



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI**  
**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN**  
**SCIENZE VETERINARIE**

**Indirizzo: Produzione, Sicurezza e Qualità degli Alimenti di Origine Animale  
(XXIX CICLO)**

**Contaminazioni da aflatossina M<sub>1</sub> nella filiera del  
latte ovino in Sardegna**

**Docente Guida**

**Prof. Enrico P. L. De Santis**

**Correlatori**

**Dott. Carlo Spanu**

**Dott. Salvatore Virdis**

**Il Coordinatore**

**Prof. ssa Berlinguer Fiammetta**

**Tesi di dottorato del**

**Dott. Gavino Murittu**

**ANNO ACCADEMICO 2017 - 2018**

## INDICE

ABSTRACT .....	5
PREMESSA .....	7
INTRODUZIONE.....	9
MICOTOSSINE .....	9
Miceti produttori di micotossine.....	9
Produzione di micotossine .....	10
Caratteristiche e classificazione delle micotossine .....	10
AFLATOSSINE .....	13
Informazioni di base e definizione.....	13
Struttura chimica.....	15
Fattori condizionanti la produzione delle aflatossine da parte dei miceti.....	17
AFLATOSSICOSI NEGLI ANIMALI E NELL’UOMO .....	22
Effetti tossicologici .....	22
Esposizione alle aflatossine .....	29
AFLATOSSINE NELLA FILIERA DEL LATTE .....	33
Fonti di contaminazione.....	33
Metabolismo delle aflatossine .....	37
Escrezione delle aflatossine nel latte .....	40
Contaminazione da aflatossina M <sub>1</sub> nei prodotti lattiero-caseari .....	45
DESTINO DELL’AFLATOSSINA M <sub>1</sub> NEL CORSO DELLA TRASFORMAZIONE DEL LATTE.....	52
Effetti dei trattamenti termici sul contenuto di AFM <sub>1</sub> .....	52
Effetto della caseificazione sul contenuto in aflatossina M <sub>1</sub> .....	52
Coagulazione e del drenaggio del siero .....	53
Salatura .....	57
Maturazione .....	57
NORMATIVA.....	60
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI .....	75
SCOPO DELLA TESI .....	105

MONITORAGGIO DEL CONTENUTO IN AFLATOSSINA M <sub>1</sub> NEL LATTE DI PECORA E DI CAPRA IN SARDEGNA (2005-2013).....	108
Introduzione.....	109
Materiali e metodi .....	112
Risultati .....	113
Discussione.....	115
Conclusione .....	116
Riferimenti bibliografici.....	118
Tabelle e figure.....	123
STUDIO DEI LIVELLI DI CONTAMINAZIONE DA AFLATOSSINA M <sub>1</sub> NEL PECORINO ROMANO E CONFRONTO CON ALTRI FORMAGGI A LUNGA MATURAZIONE .....	130
Introduzione.....	131
Materiali e metodi .....	138
Risultati .....	144
Discussione.....	146
Riferimenti bibliografici.....	151
Tabelle e figure.....	161
CONCLUSIONI FINALI.....	168

## ABSTRACT

The main objective of the thesis was to investigate the level of aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in the dairy sheep sector in Sardinia (Italy). The first contribution was a survey on the level of aflatoxin M<sub>1</sub> contamination of small ruminant raw milk collected in Sardinia. Raw milk samples were collected at farm level from bulk tanks, from tank trucks and also at plant level from silo tanks. Overall were collected 517 sheep and 88 goat milk samples. Analysis for the detection of aflatoxins M<sub>1</sub> were performed using high-performance liquid chromatography. Only one sheep bulk tank milk sample exceeded the EU limit (50 ng/kg). The second contribution of the thesis was aimed to investigate the presence of aflatoxin M<sub>1</sub> of Pecorino Romano cheese and to compare the level of contamination with other long ripened cheeses produced using cow's milk. A total of 108 Pecorino Romano, 40 Grana Padano and 32 Parmigiano Reggiano cheese samples were analyzed by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. Only 5.6% of Pecorino Romano samples were above the detection limit of the method (30 ng/kg) but always within the maximum residues levels for long ripened cheeses (275 ng/Kg). The lower risk of aflatoxins M<sub>1</sub> contamination in dairy sheep milk sector as compared to dairy cow's sector is due to differences in the farming systems, in the lower carry-over of small

ruminants and in the greater impact of dilution effect in the milk picking system adopted by sheep milk plants.

## PREMESSA

La presenza di contaminanti negli alimenti di origine animale rappresenta un serio rischio per la salute del consumatore, perché possibile causa di malattie a carattere acuto o cronico-degenerativo, con sintomatologia limitata a livello gastrointestinale o renale, oppure che può interessare diversi distretti organici ed apparati. I contaminanti comprendono una ampia gamma di sostanze sia di origine naturale e/o chimica che possono pervenire negli alimenti attraverso un'aggiunta intenzionale o accidentale durante le fasi della produzione, lavorazione o del trasporto. I contaminanti possono essere anche il risultato di una contaminazione ambientale. Tra i contaminanti naturali rivestono sicuramente un ruolo primario quelli derivanti dal metabolismo secondario di microrganismi. In particolare le micotossine, metaboliti fungini, sono tra i più pericolosi contaminanti di origine animale per via dei loro effetti tossici sull'uomo. Le muffe in grado di produrre micotossine sono principalmente riconducibili a tre generi: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. In favorevoli condizioni ambientali, principalmente di temperatura e umidità, i funghi possono proliferare e produrre micotossine. Tra i principali prodotti del metabolismo di questi funghi figurano le aflatossine, le fumosine,

i tricoteceni, le ocratossine e lo zearalenone. L'ingresso nella filiera alimentare avviene direttamente attraverso colture contaminate destinate alla produzione di alimenti oppure attraverso la carne o altri prodotti di origine animale come le uova, il latte ed il formaggio mediante ingestione da parte degli animali di mangimi zootecnici contaminati. L'attività patogena delle micotossine è associata ad effetti tossici, mutageni, estrogenici e teratogeni. In alcuni casi si possono avere effetti di immunosoppressione con predisposizione a malattie infettive. Poiché le micotossine sono resistenti al calore e non vengono distrutte dalla normale cottura o dai trattamenti applicati nei processi di trasformazione degli alimenti, possono ritrovarsi attive anche dopo la morte dei funghi che le hanno prodotte.

Per via della loro pericolosità in oltre 100 Paesi sono previste delle soglie di contaminazione da micotossine per le varie derrate alimentari ed esiste un sistema di monitoraggio per il controllo dei prodotti sia nazionali che esteri.

# INTRODUZIONE

## MICOTOSSINE

### **Miceti produttori di micotossine**

Le micotossine sono prodotti del metabolismo secondario di una ampia varietà di specie fungine, ad azione patogena nei confronti dell'uomo e degli animali, che possono causare effetti nocivi di tossicità acuta e cronica, estrogenici, teratogeni, mutageni e cancerogeni. Sebbene siano note allo stato attuale circa 300 tipi di micotossine, prodotte da alcune specie di funghi e muffe parassite appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Alternaria*, *Cladosporium* e *Rhizopus*, rivestono maggiore importanza le aflatossine, le ocratossine, i tricoteceni, lo zearalenone, il deossinivalenolo, le patuline e le fumosine. Dal punto di vista della struttura chimica le micotossine sono un gruppo di composti piuttosto eterogeneo, per la cui classificazione vengono utilizzate le molecole di partenza da cui si formano i metaboliti secondari. Questi comprendono i polichetidi, i terpeni e l'acido scichimico (Berthiller et al., 2013).



## **Produzione di micotossine**

In condizioni ambientali favorevoli di umidità e temperatura i funghi possono proliferare e produrre micotossine. Le condizioni ideali per lo sviluppo sono:

- temperatura compresa tra 15 e 40°C (con optimum a 20-25°C);
- elevata umidità relativa (>70%);
- pH compreso tra 4 e 8;
- presenza di ossigeno, sebbene alcune specie possano sviluppare anche in condizioni di microaerofilia (1-2% di ossigeno).

Funghi e muffe sono microorganismi ubiquitari, possono quindi vivere in moltissimi ambienti naturali caratterizzati da condizioni ambientali diverse. Si sviluppano sulle derrate alimentari (es. cereali e frutta secca) o sui mangimi ad uso zootecnico (es. foraggi, insilati e farine di estrazione) con l'aspetto di formazioni polverulente di colore bianco, verdastro o nero (Yiannikouris e Jouany, 2002).

## **Caratteristiche e classificazione delle micotossine**

Le micotossine sono composti chimici a basso peso molecolare, lipofili senza attività antigenica, hanno una notevole resistenza nei confronti degli agenti fisici e

chimici, sono termostabili e fotostabili. Per via di queste caratteristiche di resistenza, le micotossine ed i loro derivati, possono persistere per lungo tempo dopo la crescita vegetativa e la morte del micete ed essere presenti anche su prodotti che non mostrano segni di ammuffimento. Le micotossine sono attive a basse concentrazioni e non sono disponibili antidoti nei loro confronti. Gli effetti tossici a seguito dell'esposizione dell'uomo o degli animali alle micotossine prende il nome di micotossicosi e l'entità delle manifestazioni cliniche dipende dalla modalità, dalla dose e dalla frequenza di esposizione. Raramente le micotossine possono dare origine a sintomatologia di tipo acuto, il rischio maggiore è associato agli effetti di accumulo a cui seguono sintomatologie di tipo cronico (Ostry et al., 2017). Gli effetti di tipo cronico possono essere a) mutageni: favoriscono l'insorgenza di mutazioni genetiche (es. aflatossine); b) cancerogeni: con effetti a livello epatico, renale, polmonare, del sistema immunitario e del tratto digestivo; c) teratogene: portano ad alterazioni a livello embrionale (es. aflatossine).

Le micotossine possono essere classificate, oltre che in base alla loro struttura chimica, sulla base degli effetti biologici e degli organi verso i quali manifestano i loro effetti tossici (Carlile et al., 2001):

- immunotossine: includono micotossine in grado di ridurre od inibire l'attività del sistema immunitario (aflatossine e ocratossine);
- dermatotossine: inducono dermatiti da contatto;
- epatotossine: hanno un particolare tropismo per il fegato, accumulandosi nel tessuto grasso e inducendo ittero, morte delle cellule, cirrosi e cancro. Possono inoltre interagire con gli enzimi del metabolismo e influire sul metabolismo di altri composti, influenzando sulla loro tossicità;
- neurotossine: sono in grado di causare la morte dei tessuti nervosi (fumosine).

# AFLATOSSINE

## Informazioni di base e definizione

Le aflatossine sono micotossine ad azione tossica sia nei confronti degli animali che dell'uomo. Come le altre micotossine vengono prodotte da funghi microscopici filamentosi, denominati genericamente come muffe. La scoperta delle aflatossine risale al 1960, anno in cui si verificò una grave intossicazione che ha interessato il settore dell'allevamento avicolo in Inghilterra. In tale circostanza morirono più di 100.000 tacchini a seguito dell'ingestione di mangimi contenenti farina di arachidi contaminata, proveniente dal Brasile. Tale patologia è stata denominata "Turkey-X disease". Le successive indagini hanno consentito di identificare come agente eziologico una miscela di composti tossici fluorescenti, denominati aflatossine. Il termine aflatossina è stato introdotto da Nesbitt et al., (1962) ed è dato dall'acronimo del microrganismo (*Aspergillus flavus*) in cui è stata evidenziata, quindi A (*Aspergillus*) fla (*flavus*) tossina (tossina prodotta dall'*A. flavus*).

Le Aflatossine (AFs) sono prodotti secondari del metabolismo di almeno 20 specie fungine appartenenti a tre differenti sezioni del genere *Aspergillus*, come *Flavi*,

*Nidulantes* e *Ochraceorosei*. I membri inclusi nella sezione *Flavi* sono *Aspergillus arachidicola*, *A. bombycis*, *A. flavus*, *A. minisclerotigenes*, *A. nomius*, *A. novoparasiticus*, *A. parasiticus*, *A. parvisclerotigenus*, *A. pseudocoelatus*, *A. pseudonomius*, *A. pseudotamarii*, *A. togoensis*, *A. transmontanensis*, *A. mottae* e *A. sergii*; i membri della sezione *Ochraceorosei* sono *Aspergillus ocharaceroseseus* e *A. rambelii* e infine i membri inseriti nella sezione *Nidulantes* sono *Aspergillus astellatus*, *A. olivicola* e *A. venezuelensis* (Goto et al., 1996; Klich et al., 2000; Peterson et al., 2001; Varga et al., 2009; Baranyi et al., 2013; Baranyi et al., 2015). Anche se tutte le specie elencate sono risultate produttrici di aflatossine, *A. flavus* e *A. parasiticus* sono le più note.

Le condizioni di temperatura necessarie per la produzione di AFs sono solitamente inferiori a quelle ottimali per la crescita delle specie coinvolte. Studi condotti su *A. flavus* hanno evidenziato che a fronte di una temperatura ottimale per la sua crescita tra 29 °C e 35 °C, la produzione massima di aflatossina avviene a circa 24 °C, mentre non si ha alcuna produzione a temperature <13 °C o >42 °C. La produzione di aflatossina è un risultato del metabolismo secondario, correlato all'esaurimento dei carboidrati fermentescibili nel mezzo di coltura (Baptista et al., 2004).

Sebbene la produzione di micotossine da parte dei miceti non sia un processo continuo, la semplice presenza nell'ambiente di muffe potenzialmente produttrici di tossine, rappresenta un rischio di presenza di micotossine negli alimenti. Come dimostrato da Ferreira et al. (2006), pur in assenza del fungo nell'alimento, la tossina può essere presente e attiva. La moltiplicazione dei miceti e la produzione di aflatossina sono determinati dalla composizione chimica del substrato, il suo contenuto in acqua e le condizioni ambientali, come temperatura e umidità (Jay, 2005). Numerosi altri fattori possono influenzare la quantità di aflatossina prodotta, quali i danni meccanici sugli organismi vegetali, la presenza di anidride carbonica e di ossigeno, l'applicazione di pesticidi e fungicidi, la varietà vegetale, l'infestazione di insetti e la quantità di spore fungine presenti (Bryden, 2012). Il livello di contaminazione è cumulativo, quindi il tempo per la raccolta e le condizioni di essiccazione e stoccaggio possono svolgere un ruolo fondamentale nella produzione di aflatossina (Prandini et al., 2009).

### **Struttura chimica**

Le aflatossine sono solidi cristallini bianchi, solubili in diversi solventi organici (metanolo, cloroformio, acetone e benzene), insolubili in solventi lipidici (esano, etere

dietilico), hanno un basso peso molecolare e un ampio spettro di tossicità (Moss, 2003).

Non sono immunogeniche, agiscono a basse concentrazioni e sono instabili alla luce UV, ma sono molto stabili a temperature sopra i +100 °C, non vengono inattivate dai trattamenti termici quali cottura, tostatura e pastorizzazione (Ferreira et al., 2006; Midio & Martins, 2000). Le aflatossine hanno una struttura policiclica derivata da un nucleo cumarinico legato ad un sistema bi-furanico; le aflatossine del tipo B sono legate ad un pentanone mentre quelle di tipo G sono legate ad un gruppo lattone a 6 elementi (Abrar et al., 2013).

Le aflatossine comprendono 18 diversi composti, tra i quali i più importanti ad oggi identificati sono 4, le aflatossine B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) e G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>). Le aflatossine B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> sono prodotte dall'*Aspergillus flavus* e dall'*Aspergillus parasiticus*, mentre le aflatossine G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> sono prodotte solo dal secondo. A queste vanno aggiunti i metaboliti dell'AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub> chiamati rispettivamente M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) e M<sub>2</sub> (AFM<sub>2</sub>) per via della loro presenza nel latte (milk toxin). Le aflatossine M<sub>1</sub> ed M<sub>2</sub> vengono prodotte, a seguito dell'ingestione, da parte dei ruminanti, di alimenti contaminati dalle aflatossine B, mediante conversione a livello epatico nei loro metaboliti idrossilati. Tale conversione

è un meccanismo finalizzato a rendere tali molecole più idrofile, e quindi più facilmente eliminabili attraverso le feci, le urine ed il latte.

Le aflatossine sono dei composti policiclici insaturi formati da un nucleo cumarinico a cui si attaccano da un lato un gruppo bifuranico e dall'altro o un pentone (tossine B) o un lattone a 6 membri (serie G). Il suffisso B o G deriva dal fatto che le molecole difuranocumariniche legate ad un ciclopentanone producono alla luce UV una fluorescenza blu (blue, AFB) o verde (green, AFG) se legate ad un lattone.

### **Fattori condizionanti la produzione delle aflatossine da parte dei miceti**

La produzione di aflatossine è il risultato di una complessa interazione di diversi fattori, quali la presenza di una specie fungina tossigena, la presenza di un substrato nutritivo e condizioni ambientali favorevoli. In condizioni normali le piante sono resistenti all'infezione fungina, ma in condizioni di stress diventano suscettibili. La massima produzione di aflatossina da parte dei funghi avviene a sviluppo vegetativo ultimato e coincide all'incirca con il decimo giorno di sviluppo del micelio (Ceruti et al., 1993; Zaghini e Lamberti, 1995). Tra i fattori che maggiormente influiscono sulla produzione di aflatossine sono inclusi fattori ambientali, nutrizionali e biologici.



I fattori ambientali includono a loro volta: temperatura, umidità, composizione gassosa (atmosfera), luce e pH del substrato. Il range di temperatura per la produzione delle aflatossine è compreso tra i 25 °C e i 35 °C, con valori ottimali compresi tra i 25-28°C (Davis et al., 1966). Sebbene in casi eccezionali si possa avere produzione al di fuori di tale range, non è mai stata osservata la produzione di aflatossine a temperature inferiori ai 13 °C o superiori ai 42 °C (Sorenson et al., 1967). Il periodo di incubazione necessario per avere la massima produzione di aflatossina varia con il ceppo fungino e con il substrato. La produzione massima è associata all'esaurimento dei carboidrati nel mezzo colturale e alla fase di autolisi del micelio, che avvengono in circa 15 giorni a 20 °C e 11 giorni a 30 °C (Davis et al., 1966). L'umidità, sia ambientale che del substrato, è un fattore fondamentale per la produzione di aflatossine. Un clima caratterizzato da temperature elevate alternate a bruschi cali di temperatura (es. giornate calde e notti fredde o temporali) favoriscono la produzione di aflatossine. Gli stress idrici delle piante in campo sono in grado di condizionare la produzione di aflatossine, pertanto temperature superiori alla media accompagnate da scarsa piovosità, predispongono alla produzione di aflatossine. Sebbene l'umidità relativa ambientale minima per la produzione di aflatossine vari tra l'83% e l'88%, l'umidità del substrato è il vincolo principale per la

tossinogenesi. La produzione massima di aflatossine nelle cariossidi di mais è stata osservata con tenori di umidità minimi del 25-35% (Diener e Davis, 1983). La composizione dei gas che costituiscono l'aria atmosferica, con particolare riferimento alla concentrazione di O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> è un fattore determinante per la produzione di aflatossine. Infatti, questo è un processo che avviene strettamente in condizioni di aerobiosi (Jarvis, 1971). In condizioni sperimentali è stato dimostrato che l'incremento della CO<sub>2</sub> da valori del 20% al 100% nel mezzo colturale determinava una graduale diminuzione della produzione di aflatossine (Sanders et al., 1968). L'assenza di luce favorisce la produzione di aflatossine. Per quanto riguarda il pH, è stato dimostrato che la produzione di aflatossine avviene a valori compresi tra 4 e 6 (Jarvis, 1971), con differenze tra aflatossine B (AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>) per le quali sono favorevoli pH <6 e le aflatossine G (AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>) che prediligono pH >6. Le produzioni massime di aflatossine si ottengono quando il pH del substrato è compreso tra 5-6.

