverse variabili che compongono un metodo analitico.

P24 CONTAMINAZIONE DA AFLATOSSINE E OCRATOSSINA A DI CASTAGNE SECCHIE E FARINA DI CASTAGNE

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

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

La produzione italiana di castagne ammonta a circa 56.000 tonnellate/anno e rappresenta il 40% di quella europea; l'Italia è infatti il primo produttore europeo e il quinto nel mondo. Una frazione consistente di questa produzione, tra il 15-20%, è destinata alla preparazione industriale di castagne secche e farina di castagne. Negli ultimi anni, il Sistema Europeo di Allerta Rapida per gli alimenti e i mangimi (RASFF) ha rilevato in campioni di castagne secche e farine di castagne prodotte in Italia contaminazioni da aflatoossina B₁ superiori al limite di legge fissato dalla Comunità Europea per la frutta secca (2 µg/kg). Oltre a queste notifiche, alcuni lavori, pubblicati recentemente, hanno evidenziato nelle castagne fresche contaminazioni da altre micotossine, come ocratossina A, deossinivalenolo e zearalenone. Nella presente ricerca, è stato effettuato un monitoraggio sulla contaminazione da aflatoossine e ocratossina A in 14 campioni di castagne secche e 37 di farina di castagne. Dopo macinazione dei campioni con griglia da 1 mm, estrazione e purificazione attraverso colonna ad immunoaffinità, la determinazione delle aflatoossine e dell'ocratossina A è stata effettuata mediante HPLC con rivelazione fluorimetrica (per le aflatoossine dopo derivatizzazione per via fotochimica). Le analisi hanno evidenziato contaminazioni diffuse sia da aflatoossine che da ocratossina A. L'aflatoossina B₁ è stata rilevata nel 21,4% e nel 62,2% dei campioni rispettivamente di castagne secche e farina di castagne; negli stessi prodotti, la percentuale di castagne che ha superato il limite di 2 µg/kg è stata del 24,3% e 7,1%. Il valore massimo di aflatoossina B₁ è stato pari a 67,9 µg/kg. È stata rilevata anche un'alta incidenza di aflatoossina G₁ (40,5%) con valori talvolta superiori a quelli dell'aflatoossina B₁ e un valore massimo di 117,0 µg/kg. I campioni di farina di castagne sono risultati significativamente più contaminati di quelli di castagne secche ($P=0,015$). L'ocratossina A è stata rilevata in tutti i campioni spesso ad alte concentrazioni; i valori medi per farina di castagne e castagne secche sono stati rispettivamente pari a 12,38 e 13,63 µg/kg; il valore massimo è stato di 65,84 µg/kg. Negli stessi prodotti, la percentuale di campioni che ha superato il valore di 10 µg/kg è stata pari a 64,9% e 42,8%. Non è stata osservata nessuna differenza statisticamente significativa tra le due categorie di prodotti.

P25 DEFINIZIONE DEL FATTORE DI CONCENTRAZIONE DELL'AFLATOSSINA M₁ DA LATTE A FORMAGGIO TIPO GRANA

Pietri A. (a), Colombari G. (b), Mulazzi A. (a), Bertuzzi T. (a)

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

(b) *Ente Regionale per i Servizi all'Agricoltura e alle Foreste, ERSAF, Azienda Carpaneta, Bigarello, Mantova*

