

LABORATORIO NAZIONALE DI RIFERIMENTO PER LE MICOTOSSINE: UN ANNO DI ATTIVITÀ (2008-2009)

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

Introduzione

Con lo scopo di assicurare un approccio armonizzato in materia di controlli ufficiali, il Reg. CE 882/2004 (1) stabilisce, fra le altre attività, che vengano nominati i Laboratori Comunitari di Riferimento (*Community Reference Laboratory*, CRL) per i mangimi e gli alimenti, che questi agiscano in maniera integrata con la rete dei Laboratori Nazionali di Riferimento (LNR) e che congiuntamente operino secondo procedure approvate internazionalmente con metodi di analisi validati.

I laboratori di riferimento comunitari e nazionali sono designati rispettivamente dalla Commissione Europea in base al Reg. CE 776/2006 (2) e dalle Autorità governative preposte di ciascuno Stato Membro in funzione della consolidata esperienza per i diversi settori di competenza nelle analisi di mangimi e alimenti. Il laboratorio comunitario di riferimento per le micotossine nei mangimi e alimenti è il *Joint Research Centre for mycotoxins* (JRC) sito a Geel (Belgio), mentre il Reparto Organismi Geneticamente Modificati e Xenobiotici di Origine Fungina del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare (DSPVSA), ex Centro Nazionale per la Qualità e per i Rischi Alimentari, è stato designato Laboratorio Nazionale di Riferimento per le micotossine dal Ministero della Salute in ottemperanza al Regolamento 882/2004.

Le attività di tali laboratori devono coprire tutti gli ambiti della normativa in materia di mangimi e di alimenti e di salute degli animali, in particolare quelli in cui vi è la necessità di risultati analitici e diagnostici altamente accurati. La elevata qualità e uniformità dei risultati analitici nell'ambito del controllo ufficiale è assicurata dalle attività di tali laboratori di riferimento comunitari e nazionali che sono chiamati a rendere disponibili metodi analitici validati, ad assicurare che siano disponibili materiali di riferimento, ad organizzare test comparativi interlaboratorio e non ultimo a garantire la programmazione periodica di piani di formazione del personale di laboratorio.

Attività

I compiti specifici che ciascun Laboratorio Nazionale deve assolvere, a supporto tecnico per la verifica della conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali sempre dinamico, sono specificati all'articolo 33 del Reg. CE 882/2004. Innanzitutto la collaborazione con il CRL-*Mycotoxin* che organizza nella sua sede di Geel periodicamente ogni anno riunioni plenarie con i laboratori nazionali degli altri Stati Membri Europei. In tale occasione è possibile confrontarsi con tutta la rete di laboratori nazionali europei, unitamente ad una consistente partecipazione di un numero di laboratori nazionali non europei che ha in questa sede la possibilità di rapportarsi con le realtà europee.

Oggetto di tali riunioni sono un puntuale aggiornamento sulle metodiche, la presentazione dei rapporti sui *proficiency test* organizzati ma, soprattutto, scambi su le più diverse problematiche analitiche che caratterizzano l'analisi delle micotossine. Durante i passati incontri al JRC di Geel con il CRL *Mycotoxins* e tutta la rete dei laboratori nazionali, sono stati discussi i risultati dei vari *proficiency testing* organizzati; sono state discusse le modalità di calcolo dei limiti di quantificazione e rivelazione analitico. Sono anche state presentate metodiche analitiche e strumentali specifiche in uso presso alcuni laboratori, come l'analisi di micotossine con la tecnica di cromatografia liquida con spettrometria di massa e l'analisi di Tricoteceni con tecniche elettrochimiche.