La produzione di aflatossine è fortemente condizionata dalla composizione in fattori nutrizionali del substrato in cui si sviluppano le muffe tossigeniche (Pietri, 1998). *Aspergillus flavus* è in grado di produrre aflatossine su arachidi, pistacchi, spezie, frumento, mais, orzo, crusca, semi di soia, semi di cotone, piselli, sorgo e miglio. Non è

invece in grado di produrre aflatossine su riso, dove invece la fermentazione operata da questo micete è sviluppata a livello industriale per la produzione della bevanda sakè e per la produzione dell'enzima diastasi. La presenza nel substrato di composti ricchi di carboidrati (es. glucosio, mannosio, fruttosio) è un fattore predisponente per una maggiore produzione di tossine da parte dei miceti (Gerola et al., 1986). Infatti questi zuccheri rappresentano la principale fonte di carbonio per la biosintesi delle aflatossine. Inoltre la presenza degli amminoacidi glicina ed acido glutammico è essenziale per la produzione di aflatossina. L'effetto dei minerali è variabile: zinco e manganese sono essenziali, cadmio e ferro in miscela stimolano la produzione.

L'interazione microbica è un fattore biologico in grado di diminuire la produzione di aflatossine. Lo sviluppo contemporaneo sullo stesso substrato di più specie fungine sarebbe in grado di ridurre la produzione di micotossine. Il meccanismo sarebbe legato sia ad un meccanismo di competizione per i substrati nutritivi sia a fenomeni di biodegradazione delle aflatossine ad opera di enzimi o tossine prodotte da altre specie di muffe. Se in coltura pura le specie di muffe sono in grado di produrre una maggiore quantità di aflatossine. Generalmente lo sviluppo di una o di poche specie fungine tossigene si verifica principalmente su granelle, farine e mangimi che sono da ritenersi a

più elevato rischio. Invece sui foraggi prevale lo sviluppo contemporaneo di più specie di miceti, riducendo la produzione complessiva di aflatossine (Cvetnić e Pepeljnjak, 2007).

## AFLATOSSICOSI NEGLI ANIMALI E NELL’UOMO

### Effetti tossicologici

Le micotossine presenti negli alimenti ad uso zootecnico possono causare effetti nocivi sugli animali da reddito in cui si possono manifestare:

- micotossicosi cliniche: eventi rari e di facile diagnosi poiché caratterizzate da sintomatologia febbrile con compromissione di organi bersaglio specifici per ciascuna tipologia di micotossina coinvolta;
- micotossicosi subcliniche: sono relativamente frequenti ma più difficili da diagnosticare in quanto caratterizzate da un calo quantitativo e qualitativo della produzione accompagnate da una sintomatologia clinica generica legata allo stato di immunodepressione.

Gli effetti della aflatossina B<sub>1</sub>, se presente in elevate concentrazioni, può determinare sindromi epatiche in diverse specie di animali da reddito: specie avicole, suini e bovini. I sintomi sono caratterizzati da ittero, apatia, diarrea, melena fino ad avere un esito fatale nei casi più gravi. Nelle forme lievi si riscontra inappetenza e diarrea, riduzione dell'accrescimento ponderale. I rilievi anatomopatologici sono caratterizzati da

degenerazione del fegato (che rappresenta l'organo bersaglio), gastroenteriti catarrali ed emorragiche ed emorragie petecchiali diffuse in muscoli, mucose e sottocute. Nel 1960, più di 100.000 tacchini sono morti in nel Regno Unito in pochi mesi, per la cosiddetta "malattia X del tacchino" (Asao et al., 1963). A seguito di indagini epidemiologiche è stato dimostrato che la fonte della malattia era la farina di arachidi contaminata da aflatossina. Anche in un caso verificatosi nel 1981 in Australia, che ha coinvolto diverse centinaia di vitelli morti, è stato individuato che l'alimento coinvolto erano le arachidi contaminate (McKenize et al., 1981).

Oltre alle manifestazioni di tossicità acuta e cronica, una delle caratteristiche principali della tossicologia delle aflatossine, è l'ampia variazione nella risposta tra le diverse specie di animali e persino tra il maschio e la femmina della stessa specie. Ad esempio per alcuni animali, come il ratto, le aflatossine sono molto cancerogene, mentre per altre specie, è difficile dimostrarne la cancerogenicità. Questa notevole variazione nella risposta biologica deriva dal fatto che lo stesso metabolita fungino deve essere metabolizzato in modo che si verifichi una reazione tossica e i metaboliti responsabili per la tossicità acuta differiscono da quelli responsabili della cancerogenicità. Molte reazioni metaboliche come la demetilazione all'aflatossina P<sub>1</sub> e l'idratazione dell'aflatossina B<sub>2a</sub>,

possono ad esempio portare ad una diminuzione della tossicità. Inoltre, all'interno di una data specie, la entità della risposta è influenzata da età, sesso, peso, dieta, esposizione agli agenti infettivi, dalla presenza di altre micotossine e dalle sostanze farmacologicamente attive. Se le dosi di aflatossina ingerita sono sufficientemente alte, qualsiasi specie può subire effetti negativi. Tuttavia, i bassi livelli di contaminazione, come quelli che generalmente si riscontrano negli alimenti ad uso zootecnico, possono essere decisamente dannosi per alcune specie o esserlo poco o niente affatto in altre.

I mangimi contaminati provocano gravi effetti sugli animali monogastrici. A titolo di esempio i ruminanti, che hanno un'attività microbica ruminale che può esercitare un'azione metabolica di biotrasformazione nei confronti delle aflatossine, sono meno sensibili dei suini (Rustemeyer et al., 2010). Per altre specie, come il pollame, l'utilizzo di mais e di crusconi nella dieta può aumentare il rischio aflatossine. Discorso opposto può essere fatto per il pesce d'allevamento, che pur essendo potenzialmente sensibile, ha un ridotto livello di esposizione grazie all'alimentazione povera di cereali. Alcuni dei potenziali effetti tossici delle micotossine, come quelli cancerogeni, non trovano riscontro negli animali da allevamento per via del ridotto ciclo di vita degli animali in produzione. Tuttavia, hanno effetti molto importanti per la sicurezza degli alimenti prodotti. Oltre alla

specie animale, altri fattori che influiscono sugli effetti delle aflatossine sono l'età, la concentrazione e la durata dell'esposizione (Rustemeyer et al., 2010).

Le aflatossicosi possono essere di tipo acuto, spesso con esito mortale, o di tipo cronico in grado di trasformarsi in tumore, immunosoppressione e in altre condizioni patologiche (Hsieh, 1988). Gli effetti delle aflatossine sulla salute umana sono funzione della quantità di micotossina ingerita con gli alimenti, della tossicità del composto, delle concomitante presenza di altre micotossine e di fattori individuali del soggetto esposto. Per potere stabilire una relazione causa-effetto tra ingestione di aflatossine e malattia umana devono essere soddisfatte le seguenti condizioni:

- le micotossine devono essere presenti negli alimenti;
- deve essere accertata l'esposizione alle micotossine;
- deve essere dimostrata una correlazione tra esposizione e incidenza della malattia;
- la sintomatologia specifica deve essere riproducibile in animali da esperimento.



Considerata la differente risposta esistente nella sensibilità alle aflatossine tra animali da esperimento e l'uomo, è relativamente difficile trasferire agli esseri umani i dati sugli effetti tossicologici ottenuti nei modelli animali.

Tra le aflatossine in particolare l' $AFB_1$  è associata sia con effetti di tossicità sia con la cancerogenicità nell'uomo e negli animali. L'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) ha classificato l' $AFB_1$  come appartenente al gruppo I, ovvero gli agenti carcinogenici per l'uomo (IARC, 1982). Le aflatossine rientrano nella categoria dei cancerogeni genotossici, che va accuratamente distinta da quella dei cancerogeni non genotossici. Infatti, mentre per questi ultimi è sempre possibile stabilire una soglia di dose al di sotto della quale l'effetto cancerogeno non può verificarsi, per i cancerogeni genotossici, non è possibile stabilire una dose soglia per l'effetto cancerogeno. Pertanto l'abbassamento delle dosi porta ad un progressivo abbassamento che l'evento cancro possa verificarsi, ma non ad una sua eliminazione. L' $AFB_1$  è annoverata come il più potente composto epatocancerogeno (Newberne & Butler, 1969; Shank et al., 1972; Peers & Linsell, 1973; Eaton & Groopman, 1994).

L'assunzione di aflatossine mediante l'ingestione di alimenti contaminati può indurre alterazioni dell'integrità dell'epitelio intestinale (Gong et al., 2008) o modulare

l'espressione di citochine, mediatori polipeptidici "segnale" di componenti del sistema immunitario. In entrambi i casi si possono avere effetti negativi sull'accrescimento dei bambini e/o fenomeni di soppressione immunitaria (Wu, 2010). A seguito dell'ingestione di dosi elevate di aflatossine da parte dell'uomo si possono verificare casi di aflatossicosi acute, caratterizzata da emorragie, lesioni acute del fegato, edema e morte. Nel 1974 è stato segnalato in India un focolaio di epatite e 100 casi di morte attribuiti al consumo di mais fortemente contaminato da aflatossine, con ingestione giornaliera di aflatossine variabile da 2 a 6 mg al giorno (Krishnamachari et al., 1975). Sulla base di questi dati, è stato stimato che la dose letale acuta (LD) per gli adulti è tra i 10 e i 20 mg di aflatossine (Pitt, 2000). Le aflatossine sono state da anni associate a varie condizioni di salute che non interessano il fegato, come riportato da Coulombe (1994). A titolo di esempio si ipotizza che possano essere associate al *kwashiorkor*, una grave malattia determinata da malnutrizione e a una forma di aflatossicosi pediatrica (Hendrickse, 1997) o addirittura potrebbero essere coinvolte nella sindrome di Reye, encefalopatie e degenerazione del grasso di alcuni organi bersaglio in bambini e adolescenti (Hayes, 1980). Tuttavia, il fegato rappresenta il principale organo bersaglio. Nel fegato, le aflatossine possono essere trasformate da alcuni enzimi dei citocromi P450 3A4 (CYP1A2, 3A5, 3A7) alla forma

DNA-reattiva, l'aflatossina-8,9-epossido. Questa molecola può legarsi alle proteine del fegato e provocare il loro cedimento, con conseguente aflatossicosi acuta. In alternativa, può legarsi al DNA, evento precursore del carcinoma epatocellulare aflatossina-indotto (Eaton & Groopman, 1994). Si può verificare un effetto sinergico tra aflatossina e l'infezione cronica da virus dell'epatite B (HBV) che si traduce in un rischio significativamente più alto di cancro epatico (Wu, 2010). Un sistema reattivo glutatione S-transferasi che si trova nel citoplasma e nei microsomi, catalizza la coniugazione di aflatossine attivate con glutatione-ridotto, determinando l'escrezione delle aflatossine (Raj et al., 1986).

L'esposizione alle aflatossine con la dieta è considerata un importante fattore di rischio per lo sviluppo del carcinoma epatocellulare primario (Peers & Linsell, 1973; Van Rensburg et al., 1985; Li et al., 2001), anche se la quantificazione a lungo termine dell'esposizione individuale alle aflatossine è difficile da valutare. L'incidenza del tumore epatico varia notevolmente da paese a paese, ma si verifica frequentemente in Cina, Filippine, Thailandia e in molti paesi africani. Tuttavia la elevata esposizione al virus dell'epatite B rappresenta un concomitante fattore di rischio per il cancro primario del fegato che complica notevolmente gli studi epidemiologici. In uno studio nel quale sono

stati analizzati più di 18.000 campioni di urine raccolte in 3,5 anni a Shanghai, in Cina, la sola esposizione alle aflatossine ha prodotto un rischio pari a circa 2; il solo antigene del virus dell'epatite B ha prodotto un rischio relativo di circa 5; l'esposizione combinata dell'aflatossina e dell'epatite B ha portato un rischio relativo di circa 60 (Ross et al., 1992).

Le aflatossine sono associate anche a neoplasie di tessuti extraepatici, in particolare dei polmoni. Uno studio epidemiologico su lavoratori di arachidi olandesi ha mostrato una correlazione tra il tumore respiratorio e l'esposizione dei lavoratori alle polveri di lavorazione contaminate da AFB<sub>1</sub> (Hayes et al., 1984). Anche esposizioni indirette alle aflatossine possono provocare gravi problemi di salute: ad esempio è stato riportato che la polvere prodotta nel corso del raschiamento di piastre cromatografiche utilizzate per le analisi delle aflatossine ha contribuito a causare tumore in due giovani adulti (Deger, 1976).

### **Esposizione alle aflatossine**

Le aflatossine possono raggiungere direttamente l'uomo se ingerisce alimenti contaminati oppure indirettamente mediante alimenti di origine animale, alimentati con

mangimi contaminati (Miraglia & Brera, 1999). Tuttavia, la principale via di esposizione alle aflatossine dell'uomo e degli animali è rappresentata dall'ingestione di alimenti contaminati. Gli animali da reddito, una volta esposti, diventano essi stessi una fonte di contaminazione per l'uomo, se destinate a diventare alimenti o produttori di alimenti destinati all'alimentazione umana (latte, carne, uova, ecc). La presenza delle aflatossine negli alimenti, e il loro con il conseguente accumulo nella catena alimentare, è considerata un grave rischio per il consumatore per via della loro elevata tossicità. Le malattie causate dal consumo di aflatossine sono denominate con il termine di aflatossicosi. Sebbene, gli effetti sulla salute umana dovuti alla presenza di aflatossine siano difficili da documentare, soprattutto in alcuni paesi in via di sviluppo dell'area tropicale, a causa delle condizioni climatiche ed economiche, è stato dimostrato che la contaminazione da aflatossine dei cereali è associata alla incidenza di diverse malattie nell'uomo. Le aree geografiche a maggiore rischio sono in particolare le regioni tropicali e subtropicali, caratterizzate un clima caldo-umido, favorevole allo sviluppo delle muffe. In Italia le regioni più colpite sono quelle della Pianura Padana, in cui le produzioni di mais hanno evidenziano contaminazione da aflatossine a causa di fattori concomitanti favorevoli allo sviluppo di *A. flavus*, quali il clima caratterizzato da alte temperature e siccità e i danni

sulla pianta provocati dalla presenza di insetti infestanti (Pietri e Diaz, 2003). Alle nostre latitudini le contaminazioni avvengono principalmente negli alimenti conservati in magazzino. Infatti i miceti del genere *Aspergillus* sono in grado di tollerare i bassi livelli di umidità (15-18%) generalmente presenti nelle granaglie stoccate nei depositi. Uno studio condotto su campioni di mais insilato ha dimostrato che il processo di insilamento condotto in condizioni non controllate può portare allo sviluppo di muffe e successiva produzione di aflatossina B<sub>1</sub> fino a livelli di 25-40 µg/Kg (Vallone & Dragoni, 1997). La presenza di micotossine negli alimenti preoccupa particolarmente per diversi motivi: a) le micotossine possono essere presenti anche in alimenti che non sono visibilmente ammuffiti; b) hanno effetti tossici insidiosi (cancerogeni, mutageni e immunodepressivi); c) sono attive anche a basse concentrazioni; d) sono molecole particolarmente stabili e pertanto difficili da inattivare; e) non esistono antidoti nei loro confronti.

Tra i prodotti alimentari a maggiore rischio di contaminazione da aflatossine sono da ricordare il mais, i semi oleosi, le spezie, le arachidi, le noci, il latte e i suoi derivati e la frutta secca (Strosnider et al. 2006).

Nei paesi sviluppati sono stati definiti livelli limite di contaminazione da aflatossine per la protezione della popolazione dall'ingestione di livelli significativi di

aflatossine. Tuttavia, nei paesi in via di sviluppo, o in cui le popolazioni non hanno garanzie di accesso al cibo, la legislazione è più permissiva o addirittura inesistente o nei casi in cui non sono operativi dei sistemi di monitoraggio e di controllo delle contaminazioni, può verificarsi più frequentemente l'ingestione di aflatossine (Cotty et al., 1994). Un rapporto della FAO ha dichiarato che “nei paesi in via di sviluppo, dove gli approvvigionamenti sono già limitati, una drastica misura legale può portare alla mancanza di cibo e di prezzi eccessivi. Si deve ricordare che le persone che vivono in questi paesi non possono esercitare l'opzione di morire di fame oggi per vivere una vita migliore domani” (Henry et al., 1999). Tale situazione si riflette inevitabilmente sul tasso di incidenza del tumore epatico che risulta da 2 a 10 volte maggiore nei paesi in via di sviluppo rispetto ai paesi sviluppati (Henry et al., 1999). Sono stati segnalati diversi casi di aflatossicosi acuta in Africa associati al consumo di mais contaminato, compresi i focolai in Kenya nel 1982, in cui 12 persone sono morte, e nel 2004, in cui 317 persone si sono ammalate e 125 persone sono morte nelle province centrali (Azziz -Baumgartner et al., 2005; Probst et al., 2007; Lewis et al., 2005 ; Stosnider et al., 2006).

## **AFLATOSSINE NELLA FILIERA DEL LATTE**

### **Fonti di contaminazione**

La contaminazione da aflatossine è un evento che si manifesta in diversi prodotti agroalimentari destinati all'alimentazione umana ed animale provenienti da diverse parti del mondo. Le aflatossine sono inclusi tra i contaminanti più frequentemente coinvolti in casi di notifica da parte del "Rapid Alert System for Food and Feed" (RASFF) dell'Unione Europea, tanto che nel 2008 sono state responsabili di quasi il 30% di tutte le notifiche al sistema RASFF. Secondo un'indagine della Food and Agriculture Organization a livello mondiale circa il 25% delle derrate alimentari sono contaminate da micotossine (FAO, 1985). I cereali possono considerarsi i maggiori vettori di micotossine in conseguenza degli elevati consumi umani ed animali (Pfohl-Leszkowicz, 2000). La prevalenza mondiale di contaminazione da micotossine dei cereali è compresa tra il 25% e il 40 % (Pittet, 1998). Le specie di miceti produttrici di aflatossine si trovano prevalentemente nelle colture vegetali, in particolare nel mais, arachidi, semi oleosi e noci provenienti soprattutto dalle regioni tropicali e subtropicali. Il rischio associato ad alimenti come, mais e arachidi è elevato a causa del largo consumo mondiale di questi alimenti associato



alla loro particolare sensibilità alla contaminazione. Pertanto questi alimenti rappresentano la principale fonte di esposizione umana alle aflatossine (Strosnider et al., 2006). Vi è un forte interesse per la valutazione della contaminazione da aflatossina B<sub>1</sub> per questi alimenti dal momento che l'olio di semi di arachidi, di cotone e di copra costituiscono la più importante fonte di oli alimentari (Idris et al., 2010). Scudamore et al. (1997) identificarono tra gli alimenti zootecnici contaminati da aflatossina B<sub>1</sub> i semi di palma, i pannelli di semi di girasole, la farina di mais, il germe di mais, i semi di cotone, la crusca di riso e i semi di soia. Per quanto riguarda i mangimi importati, l'estratto di copra, pannelli di arachidi, di girasole e la farina di mais sono stati considerati i più importanti vettori di aflatossina B<sub>1</sub> (Blüthgen & Ubben, 2000).

Per quanto riguarda i mangimi ad uso zootecnico la direttiva UE 2002/32/CE relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali identifica mangimi come arachidi, copra, semi di palma, semi di cotone, babassu, mais e prodotti derivati dalla loro trasformazione, specifici componenti dei mangimi e stabilisce un limite massimo ammissibile. A seguito di un'annata agraria sfavorevole dal punto di vista climatico verificatasi nel corso del 2003, che ha determinato una situazione di grave crisi per la filiera zootecnica italiana con la registrazione di livelli di AFM<sub>1</sub> superiori ai limiti

di legge nel latte prodotto, è accresciuta la sensibilità ed il livello di controllo nei confronti del pericolo aflatossine nella filiera del latte. La produzione delle aflatossine avviene sia nella fase pre-raccolta (in campo) che nelle fasi successive (raccolta, condizionamento e stoccaggio) delle derrate alimentari.

*Fase preraccolta.* I cereali in uso comunemente nelle razioni, possono risultare contaminati in conseguenza di attacchi fungini di campo e soprattutto in conseguenza di condizioni favorevoli allo sviluppo di miceti tossigeni (elevata umidità e temperatura). Le contaminazioni dei vegetali risultano più frequenti rispetto a quelle dei prodotti di origine animale poiché la presenza nei primi dell'amido, sembra aumentare la tossigenesi.