Nel Regolamento CE 1881/2006, al punto (5) si stabilisce: “Per consentire l'applicazione di tenori massimi ai prodotti alimentari essiccati, diluiti, trasformati e composti ai quali non siano stati specificati specifici tenori massimi comunitari, gli operatori del settore alimentare devono fornire i fattori specifici di concentrazione e diluizione corredati dagli opportuni dati sperimentali che giustifichino il fattore proposto”. Dato che con lo stesso Regolamento, è stato fissato per l'Aflatossina M₁ (AFM₁) un limite di 0,050 µg/kg per il latte, ma nessun limite specifico per i formaggi, è necessario conoscere il fattore di arricchimento per i diversi tipi di prodotto. Questo studio ha quindi valutato il comportamento dell'AFM₁ durante 24 caseificazioni effettuate conformemente ai requisiti previsti per la produzione dei formaggi Grana Padano DOP e Parmigiano Reggiano DOP e la sua stabilità durante la stagionatura, utilizzando latte naturalmente contaminato a 3 diversi livelli, vicini al limite fissato dalla legislazione (0,030, 0,060 e 0,080 µg/kg). La determinazione dell'AFM₁ nei vari campioni (latte, crema, siero, cagliata, formaggio), dopo estrazione e purificazione attraverso colonna ad immunoaffinità, è stata effettuata mediante HPLC con rivelazione fluorimetrica. I risultati hanno mostrato che nel processo di affioramento, effettuato in modo da ottenere due diversi rapporti grasso/caseina nel latte (1,10-1,15 e 0,85-0,90), solo una piccola frazione di AFM₁ è passata nella crema e le concentrazioni nel latte intero e in quello destinato alla caseificazione sono state molto simili. Al termine delle caseificazioni, il fattore di arricchimento della cagliata (rapporto tra la concentrazione di AFM₁ nella cagliata e quella nel latte di caldaia) è risultato compreso tra 4,0 e 5,2, con un valore medio di 4,7; questo fattore non è risultato influenzato né dal livello di contaminazione né dal diverso rapporto grasso/caseina. Nei campioni di siero, la concentrazione di AFM₁ è risultata circa il 40% più bassa di quella del latte corrispondente. I bilanci di massa del processo di affioramento e di caseificazione sono risultati tutti vicini al 100%. Durante la stagionatura, la concentrazione di AFM₁ è aumentata nel tempo fino a 16 mesi di stagionatura e di conseguenza il fattore di arricchimento medio è aumentato, passando da 4,6 a 5,7 e da 4,8 a 6,2 rispettivamente per le lavorazioni con alto e basso rapporto grasso/caseina. Successivamente, la concentrazione di AFM₁ è diminuita leggermente a 24 mesi e di conseguenza anche il fattore di arricchimento, passando rispettivamente a 5,3 e 5,5. Considerando questi valori, il limite massimo ammissibile di AFM₁ in formaggi stagionati tipo grana dovrebbe essere vicino a 0,300 µg/kg.

P26 INIBIZIONE DELLA BIOSINTESI DI DIFFERENTI MICOTOSSINE E LORO DEGRADAZIONE NEI CEREALI MEDIANTE L'IMPIEGO DI COMPOSTI BIOATTIVI ESTRATTI DAL BASIDIOMICETE *TRAMETES VERSICOLOR*

Reverberi M., Bello C., Fabbri A., Scarpari M., Fanelli C.
Dipartimento di Biologia Ambientale, Università di Roma Sapienza, Roma

Le micotossine sono metaboliti secondari dannosi per la salute dell'uomo e degli animali prodotte da numerose e ampiamente diffuse specie fungine che possono contaminare diverse derrate alimentari. La crescita delle specie fungine tossigene può verificarsi durante tutte le principali fasi del ciclo produttivo degli alimenti. Le aflatoxine, l'ocratossina A e i tricoteceni sono le micotossine più diffuse sia durante le fasi di campo che in quelle del post-raccolta e, nei paesi a clima mediterraneo, sono principalmente prodotte da specie fungine appartenenti rispettivamente ai generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. In particolare i cereali costituiscono un substrato adatto per la sintesi di micotossine quando si verifica un accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS). È noto infatti che lo stress ossidativo porta all'accumulo di ROS nelle cellule dei funghi micotossigeni, quindi si può affermare che lo stress ossidativo rappresenti un pre-requisito per la biosintesi delle micotossine considerate. Infatti è stato verificato che ad un aumento della produzione di ROS sulla superficie dei semi corrisponde un aumento della produzione di micotossine. Date queste premesse, nel nostro lavoro abbiamo utilizzato degli esopolisaccaridi estratti da macro-funghi dotati di proprietà medicinali. Questi composti, in particolare quelli estratti dal fungo *Trametes versicolor*, sono capaci di stimolare il sistema antiossidativo endogeno dei funghi tossigeni e di controllare significativamente la produzione di aflatoxine, ocratossina A e deossinivalenolo su grano duro e tenero contaminato naturalmente o artificialmente con i funghi tossigeni. Inoltre, particolari ossidasi prodotte da questo basidiomicete sono capaci di degradare le micotossine prodotte. I composti utilizzati possono essere prodotti facilmente in colture su larga scala, non sono tossici per l'uomo e per gli animali e possono quindi costituire uno strumento innovativo per garantire la qualità delle derrate alimentari e degli alimenti.