Un altro compito degli LNR è il coordinamento, nella loro sfera di competenza, delle attività dei laboratori ufficiali responsabili delle analisi del controllo ufficiale. Nelle sua veste istituzionale già da molti anni il Reparto Organismi Geneticamente Modificati e Xenobiotici di Origine Fungina ha istaurato con le realtà dei laboratori pubblici coinvolti nel controllo ufficiale, rapporti di collaborazione che si sono consolidati nel tempo; oggi anche come LNR-Micotossine, prosegue tale attività con la finalità di informare, formare e supportare le strutture di laboratorio a cui affiancare una reale attività di coordinamento in un momento cruciale di generale riorganizzazione di tutto l'impianto delle attività di controllo ufficiale degli alimenti e mangimi in Italia. L'attività di programmazione è iniziata con una prima riunione, tenutasi nel marzo 2009, che ha aperto un tavolo di comunicazione con gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS), i Laboratori periferici e le ASL e che proseguirà con appuntamento annuale. Durante la prima riunione si sono acquisite informazioni tecniche per avere informazioni generali sulla tipologia di strumentazione in dotazione e sui metodi di analisi in uso presso tali laboratori. Si è per questo distribuito un questionario per raccogliere non solo informazioni generali ma anche per fare esplicita richiesta riguardo le necessità e priorità per ciò che riguarda i *proficiency testing* o studi di validazione da organizzare.

Resoconto dei dati raccolti dalle risposte al questionario inviato agli IZS - marzo 2009

Strumentazione

Per quanto riguarda la strumentazione tutti gli IZS, tranne uno, dispongono di strumentazione per l'analisi in cromatografia liquida (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), cromatografia liquida-spettrometria di massa ed *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA).

I laboratori non preparano lo *slurry* del campione e preferiscono manipolare il campione a secco, macinandolo con strumentazione a disposizione del laboratorio.

Sistema di qualità

Tutti i laboratori hanno implementato un sistema qualità e il 67% dei laboratori è accreditato secondo la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005. I metodi accreditati riguardano l'analisi delle principali micotossine (Aflatossine totali, Aflatossina M₁, Ocratossina A, Zearalenone, Deossinivalenolo, Fumonisine) nei cereali e mangimi, principalmente.

I metodi accreditati prevedono l'analisi in HPLC ad eccezione di un 5% che viene eseguito in ELISA.

Tutti i laboratori accreditati utilizzano Materiali di Riferimento Certificati (*Certified Reference Material*, CRM) e carte di controllo per tenere sotto controllo il dato analitico; partecipano a circuiti FAPAS (*The Food and Environment Research Agency*) e studi

interlaboratorio per il controllo di qualità esterno. Tutti i laboratori calcolano il recupero per esprimere il risultato delle analisi.

Tutti i laboratori effettua il calcolo dell'incertezza di misura, solo il 33% valuta tale contributo secondo l'equazione di Horwitz.

Studi interlaboratorio

L'interesse maggiore espresso per gli studi interlaboratorio riguarda studi per: Aflatossina M₁ in latte; Fumonisine in mangimi/cereali; Aflatossina B₁ in *baby food*/frutta secca; Ocratossina A in caffè; Deossinivalenolo in mangimi/cereali.

Studi di validazione e studi interlaboratorio

Il Reparto Organismi Geneticamente Modificati e Xenobiotici di Origine Fungina da tempo organizza nell'ambito di progetti di ricerca studi di validazione di metodi per l'analisi di micotossine. A tal proposito si ricordano: i) lo studio di validazione per la determinazione della Ocratossina A in campioni di cacao in polvere (2004/2005) (3); ii) lo studio di validazione per la determinazione della Aflatossina B₁ nel mais (2006) (4); iii) lo studio interlaboratorio per la validazione di un metodo immunoenzimatico per la determinazione del Deossinivalenolo (DON) in campioni di grano tenero (2006/2007 e 2008/2009) (5); e infine, iv) lo studio interlaboratorio per la validazione di un metodo immunoenzimatico per la determinazione delle Fumonisine B₁ e B₂ in campioni di mais (2007/2008) (5).

Non potendo contare su risorse economiche dedicate, LNR-Micotossine ha sfruttato l'espletamento di attività legate a progetti di ricerca dell'anno 2009, per coinvolgere i laboratori del Servizio Sanitario Nazionale e laboratori privati nazionali e internazionali che si occupano di micotossine nell'organizzazione di due studi di collaborazione: i) uno studio interlaboratorio per la determinazione in HPLC dell'Ocratossina A in campioni di prosciutto crudo (risultati in fase di elaborazione); ii) uno studio per la validazione di un metodo immunoenzimatico per la determinazione del Deossinivalenolo (DON) in campioni di grano tenero (2008/2009).

