

ANDAMENTO E GESTIONE DELL'ALLERTA AFLATOSSINA M1 NEL LATTE IN LOMBARDIA NEL 2013-2013

Zanardi G., Bolzoni G., Delle Donne G., Biancardi A., Piro R., Bertocchi L.

Key words: Aflatoxin M1, milk, food safety

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

SUMMARY: *Aim of this work is to describe the contamination trend and the management of the Aflatoxin M1 alert occurred in the second half of 2012 due to the drought conditions in the summer and the results of the surveillance carried out in 2013. At this regard we show the analytical data on 7.101 bulk tank milk samples, and 840 feed samples from about 1,000 dairy farms.*

Compared with feed bulk tank milk proved to be a suitable and cheap sampling tool to monitor contamination trend of the Aflatoxin M1. Moreover, it was very useful to verify the efficacy of the corrective measures put in place to remove the source of Aflatoxin M1.

INTRODUZIONE: L'aflatossina M1 (AM1) è la forma degradata a livello epatico dell'aflatossina B1 (AB1), metabolita secondario prodotto da funghi del genere *Aspergillus*, in particolare *A. flavus* e *A. parasiticus*, la cui replicazione è favorita dal clima caldo-umido. A causa degli effetti cancerogeni per l'uomo di AB1 e AM1, il Reg (CE) n. 1881/2006 stabilisce il limite massimo tollerato di AM1 negli alimenti, in particolare 0,050 µg/kg per il latte. Inoltre, la Dir. 2002/32/CE fissa i limiti di aflatossine nell'alimentazione animale, che nelle bovine da latte sono di 5 µg/Kg per i mangimi e di 20 µg/Kg per le materie prime.

L'estate del 2012 è stata caratterizzata da condizioni climatiche siccitose, che hanno favorito la contaminazione, la sopravvivenza e la replicazione fungina sul mais. Nel mese di agosto 2012, il sistema di sorveglianza per le aflatossine ha permesso di rilevare un incremento dei livelli di AB1 nella granella e farina di mais (sorveglianza in mangimificio) e di AM1 nel latte di massa (sorveglianza in allevamento). L'attivazione di procedure di controllo delle materie prime da parte dell'industria mangimistica e l'intervento tempestivo in azienda con la sospensione della somministrazione di cereali contaminati, affiancati dal monitoraggio continuo dei livelli di aflatossina M1 nel latte di massa, hanno consentito di tenere sotto controllo l'allerta sanitaria. Nel corso del 2013 la sorveglianza è stata mantenuta, sia sui mangimi sia sul latte di massa, al fine di evidenziare situazioni irregolari.

MATERIALI E METODI: Le analisi sul latte sono state eseguite con il kit diagnostico ELISA quantitativo "I'screen AFLA M1" (TECNA S.r.l., I). Nel periodo compreso tra agosto 2012 e luglio 2013, sono stati controllati 7.101 campioni di latte di massa, metà dei quali prelevati nel periodo di allerta nel 2012. Circa il 90% dei campioni sono stati esaminati in regime di autocontrollo dal produttore o dall'industria di trasformazione e il restante 10% deriva da controlli ufficiali nell'ambito del Piano Nazionale Residui o eseguiti in seguito a non conformità.

Il kit diagnostico presenta un campo di applicazione tra 0,005 e 0,100 µg/L (5 -100 ppt), LOQ di 0,005 µg/L (5 ppt), con un'incertezza di misura del 22,6%.

La ricerca di AB1 in cereali e mangimi è stata eseguita con un test di screening ELISA semiquantitativo "I'screen AFLA" (TECNA S.r.l.). Il campo di applicazione è 2 - 32 µg/Kg (ppb) con LOQ di 2 µg/Kg. Valori di AB1 superiori al 90% del limite prevedono la conferma con metodo cromatografico, HPLC e LC-MS/MS. Il metodo HPLC comporta un'estrazione del

campione con soluzione idrometanolica, seguita da purificazione mediante passaggio su colonnine di immunoaffinità (Easy-Extract Rhone Ltd.). Gli estratti sono derivatizzati con acido TFA e l'analisi è effettuata mediante RP-HPLC, con detector fluorimetrico (ex 365 nm, em 436 nm). Il metodo è stato oggetto di validazione inter-laboratorio. Il campo di applicazione è tra 2 e 60 µg/Kg, LOQ di 2 µg/Kg e l'incertezza di misura è del 37,2%.

Il metodo LC-MS/MS comporta un'estrazione del campione con soluzione idroacetonicitrica, seguita da purificazione mediante colonnine Mycosep 226 (RomerLab). L'analisi è effettuata mediante RP-HPLC, con detector MS/MS. Il campo di applicazione è fra 1 e 60 µg/Kg, LOQ di 1 µg/Kg e l'incertezza misura è del 21,1%.