La contaminazione nella fase di pre-raccolta o asciugatura si verifica principalmente nei mangimi, nel fieno e paglia (Bhat et al., 2010). Le specie di miceti *Aspergillus flavus* ed *Aspergillus parasiticus* sono ubiquitarie nell'ambiente, potendosi ritrovare nel terreno, nei residui colturali, nei depositi di foraggi ed alimenti. Le condizioni predisponenti l'infezione dei foraggi da parte del fungo e la successiva produzione di aflatossine sono legate alle condizioni ambientali (picchi di temperatura molto elevati, stagioni caratterizzate da clima caldo umido durante la maturazione) e dagli stress a cui possono essere sottoposte le piante nella fase di campo (stress idrici, presenza

di parassiti, carenze o squilibrio nutrizionali). La massima produzione di tossine solitamente coincide con il decimo giorno di sviluppo del micelio (Ceruti et al., 1993; Zaghini & Lambertini, 1995). La produzione di aflatossine è influenzata dal tipo di substrato sul quale si sviluppano le muffe tossigeniche (Pietri, 1998). Condizioni favorevoli sono la presenza di glucosio, mannosio, fruttosio ed azoto in forma ammoniacale nel substrato (Gerola et al., 1986). Pertanto il mais è tra gli alimenti maggiormente sensibili alla contaminazione da micotossine (Barug et al., 2004). In uno studio condotto in Italia su campioni di mais provenienti dalla pianura padana è stata osservata la formazione di aflatossinaB<sub>1</sub> legata alle alte temperature; la siccità e i danni da insetti risultavano favorevoli alla crescita di *A. flavus* e alla conseguente produzione di aflatossine (Pietri e Diaz, 2003).

*Fase post-raccolta.* I miceti tossigenici possono produrre aflatossine anche nel corso dello stoccaggio, trasporto e trasformazione delle derrate alimentari. Quando il fieno è raccolto con tenori di umidità superiori al 20% si creano condizioni predisponenti la produzione di aflatossine nel corso della conservazione. Discorso analogo può essere fatto per gli insilati e i concentrati raccolti con elevato contenuto d'acqua. Sebbene la formazione di aflatossine si possa verificare prevalentemente nella fase di campo in aree

geografiche con un clima tropicale o subtropicale, è stato dimostrato che la produzione di aflatossina sembra essere correlata al processo di insilamento nel quale, in circostanze sfavorevoli, l'alta temperatura può essere seguita da sviluppo e formazione di muffe e dalla successiva produzione di tossina. In uno studio condotto in Italia per un periodo di 4 mesi su campioni di insilato di mais, sono stati trovati livelli di aflatossina B<sub>1</sub> compresi tra 25-40 µg/kg. (Vallone e Dragoni, 1997).

### **Metabolismo delle aflatossine**

Le aflatossine vengono metabolizzate attraverso diversi sistemi enzimatici o che intervengono esclusivamente nella biotrasformazione degli xenobiotici o da enzimi normalmente implicati in altre vie metaboliche. La tossicocinetica delle aflatossine coinvolge essenzialmente quattro processi metabolici: assorbimento, distribuzione, bioconversione ed eliminazione (Hsieh e Wong, 1994). Nella fase di assorbimento le tossine entrano nell'organismo principalmente attraverso il tratto gastrointestinale, ma anche attraverso altre vie quali la cute e le vie respiratorie. L'aflatossina B<sub>1</sub> è una molecola a basso peso molecolare e lipofila, per cui viene rapidamente assorbita dopo l'ingestione. Circa il 50% della dose di aflatossina B<sub>1</sub> ingerita viene rapidamente assorbita

a livello dell'intestino tenue per raggiungere il fegato attraverso il circolo portale epatico (Coulombe e Sharma, 1985; Kumagai, 1989, Wilson et al., 1985). Il passaggio attraverso la mucosa gastrointestinale avviene mediante diffusione passiva agevolato dall'affinità lipidica dell'aflatossina B<sub>1</sub> considerevolmente superiore a quella dell'aflatossina G<sub>1</sub> (Kumagai, 1989). Nel corso della fase di distribuzione, le aflatossine dopo essere state assorbite, si legano con le proteine plasmatiche e possono raggiungere attraverso la circolazione sanguigna diversi distretti corporei (Hsieh e Wong, 1994). Nel sangue la porzione legata dell'aflatossine è in equilibrio con quella libera, ma solo la quota libera è in grado di attraversare le membrane dei capillari sanguigni. Le aflatossine presentano particolare tropismo nei confronti del fegato per via dell'alta permeabilità della membrana cellulare degli epatociti. Attraverso il circolo enteroepatico le aflatossine possono arrivare al fegato ed essere escrete nell'intestino attraverso la bile e ritornare al fegato attraverso il circolo portale (Hsieh e Wong, 1994). I reni concentrano l'aflatossina B<sub>1</sub> in misura minore rispetto al fegato (Hayes et al., 1977). Il processo di biotrasformazione (o metabolismo) delle aflatossine è quello mediante il quale l'organismo trasforma le sostanze chimiche assunte in nuovi composti (metaboliti). L'aflatossina B<sub>1</sub> può essere trasformata in diversi prodotti che a scapito di minime

differenze strutturali hanno attività biologiche significativamente differenti tra di loro: le aflatossine Q<sub>1</sub> (AFQ<sub>1</sub>), M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>), B<sub>2a</sub> (AFB<sub>2a</sub>), P<sub>1</sub> (AFP<sub>1</sub>), l'aflatossico (AFL) e l'aflatossicolo H<sub>1</sub> (AFLH<sub>1</sub>) sono i principali. La biotrasformazione dell'aflatossina B<sub>1</sub> coinvolge il sistema enzimatico del citocromo P450 presente sia negli epatociti che in altri tipi di cellule. Nella prima fase della biotrasformazione l'Aflatossina B<sub>1</sub> viene convertita in AFB<sub>1</sub>-8,9-epossido, mediante epossidazione in posizione 8,9 del diidrofurano presente nella molecola dell'aflatossina (Gallagher et al., 1996). Questa via metabolica è stata descritta principalmente negli epatociti anche se può avvenire in misura minore anche nelle cellule sinusoidali e nelle cellule del Kupferr, oltre che in altri distretti corporei extraepatici come il colon, nell'apparato respiratorio e a livello renale (Mishra e Das, 2003; Wu et al., 2009). Le reazioni della seconda fase consistono nella coniugazione dell'epossido col glutatione (GSH) e la conseguente formazione dei composti metabolici glucuro-coniugati e sulfo-coniugati (Hayes et al., 1992). La coniugazione delle aflatossine con il glutatione è la maggiore via per l'escrezione dei metaboliti tossici che si verifica nella maggior parte delle specie animali. Differenti metaboliti glucoro e sulfoconiugati vengono formati negli epatociti permettendo l'escrezione delle aflatossine attraverso la via biliare e la via urinaria (Guerre et al., 1996).

## **Escrezione delle aflatossine nel latte**

La micotossina più importante per quanto riguarda il latte è l'aflatossina M (da "milk toxin"). Le AFM<sub>1</sub> ed M<sub>2</sub> derivano delle AFB<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> da cui sono iniziate mediante idrossilazione a livello epatico (Holzapfel et al., 1966). Spesso si ritrovano nel latte dei ruminanti alimentati con mangimi contaminati e potrebbero rappresentare un rischio per la salute dei neonati anche per via della loro escrezione nel latte materno umano (consumo diretto). Il latte è il nutriente principale per la crescita nella prima infanzia ed è proprio questa l'età in cui si è maggiormente vulnerabili alle aflatossine. Per questo la presenza dell'aflatossina M<sub>1</sub> nel latte materno, nel latte alimentare disponibile in commercio e nei prodotti a base di latte è uno dei maggiori problemi sanitari a livello globale. Sembra che il latte abbia il più alto potenziale dimostrato per quanto concerne l'introduzione di residui di aflatossina da tessuti animali edibili nella dieta umana. Le aflatossine sono, infatti, tra i principali fattori eziologici di sviluppo del carcinoma epatocellulare (IARC, 2002) e, più recentemente, è stata stabilita l'associazione tra l'esposizione alle aflatossine e la stentata crescita durante l'infanzia (Gong et al., 2004). La quantità di aflatossina M<sub>1</sub> escreta nel latte è direttamente proporzionale alla quantità di aflatossina B<sub>1</sub> ingerita con la razione alimentare. Quest'ultima dopo essere stata

ingerita viene metabolizzata principalmente a livello epatico. Successivamente, il processo definito carry-over porta alla eliminazione dei metaboliti (aflatossina M<sub>1</sub>) mediante il latte e le urine. Il carry-over dipende da diversi fattori oltre che la specie animale quali: la stagione produttiva, l'età, il livello produttivo, il consumo di mangimi, il rapporto di alimenti concentrati inclusi nella dieta, l'origine geografica e il tempo nel quale è stato effettuato il raccolto, nonché la pratica di alimentazione (Montagna et al., 2008; Fink-Gremmels, 2008; Sugiyama et al., 2008; Viridis et al., 2008).

Il tasso di conversione dell'aflatossina B<sub>1</sub>, ingerita, in aflatossina M<sub>1</sub> escreta nel latte, è compresa nell'intervallo tra lo 0,3-6,2 % per molte specie, tra cui i bovini da latte e l'uomo (Patterson et al., 1980; Creppy, 2002). Nella specie bovina, varia da animale ad animale, da un giorno all'altro e da una mungitura all'altra. Si stima che il carry-over vari dallo 0,08% allo 0,33% nella specie ovina, mentre dallo 0,35 al 3% in quella bovina (Allcroft et al., 1966; Allcroft e Roberts, 1968; Battacone et al., 2005). La differenza osservata nel carry-over dell'aflatossina M<sub>1</sub> tra gli animali potrebbe essere correlata alle differenze nell'attività di degradazione del rumine, nella formazione di aflatossicolo nel sistema ossidativo enzimatico dell'aflatossina B<sub>1</sub> e nella permeabilità delle ghiandole mammarie alla tossina (Masoero et al., 2007). È stato dimostrato inoltre che l'assunzione



prolungata di aflatossina B<sub>1</sub> con gli alimenti aumenta la percentuale di carry-over rispetto alla singola dose (Allcroft e Roberts, 1968). Nelle bovine da latte il carry-over e la quantità totale di aflatossina M<sub>1</sub> escreta con il latte aumentano con il livello produttivo, per cui le vacche ad elevata produzione presentano una maggiore escrezione di aflatossina M<sub>1</sub> rispetto a quelle a bassa produzione (Masoero et al., 2007). Probabilmente la maggiore produzione latte aumenta il meccanismo endogeno di detossificazione (Frobish et al., 1986). È stato dimostrato sia nelle bovine che nelle pecore da latte che esiste una relazione lineare tra la quantità di aflatossina M<sub>1</sub> escreta nel latte e l'aflatossina B<sub>1</sub> ingerita con i mangimi contaminati (Bakirci, 2001; Battacone et al. (2003). Prandini et al. (2009) hanno dimostrato che vacche da latte che abbiano ingerito una quantità di aflatossina B<sub>1</sub> inferiore a 40 µg/vacca/giorno producono latte con un contenuto di aflatossina M<sub>1</sub> inferiore a 0,05 µg/kg (limite massimo ammissibile in UE). Alcuni autori hanno anche stabilito un'associazione temporale alla contaminazione da aflatossina, definendo un modello di distribuzione stagionale del contenuto in aflatossina M nel latte (Ruangwises & Ruangwises, 2009).

La presenza dell'aflatossina M<sub>1</sub> nel latte suscita particolare preoccupazione per via dell'elevato potere oncogeno e mutageno e per via del largo consumo di latte da parte

delle categorie di consumatori appartenenti alla fascia debole della popolazione (soggetti giovani e anziani). Pertanto il latte è considerato tra gli alimenti di origine animale quello a più alto rischio per la presenza di aflatossine. La conversione metabolica dall'AFB<sub>1</sub> all'AFM<sub>1</sub> è da considerarsi un processo metabolico di disintossicazione da parte dell'organismo. Infatti l'aflatossina M<sub>1</sub>, rispetto all'aflatossina B<sub>1</sub>, ha la stessa tossicità, il 33% della cancerogenicità e il 3,3 % dell'attività mutagenica (Ewaidah, 1987). Altri autori riferiscono che l'aflatossina M<sub>1</sub> presenti la stessa tossicità dell'aflatossina B<sub>1</sub> ma cancerogenicità notevolmente ridotta in vivo (circa il 2-10%). Inoltre, a seguito di attivazione metabolica in vitro, l'aflatossina M<sub>1</sub> ha solo il 10% della mutagenicità rispetto all'aflatossina B<sub>1</sub> (Wogan & Paglialunga, 1974; Lafont et al., 1989).

La frequenza ed il livello di contaminazione da aflatossina M<sub>1</sub> nel latte di pecora e di capra è inferiore rispetto a quanto osservato in quello di vacca (Viridis et al., 2008).

Dati ottenuti dal laboratorio Regionale Allevatori della Sardegna nel corso degli anni 2015-2017 su campioni di latte ovino, caprino e vaccino condotti nell'ambito del monitoraggio in autocontrollo, evidenziano livelli di contaminazione superiori per il latte vaccino rispetto a quello dei piccoli ruminanti. In particolare nel latte ovino su un totale di 618 campioni analizzati nessuno evidenziava valori superiori ai LMR di 50 ng/kg e

solo 3 campioni (0,48%) presentavano valori compresi tra 30 e 50 ng/kg. Nel latte caprino a fronte di 235 campioni analizzati, 8 (3,4%) evidenziavano valori superiori ai LMR di cui uno con valori superiori a 120 ng/kg. Nel latte vaccino su un totale di 301 campioni, 14 (4,7%) avevano valori superiori a 50 ng/kg di cui due con concentrazioni superiori a 120 ng/kg. I principali fattori che determinano tali differenze sono essenzialmente rappresentati dall'esposizione e dal carry-over, inferiori nei piccoli rispetto ai grossi ruminanti.

L'esposizione della pecora e della capra all'AFB<sub>1</sub> è limitata dal prevalente carattere estensivo o semiestensivo degli allevamenti, nei quali il ricorso all'integrazione della razione con alimenti zootecnici conservati è contenuto. Nel latte di allevamenti intensivi di capre che ricevevano in corsia alimenti zootecnici conservati, è stata osservata una più frequente contaminazione da aflatossina M<sub>1</sub> (Virdis et al., 2008).

La tossicocinetica e l'escrezione dell'AFM<sub>1</sub> sono linearmente dipendenti dalla dose di AFB<sub>1</sub> assunta con i mangimi. Sarebbero necessarie dalle 12 alle 24 ore dopo l'ingestione dell'aflatossina B<sub>1</sub> perché l'aflatossina M<sub>1</sub> sia rilevata nel latte, così come il raggiungimento dei livelli massimi si verificherebbe alcuni giorni dopo l'ingestione. Al termine dell'assunzione di aflatossina B<sub>1</sub>, la concentrazione di aflatossina M<sub>1</sub> nel latte

diminuisce a un livello non rilevabile dopo 72 ore (van Egmond, 1989; Nachtmann et al., 2007). Nel latte di pecora sono stati riportati valori di escrezione di aflatossina M<sub>1</sub> variabili, con la rilevazione della tossina a 6 ore dalla somministrazione dell'alimento contaminato da aflatossina B<sub>1</sub>. Picchi elevati di escrezione potevano essere osservati dopo 24-48 ore. A seguito di esposizione giornaliera prolungata si osserva un accumulo della tossina nel latte per diversi giorni prima di raggiungere uno stato stazionario (Battacone et al., 2003, 2005, 2009).

### **Contaminazione da aflatossina M<sub>1</sub> nei prodotti lattiero-caseari**

#### *Latte*

La presenza di aflatossina M<sub>1</sub> nel latte e nei prodotti lattiero-caseari è stata segnalata in diversi studi condotti a livello internazionale, destando forte preoccupazione per i possibili effetti sulla salute umana. La presenza dell'aflatossina M<sub>1</sub> è stata riscontrata in diversi tipi di latte vaccino (pastorizzato, crudo, UHT) e prodotti lattiero-caseari, come formaggio e yogurt, nonché latte crudo proveniente da diverse specie (pecora, capra, bufala) (Kamkar, 2005). Le osservazioni indicano che la contaminazione da aflatossina M<sub>1</sub> nel latte e nei prodotti a base di latte è principalmente percepita in regioni geografiche

specifiche. È difficile effettuare un confronto sui dati epidemiologici riportati in letteratura relativi al livello di contaminazione da aflatossine a causa della forte disomogeneità dei dati tra un Paese all'altro e all'interno dello stesso Paese (Galvano et al., 1996). Ad esempio non sono state osservate differenze nel contenuto di aflatossina M<sub>1</sub> in campioni di latte provenienti dalle regioni del Sud e Nord della Cina (Han et al., 2013), mentre i livelli di contaminazione erano diversi in campioni di latte crudo provenienti da diverse regioni dell'Iran (Tajkarimi et al., 2008). Tali differenze sono legate a fattori quali: la produzione di mangimi, le tipologie di animali, i fattori ambientali come l'aridità, le variazioni stagionali, le procedure di estrazione e analisi e i limiti per l'AFM<sub>1</sub> stabiliti dalla legge per i mangimi e il latte. In alcuni Paesi la scarsa disponibilità di pascolo, l'uso eccessivo di concentrati nell'alimentazione, la contaminazione del mangime con aflatossina durante lo stoccaggio e anche l'inadeguata alimentazione degli animali, possono contribuire alla presenza di un elevato livello di aflatossina M<sub>1</sub> nel latte (Oliveira et al., 2013). Uno studio condotto da Malissiova et al. (2013) ha messo a confronto la contaminazione di campioni di latte di pecora e di capra provenienti da allevamenti biologici e convenzionali, rilevando un livello di contaminazione da aflatossina M<sub>1</sub> maggiore nei campioni provenienti da aziende biologiche. L'influenza dei

fattori stagionali è stata messa in relazione con il contenuto di aflatossina M<sub>1</sub> evidenziando livelli significativamente maggiori nel latte crudo e diversi prodotti lattiero-caseari durante le stagioni inverno-primavera rispetto a quelle estate-autunno, attribuibili al maggiore consumo di concentrati nel periodo invernale (Bilandzic et al., 2010; Fallah 2010; Bilandzic et al., 2014). È stato osservato infatti che durante la stagione invernale, la disponibilità di mangimi freschi come il pascolo, erba e foraggi verdi è ridotta e i produttori modificano le pratiche di alimentazione degli animali utilizzando maggiormente i mangimi concentrati. Questo tipo di mangime è generalmente composto da mais, semi di frumento e cotone che potrebbero essere immagazzinati in condizioni inadeguate e potrebbero contenere funghi tossigenici come *Aspergillus* e, di conseguenza, essere contaminati con elevati livelli di aflatossine (Asi et al., 2012). In un recente studio condotto da Picinin et al. (2013), sono stati raccolti 129 campioni di latte da diverse aziende in tre diversi periodi (secco, di transizione e piovoso), ed è stato osservato che la concentrazione della tossina è stata fortemente influenzata dalle condizioni climatiche, con i livelli più elevati riscontrati nel periodo asciutto. In altri casi le differenze potrebbero essere attribuite dalla differente sensibilità delle metodiche analitiche utilizzate (Sassahara et al., 2005).

Per quanto riguarda i dati sulla contaminazione da aflatossina  $M_1$  del latte e dei prodotti lattiero-caseari della Sardegna, uno studio condotto da Viridis et al. (2008) su campioni di latte di allevamento caprino, ha evidenziato che solamente il 17,3% dei campioni aveva un contenuto di  $AFM_1$  compreso tra i 5 e i 40 ng/L e la maggior parte dei campioni positivi (71.4%) provenivano da allevamenti intensivi. Un altro studio condotto sul latte di allevamenti ovini della Sardegna ha evidenziato che su 118 campioni di latte crudo di massa analizzati, un solo campione è risultato avere una concentrazione di aflatossina  $M_1$  superiore alla sensibilità del metodo (5 ng/L) ma comunque inferiore ai limiti massimi ammissibili per legge (Cossu et al., 2011).