Per l'anno 2010 è prevista l'organizzazione di due studi collaborativi su le matrici e le micotossine che saranno risultate di interesse nell'ambito delle riunioni con la rete del Sistema Sanitario Nazionale.

L'LNR si prefigge inoltre di offrire assistenza scientifica e tecnica all'Autorità Competente per l'attuazione di piani di controllo coordinati avendo finora partecipato alla stesura del:

- Piano Nazionale anno 2008 di Sorveglianza e di Vigilanza Sanitaria sull'Alimentazione degli Animali (PNAA 2008, 2009 e 2010)
- Piano Nazionale per la ricerca dei Residui negli animali e nei prodotti di origine animale anno 2008 (PNR 2008).

Accreditamento

Nel Regolamento di riferimento per le attività dei laboratori nazionali di riferimento si legge che "Le autorità competenti possono designare soltanto i laboratori che operano, sono valutati e accreditati conformemente alle seguenti norme europee:

- UNI CEI EN ISO/IEC 17025 su "Criteri generali sulla competenza dei laboratori di prova e di taratura";
- UNI CEI EN 45002 su "Criteri generali per la valutazione dei laboratori di prova";
- UNI CEI EN 45003 su "Sistemi di accreditamento dei laboratori di taratura e di prova - requisiti generali per il funzionamento e il riconoscimento".

L'LNR-Micotossine, al fine di fornire prestazioni e risultati analitici qualificati e riconosciuti in ambito nazionale e internazionale, opera in base allo sviluppo di una politica della qualità conforme alla suddetta norma per l'accreditamento dei laboratori di prova (UNI CEI EN ISO/IEC 17025) implementata già dal 2006 e oggi, l'LNR-Micotossine risulta nella lista dei laboratori accreditati del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare con numero n. 0779 da parte del SINAL (Sistema Nazionale Accreditamento Laboratori, oggi Sistema Italiano di Accreditamento, ACCREDIA).

I metodi analitici applicati dall'LNR-Micotossine ricadono tutti sotto il Sistema Gestione Qualità; fra questi alcuni sono accreditati mentre altri sono in fase di accreditamento. Sono riportati in elenco le prove accreditate che esegue l'LNR-Micotossine. Nella tabella 1 sono riportati la matrice, la micotossina determinata, i documenti di riferimento e le informazioni sullo stato di accreditamento.

Tabella 1. Metodi accreditati in uso nell'LNR per la determinazione delle micotossine

Materiale/prodotto/matrice	Denominazione della prova	Norma/metodo di riferimento
Mais e mangimi	Aflatossina B ₁	interno OG-Met,AF.IV/2006 (6)
Burro di arachidi, pasta di pistacchio	Aflatossine B ₁ G ₁ B ₂ G ₂	UNI EN 14123:2008
Latte e latte in polvere	Aflatossina M ₁	UNI EN 14501:2008
Grano e prodotti derivati	Ocratossina A	interno OG-Met,OTA.IV/2006 (estensione del metodo UNI EN14132:2003)
	Deossinivalenolo	interno OG-Met,DON-I/2006 (7)

Al fine di operare in conformità con la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 per mantenere il controllo di qualità esterno, il Laboratorio partecipa regolarmente ai programmi del FAPAS® (*Central Science Laboratory*, Sand Hutton, York, UK). Il reparto vanta la partecipazione a questo circuito da almeno quindici anni, garantendo sempre risultati molto soddisfacenti. Per l'anno 2008/2009 il laboratorio ha partecipato al circuito FAPAS® per l'analisi dell'Ocratossina A in baby food, nella paprika, nel caffè e nel vino; delle Aflatossine nel mais e nei mangimi; del Deossinivalenolo nella farina di grano (Tabella 2).

