

I CONTAMINANTI: FROM FEED TO FOOD

**Presenza di micotossine nei prodotti di
origine animale**

Strategie per il controllo del carry-over

Cenni sulla normativa

SICUREZZA DEI PRODOTTI DI ORIGINE ANIMALE

Perché fra tutti i contaminanti, le micotossine hanno un ruolo particolarmente importante?

- **Recenti "emergenze" (aflatossina M1 nel latte")**
- **Normativa in continua evoluzione (più micotossine normate, limiti sempre più bassi)**
- **Conoscenze scientifiche in aumento riguardo agli effetti sull'uomo e sugli animali**
- **Strumentazione sempre più adeguata per analisi sempre più precise**
- **Mutamenti climatici (?)**

GRADUATORIA DEI RISCHI ALIMENTARI

(CHITWOOD, 1988)

RISCHI REALI (base epidemiologica)



1. Microbiologico
2. Nutrizionale
3. Sost.tossiche naturali
4. Inquinanti ambientali
5. Residui di pesticidi
6. Additivi alimentari

RISCHI PERCEPITI DALLA POPOLAZIONE



1. Additivi alimentari
2. Residui di pesticidi
3. Nutrizionale
4. Inquinanti ambientali
5. Microbiologico
6. Sost.tossiche naturali

IL GAZZETTINO

USL 8 Per il rischio di tossine

Latte sequestrato in un caseificio

Non c'è comunque allarme

Castelfranco

Il latte è a rischio tossine. Il primo sequestro di un certo quantitativo di latte destinato alla trasformazione è avvenuto, in questi giorni, in un caseificio rientrante sotto la giurisdizione dell'Usl 8. È probabile, però, che non si tratti del primo nel Veneto e, senza ombra di dubbio, non sarà l'ultimo. Sì, perché il fenomeno della presenza di tossine nel latte, con effetti cancerogeni e mutageni, costituisce una realtà diffusa o in corso di diffusione almeno in tre Regioni: il Veneto, la Lombardia, il Piemonte. Lo spiega il responsabile del Dipartimento di prevenzione dell'Usl 8 dottor Antonio D'Alba. "Per le particolari condizioni climatiche di quest'estate - spiega l'esperto - sul mais si sono sviluppati dei funghi che producono metaboliti tossici. Gli stessi vengono ingeriti dagli animali e possono passare nel latte da essi prodotto". I servizi veterinari delle varie usl sono, per questo, negli ultimi tempi in allarme. "Alla luce della particolare situazione - continua il dottor D'Alba - sono stati intensificati i controlli sulle produzioni a salvaguardia del consumatore. In un caseificio della zona, in particolare, si è scoperto che una partita di latte superava la quantità massima di tali sostanze prevista dal regolamento comunitario: 50 parti per trillione". Si tratta comunque, secondo D'Alba, di una concentrazione bassissima, se è vero che negli Usa sono ammesse fino a 500 parti per trillione. La questione è però d'obbligo, dati gli effetti cancerogeni delle tossine



assimilabili, come emerge da un paragone effettuato dallo stesso D'Alba, a quelli di tabacco e nicotina. Il caseificio in questione non è stato posto sotto sequestro: ci si è limitati all'eliminazione del latte incriminato. Sul fatto che si tratti o meno del primo caso nel Veneto e in provincia di Treviso, D'Alba aggiunge: "non mi sentirei proprio di dirlo. Sembra invece che si siano registrati altri fenomeni di positività in Regione. L'accaduto, comunque, non deve assolutamente preoccupare: rappresenta invece una testimonianza del fatto che i controlli ci sono". Nel caseificio in questione, il latte era arrivato dall'esterno e, in loco, ci si accingeva alla trasformazione. A spezzare la catena - che in questo caso avrebbe potuto essere dannosa, sono arrivati i veterinari. C'è da augurarsi ora che non si scateni uno stato d'allarme paragonabile a quello provocato, negli ultimi anni, da un altro fenomeno: i casi di mucca pazza.

