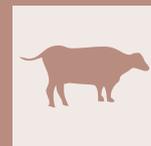


Risultati delle analisi dell'autocontrollo per la contaminazione da Aflatossina M1 nel latte in Lombardia



G. BOLZONI, G. ZANARDI, L. BERTOCCHI, G. DELLE DONNE

Centro di Referenza Nazionale per la Qualità del Latte Bovino - Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna - Brescia - Italy

RIASSUNTO

Aspergillus flavus e *A. parasiticus* sono i principali funghi responsabili della produzione di aflatossine nei vegetali e le condizioni climatiche sono il principale fattore condizionante la loro presenza finale in mangimi e alimenti. La Commissione Europea ha stabilito i livelli massimi di presenza aflatossine nei prodotti alimentari (Reg. CE N. 1881/2006): nel latte il limite per Aflatossina M1 è di 0,050 µg/kg. In regione Lombardia è stato inoltre definito il limite di 0,030 µg/kg per il latte crudo per la vendita diretta (CIR/19/SAN 2007 Lombardia e seguenti). Scopo del lavoro è quello di presentare i risultati dei controlli eseguiti su campioni di latte prodotto in Lombardia nel periodo agosto 2012 al febbraio 2013, con kit ELISA "I'screen AFLA M1" (TECNA S.r.l., I), in regime di autocontrollo da parte di produttori e industria di trasformazione. Dei 4.977 campioni analizzati, circa 400 sono rappresentati da latte crudo destinato alla vendita diretta al consumatore. Le osservazioni realizzate, pur non avendo i criteri di campionamento statisticamente rappresentativo, mostrano un incremento del livello medio di contaminazione e della percentuale di non conformità nel periodo estivo 2012, a seguito delle condizioni climatiche sfavorevoli verificatesi in questo periodo. I risultati ottenuti permettono un confronto con l'episodio ben più intenso osservato nel 2003. Il monitoraggio continuo e ripetuto della contaminazione del latte da Aflatossina M1 rappresenta sicuramente il miglior strumento di controllo di questo fenomeno a livello d'allevamento così come quello della B1 nelle partite di materia prima lo è nell'industria mangimistica.

PAROLE CHIAVE

Latte, Aflatossina M1, sicurezza alimentare, autocontrollo.

INTRODUZIONE

Le aflatossine sono micotossine prodotte da due specie di *Aspergillus*, un fungo diffuso nelle aree caratterizzate da un clima caldo e umido. L'esposizione attraverso gli alimenti a questi contaminanti deve essere il più possibile limitata poiché alcune aflatossine possono svolgere azioni genotossiche e cancerogene in funzione della dose e del periodo di assunzione.

Le aflatossine possono essere presenti in vari prodotti alimentari, quali frutta secca, cereali, spezie, frutta a guscio, conseguentemente a contaminazioni fungine avvenute prima o dopo la raccolta. Tra i differenti tipi di aflatossine presenti in natura, la B1 (AFB1), prodotta sia dall'*Aspergillus flavus* che dall'*Aspergillus parasiticus*, è la più diffusa nei prodotti alimentari. Nel latte dei mammiferi è presente il suo principale metabolita, l'aflatossina M1 (AFM1)^{1,2,3,4}.

Per il controllo di questo contaminante l'Unione Europea, con il Reg. CE 1881/2006⁵ e la Dir. 2002/32/CE⁶, ha introdotto misure di controllo e limiti di tolleranza, allo scopo di ridurre la probabilità di esposizione dei consumatori.

Già nel 2004, in seguito all'emergenza che ha interessato alcuni Paesi Europei dopo l'estate eccezionalmente siccitosa dell'anno precedente, un parere EFSA definiva i livelli massi-

mi accettati di Aflatossina B1 nei mangimi, come ragionevolmente protettivi per la salute delle specie animali bersaglio ed anche preventivi di concentrazioni indesiderabili dell'AFM1 nel latte⁷.

Anche nell'estate del 2012, si sono verificate condizioni climatiche idonee allo sviluppo fungino nelle coltivazioni della pianura Padana, in particolare nel mais destinato all'alimentazione animale sia tramite gli insilati che per la produzione di granella e farine^{8,9,10,11}. Già nel mese di agosto, le analisi routinarie di monitoraggio realizzate presso i laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Lombardia ed Emilia Romagna (IZSLER), fornivano l'evidenza dei primi incrementi di AFM1 nel latte e venivano pertanto attivate le procedure di controllo sulle partite di materia prima utilizzate nell'industria mangimistica per l'AFB1 e quelle di verifica sul latte per l'AFM1^{12,13}.