Tabella 2. Partecipazione ai circuiti FAPAS 2008-2009 e valori degli z-score ottenuti

Micotossina	Test FAPAS	Matrice	z-score
Ocratossina A	1772	alimenti per l'infanzia a base di cereali	0,5
	1773	paprika	0,6
	1775	vino	0,3
	1778	alimenti per l'infanzia a base di cereali	0,2
Aflatossine totali	4122	mais	0,2
	4124	mangime	1,0
	4133	fichi secchi	1,0
	4148	mais	0,7
Aflatossina M1	4146	latte	0,2
Deossinivalenolo	2247	farina di grano	0,5
	2259	farina di grano	0,6

L'LNRR partecipa costantemente anche all'attività organizzata dal Laboratorio Comunitario (CRL Mycotoxin JRC-Geel) per la validazione di metodi per le micotossine. Dietro il coordinamento del CRL-Mycotoxins, il Laboratorio ha partecipato a Proficiency Tests organizzati per i soli LNR europei quali quello organizzato per l'analisi del Deossinivalenolo nei cereali, l'Ocratossina A nei mangimi, la T-2 e HT2 nella farina di cereali, l'Ocratossina A nelle spezie, le Aflatossine nel burro di arachidi.

Sito web

Oggi qualsiasi attività di coordinamento che sia indirizzata sul territorio deve essere supportata con una interfaccia informatica aggiornata sia per dare visibilità che per assicurare una adeguata divulgazione delle attività e delle informazioni in generale. L'LNRR-Micotossine ha recentemente lanciato il suo sito (www.iss.it/mico) che è attivo presso il sito web dell'Istituto Superiore di Sanità con un *link* specifico. A causa della sua nuova istituzione, esso è in continua evoluzione per il suo miglioramento grazie al lavoro costante di aggiornamento e ottimizzazione realizzato dal personale del Reparto. Le sezioni attive sono:

- Chi siamo
- Attività di controllo
- Metodi di analisi
- Pubblicazioni
- Documenti
- Eventi
- Normativa
- Eventi
- IUPAC Mycotoxin Newsletter → (<http://www.iss.it/myconews>).

È prevista anche una sezione dedicata ai laboratori pubblici del sistema Nazionale con entrata riservata e controllata. La presenza di questo strumento dovrebbe facilitare lo scambio di informazioni fra i laboratori della rete del Sistema Sanitario Nazionale avendo come prime finalità quelle di aggiornare e condividere le informazioni in possesso e di armonizzare le procedure analitiche in tutto il territorio. Ad oggi l'accesso alla Area Riservata non è stato ancora avviato ma sarà predisposto quanto prima attraverso l'utilizzo di *username* e *password*.

Nel sito particolare rilievo ha la sezione *Mycotoxin Newsletter* a cui si può accedere anche direttamente (www.iss.it/myconews) che vuole rappresentare una finestra sulle attività che si svolgono sul tema delle micotossine a livello internazionale. In particolare in questa sezione sono raccolte informazioni tecnico-scientifiche, linee guida, pubblicazioni ed eventi congressuali di maggiore interesse a livello mondiale.

Bibliografia

1. Unione Europea. Regolamento (CE) 882/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali. *GUCE* L 165, 30 aprile 2004.
2. Unione Europea. Regolamento (CE) N. 776/2006 della Commissione del 23 maggio 2006 che modifica l'allegato VII del regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda i laboratori comunitari di riferimento. *GUCE* L 136, 24 maggio 2006.
3. Brera C, Grossi S, Miraglia M. Interlaboratory study for ochratoxin A determination in cocoa powder samples. *The Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2005;28(1):35-62.

4. Brera C, Debegnach F, Minardi V, Pannunzi E, De Santis B, Miraglia M. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxin B1 in corn samples: interlaboratory study. *Journal of AOAC International* 2007;90(3):765-72.
5. Brera C, Debegnach F, De Santis B, Pannunzi E, Berdini C, Prantera E, Miraglia M. Validazione di metodi immunoenzimatici per la determinazione delle micotossine in campioni di cereali. In: *Micotossine nei cereali. Risultati del progetto interregionale "MICOCER"*. Firenze: Accademia dei Georgofili; 2009. (Quaderni 2008-IV).
6. Stroka J, von Holst C, Anklam E. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of Aflatoxin B1 in cattle feed: collaborative study. *Journal of AOAC International* 2003;86:1179-86.
7. MacDonald SJ, Chan D, Brereton P. Determination of Deoxynivalenol in cereals and cereal products by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: interlaboratory study. *Journal of AOAC International* 2005;88:1197-204.