Laura Bon

..... C'è da augurarsi che non si scateni uno stato di allarme paragonabile a quello provocato, negli ultimi anni, da un altro fenomeno: i casi di mucca pazza.

Laura Bon

MICOTOSSINE

Metaboliti secondari, tossici per gli animali superiori, prodotti da muffe che colonizzano gli alimenti.

Le micotossine non sono una classe chimica (difficoltà nella determinazione analitica)

La produzione è connessa alla crescita fungina (ma la presenza del fungo non è direttamente correlata alla presenza della micotossina e viceversa)

**Le micotossine sono presenti negli alimenti ed hanno effetti tossici a concentrazioni molto basse
Alcune sono "cancerogene"**

**FUNGHI TOSSIGENI RESPONSABILI
DELLA PRODUZIONE DI MICOTOSSINE NEGLI ALIMENTI**

Funghi	Micotossine prodotte
Genere ASPERGILLUS	
<i>A. flavus</i>	Aflatossine B1, B2, acido ciclopiazonico
<i>A. parasiticus</i>	Aflatossine B1, B2, G1, G2
<i>A. versicolor</i>	Sterigmatocistina
<i>A. ochraceus</i>	Ocratossina A, citrinina, acido penicillico
<i>A. clavatus</i>	Patulina, altre neurotossine

**FUNGHI TOSSIGENI RESPONSABILI
DELLA PRODUZIONE DI MICOTOSSINE NEGLI ALIMENTI**

Funghi	Micotossine prodotte
Genere PENICILLIUM	
<i>P. verrucosum</i>	Ocratossina A, citrinina
<i>P. expansum</i>	Patulina
Genere FUSARIUM	
<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. sporotrichioides</i>	Tricoteceni (DON, nivalenolo, diacetossiscirpenolo, tossina T-2), zearalenone
<i>F. verticilloides (moniliforme)</i> , <i>F. proliferatum</i>	Fumonisine
Genere CLAVICEPS	
<i>C. purpurea</i>	Alcaloidi (ergoline)

**NON TUTTI I FUNGHI COMPRESI NEI
GENERI E NELLE SPECIE INDICATI,
PRODUCONO SEMPRE MICOTOSSINE**

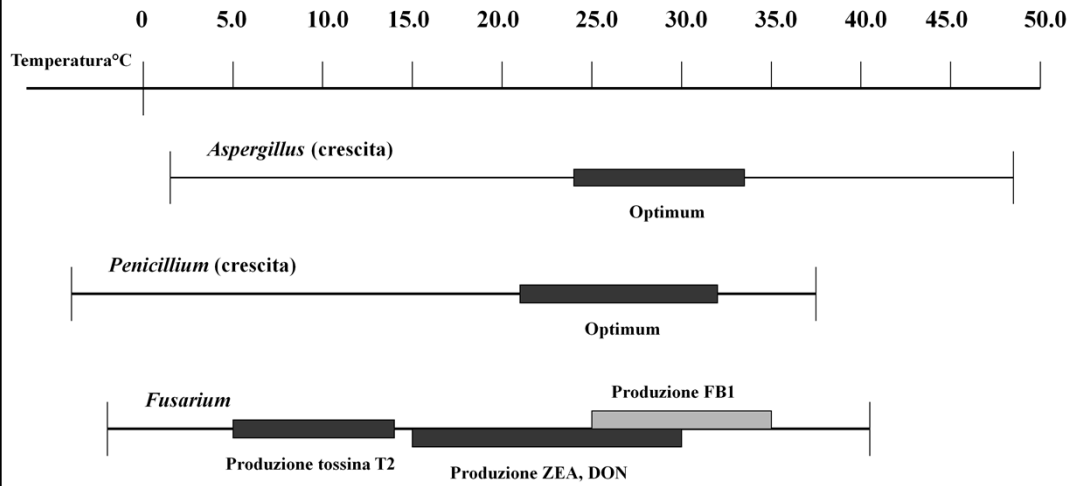
MA

**solo SPECIFICI CEPPI, all'interno di alcune specie,
riescono a produrre le sostanze in questione**

ED IN PIU'