I risultati sono confrontati con il limite di 0,050 µg/kg (50 ppt) vigente per il latte destinato alla trasformazione (Reg. CE 1881/2006) e quello di 0,030 µg/kg (30 ppt) stabilito a livello regionale per il latte crudo destinato alla vendita diretta (CIR/19/SAN 2007 Lombardia e seguenti)¹⁴.

MATERIALI E METODI

Le analisi sono state eseguite con il kit diagnostico ELISA quantitativo "I'screen AFLA M1" (TECNA S.r.l., I) presso il Reparto di Produzione Primaria dell'IZSLER, su campioni di latte di massa aziendale conferiti da produttori o aziende ca-

Autore per la corrispondenza:
Giuseppe Bolzoni (giuseppe.bolzoni@izsler.it).

suarie in applicazione dei rispettivi sistemi di autocontrollo nel periodo compreso tra settembre 2012 e febbraio 2013. A questi si aggiungono, per il periodo settembre - dicembre 2012, campioni ufficiali prelevati dai Servizi Veterinari delle ASL in applicazione del piano Regionale di controllo del latte crudo destinato alla vendita diretta.

Il kit I'screen AFLA M1, secondo il metodo di prova interno accreditato adottato, presenta: campo di applicazione tra 0,005 e 0,100 µg/L (5-100 ppt), LOD di 0,0025 µg/L e LOQ di 0,005 µg/L (5 ppt) con un'incertezza di misura del 22,6% secondo il protocollo di validazione realizzato dall'IZLER¹⁵. Sono esclusi invece i campioni ufficiali prelevati in applicazione di altri piani (ad esempio PNR) o realizzati in conseguenza delle segnalazioni di non conformità, per i quali è prevista l'eventuale analisi di conferma con metodica HPLC, di competenza di altro Laboratorio dell'IZSLER^{16,17,18}.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I campioni analizzati sono stati complessivamente 4.977 e riguardano circa un migliaio di allevamenti nel territorio lombardo; di questi circa 400 riguardavano il controllo del latte crudo destinato alla vendita diretta, i cui produttori sono in genere anche fornitori dell'industria casearia attraverso la normale compravendita del latte.

La Figura 1 riporta il numero dei campioni analizzati e l'andamento delle positività per AFM1 rispetto al limite normativo; la maggior percentuale di positività, non correlata al numero di campioni analizzati, si osserva nel mese di settembre. Dal punto di vista relativo, le percentuali di campioni positivi appaiono massime nel periodo settembre-ottobre con una successiva punta in gennaio 2013.

Ulteriore indicazione del trend della contaminazione è fornita in Figura 2, nella quale il valore medio di AFM1, conferma il picco del mese di settembre ed il successivo calo di ottobre con stabilizzazione nei mesi successivi.

Per quanto riguarda i campioni ufficiali di latte destinato alla vendita diretta, le risultanze analitiche e l'andamento del-

le non conformità sono presentati nelle Figure 3 e 4, rispetto al limite massimo di 30 ppt^{19,20}.

Le maggiori percentuali di positività, non correlate al numero di campioni analizzati, sono concentrate nella prima metà di ottobre. Il periodo più critico è risultato, anche in questo caso, a cavallo tra settembre e ottobre anche se, proprio per il limite più ristretto, il rientro nella conformità appare nel complesso più lento. L'imposizione di un limite restrittivo per il latte crudo per vendita diretta è dettata dal fatto che esso giunge direttamente al consumatore senza la "fisiologica" diluizione con latte di altri allevamenti che caratterizza invece la normale via commerciale (cisterna di raccolta, silos di stoccaggio, affioratori etc.).

Considerata la maggior entità del rischio finale per il singolo consumatore^{3,21,22,23}, il controllo dell'AFM1 era stato programmato, già negli anni precedenti, proprio per il periodo autunnale che, nelle condizioni climatiche padane, è quello a maggior rischio.

È importante evidenziare che ambedue queste valutazioni sono condizionate dai campioni conferiti che, poiché prelevati in sede di autocontrollo, non costituiscono un campione statisticamente significativo né rappresentativo in senso stretto della situazione generale. Influiscono su questo aspetto, ad esempio, il fatto che alcuni allevamenti hanno conferito al laboratorio più campioni a distanza di pochi giorni, oppure hanno utilizzato altri laboratori in differenti periodi. Con l'andare del tempo, infatti, l'insieme dei campioni conferiti tendeva a selezionarsi coinvolgendo quelli con contaminazioni più elevate o che realizzavano verifiche dopo interventi di modifica della razione alimentare.