#### *Altri prodotti lattiero-caseari*

Fernandes et al. (2012) hanno studiato la distribuzione e la stabilità dell'aflatossina  $M_1$  nel formaggio fresco Minas fabbricato con o senza colture starter. Gli autori osservarono che il tempo di conservazione non ha avuto alcun effetto sul contenuto di aflatossina  $M_1$  e il latte contenente un elevato livello di  $AFM_1$  ha determinato la concentrazione della tossina nel formaggio fresco Minas. Inoltre, l'aggiunta di colture starter non ha influenzato la concentrazione o la stabilità della tossina durante 30 giorni di stoccaggio. I risultati di Nilchian e Rahimi (2012), Bakirci (2001) e Deveci (2007)

hanno mostrato che l'aumento dei livelli di AFM<sub>1</sub> nel formaggio è in funzione del tipo di formaggio, le tipologie delle operazioni e la quantità di acqua eliminata durante i processi. Inoltre, ci sono alcuni fattori specifici che possono influenzano il livello di AFM<sub>1</sub> nella cagliata, come la temperatura del caglio, la durata della pressatura e il pH della salamoia satura. Grazie a quelle osservazioni sperimentali, le variazioni nel contenuto di AFM<sub>1</sub> nei diversi tipi di formaggio possono essere il risultato di molti altri fattori, come il trattamento termico, la proteolisi e l'esposizione del latte contaminato alla luce (Yousef & Marth, 1989). Fallah et al. (2009) e Mohajeri et al. (2013) hanno osservato che le variazioni nel contenuto di AFM<sub>1</sub> rilevate nei formaggi possono essere dovute anche al metodo analitico utilizzato per quantificare l'AFM<sub>1</sub>. In un report di Montagna et al. (2008), 256 campioni di formaggi prodotti da latte bovino, bufalino, ovino e misto ovi-caprino sono stati analizzati per verificare la presenza di AFM<sub>1</sub>. Gli autori hanno osservato che l'AFM<sub>1</sub> è stata rilevata nel 16,6% dei formaggi esaminati mentre i formaggi di capra e di pecora risultavano negativi. I risultati hanno mostrato che la quantità di AFM<sub>1</sub> nel latte caprino e ovino è minore rispetto a quella presente nel latte vaccino e questo può essere dovuto alle differenze nei loro apparati digerenti, nel meccanismo di assimilazione dell'AFB<sub>1</sub> negli animali, e nei diversi modelli di alimentazione. In altre



parole, i foraggi sono più suscettibili alla contaminazione da AFB<sub>1</sub> rispetto a quelli utilizzati per alimentare pecore e capre (Fallah et al., 2009; Fallah et al., 2011). Anfossi et al. (2012) hanno riferito che i formaggi italiani prodotti con latte di capra e pecora sono meno contaminati da AFM<sub>1</sub> rispetto ai formaggi prodotti con latte vaccino. Secondo Manetta et al. (2009), esiste una correlazione diretta tra il livello di AFM<sub>1</sub> presente nel latte e il livello ritrovato nel prodotto finale. Anfossi et al. (2012) hanno spiegato che a scala industriale i prodotti contengono un inferiore livello di AFM<sub>1</sub> rispetto ai prodotti artigianali, che può essere giustificato dal fatto che gli artigiani utilizzano spesso una sola fonte di latte che, talvolta, può essere contaminata con elevati livelli di AFM<sub>1</sub>, ma le industrie usano una combinazione diversa di latte e da fonti diverse, quindi il rischio di contaminazione è più basso per via della diluizione. Anche gli autori hanno commentato che la fase di maturazione potrebbe diminuire il livello di contaminazione probabilmente a causa del degrado della tossina, ma molti autori hanno menzionato che questa fase non è significativa in relazione all'alterazione della concentrazione della tossina. Ardic et al. (2009) hanno concluso che il formaggio è una potenziale fonte di AFM<sub>1</sub> rispetto ad altri prodotti lattiero-caseari perché questa tossina è associata alla frazione di caseina (che risulta concentrato nel formaggio). Alcuni studi hanno dimostrato che il livello di AFM<sub>1</sub>,

in alcuni tipi di formaggio molli, è di circa 3 volte superiore e di circa 5 volte maggiore nel formaggio duro rispetto al latte utilizzato per la fabbricazione (Bakirci, 2001; Deveci, 2007; Kamkar et al., 2008; Prandini et al., 2009).

## **DESTINO DELL’AFLATOSSINA M<sub>1</sub> NEL CORSO DELLA**

### **TRASFORMAZIONE DEL LATTE**

#### **Effetti dei trattamenti termici sul contenuto di AFM<sub>1</sub>**

L’afatossina M<sub>1</sub> è stabile ai processi termici applicati normalmente nel corso dei trattamenti termici del latte, necessitando per la sua decomposizione di temperature comprese tra i 237 e i 306 °C (Rustom, 1997). Il processo di pastorizzazione industriale e la bollitura del latte operata nell’ambiente domestico non sono in grado di diminuire il livello di afatossina M<sub>1</sub> nel latte vaccino (Awasthi et al., 2012). A seguito del riscaldamento del latte a differenti combinazioni tempo/temperatura comprese tra i 92°C e i 95 °C per 2-3 minuti non è stata osservata alcuna differenza significativa sul contenuto in afatossina (Govaris et al., 2002; Jasutiene et al., 2006).

#### **Effetto della caseificazione sul contenuto in afatossina M<sub>1</sub>**

A livello mondiale vengono prodotti diversi tipi di formaggio, le cui operazioni di fabbricazione, i tipi di latte (crudo e pastorizzato; bovino, caprino, ovino ecc.), i periodi di maturazione (formaggi stagionati e freschi), l’aggiunta di erbe e altri estratti, tra gli altri fattori, si differenziano notevolmente tra i vari formaggi. In generale, il formaggio è

un eccellente substrato per la crescita fungina, ma non può essere considerato un substrato adatto per la produzione di micotossine (Bullerman, 1981). Pertanto la presenza di aflatossina nel formaggio è la conseguenza dell'utilizzo di latte contaminato. Tuttavia, la presenza dell'aflatossina M<sub>1</sub> nel formaggio varia sensibilmente in funzione della tipologia di formaggio prodotto (Prado et al., 2001). È noto che il livello di AFM<sub>1</sub> nel formaggio è in funzione di diversi fattori, tra cui: il tipo di formaggio, la tecnologia, le strategie adottate nel processo di fabbricazione, la quantità di acqua rimossa durante la lavorazione, il pH della salamoia satura, la dimensione del taglio, la temperatura del caglio, la pressatura, il grado di contaminazione del latte, le differenze nella qualità del latte (van Egmond et al., 1977; Brackett e Marth, 1982a,b,c; Galvano et al., 1996; Oruc et al., 2006; Deveci, 2007; Kamkar et al., 2008; Sengun et al., 2008; Ardic et al., 2009; Mohammadi et al., 2009; Fernandes et al., 2012; Motawee, 2013).

### **Coagulazione e drenaggio del siero**

Notevoli differenze sono state osservate, oltre che nella ripartizione del contenuto di aflatossina M<sub>1</sub> tra cagliata e siero, anche nel diverso livello di concentrazione della tossina tra una tipologia di formaggio e l'altra. Tali differenze possono essere ricollegate

a diversi fattori quali il processo di fabbricazione del formaggio, dalla composizione chimica dei formaggi, dei metodi analitici oltre che dal tipo (contaminazione naturale o artificiale) e dal livello di contaminazione iniziale del latte (Blanco et al., 1988; Oruc et al., 2006). In uno studio condotto in Brasile, nel corso della produzione del formaggio tipico Minas Frescal, ottenuto con latte artificialmente contaminato da Aflatossina M<sub>1</sub>, è stato osservato che la tossina era distribuita per circa il 60% nella cagliata e per circa il 40% nel siero (Brackett & Marth, 1982b; Fernandes et al., 2012). In uno studio analogo condotto in Turchia sui formaggi Turkis white e Kashar è stata osservata una ripartizione del contenuto in aflatossina M<sub>1</sub> rispettivamente del 33%-46% nella cagliata e del 55%-58% nel siero (Colak, 2007; Oruc et al., 2007). All'aumentare del livello di contaminazione iniziale aumenta la percentuale di aflatossina M<sub>1</sub> che si ripartisce nella cagliata e, successivamente, nel formaggio (Oruc et al., 2007). Nei formaggi italiani Robiola, Primosale e Maccagno è stata osservata una ripartizione tra cagliata e siero rispettivamente del 41%-74,1% e del 30,7%-65,6%, del 25,4%-44,0% e del 60,8%-82,7%, del 31,3%-35,7% e del 63,9-77,0% (Cavallarini et al., 2014). La riduzione della quantità di aflatossina M<sub>1</sub> presente nella cagliata rispetto a quella inizialmente presente nel latte è legata al fatto che parte viene drenata dal siero e una parte minore finisce nella

salamoia (Oruc et al., 2006). Nel formaggio tipo Mozzarella è stata osservato che circa il 20% della quantità totale di aflatoxina presente nel latte si ritrovava nel siero (Brackett & Marth, 1982c). La distribuzione di aflatoxina M<sub>1</sub> nel siero in formaggi tradizionali della Spagna era del 42,3% per il Manchego e del 33,7%-44,4% nel formaggio Requesòn (Rubio et al., 2011). Invece nel formaggio Feta non sono state osservate differenze significative nella partizione di aflatoxina M<sub>1</sub> tra cagliata e siero rispetto al livello iniziale nel latte (Motawee & McMahon, 2009).

Al di là della quantità totale residua, nella cagliata si osserva una concentrazione dell'aflatoxina che è molto variabile da una tipologia di formaggio all'altra. È pari a circa 1,4-6,7 volte nel formaggio bianco di Turchia e a 4,3 volte nel Cheddar (Brackett & Marth, 1982b, Oruc et al., 2006; Colak, 2007; Cavallarin et al., 2014). Cavallarin et al. (2014) hanno osservato che di Primosale, i formaggi Robiola e Maccagno hanno mostrato rispettivamente concentrazioni di aflatoxina M<sub>1</sub> di 1,4, 2,2 e 6,7 volte più elevate del latte da cui sono stati prodotti. Nella cagliata del formaggio Feta è stato riscontrato un fattore di arricchimento dell'aflatoxina M<sub>1</sub> di 4,9 volte quello presente nel latte (Kaniou-Grigoriadou et al., 2005). Nel formaggio Feta Motawee & McMahon (2009) hanno osservato che la concentrazione dell'aflatoxina M<sub>1</sub> nel formaggio è di circa 3 volte. Nei

formaggi turchi Turkis white e Kashar e white cheese iraniano il fattore di concentrazione variava da 2,9 a 3,6 volte in funzione del livello di contaminazione iniziale del latte (Oruc et al., 2007; Kamkar et al., 2008). Nei formaggi tradizionali spagnoli Manchego e Requesòn la concentrazione dell'aflatossina M<sub>1</sub> nella cagliata era rispettivamente 2-3 volte e 1,7 volte più elevata che nel latte (Rubio et al., 2011). Invece, in altri formaggi come il Brick, a fronte di una concentrazione nella cagliata pari a 1,7 volte quella del latte, il siero residuo conteneva la stessa concentrazione di aflatossina M<sub>1</sub> riscontrata nel latte, condizione resa possibile dalla bassa resa della cagliata e delle piccole particelle di cagliata contenute nel siero (Brackett et al., 1982). Esistono pertanto dati bibliografici molto variabili con indicazione del livello di aflatossina M<sub>1</sub> da 3-16 volte più elevate nel formaggio che nel latte, mentre altri studi hanno riferito che è circa tre volte superiore nei formaggi molli e cinque volte più elevata nei formaggi duri rispetto al latte (Ardic et al., 2009). La concentrazione dell'aflatossina M<sub>1</sub> nella cagliata sarebbe legata alla particolare affinità nei confronti delle micelle di caseina (Applebaum & Marth, 1982a; Brackett e Marth, 1982a; Mendonça e Venancio, 2005; Barbiroli et al., 2007).

## **Salatura**

Il contenuto di sale varia notevolmente in funzione della tipologia di formaggio e delle modalità di salatura (a secco nella cagliata, a secco superficiale o in salamoia (Guinee, 2004). Un numero di studi limitato è stato condotto per valutare l'evoluzione del contenuto in aflatoossina M<sub>1</sub> a seguito della salatura e quelli disponibili hanno considerato esclusivamente il metodo dell'immersione in salamoia. Nel corso della salatura è stato osservato che i livelli di aflatoossina nella salamoia aumentavano significativamente nel corso dei primi 10 giorni di salatura (Motawee e McMahon, 2009) ma che solo il 2-4% della contaminazione iniziale di AFM<sub>1</sub> iniziale era trasferita nella salamoia (Govaris et al., 2001; Oruc et al., 2006).

## **Maturazione**

Il destino dell'AFM<sub>1</sub> nella maturazione del formaggio è stato valutato su differenti tipologie di formaggio. Nel formaggio Cheddar ottenuto da latte naturalmente contaminato, Brackett e Marth (1982b), hanno osservato che il contenuto di aflatoossina M<sub>1</sub> dai valori iniziali aumentava alle 18-24 settimane di maturazione, per poi diminuire fino ai valori iniziali a fine maturazione intorno alle 40 settimane. Nel formaggio Telemes



è stata osservata una riduzione significativa del contenuto in aflatossina  $M_1$  nel corso della maturazione protratta fino a 120 giorni. Tuttavia la diminuzione era maggiore nel corso dei primi due mesi ed era più marcata nei campioni con livello di contaminazione iniziale più elevato (Govaris et al., 2001). In altre tipologie di formaggi come il white pickled turco nel corso della maturazione prolungata fino a tre mesi non è stato osservato alcun degrado significativo dell'aflatossina  $M_1$  (Oruc et al., 2006). Diversamente, nel formaggio Parmigiano Reggiano è stato osservato che nel corso della maturazione il contenuto di  $AFM_1$  tendeva a decrescere alle 22 settimane, per poi aumentare fino al termine della maturazione a 43 settimane. Tale andamento sarebbe legato all'azione degli enzimi (lipasi) che determinerebbe un più efficace recupero della tossina dal formaggio nel corso della preparazione del campione per le successive indagini analitiche (Brackett & Marth, 1982c). Sempre all'attività enzimatica sembrerebbe legata la differente ripartizione dell'aflatossina  $M_1$  riscontrata nel formaggio Brick, in cui si è osservata una maggiore concentrazione nella crosta dei formaggi maturati per 2-3 settimane e nel centro della forma in quelli maturati per 4 settimane (Brackett et al., 1982). Viceversa, Blanco et al. (1988) non hanno trovato differenze di concentrazione di aflatossina tra parti interne ed esterne del formaggio dopo 60 giorni. Nel Grana Padano e in formaggi tipo Parmigiano

matturo è stato riscontrato un contenuto 4,5-5,8 volte superiore a quello del latte di partenza. È stata inoltre, osservata una correlazione positiva tra contenuto in aflatossina del latte e quella del formaggio, che consente di prevedere il livello di aflatossina M<sub>1</sub> nel formaggio sulla base di quello del latte con cui viene prodotto (Brackett e Marth,1982c; Manetta et al., 2009). In formaggi a pasta filata della tipologia mozzarella è stato osservato un aumento di 8,1 volte del livello di aflatossina iniziale del latte ((Brackett e Marth,1982c).

## NORMATIVA

Sebbene dal punto di vista di tutela della salute pubblica sia auspicabile la totale assenza di cancerogeni genotossici nei prodotti destinati all'alimentazione umana, le metodiche di analisi per quanto sensibili hanno dei limiti di determinazione esprimibili nell'ordine di pochi ng/kg (ppt). Il perseguimento dell'assenza di aflatossine non è perseguibile e pertanto, a livello internazionale, l'orientamento delle autorità sanitarie è quello di fissare dei livelli di concentrazione massimi tollerabili (limiti massimi di residui). Le normative sono fatte prima di tutto sulla base degli effetti tossici noti. La valutazione dei rischi per le micotossine attualmente considerate più significative è stata fatta dal Joint Expert Committee on Food Additives (JEFCA), organismo consultivo scientifico della FAO e del WHO. La valutazione dei dati tossicologici normalmente risulta nella stima di un PTDI (Provisional Tolerable Daily Intake - Ingestione giornaliera tollerabile provvisoria). Per le sostanze cancerogene, come le micotossine, non essendo definibile una dose giornaliera senza effetto, nella definizione dei limiti si segue il principio A.L.A.R.A. Il livello ALARA derivante dall'acronimo As Low As Reasonably Achievable (tanto basso quanto ragionevolmente ottenibile) è definito come la concentrazione di una sostanza che non può essere eliminata da un alimento senza

richiedere lo scarto dell'alimento nel complesso o senza compromettere la disponibilità della domanda di alimento. Il documento FAO "Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003" ([www.fao.org](http://www.fao.org)) riporta in allegato i limiti per le singole nazioni e alcune osservazioni sulle micotossine normate, le soglie e il numero di paesi che a livello mondiale le hanno normate. L'applicazione di questo principio spiega la definizione a livello internazionale di limiti massimi ammissibili (MRL) differenti. In Europa sono stati definiti limiti di  $50 \text{ ng kg}^{-1}$  (Regolamento CE 1881/2006 e successive modifiche), mentre negli Stati Uniti la FDA ha definito un limite massimo di  $500 \text{ ng kg}^{-1}$  (U.S. Food and Drug Administration, 2011), quindi dieci volte superiore a quello europeo. Tali differenze sono giustificate dal fatto che negli USA esistono ampie zone con condizioni climatiche favorevoli alla formazione delle aflatossine, rendendo un limite restrittivo come quello stabilito in Europa praticamente non perseguibile. È da tenere in considerazione, tuttavia, che la valutazione del rischio per i cancerogeni genotossici diretti viene effettuata, sulla base dei dati sperimentali, ricorrendo ad una estrapolazione lineare allo zero del limite di confidenza superiore della dose più piccola che ha prodotto il cancro nel modello sperimentale. Questo consente un calcolo teorico, ampiamente conservativo, della percentuale a rischio in una popolazione esposta a dosaggi minimi

della sostanza in causa. È così possibile arrivare, ad esempio, a tollerare dei livelli massimi di residuo che, se costantemente presenti nell'alimento, causano un rischio teorico di cancerogenesi in un individuo su un milione, o su 10 milioni o su 100 milioni.

Il livello di residuo tollerato, se accettabile in base ad un criterio rischio/beneficio, è quello più conservativo che risulta ancora compatibile con i livelli inevitabili di contaminazione. Criteri tossicologici di questo tipo hanno portato in Europa a stabilire il limite particolarmente severo di 0,05 mcg/kg (ppb) per l'aflatossina M<sub>1</sub> nel latte. Come conseguenza di tale limite l'allevatore di bovine da latte dovrà preoccuparsi dei livelli di aflatossina B<sub>1</sub> nell'alimento della bovina anche quando questi non creano alcun problema di salute alla bovina stessa. Anche nella donna è stato constatato che l'ingestione di alimenti contaminati da aflatossina B<sub>1</sub> comporta l'escrezione di aflatossina M<sub>1</sub> nel latte. I monitoraggi finora condotti in Italia sul latte materno hanno tuttavia dato indicazioni molto rassicuranti. La stessa cosa purtroppo non può dirsi per alcuni Paesi in via di sviluppo; ad esempio, un monitoraggio condotto in Sierra Leone ha evidenziato una percentuale molto alta (88%) di positività del latte materno alle aflatossine. In diversi Paesi a clima tropicale, sia dell'Africa che dell'India, la presenza di aflatossine nel mais e in altri prodotti è stata da tempo correlata all'incidenza di tumori epatici, di cirrosi e di

sindromi immunodepressive nell'uomo. Va sottolineato inoltre che in alcuni di questi Paesi, a causa della scarsa igiene degli alimenti che si combina ad un largo impiego dei cereali nell'alimentazione umana, ancora oggi si verificano nelle persone casi di intossicazioni acute da micotossine, laddove nei Paesi sviluppati le intossicazioni acute sono diventate rare anche negli animali.

I rischi derivanti dall'ingestione di prodotti contaminati da micotossine hanno indotto numerosi Paesi a imporre misure atte al loro controllo. Vanno presi in considerazione svariati fattori al fine di determinare i limiti previsti dai regolamenti applicabili alle aflatossine:

- i dati sulla diffusione delle aflatossine consentono di individuare i prodotti alimentari a rischio su cui intervenire con una regolamentazione legislativa; occorre tuttavia considerare che, nei paesi in via di sviluppo, le disponibilità alimentari sono limitate e, di conseguenza, l'imposizione di misure legali potrebbe generare una penuria alimentare e quindi un aumento dei prezzi delle derrate;
- i dati tossicologici indicano una tolleranza pressoché nulla per le aflatossine;
- i metodi di analisi devono essere affidabili e sensibili;

- eccezion fatta per i prodotti di origine animale, la distribuzione delle AFs nel substrato di contaminazione primario (cereali) non è omogenea; occorre di conseguenza stabilire dei criteri validi per realizzare un campionamento statisticamente rappresentativo;
- spesso la mancata armonizzazione dei limiti legislativi crea una netta spaccatura tra paesi esportatori che desiderano imporre i loro prodotti su nuovi mercati e paesi importatori che richiedono un costante approvvigionamento secondo giusti criteri di sicurezza alimentare.