P27 SVILUPPO DI UN NUOVO SAGGIO ELISA PER LA DETERMINAZIONE DELLA TOSSINA T-2 AVENTE ELEVATA CROSS-REATTIVITÀ PER HT-2

Rosar G., Gon F., Diana F.
Tecna Srl, Padriciano, Trieste

La tossina T-2 ed il suo metabolita HT-2 sono micotossine prodotte da diverse specie di funghi del genere *Fusarium*. I loro effetti tossici sono noti nell'uomo ed in tutte le specie animali, e vanno dall'inibizione della sintesi proteica, all'alterazione del sistema immunitario, all'inibizione dell'ematopoiesi. Ad oggi non sono stati ancora stabiliti dalla Comunità Europea dei tenori massimi, a causa della mancanza di dati sufficienti, in quanto è tuttora in corso la valutazione del rischio effettivo per la salute umana ed animale correlato alla presenza di queste tossine nel cibo e nei mangimi. L'Agenzia Europea per la Sicurezza Alimentare (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. Nel rapporto dell'EFSA l'esposizione dell'uomo a tali micotossine è largamente dovuta alla contaminazione di frumento ed avena. In questo lavoro viene presentato un nuovo saggio ELISA semplice e rapido per la determinazione quantitativa delle tossine T-2 e HT-2. Grazie all'impiego di un particolare immunogeno è stato prodotto un anticorpo policlonale che riconosce entrambe le molecole, con una *cross*-reattività del 100% per la tossina T-2 e del 72% per la HT-2. L'intervallo di calibrazione ottenuto va da 0,025 a 1 ppm. Il saggio si è dimostrato idoneo all'analisi quantitativa di campioni quali frumento integrale, frumento raffinato (farina 00), avena, e granella di mais. Il limite di quantificazione è risultato di 0,025 ppm per frumento e granella di mais e di 0,05 ppm per l'avena, con una sensibilità $\geq 95\%$. Il recupero medio per campioni addizionati nell'intervallo 0,1-1 ppm era del $125 \pm 18\%$ per il frumento integrale, del $116 \pm 14\%$ per la farina raffinata, del $100 \pm 9\%$ per l'avena priva di tegumento, del $109 \pm 13\%$ per la granella di mais. Per campioni di riferimento naturalmente contaminati è stato ottenuto un recupero del $100 \pm 24\%$ per la granella di mais e del $131 \pm 12\%$ per il frumento integrale. Il saggio è stato inoltre valutato nell'analisi di campioni di mangimi per polli e maiali, che risultano tra le specie animali più sensibili alle tossine T-2 ed HT-2. I risultati ottenuti indicano che il saggio sviluppato è sensibile, preciso ed accurato e potrà rappresentare un rapido ed affidabile metodo di *screening* per la presenza delle tossine T-2 ed HT-2 in campioni di cereali e mangimi.