**ciò può avvenire solamente se le CONDIZIONI
AMBIENTALI (temperatura ed umidità) sono
FAVOREVOLI a tali processi.**

TEMPERATURE DI CRESCITA OTTIMALE E POSSIBILE PER MUFFE COMUNEMENTE ASSOCIATE AD ALIMENTI PER ANIMALI



MICOTOSSINE: due ordini di problemi

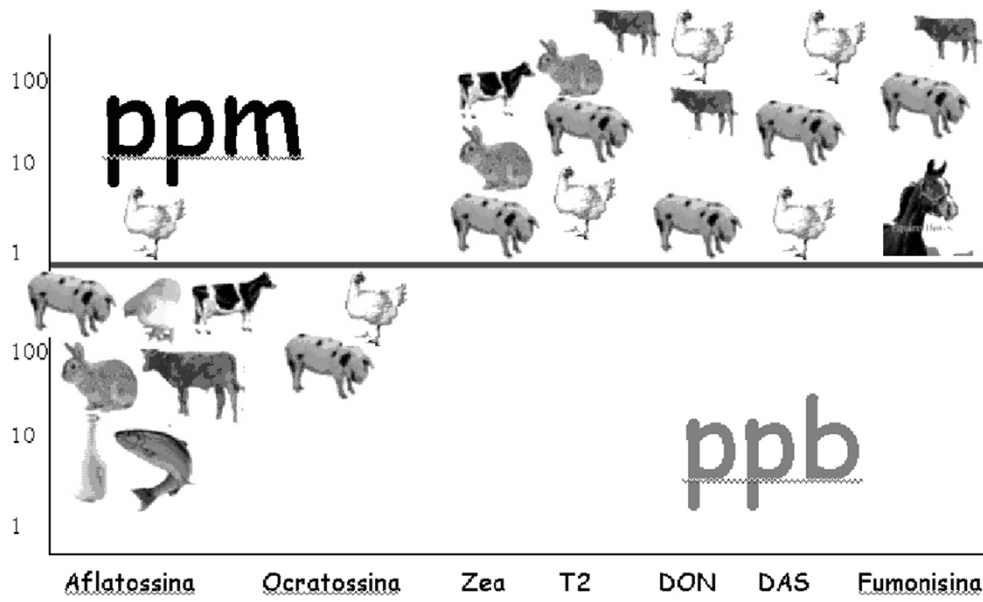
- 1) Tossicità per l'uomo**
 - per ingestione diretta
 - indiretta



- 2) Tossicità per gli animali**

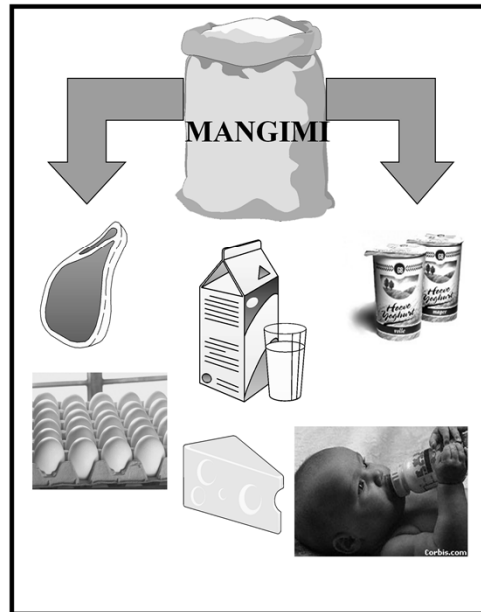
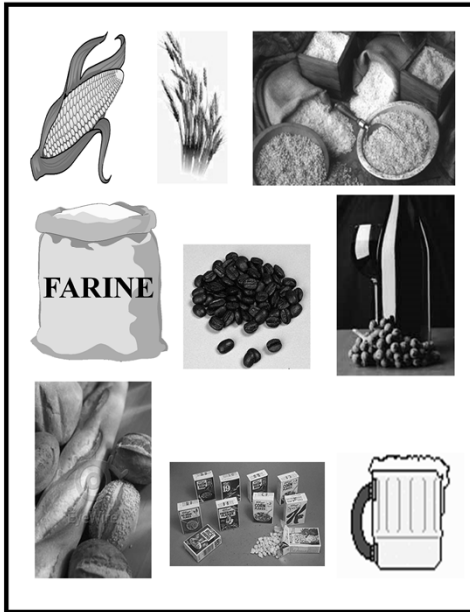