Non c'è una soluzione semplice e univoca che consenta di soddisfare contemporaneamente tutti i suddetti fattori. Inoltre, le aflatossine dovrebbero essere assenti da tutti gli alimenti destinati sia all'alimentazione umana che animale, ma dato che sono contaminanti naturali, è impossibile annullare completamente il rischio di esposizione.

Nell'applicare i tenori massimi delle tossine si tiene conto di:

- Modifiche nella concentrazione del contaminante causate dai processi di essiccazione o di diluizione;
- modifiche nella concentrazione del contaminante causate dalla trasformazione;

- le proporzioni relative agli ingredienti del prodotto;
- il limite analitico di quantificazione.

Il Regolamento dell'UE n. 165/2010 reca la modifica del Reg. 1881/2006 e precisa i tenori massimi di AFB<sub>1</sub> e di Aflatossine totali in una serie di prodotti alimentari (tabella 1a, b e c). Queste modifiche sono state necessarie per tenere conto degli sviluppi del *Codex Alimentarius*, delle indicazioni del gruppo di esperti sui contaminanti nella catena alimentare (CONTAM) dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) e di nuove informazioni contenute in recenti pareri scientifici.



**Tabella 1a.** Limiti di aflatossine definiti per alcuni prodotti alimentari (Reg. 1831/2006).

		Parte 2: Micotossine		
Prodotti alimentari (*)		Tenori massimi (µg/kg)		
2.1	<b>Aflatossine</b>	B <sub>1</sub>	Somma di B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>
2.1.1	Arachidi da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego come ingredienti di prodotti alimentari	8,0 (*)	15,0 (*)	—
2.1.2	Frutta a guscio da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari	5,0 (**)	10,0 (**)	—
2.1.3	Arachidi, frutta a guscio e relativi prodotti di trasformazione, destinati al consumo umano diretto o all'impiego quali ingredienti di prodotti alimentari	2,0 (*)	4,0 (*)	—
2.1.4	Frutta secca da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari	5,0	10,0	—
2.1.5	Frutta secca e relativi prodotti di trasformazione, destinati al consumo umano diretto o all'impiego quali ingredienti di prodotti alimentari	2,0	4,0	—
2.1.6	Tutti i cereali e loro prodotti derivati, compresi i prodotti trasformati a base di cereali, eccetto i prodotti alimentari di cui ai punti 2.1.7, 2.1.10 e 2.1.12	2,0	4,0	—
2.1.7	Granturco da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari	5,0	10,0	—
2.1.8	Latte crudo (*), latte trattato termicamente e latte destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte	—	—	0,050

**Tabella 1b.** Limiti di aflatossine definiti per alcuni prodotti alimentari (Reg.

165/2010).

Prodotti alimentari (1)		Tenori massimi (µg/kg)		
2.1.9	Le seguenti specie di spezie: Capsicum spp. (frutti secchi dello stesso, interi o macinati, compresi peperoncini rossi, peperoncino rosso in polvere, pepe di Caienna e paprica) Piper spp. (frutti dello stesso, compreso il pepe bianco e nero) Myrsine fragrans (noce moscata) Zingiber officinale (zenzero) Curcuma longa (curcuma)	5,0	10,0	—
2.1.10	Alimenti a base di cereali e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini (2) (3)	0,10	—	—
2.1.11	Alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento, compresi il latte per lattanti e il latte di proseguimento (4) (5)	—	—	0,025
2.1.12	Alimenti dietetici a fini medici speciali (6) (10), destinati specificatamente ai lattanti	0,10	—	0,025

**Tabella 1c.** Limiti di aflatossine definiti per alcuni prodotti alimentari (Reg. 165/2010).

Prodotti alimentari <sup>(1)</sup>		Tenori massimi (µg/kg)		
2.1.	<b>Aflatossine</b>	B <sub>1</sub>	Somma di B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>
2.1.1.	Arachidi e altri semi oleosi <sup>(40)</sup> da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quali ingredienti di prodotti alimentari ad eccezione: — delle arachidi e degli altri semi oleosi da sottoporre a pressatura per la produzione di oli vegetali raffinati	3,0 <sup>(5)</sup>	15,0 <sup>(5)</sup>	—
2.1.2.	Mandorle, pistacchi e semi di albicocca da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quali ingredienti di prodotti alimentari	12,0 <sup>(5)</sup>	15,0 <sup>(5)</sup>	—
2.1.3.	Nocciole e noci del Brasile da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quali ingredienti di prodotti alimentari	3,0 <sup>(5)</sup>	15,0 <sup>(5)</sup>	—
2.1.4.	Frutta a guscio, diversa dalla frutta a guscio di cui ai punti 2.1.2 e 2.1.3, da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari	5,0 <sup>(5)</sup>	10,0 <sup>(5)</sup>	—
2.1.5.	Arachidi e altri semi oleosi <sup>(40)</sup> e relativi prodotti di trasformazione, destinati al consumo umano diretto o all'impiego quali ingredienti di prodotti alimentari, ad eccezione: — degli oli vegetali crudi destinati alla raffinazione — degli oli vegetali raffinati	2,0 <sup>(5)</sup>	4,0 <sup>(5)</sup>	—
2.1.6.	Mandorle, pistacchi e semi di albicocca destinati al consumo umano diretto o all'impiego quali ingredienti di prodotti alimentari <sup>(41)</sup>	3,0 <sup>(5)</sup>	10,0 <sup>(5)</sup>	—
2.1.7.	Nocciole e noci del Brasile destinate al consumo umano diretto o all'impiego quali ingredienti di prodotti alimentari <sup>(41)</sup>	5,0 <sup>(5)</sup>	10,0 <sup>(5)</sup>	—
2.1.8.	Frutta a guscio, diversa dalla frutta a guscio di cui ai punti 2.1.6 e 2.1.7, e relativi prodotti di trasformazione, destinati al consumo umano diretto o all'impiego quali ingredienti di prodotti alimentari	2,0 <sup>(5)</sup>	4,0 <sup>(5)</sup>	—
2.1.9.	Frutta secca da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari	5,0	10,0	—
2.1.10.	Frutta secca e relativi prodotti di trasformazione, destinati al consumo umano diretto o all'impiego quali ingredienti di prodotti alimentari	2,0	4,0	—
2.1.11.	Tutti i cereali e loro prodotti derivati, compresi i prodotti trasformati a base di cereali, eccetto i prodotti alimentari di cui ai punti 2.1.12, 2.1.15 e 2.1.17	2,0	4,0	—

Prodotti alimentari (*)		Tenori massimi (µg/kg)		
2.1.12.	Granturco e riso da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quali ingredienti di prodotti alimentari	5,0	10,0	—
2.1.13.	Latte crudo <sup>(6)</sup> , latte trattato termicamente e latte destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte	—	—	0,050
2.1.14.	Le seguenti specie di spezie: <i>Capsicum</i> spp. (frutti secchi dello stesso, interi o macinati, compresi peperoncini rossi, peperoncino rosso in polvere, pepe di Caienna e paprica) <i>Piper</i> spp. (frutti dello stesso, compreso il pepe bianco e nero) <i>Myristica fragrans</i> (noce moscata) <i>Zingiber officinale</i> (zenzero) <i>Curcuma longa</i> (curcuma) Miscele di spezie contenenti una o più delle suddette spezie	5,0	10,0	—
2.1.15.	Alimenti a base di cereali e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini <sup>(7)</sup> <sup>(7)</sup>	0,10	—	—
2.1.16.	Alimenti per lattanti e aliment. di proseguimento, compresi il latte per lattanti e il latte di proseguimento <sup>(4)</sup> <sup>(8)</sup>	—	—	0,025
2.1.17.	Alimenti dietetici a fini medici speciali <sup>(9)</sup> <sup>(10)</sup> destinati specificamente ai lattanti	0,10	—	0,025

In altri paesi sono stati stabiliti dei limiti massimi ammissibili per le aflatossine più elevati rispetto all'UE, ad es. per l'AFM<sub>1</sub> questo limite è pari a 200 ng/L in Siria (FAO, 2004) e 500 ng/L in Brasile, Cina e Serbia. Nella tabella 2 sono riportati i limiti massimi ammissibili per le aflatossine totali in alcuni paesi, mentre in tabella 3 sono riportati i limiti massimi ammissibili di Aflatossina M<sub>1</sub>.

**Tabella 2:** Limiti previsti in alcuni paesi per il contenuto di aflatossine negli alimenti.

<b>Paese</b>	<b>Alimenti</b>	<b>Aflatossine Totali (µg/kg)</b>
Australia/Nuova Zelanda	Peanuts Tree nuts	15
Canada	Nut and nut products	15
Codex GCC <sup>(a)</sup>	Peanuts, almonds, shelled Brazil nuts, hazelnuts pistachios intended for further processing	15
Nigeria	Almonds, hazelnuts, pistachios, shelled Brazil nuts, “ready-to-eat”	10
India	Wheat, maize, jawar (sorghum) and bajra, rice, whole and split pulse (dal) masur (lentil), whole and split pulse urd (mung bean), whole and split pulse moong (green gram), whole and split pulse chana (gram), split pulse arhar (red gram), and other food grains	30
	Groundnut kernels (shelled) (peanuts);	30
USA	Brazil nuts, peanuts and peanut products, pistachio products	20
South Africa	Peanuts	15

<sup>(a)</sup>I paesi membri del GCC sono l’Arabia Saudita, gli Emirati Arabi Uniti (UAE), Kuwait, Bahrain, Oman, Yemen e Qatar.

**Tabella 3.** Limiti previsti in alcuni paesi per il contenuto di aflatossina M<sub>1</sub> negli alimenti

Paese	Alimento	Aflatossina M <sub>1</sub> (µg/kg)
EU Bosnia and Herzegovina Turkey	Raw milk, heat-treated milk and milk for the manufacture of milk-based products	0.050
	Infant formulae and follow-on formulae, including infant milk and follow-on milk	0.025 (products ready to use)
	Dietary foods for special medical purposes intended specifically for infants	0.025 (products ready to use)
China	Milk and milk products (for milk powder, calculated on a fresh milk basis)	0.5
	Formulated foods for infants (milk or milk protein based)	0.5 (calculated on a dry powder basis)
	Formulated foods for older infants and young children (milk or milk protein based)	0.5 (calculated on a dry powder basis)
	Formulated foods for special medical purposes intended for infants	0.5 (calculated on a dry powder basis)
Codex, GCC, India, Kenya, USA	Milk	0.5
Argentina	Milk, liquid including milk used in the manufacture of milk and milk products and reconstituted milk	0.5 <sup>(1)</sup>
	Milk, powder	5.0
	Milk formula	ND
Mexico	Pasteurised, ultrapasteurised, sterilised and dehydrated milk, milk formula and combined milk products	0.5 <sup>(1)</sup>
South Africa	Milk	0.05

Sulla base dei meccanismi metabolici che regolano l'escrezione di aflatossine con il latte, appare evidente che la regolamentazione dei livelli massimi tollerabili di aflatossina M<sub>1</sub> negli alimenti a base di latte non può prescindere dagli analoghi valori stabiliti per i mangimi destinati alle lattifere. Il Decreto Legislativo 149/2004, "Attuazione delle direttive 2001/102/CE, 2002/32/CE, 2003/57/CE, 2003/100/CE, relative alle sostanze e ai prodotti indesiderabili nell'alimentazione degli animali" fissa i limiti di aflatossine nei alimenti destinati all'alimentazione degli animali. La normativa relativa alle micotossine risulta molto complessa e in continua evoluzione. Sebbene siano stati riportati diversi studi che rendono evidente il rischio associato a contaminazione da AFM<sub>1</sub> in diversi prodotti lattiero caseari, non tutti i paesi hanno definito criteri di accettabilità per i prodotti a base di latte. A fronte delle indicazioni della Commissione del Codex Alimentarius che sostiene che il limite massimo ammissibile di AFM<sub>1</sub> nel formaggio non dovrebbe essere superiore a 250 ng/kg (Codex Alimentarius Commission, 2001), limiti specifici massimi ammissibili di AFM<sub>1</sub> sono stati fissati a 200 ng kg<sup>-1</sup> (Olanda) e a 250 ng kg<sup>-1</sup> (Svizzera, Austria e Turchia). In Italia, il Ministero della Salute, in seguito all'emergenza aflatossina del 2003, aveva definito, per i formaggi a pasta dura tipo grana, un limite provvisorio di 450 ng kg<sup>-1</sup> (Ministero della Salute, 2004). Tale limite



era stato individuato tenendo conto del fattore di concentrazione del latte individuato per questa tipologia di formaggio, in ottemperanza al Regolamento Comunitario in materia di quote latte (GURI, 2003). A seguito dell'ultima emergenza aflatossina con la nota DGISAN n. 28454 del 3/7/2013 il limite massimo ammissibile di AFM1 nei formaggi a pasta dura pari a 275 ng/kg.

## RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Allcroft, R., & Roberts, B. A. (1968). Toxic groundnut meal: the relationship between aflatoxin B1 intake by cows and excretion of aflatoxin M1 in milk. *Veterinary Record*, 82, 116-118.
2. Allcroft, R., Rogers, H., Lewis, G., Nabney, J., & Best, P. E. (1966). Metabolism of aflatoxin in Sheep: excretion of the 'milk toxin'. *Nature*, London, 209(5019), 154-155.
3. Anfossi, L., Baggiani, C., Giovannoli, C., D'Arco, G., Passini, C., & Giraudi, G. (2012). Occurrence of aflatoxin M1 in Italian cheese: results of a survey conducted in 2010 and correlation with manufacturing, production season, milking animals, and maturation of cheese. *Food Control*, 25, 125e130.
4. Ardic, M., Karakaya, Y., Atasever, M., & Adiguzel, G. (2009). Aflatoxin M1 levels of Turkish white brined cheese. *Food Control*, 20, 196-199.
5. Ardic, M., Karakaya, Y., Atasever, M., & Adiguzel, G. (2009). Aflatoxin M1 levels of Turkish white brined cheese. *Food Control*, 20, 196-199.

6. Asi, M. R., Iqbal, S. Z., Arino, A., & Hussain, A. (2012). Effect of seasonal variations and lactation times on aflatoxin M1 contamination in milk of different species from Punjab, Pakistan. *Food Control*, 25, 34-38.
7. Awasthi, V., Bahman, S., Thakur, L. K., Singh, S. K., Dua, A., & Ganguly, S. (2012). Contaminants in milk and impact of heating: an assessment study. *Indian Journal of Public Health*, 56, 95-99.
8. Azziz-Baumgartner E, Lindblade K, Giesecker K, Schurz Rogers H, Kieszak S, Njapau H, Schleicher R, McCoy LF, Misore A, DeCock K, Rubin C, Slutsker L, Aflatoxin Investigative Group (2005). Case-Control Study of an Acute Aflatoxicosis Outbreak, Kenya, 2004. *Environmental Health Perspectives* 113:1779-1783.
9. Bakirci, I. (2001). A study on the occurrence of aflatoxin M1 in milk and milk products produced in Van province of Turkey. *Food Control*, 12, 47-51.
10. Baptista, A. S., Horii, J., & Baptista, A. S. (2004). Fatores físico-químicos e biológicos ligados a produção de micotoxinas. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, 22, 1-14.

11. Baranyi, N., Kocsube, S., & Varga, J. (2015). Aflatoxins: climate change and biodegradation. *Current Opinion in Food Science*, 5, 60-66.
12. Baranyi, N., Kocsube, S., Vagvolgyi, C., & Varga, J. (2013). Current trends in aflatoxin research. *Acta Biologica Szegediensis*, 57, 95-107.
13. Barbiroli, A., Bonomi, F., Benedetti, S., Mannino, S., Monti, L., Cattaneo, T., et al. (2007). Binding of aflatoxin M1 to different protein fractions in ovine and caprine milk. *Journal of Dairy Science*, 90, 532-540.
14. Barug, D., van Egmond, H., López Garzía, R., van Osenbruggen, T., Visconti, A. (2004). *Meeting the Mycotoxin Menace*. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands. 319.
15. Battacone G., Nudda A., Cannas A., Borlino A.C., Bomboi G., Pulina G. (2003). Excretion of Aflatoxin M1 in Milk of Dairy Ewes Treated with Different Doses of Aflatoxin B1. *Journal of Dairy Science*, 86, 2667-2675.
16. Battacone G., Nudda A., Palomba M., Mazzette A., Pulina G. (2009). The Transfer of Aflatoxin M1 in Milk of Ewes Fed Diet Naturally Contaminated by Aflatoxins and Effect of Inclusion of Dried Yeast Culture in the Diet. *Journal of Dairy Science*. 92, 4997-5004.

17. Battacone, G., Nudda, A., Palomba, M., Pascale, M., Nicolussi, P., Pulina, G. (2005). Transfer of aflatoxin B1 from feed to milk and from milk to curd and whey in dairy sheep fed artificially contaminated concentrates. *J. Dairy Sci.*, 88, 3063-3069.
18. Berthiller, F., Crews, C., Dall'Asta, C., Saeger, S. D., Haesaert, G., Karlovsky, P., ... & Stroka, J. (2013). Masked mycotoxins: A review. *Molecular nutrition & food research*, 57(1), 165-186.
19. Bhat, R., Rai, R. V., & Karim, A. A. (2010). Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol. 9, Jan, pp. 57-81,1541-4337
20. Bilandzic, N., Bozic, D., Dokic, M., Sedak, M., Kolanovic, B. S., Varenina, I., et al. (2014). Seasonal effect on aflatoxin M1 contamination in raw and UHT milk from Croatia. *Food Control*, 40, 260-264.
21. Bilandzic, N., Varenina, I., & Solomun, B. (2010). Aflatoxin M1 in raw milk in Croatia. *Food Control*, 21, 1279-1281.
22. Blanco, J. L., Dominguez, L., Gomez-Lucia, E., Garayzabal, J. F. F., Garcia, J. A., & Suarez, G. (1988). Presence of aflatoxin M1 in commercial ultra-

- hightemperature-treated milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 1622-1623.
23. Blüthgen, A., Ubben, E.H. (2000). Survey of the contamination of feeds and tank bulk milk with aflatoxins B1 and M1. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*. 52, 335-354.
  24. Brackett, R. E., & Marth, E. H. (1982a). Association of aflatoxin M1 with casein. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 174, 439-441.
  25. Brackett, R. E., & Marth, E. H. (1982b). Fate of Aflatoxin M1 in Cheddar cheese and in process spread. *Journal of Food Protection*, 45, 549-552.
  26. Brackett, R. E., & Marth, E. H. (1982b). Fate of Aflatoxin M1 in Cheddar cheese and in process spread. *Journal of Food Protection*, 45, 549-552.
  27. Brackett, R. E., & Marth, E. H. (1982c). Fate of aflatoxin M1 in parmesan and mozzarella cheese. *Journal of Food Protection*, 45, 597-600.
  28. Brackett, R. E., Applebaum, R. A., Wiseman, D. W., & Marth, E. H. (1982d). Fate of aflatoxin M1 in brick and Limburger-like cheese. *Journal of Food Protection*, 45, 553-556.

29. Bressac, B., Kew, M., Wands, J., & Ozturk, M. (1991). Selective G to T mutations of gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*, 350, 429-431.
30. Bryden, W. L. (2012). Mycotoxin contamination of the feed supply chain: implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*, 173, 134-158.
31. Bullerman, L. B. (1981). Public health significance of molds and mycotoxins in fermented dairy products. *Journal of Dairy Science*, 64, 2439-2452.
32. Carlile, M. J., Watkinson, S. C., & Gooday, G. W. (2001). *The fungi*. Gulf Professional Publishing.
33. Cavallarin, L., Antoniazzi, S., Giaccone, D., Tabacco, E., & Borreani, G. (2014). Transfer of aflatoxin M1 from milk to ripened cheese in three Italian traditional production methods. *Food Control*, 38, 174-177.
34. Ceruti, A., Ceruti, M., Vigano, G., (1993). *Botanica medica farmaceutica e veterinaria con elementi di biologia vegetale*. Zanichelli, Bologna, Italia.