È possibile valutare un confronto tra le due tipologie di campioni (Figura 5) dal quale si evidenzia che i campioni di latte crudo per vendita diretta hanno presentato in genere un livello di contaminazione inferiore; anche i rari casi di contaminazioni estremamente elevate sono risultati meno frequenti in questa tipologia di campioni: circa 1% per i campioni con contenuto di AFM1 > 100 ppt rispetto a frequenze variabili dall'1,34 al 5,93 %, per i campioni in autocontrollo (dati non pubblicati). Considerata la differenza quan-

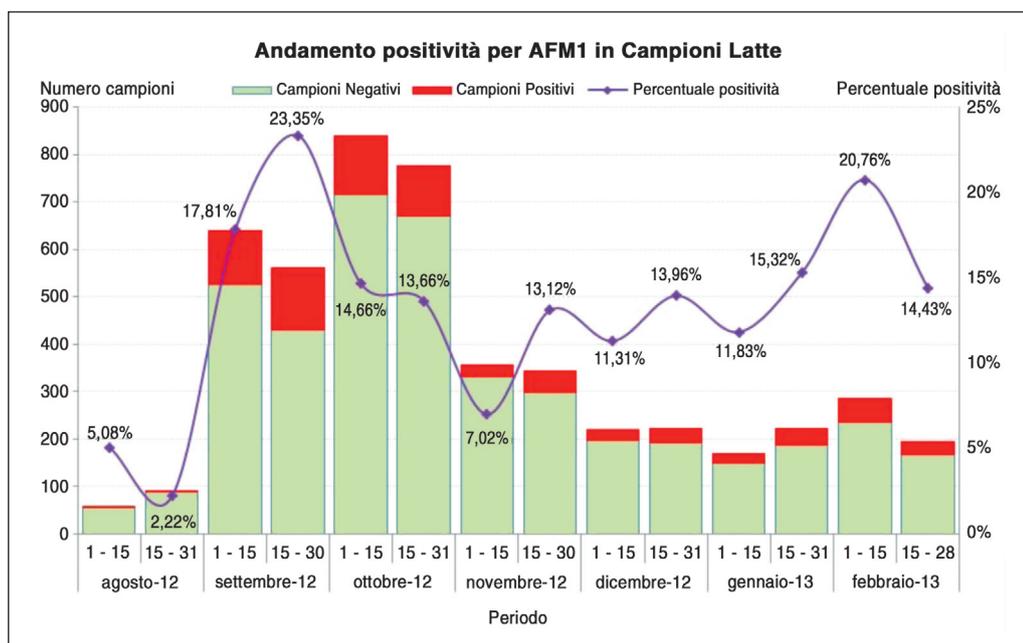


Figura 1
Andamento campioni e positività per Aflatossina M1.

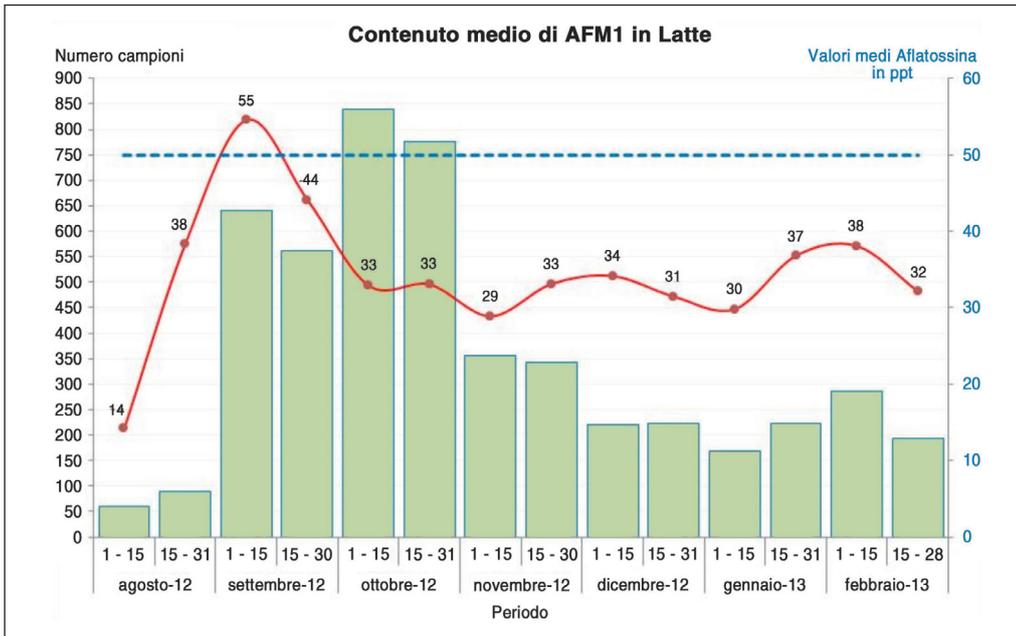


Figura 2
Andamento del contenuto di Aflatoxina M1 in ppt e limite legale (50 ppt).