MICOTOSSINE: tossicità per gli animali



MICOTOSSINE

Tossicità per l'uomo



MICOTOSSINE: classi di pericolosità (IARC)

Gruppo	Micotossine	Pericolosità
1	Aflatossine B1, B2, G1 e G2	Accertati effetti cancerogeni per l'uomo
2B	Aflatossina M1, ocratossina A, fumonisine, tossina T2	Possibili effetti cancerogeni per l'uomo
3	Deossinivalenolo, zearalenone	Non classificabili per la cancerogenicità sull'uomo

AFLATOSSINE: tossicità per l'uomo

- **L'effetto tossico è dovuto al legame tossina-acidi nucleici, tossina-nucleoproteine che determina un indebolimento delle difese immunitarie, cancerogenesi (fegato, rene), teratogenesi.**
- **L'organo più colpito è il fegato con necrosi delle cellule epatiche e/o ingrossamento (colore grigiastro, struttura fibrosa, lobi allargati e bordi arrotondati).**
- **TDI = tolerable daily intake (quantità massima ingeribile giornalmente espressa in nanogrammi/kg di peso corporeo al giorno per un rischio di un caso di tumore per 10⁶ individui per anno)
TDI: per la B1= 0.014, per la M1=0.200**

AFLATOSSINE: alimenti a rischio per ingestione diretta

Gli alimenti maggiormente sottoposti alla contaminazione sono arachidi e derivati, mais e derivati, noci brasiliane, pistacchi, mandorle, fichi secchi, alcune spezie (peperoncino)...

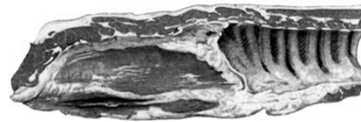


TRASFERIMENTO DELLE MICOTOSSINE FEED → FOOD

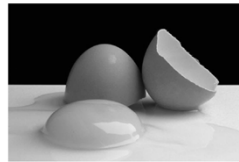
Alimento → LATTE



Alimento → CARNE



Alimento → UOVA



Prodotti di origine animale che possono essere contaminati da micotossine

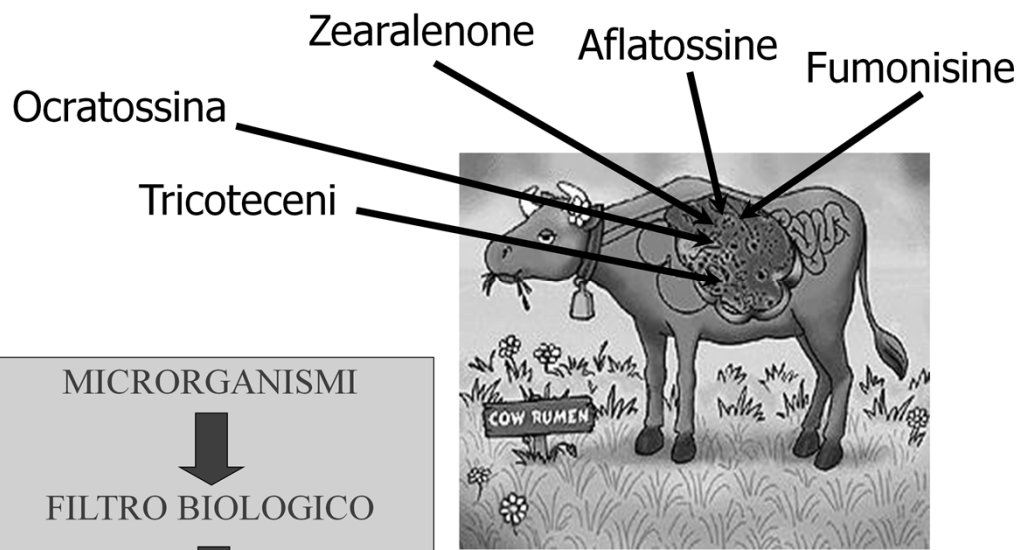
(Ratcliff, 2002)