35. Circular No. 10 of 9 June 1999, Official control of foodstuffs: maximum permitted levels for mycotoxins in those foods of natural, Community or third country origin, Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, 140 (135), 11/6/99, 52-7.
36. Codex Alimentarius Commission. (2001). Comments submitted on the draft maximum level for Aflatoxin M1 in milk. Codex committee on food additives and contaminants 33rd session. The Netherlands: Hague.
37. Codex: Codex General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed (CODEX STAN 193-1995), as amended.
38. Colak, H. (2007). Determination of aflatoxin M1 levels in turkish white and kashar cheeses made of experimentally contaminated raw milk. Journal of Food and Drug Analysis, 15, 163-168.
39. Cossu F., Scarano C., Moniello G., Spanu C., Pittau D., Viridis S., De Santis EPL (2011). Detection of aflatoxin M1 in bulk-tank milk and sheep cheese. A.I.V.I online, 1, 93-97.
40. Cotty, P. J., Bayman, P., Egel, D. S., & Elias, K. S. (1994). Agriculture, aflatoxins and Aspergillus, In Powell, K. A., Renwick, A., Peberdy, J. F. (Ed.). The genus Aspergillus. Plenum Press, New York (USA)., 1-27.



41. Coulombe Jr, R. A., & Sharma, R. P. (1985). Clearance and excretion of intratracheally and orally administered aflatoxin B1 in the rat. *Food and chemical toxicology*, 23(9), 827-830.
42. Coulombe, R. A., & Jr. (1994). Nonhepatic effects and Biotransformations of aflatoxin B1, In Eaton, D.L., Groopman, J.D. (Eds.). *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural Significance*. Academic Press, Orlando (USA), 89-110.
43. Creppy, E.E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127, 19-28.
44. Cvetnić, Z., & Pepeljnjak, S. (2007). Interaction between certain moulds and aflatoxin B1 producer *Aspergillus flavus* NRRL 3251. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 58(4), 429-434.
45. Davis, N. D., Diener, U. L., & Eldridge, D. W. (1966). Production of aflatoxins B1 and G1 by *Aspergillus flavus* in a semisynthetic medium. *Applied Microbiology*, 14(3), 378-380.
46. Deger, G. E. (1976). Aflatoxin-human colon carcinogenesis? *Ann. Intern. Med.* , 85, 204-205.

47. Deveci, O. (2007). Changes in the concentration of aflatoxin M1 during manufacture and storage of White Pickled cheese. *Food Control*, 18, 1103-1107.
48. Diener, U. L., & Davis, N. D. (1983). Aflatoxins in corn.
49. Eaton, D. L., & Gallagher, E. P. (1994). Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 34, 135-172.
50. Eaton, D. L., Groopman, J. D. ., & Ed. (1994). The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance. Academic Press, San Diego (USA).
51. Energy., E. C. D.-G. f. (2009). The rapid alert system for food and feed (RASFF) Annual report 2008. European Communities.
52. European Commission. (2001). Regulation (EC) no. 466/2001 of 8 March 2001, setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*, L77, 1e13.
53. European Commission. (2002). European Commission decision no. 2002/657/EC (2002) of 14 August 2002, implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results 2002/657/EC. *Official Journal*, L221, 8e36.

54. European Commission. (2006). Commission regulation 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union, L 364, 5e24.
55. European Commission. (2006). Regulation (EC) no. 401/2006 of 23 February 2006, laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. Official Journal of the European Union, L70(12), 20e23.
56. Ewaidah, E.H., (1987). Aflatoxin M in Milk. A Review. J. King Saud Univ., 1: Agric. Sci. (1,2), 37-55.
57. Fallah, A. A. (2010). Aflatoxin M1 contamination in dairy products marketed in Iran during winter and summer. Food Control, 21, 1478-1481.
58. Fallah, A. A., Jafari, T., Fallah, A., & Rahnama, M. (2009). Determination of aflatoxin M1 levels in Iranian white and cream cheese. Food and Chemical Toxicology, 47, 1872-1875.
59. Fallah, A. A., Rahnama, M., Jafari, T., & Saei-Dehkordi, S. S. (2011). Seasonal variation of aflatoxin M1 contamination in industrial and traditional Iranian dairy products. Food Control, 22, 1653-1656.

60. FAO. (2004). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
61. FDA. (2005). Sec. 527.400 whole milk, low fat milk, skim milk e Aflatoxin M1 (CPG 7106.10) FDA/ORA Compliance Policy Guides. Food and Drug Administration.
62. Fernandes, A. M., Correa, B., Rosim, R. E., Kobashigawa, E., & Oliveira, C.A.F. (2012). Distribution and stability of aflatoxin M1 during processing and storage of Minas Frescal cheese. *Food Control*, 24, 104-108.
63. Fink-Gremmels, J. (2008). Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. *Food Additives and Contaminants*, 25, 172-180.
64. Fremy, J. M., Roiland, J. C., & Gaymard, D. (1990). Behavior of 14C aflatoxin M1 during Camembert cheese making. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 10, 95-98.
65. Frobish, R. A., Bradley, B. D., Wagner, D. D., Long-Bradley, P. E., & Hairston, H. (1986). Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain. *Journal of Food Protection*, 49(10), 781-785.

66. Gallagher, E. P., Kunze, K. L., Stapleton, P. L., & Eaton, D. L. (1996). The Kinetics of Aflatoxin B<sub>1</sub> Oxidation by Human cDNA-Expressed and Human Liver Microsomal Cytochromes P450 1A2 and 3A4. *Toxicology and applied pharmacology*, 141(2), 595-606.
67. Galvano, F., Galofaro, V., & Galvano, G. (1996). Occurrence and stability of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products. A worldwide review. *Journal of Food Protection*, 59, 1079-1090.
68. Galvano, F., Galofaro, V., & Galvano, G. (1996). Occurrence and stability of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products. A worldwide review. *Journal of Food Protection*, 59, 1079-1090.
69. Gerola, F.M., Gerola, P.D. (1986). *Botanica per i corsi di Medicina Veterinaria e di Scienze della Produzione Animale*. Utet, Torino, Italia.
70. Gong, Y.; Hounsa, A.; Egal, S.; Turner, P. C.; Sutcliffe, A. E.; Hall, A. J.; Cardwell, K.; Wild, C. P. (2004). Postweaning exposure to aflatoxin results in impaired child growth: a longitudinal study in Benin, West Africa. *Environmental Health Perspectives*, No. 112, pp. (1334–1338).

71. Goto, T., Hsieh, D.P. (1985). Fractionation of radioactivity in the milk of goats administered <sup>14</sup>C-Aflatoxin B<sub>1</sub>. *Journal of AOAC*, 68, 456–458.
72. Goto, T., Wicklow, D. T., & Ito, Y. (1996). Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a sclerotium-producing *Aspergillus tamaris* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4036-4038.
73. Govaris, A., Roussi, V., Koidis, P. A., & Botsoglou, N. A. (2001). Distribution and stability of aflatoxin M<sub>1</sub> during processing, ripening and storage of Telemes cheese. *Food Additives and Contaminants*, 18, 437-443.
74. Govaris, A., Roussi, V., Koidis, P. A., & Botsoglou, N. A. (2002). Distribution and stability of aflatoxin M<sub>1</sub> during production and storage of yoghurt. *Food Additives and Contaminants*, 19, 1043-1050.
75. Guerre, P., Galtier, P., & Burgat, V. (1996). Le métabolisme: un facteur de susceptibilité a la toxicité des aflatoxines. *Revue Mld. Vlr*, 12, 892.
76. Guinee, T. P. (2004). Salting and the role of salt in cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 99-109.

77. Han, R. W., Zheng, N., Wang, J. Q., Zhen, Y. P., Xu, X. M., & Li, S. L. (2013). Survey of aflatoxin in dairy cow feed and raw milk in China. *Food Control*, 34, 35-39.
78. Hayes, A. W. (1980). Mycotoxins: a review of biological effects and their role in human diseases. *Clin. Toxicol.*, 17, 45-83.
79. Hayes, J. D., Judah, D. J., Neal, G. E., & Nguyen, T. (1992). Molecular cloning and heterologous expression of a cDNA encoding a mouse glutathione S-transferase Yc subunit possessing high catalytic activity for aflatoxin B1-8, 9-epoxide. *Biochemical Journal*, 285(Pt 1), 173.
80. Hayes, J. R., Polan, C. E., & Campbell, T. C. (1977). Bovine liver metabolism and tissue distribution of aflatoxin B1. *Journal of agricultural and food chemistry*, 25(5), 1189-1193.
81. Hayes, R. B., van Nienwenhuise, J. P., Raatgever, J. W., & Ten, Kate. F. J. W. (1984). Aflatoxin exposure in the industrial setting: an epidemiological study of mortality. *Food Chem. Toxicol.* , 22, 39-43.
82. Hendrickse, R. G. (1997). Of sick turkeys, kwashiorkor, malaria, perinatal mortality, heroin addicts and food poisoning: research on the influence of

- aflatoxins on child health in the tropics. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 91, 787-793.
83. Henry, S. H., Bosch, F. X., Troxell, T. C., & Bolger, P. M. (1999). Reducing liver cancer-global control of aflatoxin. *Science.*, 286, 2453-2454.
84. Holzapfel, C. W., Steyn, P. S., & Purchase, I. F. H. (1966). Isolation and structure of aflatoxins M1 and M2. *Tetrahedron Letters*, 7(25), 2799-2803.
85. Hsieh, D. (1988). Potential human health hazards of mycotoxins, In Natori, S., Hashimoto, K., Ueno, Y. (Ed.), *Mycotoxins and phytotoxins*. Third Joint Food and Agriculture Organization W.H.O. United Nations Program International Conference of Mycotoxins. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands., 69-80.
86. Hsieh, D. P., & Wong, J. J. (1994). Pharmacokinetics and excretion of aflatoxins. *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*, 73-88.
87. Hsu, I. C., Metcalf, R. A., Sun, T., Welsh, J. A., Wang, N. J., & Harris, C. C. (1991). Mutational hotspot in the gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature*, 350, 377-378.



88. Idris, Y. M. A., Mariod, A. A., Elnour, I. A., & Mohamed, A. A. (2010).  
Determination of aflatoxin levels in Sudanese edible oils. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 48, Aug-Sep, pp. 2539-2541.
89. Jalili, M., & Scotter, M. (2015). A review of aflatoxin M1 in liquid milk. *Iranian Journal of Health, Safety and Environment*, 2, 283-295.
90. Jarvis, B. (1971). Factors affecting the production of mycotoxins. *Journal of Applied Microbiology*, 34(1), 199-213.
91. Jasutiene, I., Garmiene, G., & Kulikauskiene, M. (2006). Pasteurisation and fermentation effects on Aflatoxin M1 stability. *Milchwissenschaft*, 61, 75-79.
92. Jay, J. M. (2005). *Microbiologia de Alimentos*. Porto Alegre: Artmed.
93. Kamkar, A. (2005). A study on the occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced in Sarab city of Iran. *Food Control*, 16, 593-599.
94. Kamkar, A., Karim, G., Aliabadi, F. S., & Khaksar, R. (2008). Fate of aflatoxin M1 in Iranian white cheese processing. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2236-2238.

95. Kaniou-Grigoriadou, I., Eleftheriadou, A., Mouratidou, T., & Katikou, P. (2005).  
Determination of aflatoxin M1 in ewe's milk samples and the produced curd and  
Feta cheese. *Food Control*, 16, 257-261.
96. Klich, M. A., Mullaney, E. J., Daly, C. B., & Cary, J. W. (2000). Molecular and  
physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *A.*  
*tamarii* and *A. ochraceoroseus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* , 53, 605-609.
97. Krishnamachari, K. A. V. R., Bhat, R. V., Nagarajan, V., & Tilnak, T. M. G.  
(1975). Hepatitis due to aflatoxicosis. An outbreak in Western India. *Lancet.* , 1,  
1061-1063.
98. Kumagai, S. (1989). Intestinal absorption and excretion of aflatoxin in rats.  
*Toxicology and applied pharmacology*, 97(1), 88-97.
99. Lafont, P.; Siriwardana, M.; & Lafont, J. (1989). Genotoxicity of hydroxy-  
aflatoxins M1 and M4. *Microbiology Alimentarius Nutrition*, NO. 7, pp (1-8).
100. Lewis, L., M. Onsongo, H. Njapau, H. Schurz-Rogers, G. Lubber, S. Kieszak, J.  
Nyamongo, L. Backer, A. Dahive, A. Misore, K. DeCock, C. Rubin, and the  
Kenya Aflatoxicosis Investigation Group (2005)“Aflatoxin Contamination of  
Commercial Maize Products during an Outbreak of Acute Aflatoxicosis in

Eastern and Central Kenya,” *Environ Health Perspect.* December; 113(12):  
1763–1767.

101. Li, F. Q., Yoshizawa, T., Kawamura, S., Luo, S. Y., & Li, Y. W. (2001).  
Aflatoxins and fumonisins in corn from the high-incidence area for human  
hepatocellular carcinoma in Guangxi, China. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4122-  
4126.
102. Lopez, C., Ramos, L., Ramadan, S., Bulacio, L., & Perez, J. (2001). Distribution  
of aflatoxin M1 in cheese obtained from milk artificially contaminated.  
*International Journal of Food Microbiology*, 64, 211-215.
103. Malissiova, E., Tsakalof, A., Arvanitoyannis, I. S., Katsafliaka, A., Katsioulis,  
A., Tserkezou, P., et al. (2013). Monitoring Aflatoxin M1 levels in ewe's and  
goat's milk in Thessaly, Greece; potential risk factors under organic and  
conventional production schemes. *Food Control*, 34, 241-248.
104. Manetta, A. C., Giammarco, M., Giuseppe, L., Di Fusaro, I., Gramenzi, A.,  
Formigoni, A., et al. (2009). Distribution of aflatoxin M1 during Grana Padano  
cheese production from naturally contaminated milk. *Food Chemistry*, 113, 595-  
599.

105. Masoero, F., Gallo, A., Moschini, M., Piva, G., & Diaz, D. (2007). Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. *Animal*, 1, 1344-1350.
106. Mendonça, C., & Venancio, A. (2005). Fate of aflatoxin M1 in cheese whey processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 2067-2070.
107. Miraglia, M., Brera, C. (1999). "Le micotossine". In: "Tossicologia degli alimenti. Captano, A., Dugo, G., Restani, P., Editors, UTET, Torino, Italy. 22-28.
108. Mishra, H. N., & Das, C. (2003). A review on biological control and metabolism of aflatoxin.
109. Mohajeri, F. A., Ghalebi, S. R., Rezaeian, M., Gheisari, H. R., Azad, H. K., Zolfaghari, A., et al. (2013). Aflatoxin M1 contamination in white and Lighvan cheese marketed in Rafsanjan, Iran. *Food Control*, 33, 525-527.
110. Mohammadi, H., Alizadeh, M., Bari, M. R., Khosrowshahi, A., & Tadjik, H. (2009). Optimization of the process variables for minimizing of the aflatoxin M1 content in Iranian white brine cheese. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 11, 181-190.

111. Montagna, M. T., Napoli, C., De Giglio, O., Iatta, R., & Barbuti, G. (2008). Occurrence of aflatoxin M1 in dairy products in Southern Italy. *International Journal of Molecular Sciences*, 9, 2614-2621.
112. Motawee, M. M. (2013). Reduction of aflatoxin M1 content during manufacture and storage of egyptian domaiti cheese. *International Journal of Veterinary Medicine: Research and Reports*, 2013, 1-10.
113. Motawee, M. M., & McMahon, D. J. (2009). Fate of aflatoxin M1 during manufacture and storage of feta cheese. *Journal of Food Science*, 74, 42-45.
114. Nachtmann, C., Gallina, S., Rastelli, M., Ferro, G. L., & Decastelli, L. (2007). Regional monitoring plan regarding the presence of aflatoxin M1 in pasteurized and UHT milk in Italy. *Food Control*, 18, 623-629.
115. Nageswara Rao, S.B., Chopra, R.C. (2001). Influence of sodium bentonite and activated charcoal on aflatoxin M1 excretion in milk of goats. *Small Rum. Res.*, 41, 203-213.
116. Newberne, P. M., & Butler, W. H. (1969). Acute and chronic effect of aflatoxin B1 on the liver of domestic and laboratory animals: a review. *Cancer Res.*, 29, 236-250.

117. Nilchian, Z., & Rahimi, E. (2012). Aflatoxin M1 in yoghurts, cheese and ice-cream in Shahrekord-Iran. *World Applied Sciences Journal*, 19, 621-624.
118. Oliveira, C. P., de Soares, N. D. F. F., Oliveira, T. V., de Baffa Júnior, J. C., & Silva, W. A. (2013). Aflatoxin M1 occurrence in ultra high temperature (UHT) treated fluid milk from Minas Gerais/Brazil. *Food Control*, 30, 90-92.
119. Oruc, H. H., Cibik, R., Yilmaz, E., & Gunes, E. (2007). Fate of aflatoxin M1 in kashar cheese. *Distribution*, 27, 82-90.
120. Oruc, H. H., Cibik, R., Yilmaz, E., & Kalkanli, O. (2006). Distribution and stability of Aflatoxin M1 during processing and ripening of traditional white pickled cheese. *Food Additives and Contaminants*, 23, 190-195.
121. Ostry, V., Malir, F., Toman, J., & Grosse, Y. (2017). Mycotoxins as human carcinogens—The IARC monographs classification. *Mycotoxin research*, 33(1), 65-73.
122. Patterson, D. S. P., Glancy, E. M., & Roberts, B. A. (1980). The ‘carry over’ of aflatoxin M1 into the milk of cows fed rations containing a low concentration of aflatoxin B1. *Food and cosmetics toxicology*, 18(1), 35-37.

123. Peers, F. G., & Linsell, C. A. (1973). Dietary aflatoxins and human liver cancer- a population study based in Kenya. *Br. J. Cancer.*, 27, 473-484.
124. Peterson, S. W., Ito, Y., Horn, B. W., & Goto, T. (2001). *Aspergillus bombycis* a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia*, 93, 689-703.
125. Pfohl-Leszkowicz, A. (2000). Ecologie des moisissures et des mycotoxines situation en France *Cahier Nutr. Diét.*, 35, 379-388.
126. Picinin, L. C. A., Cerqueira, M. M. O. P., Vargas, E. A., Lana, A. M. Q., Toaldo, I. M., & Bordignon-Luiz, M. T. (2013). Influence of climate conditions on aflatoxin M1 contamination in raw milk from Minas Gerais State, Brazil. *Food Control*, 31, 419-424.
127. Pietri, A., (1998). Micotossine, la situazione odierna in Italia. *Rivista di Avicoltura*. 1/2: 32-38.
128. Pietri, A., Diaz, G. (2003). Faculty of Agriculture UCSC, Piacenza, Italy. Personal communication.
129. Pitt, J. I. (2000). Toxigenic fungi: which are important? *Med. Mycol.* , 38(1), 17-22.

130. Pittet, A., (1998). Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds an updated review. *Revue de Medicine Veterinarie, Toulouse*, 149, 6, 479-492.
131. Prado, G., Oliveira, M. S., Carvalho, E. P., Veloso, T., Sousa, L. A. F., & Cardoso, A. C. F. (2001). Aflatoxina M1 em queijo prato e parmesao determinada por coluna de imunoafinidade e cromatografia líquida. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 60, 147-151.
132. Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M., & Piva, G. (2009). On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 984-991.
133. Probst C, H. Njapau, and Cotty, P (2007). Outbreak of an Acute Aflatoxicocosis in Kenya in 2004: Identification of the Causal Agent, *Applied and Environmental Microbiology*, April, p 2762-2764.
134. Raj, H. G., Prasanna, H. R., Mage, N., & Lotlikar, P. D. (1986). Effect of purified rat and hamster hepatic glutathione S-transferases on the microsome mediated binding of aflatoxin B1 to DNA. *Cancer Lett.* , 33, 1-9.
135. Regolamento UE N. 165/2010 DELLA COMMISSIONE del 26 febbraio 2010 recante modifica, per quanto riguarda le aflatossine, del regolamento (CE) n.



1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, L 50/8 del 27.02.2010.