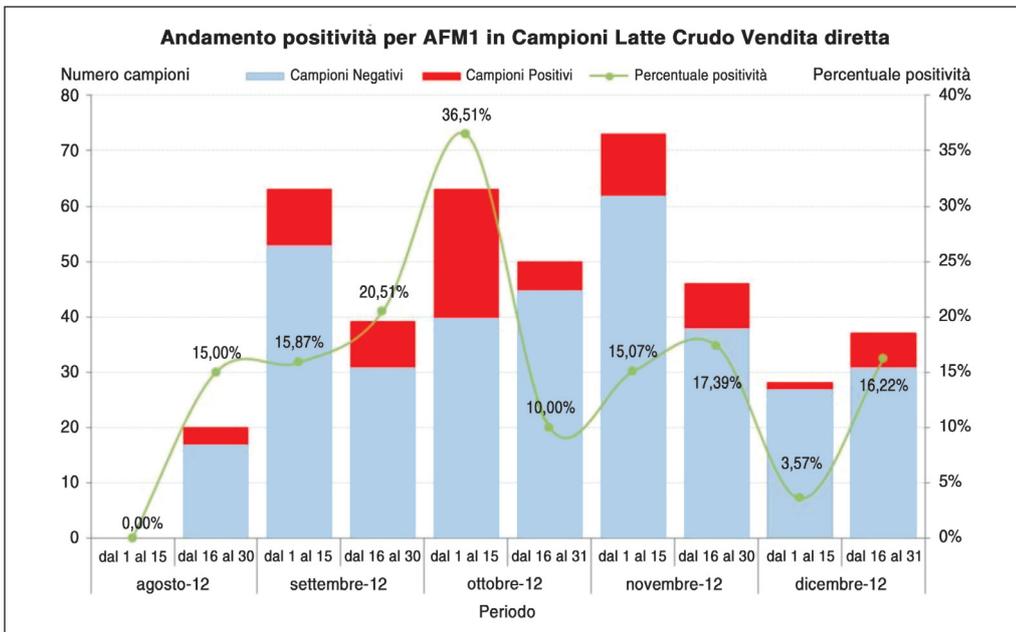


Figura 3
Andamento del contenuto di Aflatoxina M1 in campioni Latte Crudo Vendita diretta.