Alimento	Micotossina	Livelli massimi riscontrato ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Latte vaccino	Aflatossina M1	0.33
Muscolo suino	Aflatossina B1	1.04
	Zearalenone	10.00
Fegato suino	Aflatossina B1	0.50
	Zearalenone	10.00
	Ocratossina A	98.00
Rene suino	Aflatossina B1	1.02
	Ocratossina A	89
Insaccati	Ocratossina A	3.4
Uova	Aflatossina B1	0.4

Micotossine attualmente normate nei prodotti di origine animale

Alimento	Micotossina	Livelli massimi ammissibili ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Riferimenti legislativi
Latte (latte crudo, latte destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte quali definiti dalla Direttiva 92/46/CEE)	Aflatossina M1	0.05	Reg. (CE) N. 1525/98 Reg. (CE) N. 446/01 Reg. (CE) N. 472/02 Reg. (CE) N. 1425/03 Reg. (CE) N. 2174/03 Reg. (CE) N. 683/04
Carne suina e prodotti derivati	Ocratossina A	1	G.U. n. 135 dell'11.06.99 (circolare Min. Sanità 09.06.1999 n.10)

MICOTOSSINE NEI RUMINANTI



MICROORGANISMI



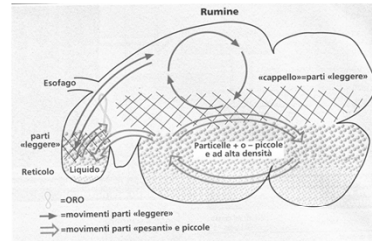
FILTRO BIOLOGICO



DETOSSIFICAZIONE

LE MICOTOSSINE NEI RUMINANTI

Nelle specie ruminanti, le micotossine devono resistere alle condizioni d'idrolisi e di anaerobiosi esistenti nel rumine per poter essere poi trasferite ai prodotti di origine animale



Alcuni m.o. (*Butyrivibrio fibrisolvens* ecc.) usano le micotossine come fonte di energia. Altri usano i metaboliti delle micotossine per il loro metabolismo (studi *in vitro*).

METABOLITI DELLE MICOTOSSINE PRESENTI NEL LATTE VACCINO

- ***Deossinivalenolo DON***
DOM-1, DON e DON glucuron-coniugato
- ***Ocratossina A***
OTA e OT α
- ***Zearalenone ZEA***
ZEA, α - β -ZEL e ZEA glucuron-coniugato
- ***Aflatossina B₁***
AFM₁ (AFB₁)

Relazione tra livello di aflatossina nella dieta e quantità di aflatossina nei tessuti edibili

Specie animale	Tessuto	Aflatossina	Alimento/tessuto
Vacche da latte	Latte	M1	75-40
Bovini da carne	Fegato	B1	14000
Suini	Fegato	B1	800
Pollo da carne	Fegato	B1	1200
Ovaiole	Uova	B1	2000