P28 CONTAMINAZIONE DA MONILIFORMINA E FUMONISINE NEL MAIS: IL RUOLO DELLA PIRALIDE

Scarpino V., Blandino M., Reyneri A., Sovrani V., Vanara F.
Dipartimento di Agronomia, Selvicoltura e Gestione del Territorio, Università degli Studi, Grugliasco, Torino

La piralide del mais (*Ostrinia nubilalis*) svolge un ruolo molto importante nel favorire l'infezione e lo sviluppo di *F. verticillioides* e *F. proliferatum* e quindi la contaminazione da fumonisine nella granella di mais. 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. Nel corso del triennio 2008-2010 è stata condotta presso il centro sperimentale dell'Università di Torino, sito a Carmagnola (TO), una sperimentazione al fine di approfondire l'influenza dell'attività della piralide sulla contaminazione da moniliformina. Per ciascun anno sono stati confrontati l'infestazione naturale dell'insetto 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 m². 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. 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%. 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. L'attività della piralide ha inoltre favorito significativamente la contaminazione da moniliformina: in media la contaminazione di questa tossina è stata di 511 µg/kg e 40 µg/kg rispettivamente in presenza e assenza di infestazione da piralide. 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 in moniliformina ($r=0,694$, $P<0,001$). Si evidenzia inoltre una correlazione significativa tra la contaminazione da moniliformina e fumonisine ($r=0,323$, $P=0,001$). In conclusione i dati raccolti evidenziano che, come per le fumonisine, le più efficaci soluzioni per il controllo della moniliformina dipendono principalmente dalla possibilità di ridurre l'attività della piralide.

P29 IL VANTAGGIO DELL'IMPIEGO DELLO STANDARD INTERNO COMPLETAMENTE MARCATO ALL'ISOTOPO STABILE ¹³C NELL'ANALISI DELLE MICOTOSSINE IN LC-MS/MS

Schiess A., Jaunecker G., Häubl G., Prinster M.
Romer Labs Division Holding, Technopark, Tulln, Austria

La diffusione della tecnologia LC-MS/MS è in costante aumento. Sempre più laboratori ad oggi usano l'LC-MS/MS per le analisi di routine delle micotossine. Un problema legato a questo tipo di analisi è la presenza di componenti nella matrice analizzata che interferiscono nella ionizzazione degli analiti. L'efficienza di ionizzazione, quindi, può variare tra campioni di differenti matrici e i calibranti standard puri, da ciò consegue che gli spettri di massa abbiano differenti intensità di segnale. Per questo motivo nel calcolo della concentrazione il picco dell'analita presente nel campione non può essere comparato con la curva di calibrazione (fatta con standard calibratori puri). Per ovviare al problema dell'effetto matrice sulla ionizzazione deve essere utilizzato uno standard interno. Una possibilità è l'uso dello standard interno marcato dove un certo numero di atomi della molecola analita è rimpiazzato da un isotopo stabile dello stesso elemento. Un possibile isotopo può essere il ¹³C. Le micotossine marcate con il ¹³C devono avere le stesse caratteristiche delle analoghe molecole con il ¹²C: uguale tempo di eluizione e ritenzione in cromatografia. Quando la determinazione viene effettuata in spettrometria di massa, vengono determinate entrambe le forme eluite e possono essere separate grazie al diverso peso molecolare tra le micotossine ¹²C e ¹³C. Il picco corrispondente all'isotopo ¹³C rappresenta l'ammontare della micotossina marcata ¹³C aggiunta, che è noto e può essere usato per calcolare la concentrazione ignota della micotossina ¹²C. Usare come standard interno le micotossine marcate completamente con l'isotopo stabile ¹³C stabile comporta diversi vantaggi rispetto all'impiego degli standard interni deuterati (al ²H). Rimpiazzando il ¹³C con il ¹²C cambia di poco il peso molecolare, mentre usando il deuterio, la massa raddoppia e le micotossine deuterate mostrano tempi di ritenzione molto differenti rispetto all'analoga presente in natura, comportando risultati meno accurati. Quindi, i composti completamente marcati con ¹³C sono il migliore standard interno per la quantificazione delle micotossine.