136. Ross, R. K., Yuan, J. M., Yu, M. C., Wogan, G. N., Qian, G. S., Tu, J. T., Groopman, J., Gao, Y. T., & Henderson, B. E. (1992). Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. *Lancet.* , 339, 1413-1414.
137. Ruangwises S., & Ruangwises N. (2009). Occurrence of Aflatoxin M1 in Pasteurized Milk of the School Milk Project in Thailand. *Journal of Food Protection*, 72, 1761-1763.
138. Rubio, R., Moya, V. J., Berruga, M. I., Molina, M. P., & Molina, A. (2011). Aflatoxin M1 in the intermediate dairy products from Manchego cheese production: distribution and stability. *Mljekarstvo*, 61, 283-290.
139. Rustemeyer, S. M., Lamberson, W. R., Ledoux, D. R., Rottinghaus, G. E., Shaw, D. P., Cockrum, R. R., Kessler, K. L., Austin, K. J., & Cammack, K. M. (2010). Effects of dietary aflatoxin on the health and performance of growing barrows. *Journal of Animal Science*, Vol. 88, Nov, pp. 3624-3630.
140. Rustom, I. Y. S. (1997). Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry*, 59, 57-67

141. Sabbioni, G., & Sepai, O. (1994). Determination of human exposure to aflatoxins, In Sinha, K.K., Bhatnagar, K. (Ed.), *Mycotoxins in agriculture and food safety*. Marcel Dekker, Inc., New York (USA)., 183-226.
142. Sanders, T. H., Davis, N. D., & Diener, U. L. (1968). Effect of carbon dioxide, temperature, and relative humidity on production of aflatoxin in peanuts. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45(10), 683-685.
143. Sassahara, M., Pontes Netto, D., & Yanaka, E. K. (2005). Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the North of Parana state. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 981-984.
144. Scudamore KA, Hetmanski MT, Nawaz S, Naylor J., Rainbird S (1997). Determination of mycotoxins in pet foods sold for domestic pets and wild birds using linked-column immunoassay clean-up and HPLC. *Food Addit. Contam.*, 14: 175-186.
145. Sengun, I. Y., Yaman, D. B., & Gonul, S. A. (2008). Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. *World Mycotoxin Journal*, 1, 291-298.

146. Shank, R. C., Bhamarapravati, N., Gordon, J. E., & Wogan, G. N. (1972).  
Dietary aflatoxins and human liver cancer. IV. Incidence of primary liver cancer  
in two municipal populations in Thailand. *Food Cosmet. Toxicol.*, 10, 171-179.
147. Sorenson, W. G., Hesseltine, C. W., & Shotwell, O. L. (1967). Effect of  
temperature on production of aflatoxin on rice by *Aspergillus flavus*.  
*Mycopathologia et mycologia applicata*, 33(1), 49-55.
148. Stoloff, L. (1980). Aflatoxin in perspective. *Journal of Food protection*, 43, 226–  
230.
149. Strosnider H, Azziz-Baumgartner E, Banziger M, Bhat RV, Breiman R, Brune  
M, DeCock K, Dilley A, Groopman J, Hell K, Henry SH, Jeffers D, Jolly C,  
Jolly P, Kibata GN, Lewis L, Liu X, Lubber G, McCoy L, Mensah P, Miraglia M,  
Misore A, Njapau H, Ong C, Onsongo MTK, Page SW, Park D, Patel M,  
Phillips T, Pineiro M, Pronczuk J, Schurz Rogers H, Rubin C, Sabino M,  
Schaafsma A, Shephard G, Stroka J, Wild C, Williams JT, Wilson D (2006).  
“Workgroup Report: Public Health Strategies for Reducing Aflatoxin Exposure  
in Developing Countries.” *Environmental Health Perspectives*, 114:1989-1903.

150. Strosnider H., Azziz-Baumgartner E., Banziger M., Bhat R.V., Breiman R., Brune M.N., et al. (2006). Workgroup report: public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. *Environ Health Perspect.*, 114(12):1898–903.
151. Sugiyama K., Hiraoka H., Sugita-Konishi Y. (2008). Aflatoxin M1 Contamination in Raw Bulk Milk and the Presence of Aflatoxin B1 in Corn Supplied to Dairy Cattle in Japan. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 49, 352-355.
152. Tajkarimi, M., Aliabadi-Sh, F., Salah Nejad, A., Poursoltani, H., Motallebi, A. A., & Mahdavi, H. (2008). Aflatoxin M1 contamination in winter and summer milk in 14 states in Iran. *Food Control*, 19, 1033-1036.
153. US FDA. (1996). Whole milk, low fat milk, skim milk-aflatoxin M1 (CPG 7106.210). FDA compliance policy guides. Washington, DC: FDA.
154. Vallone, L and Dragoni, I. (1997). Investigation of mycotoxins (aflatoxin B1) occurrence in corn silage trench. *Atti della Societa Italiana delle Scienze Veterinarie*. 51, 237-238.

155. Van Egmond, H. P. (1989). Aflatoxin M<sub>1</sub>: occurrence, toxicity, regulation, In: Mycotoxins in Dairy Products, Van Egmond, H. P., pp. (11- 55), Elsevier Applied Science, New York.
156. Van Egmond, H. P., Paulsch, W. E., Veringa, H. A., & Schuller, P. L. (1977). The effect of processing on the Aflatoxin M<sub>1</sub> content of milk and milk products. Archives de l'Institut Pasteur de Tunis, 54, 381-390.
157. van Rensburg, S. J., Cook-Mazaffari, P., van Schalkwyk, D. J., van der Watt, J. J., Vincent, T. J., & Purchase, I. F. (1985). Hepatocellular carcinoma and dietary aflatoxin in Mozambique and Transkei. Br. J. Cancer , 51, 713-720.
158. Varga, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2009). A reappraisal of fungi producing aflatoxins. World Mycotoxin Journal, 2, 263-277.
159. Veldman, A., Meijst, J.A.C., Borgrevve, G.J., Heeres Van Der Tol, J.J. (1992). Carry over of aflatoxin from cows' food to milk. Anim. Prod., 55, 163-168.
160. Viridis S., Corgiolu G., Scarano C., Pilo A.L., De Santis E.P.L. (2008). Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in tank bulk goat milk and ripened goat cheese. Food Control, 19, 44-9.

161. Viridis Salvatore, Christian Scarano, Vincenzo Spanu, Gavino Murittu, Carlo Spanu, Ignazio Ibba, Enrico Pietro Luigi De Santis (2014). A survey on Aflatoxin M1 content in sheep and goat milk produced in Sardinia Region, Italy (2005-2013). *Italian Journal of Food Safety*, 3, 206-209.
162. Wilson, R., Ziprin, R., Ragsdale, S., & Busbee, D. (1985). Uptake and vascular transport of ingested aflatoxin. *Toxicology letters*, 29(2-3), 169-176.
163. Wogan, G.N., Paglialunga, S., (1974). Carcinogenicity of synthetic aflatoxin M1 in rats. *Food Cosmet Toxicol.*, 12, 3, 381-384.
164. Wu F. (2010). The global burden of disease caused by foodborne aflatoxin. WHO Commissioned Report, *Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group (FERG)*.
165. Wu, Q., Jezkova, A., Yuan, Z., Pavlikova, L., Dohnal, V., & Kuca, K. (2009). Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metabolism Reviews*, 41(1), 1-7.
166. Yiannikouris, A., & Jouany, J. P. (2002). Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research*, 51(2), 81-99.

167. Yousef, A. E., & Marth, E. H. (1989). Stability and degradation of aflatoxin M<sub>1</sub>.  
  
In H. P. van Egmond (Ed.), Mycotoxin in dairy products (pp. 127e161). London  
  
and New York: Elsevier Applied Science.
168. Zaghini, A., Lambertini, L. (1995). Piante e funghi di interesse veterinario.  
  
Caratteristiche Botaniche ed Aspetti Farmacologici e Tossicologici. CLUEB,  
  
Bologna Italia.

## SCOPO DELLA TESI

Il comparto lattiero-caseario ovino rappresenta per la Sardegna un indiscusso ruolo economico e sociale. È pertanto fondamentale per gli operatori che vogliono accedere e competere sui mercati internazionali assicurare la conformità degli alimenti ai requisiti normativi. In tale contesto l'approccio preventivo, basato sulla valutazione dei rischi per il consumatore, è di fondamentale importanza ed è responsabilità dell'intero comparto adottare strategie integrate a partire dalla produzione primaria per dare garanzie sulla sicurezza dei prodotti che vengono immessi sul mercato. Pertanto, lo scopo principale della seguente tesi è quello di studiare le contaminazioni da aflatossina M<sub>1</sub> nella filiera del latte ovino in Sardegna. In particolare il lavoro di tesi si articola in due contributi scientifici originali che hanno nel loro insieme la finalità di dimostrare mediante solide evidenze il vantaggio competitivo dei prodotti a base di latte ovino rispetto a quelli da latte vaccino, per quanto attiene alle contaminazioni da aflatossina M<sub>1</sub>.

Il primo contributo dal titolo: "Monitoraggio del contenuto in aflatossina M<sub>1</sub> nel latte di pecora e di capra in Sardegna (2005-2013)", di: Salvatore Viridis, Christian Scarano, Vincenzo Spanu, Gavino Murittu, Carlo Spanu, Ignazio Ibba, Enrico Pietro



Luigi De Santis, è stato pubblicato sulla rivista Italian Journal of Food Safety (2014), 3(4), pp 206-209. Il lavoro si è occupato di effettuare un monitoraggio sulla contaminazione da aflatossina M<sub>1</sub> nel latte crudo di piccoli ruminanti allevati in Sardegna nel corso di 8 anni. Sebbene nel settore dei piccoli ruminanti da latte i dati disponibili in bibliografia indichino che in generale il rischio associato alla contaminazione da aflatossina sia basso rispetto a quanto avviene nel comparto bovino, il monitoraggio nell'ambito dell'autocontrollo è condotto dagli stabilimenti con una frequenza piuttosto variabile. Tuttavia, non è stato avviato nella regione Sardegna un piano di monitoraggio estensivo per valutare la contaminazione da aflatossina M<sub>1</sub> nel comparto. Le analisi vengono condotte prevalentemente dal laboratorio dell'Associazione Regionale Allevatori della Sardegna mediante HPLC (High-performance liquid chromatography). Il lavoro è stato finalizzato a dimostrare mediante dati oggettivi che il latte ovino della Sardegna presenta un basso livello di contaminazione da aflatossina M<sub>1</sub>, dato a supporto della valutazione del rischio per gli operatori che producono formaggi da latte di pecora.

Il secondo contributo dal titolo: “Studio dei livelli di contaminazione da aflatossina M<sub>1</sub> nel Pecorino Romano e confronto con altri formaggi a lunga maturazione” che sarà oggetto di prossima pubblicazione, si propone di attuare un esteso programma

finalizzato al monitoraggio della contaminazione da Aflatossine nel Pecorino Romano ed in altri formaggi a lunga maturazione ottenuti da latte bovino. L'obiettivo è quello di acquisire dati scientifici per la valutazione del rischio e per fornire agli operatori del settore ed al consumatore evidenze e garanzie sulla sicurezza. È noto che al termine del processo di caseificazione il livello finale di AFM<sub>1</sub> presente nel formaggio è pari a 3-8 volte il valore originariamente presente nel latte. A tale proposito il DGISAN n. 28454 del 3/7/2013 fissa il limite massimo ammissibile di AFM<sub>1</sub> nei formaggi a pasta dura pari a 275 ng/Kg. Il progetto di ricerca si rivolge agli operatori del settore lattiero caseario ovino della Regione Sardegna. I dati ottenuti potranno supportare con evidenze scientifiche il minore livello di rischio da AFM<sub>1</sub> associato al Pecorino Romano, rispetto ai due principali formaggi italiani (Parmigiano reggiano e Grana Padano). Tale aspetto sarà essenziale in un'ottica di promozione del prodotto sui mercati nazionale ed internazionale, particolarmente sensibili alle problematiche di sicurezza alimentare.

# **MONITORAGGIO DEL CONTENUTO IN AFLATOSSINA M<sub>1</sub> NEL LATTE DI PECORA E DI CAPRA IN SARDEGNA (2005-2013)**

## **Introduzione**

Negli ultimi anni è stato registrato un incremento della frequenza di contaminazione da aflatossine nel mais, sia importato da paesi terzi che prodotto in diversi

paesi della parte occidentale e meridionale della Comunità Europea (Streit et al., 2012; EU RASFF, 2014). Il mais ed i prodotti derivati dal mais sono ampiamente utilizzati in zootecnia per la preparazione di mangimi destinati agli animali da latte poiché rappresentano un'importante fonte di carboidrati fermentescibili. Recenti studi hanno messo in evidenza un incremento della prevalenza di contaminazione da aflatossine nel mais prodotto in Italia (Causin, 2013). Nel corso degli anni dal 2003 al 2012 le regioni del Nord Italia, che sono i maggiori produttori nazionali di mais, sono state affette da particolari condizioni metereologiche. Un incremento delle temperature associato a stress idrico indotto da scarsa piovosità ha creato le condizioni predisponenti per una diffusa contaminazione delle piantagioni di mais da aflatossina B<sub>1</sub>. Nel corso del 2012 durante un monitoraggio estensivo condotto sul mais prodotto in Nord Italia, sono stati analizzati 31.326 campioni prelevati da locali di magazzinaggio. I risultati hanno mostrato un livello di contaminazione da aflatossina B<sub>1</sub> superiore al limite di 20 µg/kg fissato nella Comunità Europea, in campioni di mais rappresentativi di circa 784.000 tonnellate di mais, pari a circa il 45,2% della produzione totale (Causin, 2013). È stata riscontrata una stretta correlazione tra i livelli di aflatossina nel mais e la presenza di metaboliti delle aflatossine nel latte delle vacche da latte allevate in Italia e nei prodotti lattiero-caseari derivati

(Bolzoni et al., 2013). In conseguenza dell'ultima crisi legata alla contaminazione da aflatossine, il Ministero della Salute Italiano ha emanato delle misure di controllo per minimizzare il rischio di contaminazione da aflatossina M<sub>1</sub> latte e dei prodotti lattiero-caseari. Le misure preventive hanno coinvolto la filiera di produzione delle bovine da latte e requisiti molto più stringenti per gli operatori del settore alimentare per quanto riguarda i programmi di monitoraggio nell'ambito delle procedure di autocontrollo (Ministero della Salute, 2013).

Il contenuto di aflatossina M<sub>1</sub> nel latte di pecora e di capra è generalmente più basso rispetto a quanto osservato nelle vacche da latte (Viridis et al., 2008). Le capre e le pecore generalmente sono alimentate al pascolo ed il loro livello di ingestione più basso riduce il rischio di esposizione alle aflatossine. L'utilizzo di concentrati o mangimi nell'alimentazione dei piccoli ruminanti da latte è utilizzato, per ragioni economiche, a una semplice integrazione della razione ed è limitato principalmente ai periodi dell'anno in cui vi è scarsa disponibilità di pascolo (Molle et al., 2008). La capacità di convertire l'aflatossina B<sub>1</sub> ingerita con gli alimenti in aflatossina M<sub>1</sub> escreta con il latte (carry-over) è diversa nei grossi ruminanti rispetto ai piccoli ruminati. In bibliografia sono riportati valori di carry-over variabili tra 0,35% e 3% nelle vacche da latte (Veldman et al., 1992;

Frobish et al., 1996) e tra lo 0.018% e il 3.1% nelle capre (Goto et al., 1985; Nageswara Rao et al., 2001; Ronchi et al., 2005). Livelli più bassi di carry-over sono stati osservati nelle pecore da latte, variabili tra lo 0.08% e 0.33% (Battacone et al., 2005).

I programmi di autocontrollo sviluppati in Sardegna dagli operatori del settore degli ovini e dei caprini da latte, solo in alcuni casi hanno incluso il monitoraggio delle aflatossine M<sub>1</sub>. Solo alcuni impianti di trasformazione di latte conducono analisi mediante test rapidi presso laboratori interni. Gran parte delle analisi per la determinazione dell'aflatossina M<sub>1</sub> vengono eseguite presso il laboratorio dell'Associazione regionale Allevatori della Sardegna mediante cromatografia liquida ad alta pressione (o HPLC, High Pressure Liquid Chromatography).

Nel presente contributo sono presentati i risultati di un programma di monitoraggio condotto in Sardegna durante un periodo di otto anni (dal 2005 al 2013) per la determinazione del livello di aflatossina M<sub>1</sub> del latte di pecora e di capra.

## **Materiali e metodi**

Nel corso di un periodo di otto anni, dal 2005 al 2013 sono stati raccolti un totale di 517 campioni di latte di pecora e di 88 di capra per la determinazione del contenuto in

aflatossina M<sub>1</sub>. I campioni di latte erano così rappresentati: 75 campioni di massa aziendali (56 da allevamenti di pecore e 19 da allevamenti di capre); di 443 campioni di latte di autocisterna 401 provenivano da allevamenti di pecore, 42 da allevamenti di capre e 87 da silos di stoccaggio (di cui 60 di stabilimenti che lavorano latte di pecora e 27 che lavorano latte di capra). Tutte le analisi sono state effettuate presso il laboratorio dell'Associazione Regionale Allevatori della Sardegna mediante l'utilizzo dell'HPLC 1100 series (Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Germany) dotato di campionatore automatico LAS G1313A e di un rilevatore di fluorescenza FLD G1321, in accordo con la lo standard ISO 14501:1998.

Dopo l'estrazione delle aflatossine M<sub>1</sub>, i campioni sono stati processati utilizzando il metodo HPLC - FLD. Brevemente, 50 mL di ciascun campione di latte sono stati centrifugati a 4000 r/min per 15 minuti per separare la frazione grassa dal latte scremato, quindi il latte scremato è stato iniettato dentro colonne di immunoaffinità (VICAM) con un flusso di 2 mL/min. ciascuna colonna è stata lavata con 10 mL di acqua ultrafiltrata (MillQ, Millipore S.p.A. Vimodrone M<sub>1</sub>) con un flusso di 2 mL/min e l'aflatossina M<sub>1</sub> eluita dalla colonna utilizzando 4 mL di acetonitrile. Quindi, l'eluato è stato essiccato a 45-50 °C con un flusso di azoto ed il residuo disidratato risospeso con 500 µL di una

miscela acqua-metanolo (50:50 w/v). Infine, 10 µL della soluzione sono stati iniettati in una colonna Zorbax SB C18 150x4.6 mm con un diametro di 5 µm (Agilent Technologies Inc., Santa Clara , CA, USA). La fase mobile (acqua-metanolo-acetonitrile, 63:26:11 w/v) è stata iniettata con un flusso di 1 mL/min in condizioni isocratiche. Tutti gli standard per la determinazione delle aflatossine M<sub>1</sub> sono stati dissolti in una soluzione metanolo-acqua (10 µg/mL) e conservati a 4 °C fino all'utilizzo.

La curva di calibrazione è stata determinata caricando 5 soluzioni standard di aflatossina M<sub>1</sub> alla concentrazione di 0.012, 0.025, 0.050, 0.100, 0.200 e 0.300 µg/L.

## **Risultati**

Sono stati raccolti un totale di 517 campioni di latte di pecora (tabella 1) e 88 di capra (tabella 2), provenienti da tank aziendale, da autocisterna e da silos. Nei campioni di latte prelevati nel periodo dal 2005 al 2012, 345 (66.7%) e 22 (25%) rispettivamente di pecora e capra, non è mai stata riscontrata la presenza di aflatossina M<sub>1</sub>. In entrambe le specie, la presenza di aflatossina M<sub>1</sub> è stata osservata solo nei campioni raccolti nel corso del 2013. Otto campioni di latte di pecora su 172 (4,6%) hanno mostrato una contaminazione da aflatossina M<sub>1</sub> superiore a 8 ng/L, con una concentrazione



(media±DS) di 12,59±14,05 ng/L. Nel latte di massa aziendale raccolto da 2 allevamenti di pecora (7,4%) il tenore di aflatossina riscontrato era di 34,19±34,83 ng/L, e in uno di questi la concentrazione era di 58,82 ng/L (pertanto, superiore al limite definito in Europa). L'aflatossina M<sub>1</sub> è stata riscontrata anche in 4 campioni (4,5%) di latte di autocisterna con una concentrazione di 13,54±6,80 ng/L e da 2 campioni (3,6%) di silo con una concentrazione di 13,67±6,99 ng/L. I risultati completi dei livelli di contaminazione da aflatossina riscontrati nei campioni positivi sono riportati in tabella 3.