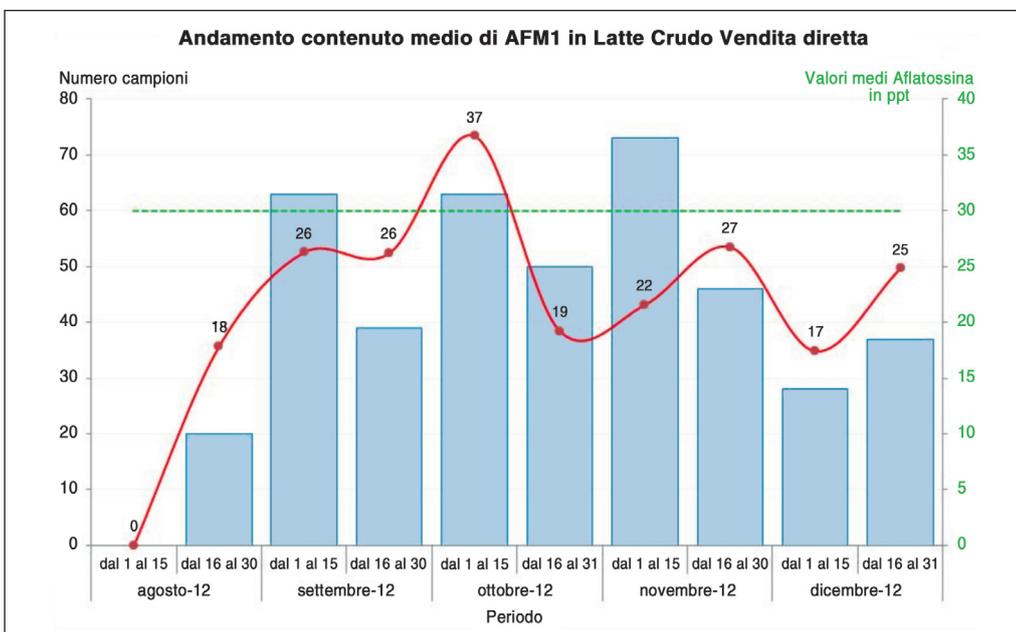


Figura 4
Andamento medio di Aflatoxina M1 in ppt in Latte crudo per vendita diretta e limite legale (30 ppt).

titativa delle osservazioni e la mancanza di rappresentatività statistica dei campioni rispetto alla realtà complessiva regionale, si può soltanto ipotizzare che, almeno in via teorica, l'esistenza di un limite più restrittivo abbia "costretto" i produttori di latte crudo vendita diretta a interventi correttivi anche quando il loro prodotto presentava tenori di AFM1 che ne permettevano la commercializzazione "normale". Riteniamo interessante sottolineare che questo episodio di contaminazione, sembra presentare una dinamica diversa da quella osservata nel 2003; in quell'anno l'incremento fu molto rapido, inatteso e molto intenso, ma il rientro a valori di normalità fu estremamente veloce tanto che, già nei primi mesi dell'anno successivo i livelli medi di contaminazione tendevano a riallinearsi con quelli pre-emergenza (Figura 6). Nell'attuale episodio, dopo l'incremento altrettanto rapido

ma meno intenso di settembre, atteso grazie al monitoraggio continuo messo in atto negli ultimi anni, il calo della contaminazione è apparso meno rapido e risolutivo. Ancora nei mesi invernali si registra un livello medio "non normale" se confrontato con quello degli anni precedenti; non mancano sporadici casi di contaminazione molto elevate. Le cause di questa diversa situazione possono ovviamente essere molteplici e di diversa natura ed è pertanto soltanto in forma d'ipotesi che si può considerare quanto segue. L'episodio 2012 si è caratterizzato per un breve periodo d'intensa siccità nel mese di luglio che ha bloccato le possibilità d'irrigazione in gran parte del territorio nazionale, rispetto a quello molto prolungato del 2003. La contaminazione delle cariossidi, nel caso attuale, è quindi avvenuta già in campo in fase di sviluppo.

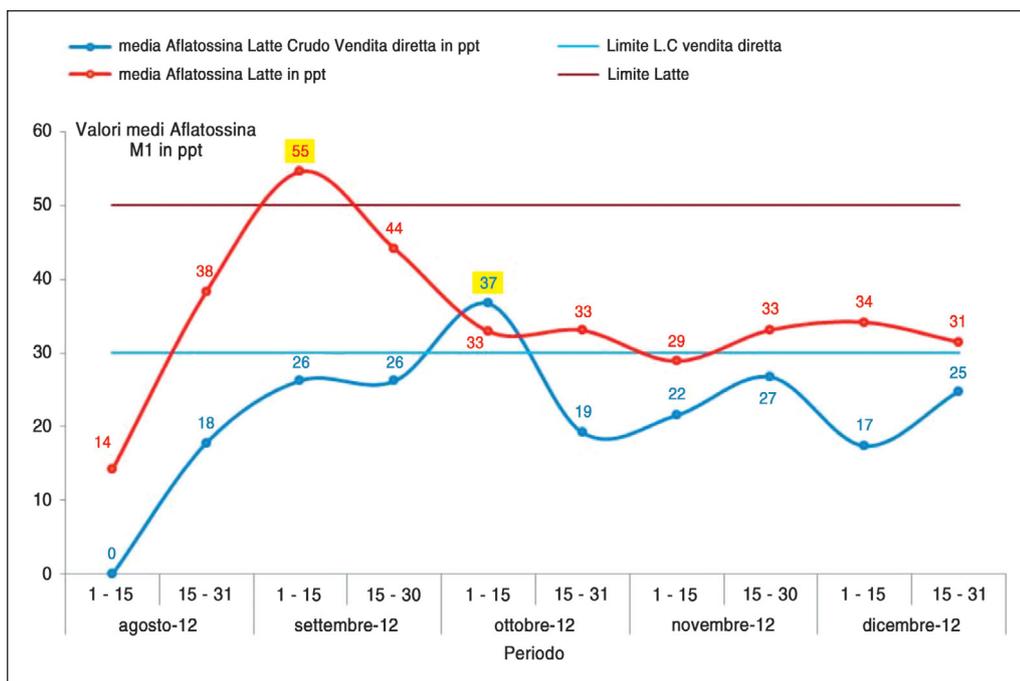


Figura 5
Confronto andamenti medi del contenuto di Aflatossina M1 in latte, evidenziati i livelli oltre valore limite per le due categorie merceologiche di latte.