* Livello di aflatossina B₁ nella dieta diviso il tenore nello specifico tessuto

Tenori massimi consentiti per l'aflatossina B1 negli alimenti per gli animali

Direttiva della Commissione n. 2003/100/CE
Decreto Ministero Sanità 10 maggio 2004, n. 149 (G.U. 139 del 16/06/2004)

Mangimi	Contenuto max in mg/kg (ppm) di mangime al tasso di umidità del 12%
Tutte le materie prime per mangimi Mangimi completi e complementari per bovini, ovini e caprini (Ad eccezione di: animali da latte, vitelli e agnelli)	0.02
Mangimi completi per vitelli, agnelli e altre specie non contemplate	0.01
Mangimi completi e complementari per animali da latte e altre specie non contemplate	0.005

Valori di riferimento per le fusarium-tossine in prodotti destinati all'alimentazione degli animali
Raccomandazione della Commissione del 17 agosto 2006 2006/576/Ce

VALORI DI RIFERIMENTO

Micotossina	Prodotti destinati all'alimentazione degli animali	Valore di riferimento in mg/kg (ppm) di mangime al tasso di umidità del 12 %
Desossinivalenolo	Materie prime per mangimi (*)	
	— Cereali e prodotti a base di cereali (**) fatta eccezione per sottoprodotti del granoturco	8
	— Sottoprodotti del granoturco	12
	Mangimi complementari e completi, ad eccezione di:	5
	— mangimi complementari e completi per suini,	0,9
— mangimi complementari e completi per vitelli (< 4 mesi), agnelli e capretti	2	
Zearalenone	Materie prime per mangimi (*)	
	— Cereali e prodotti a base di cereali (**) fatta eccezione per sottoprodotti del granoturco	2
	— Sottoprodotti del granoturco	3
	Mangimi complementari e completi	
	— Mangimi complementari e completi per suinetti e scrofette (giovani scrofe)	0,1
	— Mangimi complementari e completi per scrofe e suini da ingrasso	0,25
— Mangimi complementari e completi per vitelli, bovini da latte, ovini (inclusi agnelli) e caprini (inclusi capretti)	0,5	
Ocratossina A	Materie prime per mangimi (*)	
	— Cereali e prodotti a base di cereali (**)	0,25
	Mangimi complementari e completi	
	— Mangimi complementari e completi per suini	0,05
— Mangimi complementari e completi per pollame	0,1	
Fumonisine B1 + B2	Materie prime per mangimi (*)	
	— Granoturco e prodotti derivati (**)	60
	Mangimi complementari e completi per:	
	— suini, equini (Equidi), conigli e animali da compagnia,	5
	— pesci,	10
	— pollame, vitelli (< 4 mesi), agnelli e capretti,	20
— ruminanti adulti (> 4 mesi) e visoni	50	

**Limiti per alcune *FUSARIUM*-TOSSINE
nel mais destinato ad alimentazione umana**

Tossina	Valore di riferimento in $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb)	Riferimento legislativo
Deossivalenolo	1750	Regolamento 856/2005/CE e il Regolamento 1881/2006/CE
Zearalenone	350	Regolamento 1126/2007/CE
Fumonisine B1+B2	4000	

PREVENZIONE DELLA CONTAMINAZIONE DA MICOTOSSINE NEL MAIS

(Racc. 2006/583/CE del 17 agosto 2006)

- **Scelta degli ibridi**
- **Effettuare concimazioni equilibrate**
- **Evitare stress idrici**
- **Limitare gli attacchi da insetti**
- **Limitare al massimo i danni meccanici**
- **Effettuare l'essiccamento tempestivamente**
- **Eventualmente trattare con antimuffa**
- **Essiccare il mais ad un tenore di umidità < 14%
(meglio 13%)**
- **Pulire accuratamente sili e locali di stoccaggio e
trattare le pareti con antifungini**

DECONTAMINAZIONE
(allontanamento delle parti contaminate)
DETOSSIFICAZIONE
(distruzione o inattivazione *in situ* delle micotossine)