RISULTATI E CONCLUSIONI: L'emergenza nazionale per AM1 occorsa nel 2003 ha attivato un sistema di sorveglianza sul latte di massa e sugli alimenti a base di mais, ufficiale e in autocontrollo, che ha permesso di rilevare tempestivamente la contaminazione nel 2012 e di intervenire per gestire l'allerta per la sicurezza alimentare.

Da agosto 2012 a luglio 2013 sono stati analizzati 7.101 campioni di latte di massa riferibili a circa 1.000 allevamenti lombardi. Nello stesso periodo sono stati esaminati 956 campioni di alimenti zootecnici, di cui 840 per bovine da latte. Il campionamento è stato di convenienza, poiché condizionato dalla necessità di autocontrollo dei produttori con frequenze plurime nel periodo considerato. Inoltre, i campioni conferiti si sono selezionati nel tempo, perché riguardanti il monitoraggio di allevamenti "problema", caratterizzati da contaminazioni più elevate, o di quelli che verificavano i valori di AM1 in seguito a modifiche della razione alimentare.

La figura 1 presenta il numero di campioni di latte analizzati nell'arco di un anno, suddiviso per mese, e la curva di tendenza della positività per AM1. Il picco di campioni irregolari si è riscontrato in settembre-ottobre (18,8%-14,7%), per poi diminuire intorno al 10% a fine 2012. La sorveglianza svolta nel 2013 su circa 500 campioni/mese ha mostrato un andamento costante di campioni irregolari con valori intorno al 9-13% e un picco del 14,7% in febbraio.

La figura 2 mostra il trend di contaminazione del latte, espresso come valore medio di AM1, che conferma il picco di contaminazione di 0,049 µg/L nel settembre 2012 ed evidenzia la sua stabilizzazione intorno a valori di 0,030 µg/L da novembre 2012 a maggio 2013, con un altro picco moderato di 0,034 µg/L a febbraio e una diminuzione sotto gli 0,030 µg/L nel bimestre giugno-luglio.

La figura 3 mostra il numero di campioni di alimenti zootecnici analizzati, suddiviso per mese, e la curva di tendenza della loro positività per AB1. Il picco di positività a settembre 2012 (9%) corrisponde a quello del latte. Il profilo della curva in seguito si presenta fluttuante nel tempo con percentuali di positività inferiori al latte. La figura 4 mostra il trend medio dei valori di contaminazione di AB1 nelle materie prime e nei mangimi. Si evidenzia come il valore medio di AB1 nei mangimi si sia stabilizzato intorno a 2,5 µg/Kg dopo un primo picco di 4,2 µg/Kg in agosto 2012.

Figura 1. Andamento della positività per AM1 su 7.101 campioni di latte.

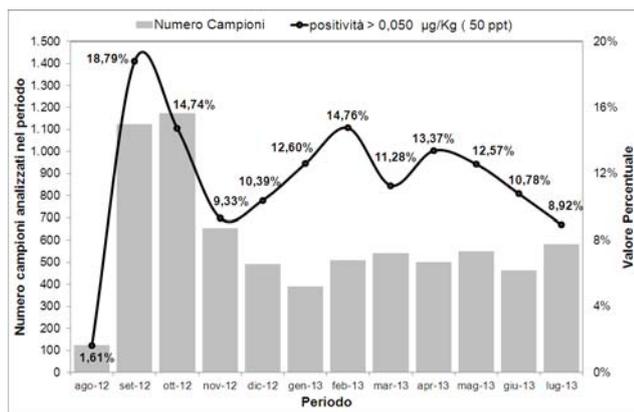


Figura 2. Andamento del valore medio di AM1 su 7.101 campioni di latte.

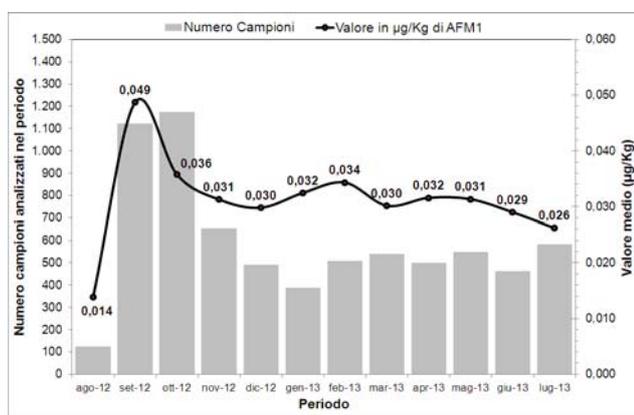
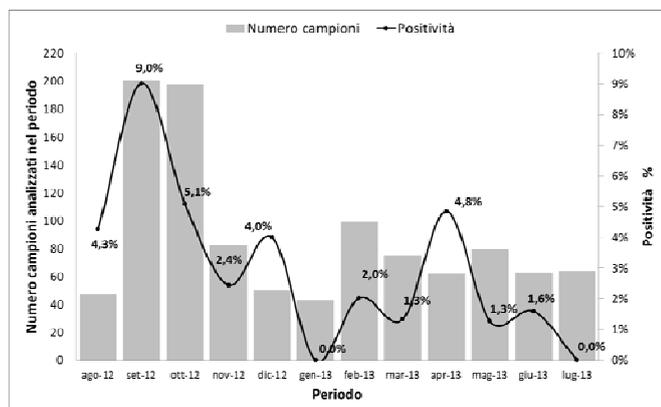
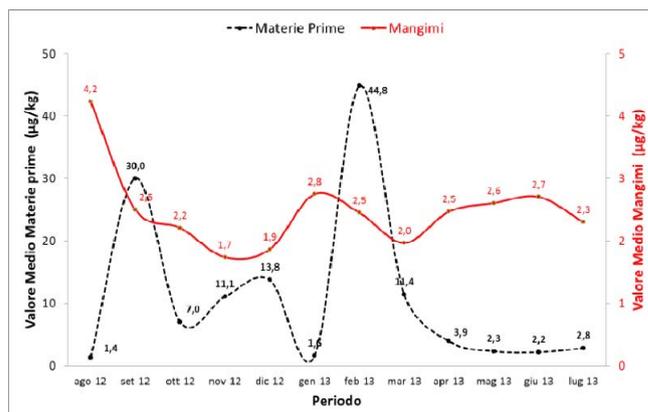