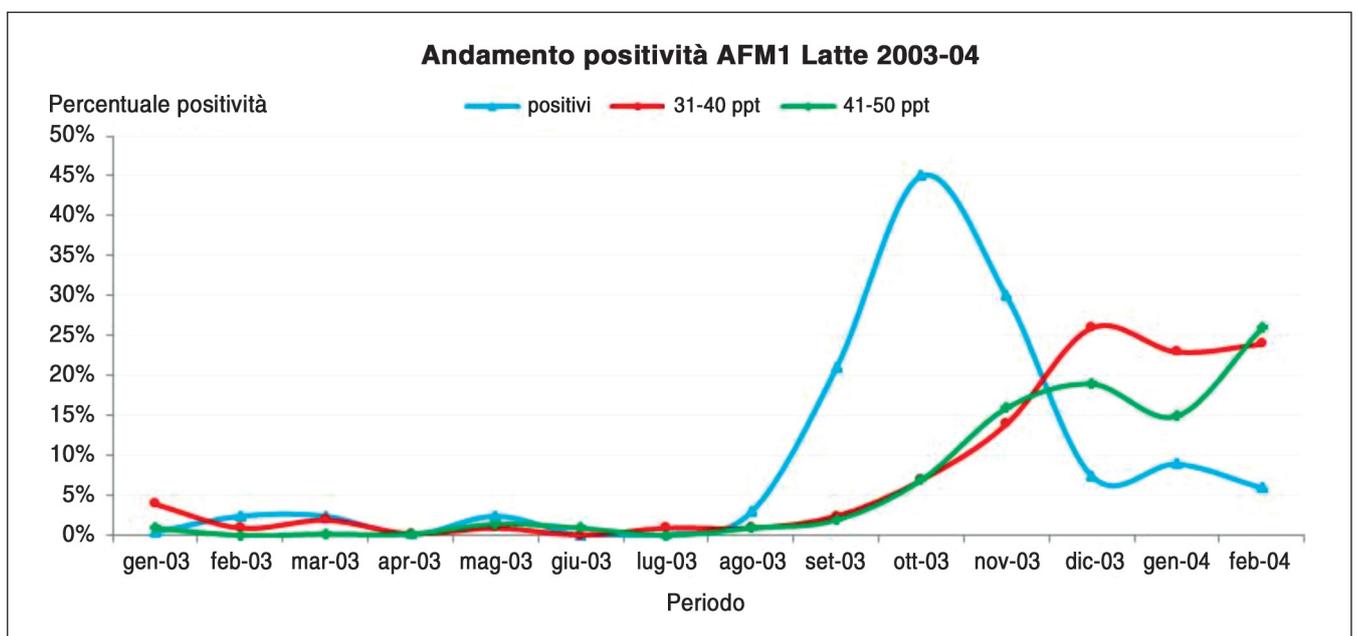


Figura 6 - Andamento del contenuto in Aflatossina M1 nel latte in Lombardia nell'anno 2003 - Fonte IZSLER.

Le conseguenze principali sarebbero state: l'interessamento degli insilati e la presenza dell'aflatossina all'interno delle cariossidi mature che ha reso poco efficaci le procedure di "pulitura" (vagliatura e spazzolatura) attuate dai mangimifici per la produzione di farine e granella.

Nel 2003 la relativa "novità" dell'allarme non permise di prevenire gli eventi con, ad esempio, interventi correttivi in fase di raccolta o di trattamento delle materie prime. Nel 2012, malgrado le conoscenze acquisite, gli interventi correttivi sono risultati più complessi e meno efficaci sia in mangimificio sia in allevamento, costringendo a interventi ripetuti e progressivi sulle razioni alimentari e al ricorso a prodotti di provenienza estera. Della correttezza di questa ipotesi si avrà la verifica o la smentita nel corso del primo semestre del 2013.