P30 CONTAMINAZIONE DA DEOSSINIVALENOLO DELLE FRAZIONI DELLA DECORTICATURA DI GRANO TENERO

Sovrani V., Blandino M., Reyneri A., Scarpino V., Vanara F.
*Dipartimento di Agronomia, Selvicoltura e Gestione del Territorio, Università degli Studi,
Grugliasco, Torino*

La porzione corticale più esterna della granella dei cereali risulta essere quella in cui si concentrano contaminanti sintetici o naturali. Rispetto alla macinazione convenzionale, la decorticatura è un processo che permette, mediante abrasione, di rimuovere gradualmente le frazioni corticali. 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. 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 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% ed il rimanente 75% della granella corrispondente all'endosperma (25-100%). Ciascun campione è stato analizzato per il contenuto in DON (metodica LC-MS) e cadmio e piombo (UNI EN 14083, 2003). 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: 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%). In media il 64% della micotossina presente nella cariosside è stata trovata nelle frazioni 0-5% e 5-10%. Tra i metalli pesanti, il piombo non è stato trovato in nessuna delle frazioni analizzate, mentre il cadmio è stato ritrovato solo nella frazione più esterna (0-5%) delle cv. Bologna e Taylor. L'inserimento di una decorticatrice negli impianti molitori, con l'obiettivo di rimuovere le frazioni corticali più esterne della granella (10% circa in peso) può quindi contribuire a ridurre significativamente il rischio di contaminazione delle farine da DON e metalli pesanti.

AUTORI CONTRIBUTI

Abécassis J.; 26
Aimo C.; 20; 47
Alesso F.; 14; 54
Alfieri M.; 21
Altafini A.; 8
Amenduni C.; 15
Ammar K.; 64
Anichini L.; 42
Arletti P.; 50
Aureli G.; 12
Baccarini G.; 24
Baert K.; 5
Balconi C.; 21; 45; 46
Battilani P.; 10; 25; 57; 61
Battista N.; 15
Bellincontro A.; 37
Bello C.; 73
Belocchi A.; 12
Berardo N.; 21; 45; 46
Bernabucci U.; 37
Berretta S.; 52
Bertazzoni V.; 49
Bertuzzi T.; 6; 37; 71; 72
Biancardi A.; 20; 47
Bianco E.; 48
Bibi R.; 33
Binaglia M.; 5
Blandino M.; 16; 35; 75; 77
Bodda M.; 14; 54
Boi C.; 66
Bossi A.; 45
Brera C.; 3; 7; 10; 29; 38; 40; 41; 49; 50;
51
Brunetti A.; 15
Busico F.; 52
Camardo Leggieri M.; 10
Carcea M.; 26
Carrara M.; 45
Castiglioni M.; 51
Causin R.; 53
Celette F.; 26
Chiavaioli A.; 37
Ciacciarelli S.; 14; 54
Cini B.; 70
Cirlini M.; 25
Colombari G.; 72
Coluccia S.J.; 14; 54
Corte G.; 15
Cremaschini L.; 47
D'Egidio M.G.; 12; 64
Dall'Asta C.; 25; 36; 57; 61
Dall'Erta A.; 36
Danieli P.P.; 37
David C.; 26
De Girolamo A.; 31
De Pace R.; 55; 56
De Santis B.; 3; 7; 29; 38; 40; 41; 49; 50;
51
Debegnach F.; 7; 29; 38; 40; 41; 49; 50
Delahaut P.; 67
Delaini A.; 14; 54
Della Gatta S.; 67
Di Ianni S.; 7
Diana F.; 48; 74
Dona M.; 19
Donati C.; 11
Dossena A.; 36
Dubois D.; 26
Eskola M.; 5
Fabbri A.; 73
Facchinetti F.; 46
Fadda P.; 42
Falavigna C.; 57; 61
Fanelli C.; 25; 73
Fanelli F.; 58
Ferrieri F.; 15
Fiori M.; 38
Fiume F.; 15
Forapani S.; 24
Fragassi A.; 33
Franchino C.; 55; 56
Friedel J.K.; 26
Galardo S.; 19
Galaverna G.; 25; 36; 57; 61; 64