Figura 3. Andamento della positività per AB1 su 956 campioni di materie prime e mangimi.



Viceversa, l'andamento nelle materie prime ha evidenziato due picchi a settembre 2012 (30 µg/Kg) e febbraio 2013 (44,8 µg/Kg), coincidenti con i picchi rilevati nel latte, per poi decrescere e stabilizzarsi intorno a valori di 2-4 µg/Kg. Questa dinamica nel latte e negli alimenti zootecnici differisce da quella che ha caratterizzato l'emergenza del 2003 (1). Nel 2003 la curva epidemica fu caratterizzata da un picco rapido ed elevato con una diminuzione altrettanto veloce dei valori fuori norma. La contaminazione del mais, inoltre, non

Figura 4. Andamento del valore medio di AB1 su 840 campioni di materie prime e mangimi per bovine da latte.



era diffusa a tutto il territorio nazionale, per cui la sostituzione del mais contaminato nella razione alimentare aveva normalizzato rapidamente i valori di AM1 nel latte.

Nel 2012 si è verificato un incremento altrettanto rapido dei valori di AM1 nel latte, con diversi picchi di valori meno elevati rispetto al 2003, che sono diminuiti lentamente nell'arco di un anno, stabilizzandosi intorno su valori medi di 0,030 µg/L, con sporadici casi di contaminazione molto elevate. Questo differente andamento può essere giustificato dal fatto che lo stress idrico ha interessato quasi tutto il territorio nazionale, compromettendo tutto il raccolto di granella e parte dei trinciati e pastoni di mais. Inoltre, la pianta è stata precocemente attaccata dal fungo con produzione di aflatoxina all'interno delle cariossidi in fase di sviluppo. Ciò ha comportato la presenza di aflatoxina già a livello d'insilato e nella cariosside matura, rendendo poco efficaci le procedure di pulizia, vagliatura e spazzolatura applicate dai mangimifici per abbattere la contaminazione nella produzione di farine e granella di mais (2). In una prima fase, perciò, la de-contaminazione del latte è stata raggiunta con la sostituzione del mais e suoi derivati contaminati con altre fonti amilacee. Nel 2013 la necessità di contenere i costi ha portato alla gestione del mais contaminato, sotto i limiti di legge, attraverso la sua miscelazione con mais privi di aflatoxine. I successivi autocontrolli del latte prodotto sono stati mirati a stabilire la quantità idonea per rispettare i limiti normativi di AM1. La stabilizzazione del valore medio di AM1 intorno a 0,030 µg/L è un indicatore di questa gestione e di una contaminazione di fondo elevata.

La disomogenea distribuzione della AB1 negli alimenti zootecnici e la conseguente carenza di rappresentatività nel campionamento sono fattori da considerare nella fluttuazione dei valori rilevati. Ciononostante, una connessione tra l'alimentazione animale e la contaminazione del latte è stata evidenziata, soprattutto da agosto 2012 a febbraio 2013. Nel proseguimento del 2013 alimenti già analizzati in precedenza e risultati contaminati sono stati ri-utilizzati nelle razioni alimentari, spiegando in parte la differenza nel rumore di fondo di positività evidenziate nel latte rispetto ai mangimi e alle materie prime.

BIBLIOGRAFIA: 1) Bertocchi L, Biancardi A, Boni P, Bonacina C. (2004). "Emergenza aflatoxine nella provincia di Brescia: esperienza di campo". *L'Osservatorio*, anno 7, n.1, 4-13
2) Fusi F, Scalvenzi A, Angelucci A, Bolzoni G, Bertocchi L. "Aflatoxina/2: La fase di allerta non può dirsi conclusa". *Informatore Zootecnico* (Edagricole) LX (9), 54-60.