CONCLUSIONI

Il quadro qui riportato rappresenta la sintesi dell'attività analitica svolta dall'IZSLER come risposta alle esigenze di autocontrollo che gli operatori alimentari hanno espresso in conseguenza delle avverse condizioni climatiche dell'estate 2012. Insieme all'attività realizzata dall'Autorità Sanitaria con i campionamenti ufficiali e quella messa in atto dai produttori di mangimi, l'ingente quantità di dati analitici ha consentito di conoscere la situazione, di evidenziare i punti critici e di verificare gli effetti degli interventi correttivi per la filiera lattiero casearia nel suo insieme. L'esperienza maturata nel 2003, insieme a quanto osservato in altre realtà territoriali negli anni scorsi^{24,25}, ha permesso a tutto il sistema regionale nel suo insieme di affrontare in modo efficiente il problema della contaminazione del latte fin dall'inizio e, grazie al monitoraggio continuo messo in atto in questi anni, anche di prevedere con anticipo la problematica. Tra le conseguenze scaturite è doveroso citare l'avvio di un programma di controllo delle autocisterne di ritiro del latte programmato dall'Ufficio Veterinario Regionale per il 2013.

Pur non potendo considerare del tutto chiuso il periodo di allerta, i dati raccolti possono servire anche a rendersi conto delle possibilità di "gestione" che un sistema ben organizzato può mettere in atto rispetto a problemi complessi le cui soluzioni sono spesso parziali o "imperfette" ma che devono essere sostanzialmente efficaci e realizzabili dal punto di vista pratico, con lo scopo finale di salvaguardare "nel miglior modo possibile" la salute del consumatore.

■ Results of own-check for Aflatoxin M1 contamination in milk in Lombardy region

SUMMARY

Introduction - *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* are the main fungi responsible for Aflatoxin (AF) production. To provide an adequate margin of safety to protect human and animal health European Commission (EC) established maximum levels for AFs presence in food and feed (Commission Regulation N° 1881/2006). The limit for AFM1 in milk is fixed at 0,050 µg/kg (50 ppt); in Lombardy Region a more restrictive limit has been fixed at 0,030 µg/kg

(30 ppt) for raw milk for direct sale (CIR/19/SAN 2007 Lombardia). The impact of climatic conditions has been identified as an emerging issue for food and feed safety. In summer 2012 an alert was launched because of AF feed contamination due to drought conditions. The surveillance performed on milk was increased in order to assess the risk for consumers and to warrant food safety. The aim of this paper is to present the results of AFM1 detection in milk samples collected by producers or dairy industries for own-check purposes in Lombardy Region from August 2012 to February 2013.

Material - Commercial ELISA kit "T'screen Afla M1" (TECNA S.r.l., I) was used for screening AFM1 concentration in 4.977 bulk tank milk samples; among them, about 400 samples originated from official control of raw milk for direct sale.

Results - From August 2012 to February 2013, tolerance level of 50 ppt was exceeded in 2,2 to 23,3% of the samples: the higher AFM1 value was found in September; the tolerance level of 30 ppt in raw milk for direct sale was exceeded in 3,5 to 35,5% of the samples with the higher value in October.

Conclusions - The monitoring of the AFM1 in bulk tank milk through a rapid screening method, mainly during critic period of the year, is able to describe the dynamic trend of AFM1 contamination, giving useful information to support the decision making actions, for example monitoring of effects of changes in bovine diet at single farm level.

KEY WORDS

Milk, Aflatoxin M1, food safety, own-check.

Bibliografia

- Battacone G, Nudda A, Rattu SP, Decandia M, Pulina G. Excretion pattern of aflatoxin M1 in milk of goats fed a single dose of aflatoxin B1. May 2012, J Dairy Sci, Vol. 95 (5), pp. 2656-61.
- Cossu F, Scarano C, Moniello G, Spanu C, Pittau D, Viridis S, De Santis EPL. Determinazione dell'Aflatoxina M1 nel latte e nei formaggi ovis. 2011, Italian Journal of Food Safety, Vol. 1 n. 0.
- Garamaglia M, Gili M, Dalla Mutta M, Marellò M, Mastrodomenico M, Bianchi DM, Decastelli L. Aflatoxina M1 in latte crudo ai distributori. 2012, Italian Journal of Food Safety, Vol. 1 n. 3, pp. 79-80.
- Prandini A, Tansini G, Sigolo S, Filippi L, Laporta M, Piva G. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. May 2009, Food Chem Toxicol, Vol. 47 (5), pp. 984-91.
- The European Parliament and of the Council. REGOLAMENTO (CE) N. 1881/2006 DELLA COMMISSIONE del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. s.l.: Off. J. Eur. Communities, 2006. pp. 5-24. Vol. L 364.
- The European Parliament and of the Council. DIRETTIVA 2002/32/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 7 maggio 2002 relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali. 2002, Vol. L140, pp. 10-21.
- EFSA. SCIENTIFIC REPORT submitted to EFSA Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate. 18 January 2012.
- Battilani P, Barbano C and Piva G. Aflatoxin B1 contamination in maize related to the aridity index in North Italy. 2008, World Mycotoxin Journal, Vol. 1, pp. 449-456.
- Battilani P, Toscano P, van del Fels-Klerx I.H., Moretti A, Breda C, Rortais A, Camardo Leggeri M, Tilemachos G, Robinson T. Il rischio Aflatoxine nei cereali in uno scenario europeo di cambiamento del clima. [ed.] Carlo Crera, et al., et al. Roma: ITISAN Congressi, 2012. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Vol. 12/C3, p. 10. 0393-5620.
- Cotty R, Jaime-Garcia PJ. Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. International Journal of Food Microbiology: s.n., 2007, Vol. 119, pp. 109-115.
- Chauhan YS, Wright GC and Rachaputi NC., Modelling climatic risks of aflatoxin contamination in maize. 2008, Australian Journal of Experimental Agriculture, Vol. 48, pp. 358-366.