❖ **Misure preventive**

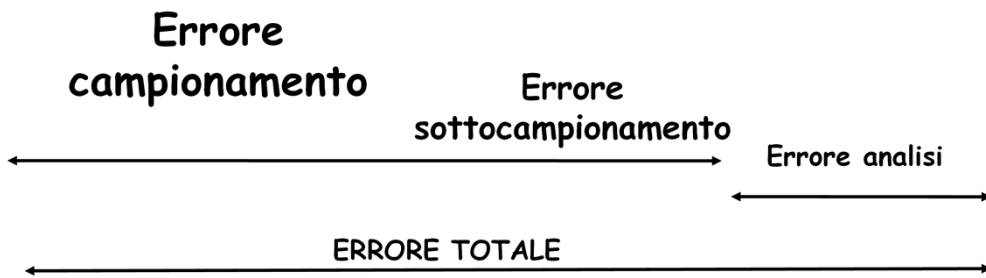
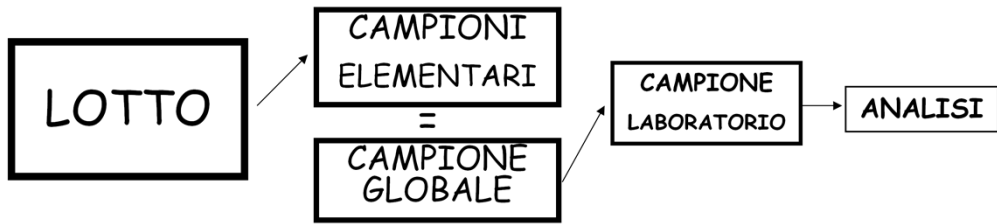
Non esiste un metodo per "decontaminare da micotossine" in generale perché sono sostanze molto eterogenee tra loro dal punto di vista chimico e fisico.

Vietata la miscelazione a scopo di diluizione di prodotti conformi con prodotti non conformi
(DL 10 maggio 2004, n. 149 art. 5)

ANALISI AFLATOSSINE

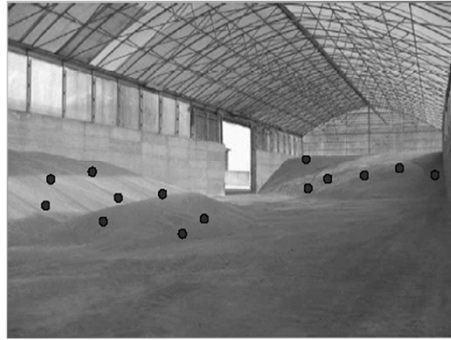
- Campionamento
- Preparazione del campione
- Scelta del metodo di analisi
- Estrazione
- Analisi ELISA o HPLC
- Interpretazione del report di analisi

CAMPIONAMENTO



CAMPIONAMENTO

- Problema: distribuzione non omogenea delle micotossine in alimenti solidi (campione dinamico, sul flusso)
- Metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari (Reg. (CE) n. 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006)



METODICHE ANALITICHE: saggi immunoenzimatici

ELISA (Enzyme Linked Immun Sorbent Assay)

- Vantaggi: ricerca di metaboliti in concentrazioni molto basse (ppt) in tempi brevissimi, con attrezzature relativamente semplici
- Errori di sovrastima ("falsi positivi")
- Errori "matrice-dipendenti"
- Nel caso della M1 nel latte, l'accuratezza del metodo ELISA è paragonabile a quella dell'HPLC per intervalli compresi tra 5 e 30 ppt (Biancardi et al., 1997).
- Nel caso di B1 negli alimenti c'è una maggior accuratezza dell'ELISA per concentrazioni relativamente alte (superiori a 5 ppb)

METODICHE ANALITICHE: analisi in HPLC

Determinazione aflatoossina

M1 nel latte:

- sgrassatura campione
- estrazione e purificazione su colonnine di immunoaffinità specifiche
- filtrazione
- lettura tramite HPLC con rivelatore a fluorescenza;