Gandini G.; 42
 Gatti M.; 50
 Giorni P.; 25
 Giuffrè F.; 59
 Gon F.; 74
 Grandi A.; 51
 Grandi F.; 51
 Granier B.; 67
 Gregori E.; 29; 38; 40; 41; 49; 50
 Gregori R.; 25
 Gunst L.; 26
 Hartings H.; 21
 Haübl G.; 76
 Hellou G.; 26
 Hiltbrunner J.; 26
 Huet A.C.; 67
 Intini N.; 15
 Jaunecker G.; 76
 Kunsagi Z.; 28
 Lafiandra D.; 64
 Laganà P.; 46
 Lampis G.; 60
 Lanzanova C.; 21; 45; 46
 Lattanzio V.M.T.; 67
 Lazzaro I.; 61
 Leonetti F.; 15
 Lippolis V.; 62; 67; 68
 Lo Greco F.; 15
 Locatelli S.; 21; 46
 Logrieco A.; 18; 58
 Macri A.; 19
 Maeder P.; 26
 Marzari R.; 48
 Mascheroni S.; 46
 Massi A.; 64
 Maurizi D.; 17
 Mauti T.; 52
 Mayer J.; 26
 Mazzinelli G.; 45
 Melloni S.A.; 12
 Mencarelli F.; 37
 Merlo V.; 66
 Messmer M.; 26
 Miraglia M.; 3
 Mondin M.; 53
 Montepeloso E.; 41
 Monti M.; 39
 Moretti A.; 10
 Morgante M.; 64
 Mosiello L.; 32
 Motta G.; 53
 Mulazzi A.; 71; 72
 Mulè G.; 58
 Narducci V.; 26
 Neri B.; 52
 Nigri A.; 50; 51
 Nivarlet N.; 67
 Palma M.; 15
 Pannunzi E.; 7; 29; 40; 41; 49; 50; 51
 Panza L.; 21; 45
 Paoloni A.; 33
 Paoluzzi E.; 48
 Parizia E.; 66
 Pascale M.; 62; 64; 68
 Pastorelli A.; 38
 Pecorelli I.; 33
 Peigné J.; 26
 Pellegrino L.; 66
 Pelligra S.; 14; 54
 Peppi O.; 42
 Perez E.; 70
 Piazza P.; 20
 Piccialuti M.; 23
 Pietri A.; 6; 37; 71; 72
 Piffanelli P.; 64
 Piro R.; 20; 47
 Prantera E.; 7; 40; 41; 49; 50; 51
 Prinster M.; 76
 Proctor R.; 61
 Quaranta F.; 12
 Rastelli S.; 71
 Redaelli R.; 21
 Reverberi M.; 25; 73
 Reyneri A.; 16; 35; 75; 77
 Ricci F.; 14; 54
 Robinson T.; 10
 Roncada P.; 8
 Ronchi B.; 37
 Rortais A.; 10
 Rosar G.; 48; 74
 Samson M.F.; 26
 Santoro T.; 15

Scala V.; 25
Scarpari M.; 73
Scarpino V.; 35; 75; 77
Scheda R.; 31
Schiess A.; 76
Schweitzer A.; 26
Scopel C.; 53
Sori F.; 8
Soricelli S.; 41; 51
Sovrani V.; 75; 77
Spinella K.; 32
Spisni P.; 24
Stacchini P.; 38
Stefenatti M.; 53
Stolze M.; 26
Surboeck A.; 26
Tallone L.; 66
Thatcher N.; 5
Thomsen I.K.; 26
Tilemachos G.; 10
Tonelli A.; 36
Torresani M.C.; 59
Torri A.; 21; 46
Toscano P.; 10
Tuberosa R.; 64
Ubaldi A.; 52
Valenzano S.; 62; 68
Valoti P.; 45
van del Fels-Klerx I.H.; 10
Vanara F.; 16; 35; 75; 77
Villani A.; 24
Visconti A.; 27; 31; 62; 67; 68
Vita V.; 55; 56
Vitali F.; 32
Zaghini A.; 8

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

Roma, aprile-giugno 2012 (n.2) 8° Suppl.