12. Bertocchi L, Scalvenzi A, Santini S, Fusi F. Aflatossina dal mais al latte? La siccità alimenta i timori. s.l.: Edagricole, settembre 14, 2012, *Informatore Zootecnico*, Vol. LIX (15), pp. 6-18.
13. Fusi F, Scalvenzi A, Angelucci A, Bolzoni G, Bertocchi L. Aflatossina/2: La fase di allerta non può dirsi conclusa. s.l.: Edagricole, maggio 7, 2013, *Informatore Zootecnico*, Vol. LX (9), pp. 54-60.
14. Regione Lombardia. CIR/19/SAN 2007 Lombardia. 2007.
15. IZSLER. MP 02/028 rev. 10. Metodo di prova interno per la ricerca e la determinazione di Aflatossina M1 nel latte mediante ELISA (KIT L'-SCREEN AFLA M1 TECNA). 2012.
16. Biancardi A, Aimo C and Piazza P, Piro R. Tecniche di Screening e conferma: il caso Aflatossina M1. [ed.] Carlo Crera, et al., et al. Roma: ITI-SAN Congressi, 2012. *Le micotossine nella filiera agro-alimentare*. Vol. 12/C3, p. 20. 0393-5620.
17. Dragacci S, Grosso F and Gilbert J. Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography for Determination of AflatoxinM1 in Liquid Milk: Collaborative Study. 2001, *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL*, Vol. 84 (2), pp. 437-443.
18. International Standard Organization. ISO 14501:2007 (IDF 171: 2007) "Milk and milk powder- Determination of aflatoxin M1 content- Clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by high-performance liquid chromatography". 2007.
19. Regione Lombardia. Circolare 20/SAN/05 Regione Lombardia. 2005.
20. Regione Lombardia. RL PLC 2011 RL nota prot. n° H1.2011.0001776 del 19/01/2011. 01 19, 2011.
21. Tsakiris IN, Tzatzarakis MN, Alegakis AK, Vlachou MI, Renieri EA, Tsatsakis AM. Risk assessment scenarios of children's exposure to aflatoxin M1 residues in different milk types from the Greek market. Jun 2013, *Food Chem Toxicol*, Vol. 56, pp. 261-5.
22. Lopez CE, Ramos LL, Ramadàn SS, Bulacio LC. Presence of aflatoxin M1 in milk for human consumption in Argentina. 2003, *Food Control*, Vol. 114 (1), pp. 31-34.
23. Omar SS. Incidence of aflatoxin M1 in human and animal milk in Jordan. 2012, *J Toxicol Environ Health*, Vols. 75 (22-23), pp. 1404-9.
24. Bianchi DM, Morello G, Mastrodomenico M, Dalla Mutta M, Decastelli L, Gallina S, Gili M, Gramaglia M. Aflatossina M1 nel latte bovino: tecniche di screening e di conferma per il monitoraggio in Piemonte. 2013, *Large Animal Review*, Vol. 19 (2), pp. 59-63.
25. Santini A, Raiola A, Ferrantielli V, Giangrosso G, Macaluso A, Bognanno M, Galvano F, Ritieni A. Aflatoxin M1 in raw, UHT milk and dairy products in Sicily (Italy). aprile 22, 2013, *Food Additives & Contaminants*, Vol. Contaminants Part B: Surveillance.