In 9 (13,6%) campioni di latte di capra su 66 raccolti nel 2013, l'aflatossina M<sub>1</sub> è stata riscontrata con un livello di concentrazione media pari a 47,21±19,58 ng/L (tabella 4). La contaminazione da aflatossina M<sub>1</sub> è stata osservata anche in due campioni (22,2%) di latte di massa aziendale (80,00±82,25 ng/L), in 6 campioni di autocisterna (34,38±19,92 ng/L) e in 1 campione (3,8%) di silo (30,40 ng/L). L'aflatossina M<sub>1</sub> è stata ritrovata a concentrazioni eccedenti i limiti fissati in Europa in un campione di latte di massa aziendale (138,6 ng/L) e in un campione di latte di autocisterna (62,09 ng/L).

## Discussione

Negli anni passati il monitoraggio sulla presenza di aflatossina M<sub>1</sub> nel latte di piccoli ruminanti allevati in Sardegna è stato condotto solo su un numero limitato di campioni.

Tuttavia, nel corso del 2013 la contaminazione da aflatossina M<sub>1</sub> nel latte di vacca e in alcuni casi anche di pecora e di capra è stata riportata. Rispetto alla crisi occorsa nel 2003 in Sardegna, l'ultima è stata meglio gestita, mediante una pronta risposta da parte del servizio veterinario pubblico. Come avvenuto in altre parti d'Italia, questo è legato all'esperienza maturata nel corso delle precedenti emergenze (Bolzoni *et al.*, 2013). Pertanto, a partire dal 2003, l'autorità sanitaria competente in Sardegna ha aumentato i controlli ufficiali lungo tutta la filiera dei piccoli ruminanti da latte (RAS, 2013). Nello stesso anno il numero di campioni analizzati nel corso dei programmi di monitoraggio eseguiti in regime di autocontrollo ha evidenziato un trend in aumento (tabelle 1 e 2). Tuttavia, il numero di campioni di latte di piccoli ruminanti analizzati per la determinazione delle aflatossine M<sub>1</sub> è ancora limitato e dovrebbe essere incrementato, sia in Sardegna che in altri Paesi (tabella 5 e tabella 6). Fino al 2012, la contaminazione da aflatossina M<sub>1</sub> in tutti i campioni analizzati era non rilevabile. Nel corso del 2013 diversi

campioni di latte di pecora (7.4%) e di capra (22.2%) sono risultati contaminati da aflatoossina M<sub>1</sub>. Precedenti indagini condotte sullo stesso territorio di produzione, mediante l'utilizzo di test rapidi ELISA, hanno evidenziato prevalenze di campioni positivi dello 0.8% e del 17.3% rispettivamente per il latte di pecora e di capra (Virdis *et al.*, 2008; Cossu *et al.*, 2011). Tuttavia, il presente studio dimostra che in Sardegna la prevalenza dei campioni di pecora contaminati da aflatoossina M<sub>1</sub> è inferiore rispetto a quanto osservato in altri Paesi (tabella 5).

## **Conclusione**

I programmi di monitoraggio dei livelli di contaminazione da aflatoossina M<sub>1</sub> attualmente implementati nella regione Sardegna necessitano di una rivalutazione alla luce delle nuove disposizioni e alle risorse disponibili. Un numero più elevato di campioni dovrebbe essere analizzato per essere rappresentativo degli allevamenti e degli stabilimenti di trasformazione di latte di piccoli ruminanti della Sardegna. Dovrebbe essere promosso un più largo impiego di metodi di screening rapidi, limitando l'utilizzo dell'HPLC come metodo di conferma. Lo sviluppo di programmi di monitoraggio in regime di autocontrollo è molto più complesso nel settore dei piccoli ruminanti rispetto a

quello delle bovine da latte. Questo è dovuto principalmente all'elevato numero di aziende di pecore e di capre da latte che dovrebbero essere sottoposte a piani di monitoraggio che spesso conferiscono limitati quantitativi di latte agli stabilimenti di trasformazione. Per questa ragione gli operatori del settore alimentare hanno aumentato il numero di controlli condotti sul latte di autocisterna e di silo (tabella 3 e tabella 4). Nel settore dei piccoli ruminanti, le autocisterne e i silo raccolgono latte da un numero maggiore di aziende rispetto a quanto avviene per le bovine da latte, amplificando il potenziale effetto diluizione del contaminante nel latte conferito. Nel presente lavoro una riduzione della prevalenza di contaminazione e dei livelli di concentrazione di aflatossina  $M_1$  è stata osservata in relazione all'origine dei campioni di latte, con un decremento che si osserva passando dai campioni di massa aziendale, al latte di autocisterna fino a quello di silo. In Italia è stato stabilito un livello di attenzione di 40 ng/Kg di aflatossina  $M_1$  nel latte di massa di vacca. Nei piccoli ruminanti, i programmi di monitoraggio sono condotti principalmente sul latte di autocisterna, rappresentativo di più allevamenti. Pertanto il livello soglia di attenzione dovrebbe essere abbassato per tenere conto del maggiore effetto diluizione.

## Riferimenti bibliografici

1. Battacone G, Nudda A, Palomba M, Pascale M, Nicolussi P, Pulina G, 2005.  
  
Transfer of Aflatoxin B<sub>1</sub> from feed to milk and from milk to curd and whey in dairy sheep fed artificially contaminated concentrates. J Dairy Sci, 88:3063-3069.
2. Bilandžić N, Božić Đ, Đokić M, Sedak M, Kolanović BS, Varenina I, Cvetnić Ž, 2014. Assessment of aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in the milk of four dairy species in Croatia. Food Control, 43:18-21.
3. Bolzoni G, Zanardi G, Bertocchi L, Delle Donne G, 2013. Risultati delle analisi dell'autocontrollo per la contaminazione da Aflatossina M<sub>1</sub> nel latte in Lombardia. Large Anim Rev, 19:251-255.
4. Causin R, 2013. Mycotoxins contamination in Italy and management experiences. Mycotoxin Forum Brussels, 5-6 September 2013.
5. Cossu F, Scarano C, Moniello G, Spanu C, Pittau D, Viridis S, De Santis EPL, 2011. Detection of aflatoxin M<sub>1</sub> in bulk-tank milk and sheep cheese. Ital J Food Safety, 1:93-97.

6. European Commission, 2006. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December as amended, on setting maximum levels of certain contaminants in foodstuffs.
7. EU, RASFF. European Commission, Rapid Alert System for Food and Feed. RASFF Portal. Available online: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/>. (accessed on 09 May, 2014).
8. Frobisch RA, Bradley DD, Wagner DD, Long-Bradley PE, Hairston H, 1986. Aflatoxin residues in the milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain. *J Food Protect*, 49:781-785.
9. Ghanem I, Orfi M, 2009. Aflatoxin M<sub>1</sub> in raw, pasteurized and powdered milk available in the Syrian market. *Food Control*, 20:603-605.
10. Goto T, Hsieh DP, 1985. Fractionation of radioactivity in the milk of goats administered <sup>14</sup>C-Aflatoxin B<sub>1</sub>. *J Assoc Off Anal Chem*, 68:456-458.
11. Hell K, Cardwell KF, Poehling H-M, 2003. Relationship between management practices, fungal infection and aflatoxin for stored maize in Benin. *J. Phytopathol*, 151:690-698.

12. Hussain I, Anwar J, Asi MR, Munawar MA, Kashif M, 2010. Aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in milk from five dairy species in Pakistan. Food Control, 21:122-124.
13. Ministero della Salute, 2013. Contaminazioni da aflatossine nel mais e nella catena alimentare. Circolare N. 855-P-16/01/2013. 16/01/2013.
14. Molle G, Decandia M, Cabiddu A, Landau SY, Cannas A, 2008. An update on the nutrition of dairy sheep grazing Mediterranean pastures, Small Ruminant Res, 77:93-112.
15. Nageswara Rao SB, Chopra RC, 2001. Influence of sodium bentonite and activated charcoal on Aflatoxin M<sub>1</sub> excretion in milk of goats. Small Ruminant Res, 41:203:213.
16. Rahimi E, Bonyadian M, Rafei M Kazemain HR, 2010. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran Food ChemToxicol, 48:129-131.
17. Rahimi E, Ameri M, 2012. A Survey of Aflatoxin M<sub>1</sub> Contamination in bulk milk samples from dairy bovine, ovine, and caprine herds in Iran. Bull. EnvironContamToxicol, 89:158-160.

18. Regione Autonoma della Sardegna, (2013). Piano di controllo per la prevenzione e gestione del rischio aflatossine nel mais, destinato all'alimentazione umana e animale, e nella filiera lattiero casearia.
19. Ronchi B, Danieli PP, Vitali A, Sabatini A, Bernabucci U, Nardone A, 2005. Evaluation of AFB<sub>1</sub>/AFM<sub>1</sub> carry-over in lactating goats exposed to different levels of afb<sub>1</sub> contamination. 56<sup>th</sup> Annual Meeting of the EAAP, Uppsala, Sweden.
20. Rubio R, Licon CC, Berruga M, 2011. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in the Manchego cheese supply chain. Journal of Dairy Science 94:2775-2778.
21. Streit E, Schatzmayr G, Tassis P, Tzika E, Marin D, Taranu I, Tabuc C, Nicolau A, Aprodu I, Puel O, Oswald IP, 2012. Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed-focus on Europe. Toxins, 4:788-809.
22. Veldman A, Meijst JAC, Borgrevve GJ, Heeres-van der Tol JJ, 1992. Carry-over of Aflatoxin from cows' food to milk. Anim Prod, 55:163-168.



23. Viridis S, Corgiolu G, Scarano C, Pilo AL, De Santis EPL, 2008. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in tank bulk goat milk and ripened goat cheese. Food Control, 19:44-49.

## Tabelle e figure

**Tabella 1.** Concentrazione di aflatossina M<sub>1</sub> rilevata in campioni di latte di pecora raccolti tra il 2005 e il 2013 mediante metodica HPLC - FLD.

anno	numero campioni	concentrazione AFM <sub>1</sub>			
		<8 ng/L	>8-20 ng/L	20-50 ng/L	>50 ng/L
2005	12	12	-	-	-
2006	58	58	-	-	-
2007	51	51	-	-	-
2008	46	46	-	-	-
2009	52	52	-	-	-
2010	40	40	-	-	-
2011	41	41	-	-	-
2012	45	45	-	-	-
2013	172	164	6	1	1
Totale	517	509	6	1	1

**Tabella 2.** Concentrazione di aflatossina M<sub>1</sub> rilevata in campioni di latte di capra raccolti tra il 2005 e il 2013 mediante metodica HPLC – FLD.

anno	numero campioni	concentrazione AFM <sub>1</sub>			
		<8 ng/L	>8-20 ng/L	20-50 ng/L	>50 ng/L
2010	4	4	-	-	-
2011	5	5	-	-	-
2012	13	13	-	-	-
2013	66	57	2	5	2
Totale	88	79	2	5	2

**Tabella 3.** Ricerca di aflatossina M<sub>1</sub> (ng/L) in campioni di latte di pecora prelevati da tank aziendale, autocisterna e silo mediante metodo HPLC - FLD.

tipologia	numero campioni	concentrazione AFM <sub>1</sub>			
		<8 ng/L n. (%)	>8-20 ng/L n. (%)	20-50 ng/L n. (%)	>50 ng/L n. (%)
latte aziendale	27	25 (92,6)	1 (3,7)	-	1 (3,7)
autocisterna	89	85 (95,5)	3 (3,4)	1 (1,1)	-
silo	56	54 (96,4)	2 (3,6)	-	-
totale	172	164 (95,3)	6 (3,5)	1 (0,6)	1 (0,6)

**Tabella 4.** Ricerca di aflatossina M<sub>1</sub> (ng/L) in campioni di latte di capra prelevati da tank aziendale, autocisterna e silo mediante metodo HPLC - FLD.

tipologia latte	numero campioni	concentrazione AFM <sub>1</sub>			
		<8 ng/L	>8-20 ng/L	20-50 ng/L	>50 ng/L
		n. (%)	n. (%)	n. (%)	n. (%)
bulk tank	9	7 (77,8)	-	1 (11,1)	1 (11,1)
autocisterna	31	25 (80,6)	2 (6,5)	3 (9,7)	1 (3,2)
silo	26	25 (96,2)	-	1 (3,8)	-
totale	66	57 (86,4)	2 (3,0)	5 (7,6)	2 (3,0)

**Tabella 5.** Casi di contaminazione da aflatossina M<sub>1</sub> in latte di massa di pecora in diversi paesi.

anno	numero di campioni	Paese	Campioni positivi (%)	media $\pm$ SD (ng/L)	Metodi rilevazione	Riferimento
2005-2006	23	Siria	13 (57%)	67 $\pm$ 18.4	ELISA	Ghanem and Orfi, 2009
2007	24	Pakistan	4 (16.7)	2.0 $\pm$ 4.0*	HPLC	Hussain <i>et al.</i> , 2010
2007-2008	51	Iran	19 (37.3)	28.1 $\pm$ 13.7	ELISA	Rahimi <i>et al.</i> , 2010
2007-2008	814	Spagna	387 (47.5)	-	ELISA	Rubio <i>et al.</i> , 2011
2008-2009	42	Iran	13 (31.0)	25.8 $\pm$ 15.1	ELISA	Rahimi and Ameri, 2012
2009	118	Italia	1 (0.8%)	5.2	ELISA	Cossu <i>et al.</i> , 2011
2013	19	Croazia	0 (0.0%)	3.7 $\pm$ 0.91*	ELISA	Bilandžić <i>et al.</i> , 2014

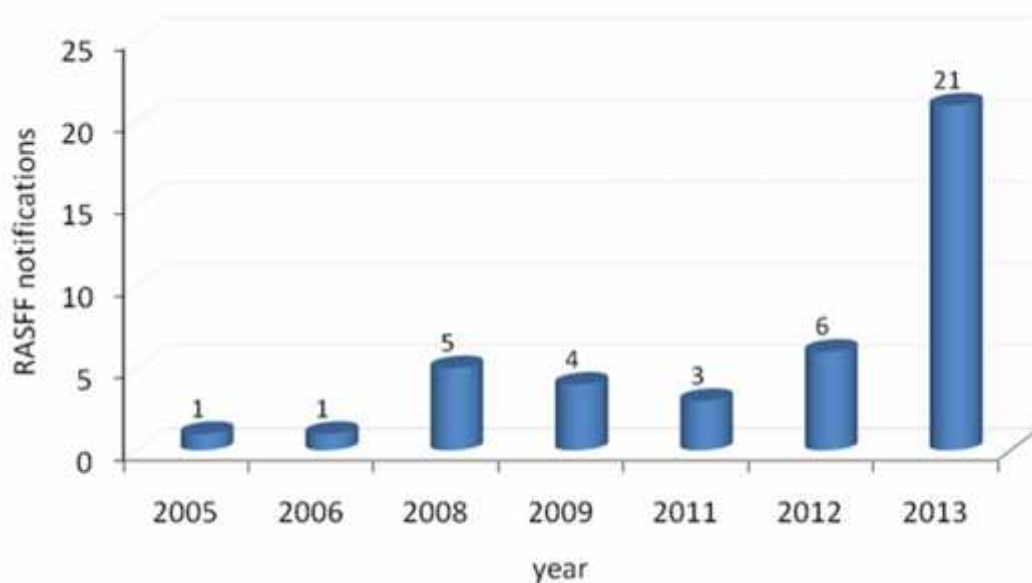
\*concentrazione ottenuta come valore medio di tutti i campioni analizzati

**Tabella 6.** Casi di contaminazione da aflatossina M<sub>1</sub> in latte di massa di capra in diversi paesi.

anno	numero di campioni	Paese	Campioni positivi (%)	media $\pm$ SD (ng/L)	Metodi rilevazione	Riferimento
2003-2004	208	Italy	36 (17.3)	14.5 $\pm$ 8.4	ELISA	Viridis <i>et al.</i> , 2008
2005-2006	11	Syria	7 (64 %)	19 $\pm$ 13.8	ELISA	Ghanem and Orfi, 2009
2007	30	Pakistan	6 (20.0)	2.0 $\pm$ 5.0*	HPLC	Hussain <i>et al.</i> , 2010
2007-2008	60	Iran	19 (31.7)	30.1 $\pm$ 18.3	ELISA	Rahimi <i>et al.</i> , 2010
2008-2009	48	Iran	17 (35.4)	31.8 $\pm$ 13.7	ELISA	Rahimi and Ameri, 2012
2013	32	Croatia	2 (6.2%)	7.6 $\pm$ 8.94*	ELISA	Bilandžić <i>et al.</i> , 2014

\*concentrazione ottenuta come valore medio di tutti i campioni analizzati

**Figura 1.** Notifiche del RASFF sulla contaminazione da aflatossine nel mais utilizzato per la produzione di mangimi dal 2005 al 2013.





**STUDIO DEI LIVELLI DI CONTAMINAZIONE DA  
AFLATOSSINA M<sub>1</sub> NEL PECORINO ROMANO E CONFRONTO  
CON ALTRI FORMAGGI A LUNGA MATURAZIONE**

## Introduzione

Le aflatossine (AFs) sono sostanze ad attività tossica, carcinogenica, mutagena e teratogena, prodotte dal metabolismo secondario di miceti filamentosi appartenenti al genere *Aspergillus*, principalmente *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Ad oggi sono state identificate più di 300 aflatossine, di cui la più diffusa e più tossica è l'aflatossina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), inserita dall' International Agency for Research on Cancer (IARC) nel gruppo I degli agenti carcinogenici per l'uomo (IARC, 2002). Alcuni degli alimenti zootecnici conservati (insilati, granelle di cereali, panelli oleosi) utilizzati nell'alimentazione del bestiame sono particolarmente soggetti alla contaminazione da parte di AFB<sub>1</sub> (Lee et al., 2004). Una volta ingerite dagli animali, le AFB vengono rapidamente idrossilate a livello epatico nei loro metaboliti, le aflatossine M (AFM), ed eliminate attraverso il latte (De Iongh et al., 1964). Tra queste, l'AFM<sub>1</sub> rappresenta il principale metabolita e, a causa della sua tossicità è stata inserita nel gruppo 2B come agente potenzialmente carcinogenico per l'uomo.

Esistono differenze per quanto riguarda la frequenza e il livello di contaminazione da aflatossina M<sub>1</sub> nel latte delle diverse specie. Nel latte di pecora e di

capra si osservano generalmente livelli inferiori rispetto al latte di vacca (Virdis et al., 2008). La concentrazione di AFM<sub>1</sub> eliminata con il latte è influenzata dal livello di esposizione e dalla quota escreta rispetto alla dose ingerita (carry-over). I livelli di ingestione delle AFs tra grandi e piccoli ruminanti assumono delle differenze legate al tipo di alimentazione. I bovini da latte vengono alimentati prevalentemente attraverso concentrati che costituiscono il substrato ideale per lo sviluppo delle aflatossine. L'esposizione della pecora e della capra all'aflatossina B<sub>1</sub> è limitata dal prevalente carattere estensivo o semi-estensivo degli allevamenti, nei quali il ricorso all'integrazione della razione con alimenti zootecnici conservati è contenuto. Il carry-over è influenzato da diversi fattori quali specie, stadio lattazione, momento di mungitura, livelli produttivi, stato sanitario della mammella e fattori individuali. Generalmente nel bovino la quantità di AFM<sub>1</sub> escreta attraverso il latte, è compresa tra lo 0,35% ed il 3% dell'AFB<sub>1</sub> ingerita (Veldman et al., 1992; Frobish et al., 1996), mentre nella capra è compresa fra lo 0,18% ed il 3% e nella pecora fra lo 0,08% e lo 0,33% (Stoloff, 1980; Goto et al., 1985; Nageswara Rao et al., 2001; Battacone et al., 2005). Nonostante l'implementazione di sistemi di monitoraggio dei livelli di aflatossina nel latte adottati in diversi paesi, circa il 10% dei formaggi ottenuti da latte bovino,

caprino e ovino hanno concentrazioni di AFM<sub>1</sub> superiori a 50 ng kg<sup>-1</sup> (Montagna et al., 2008; Torkar et al., 2008; Viridis et al., 2008).

Molti paesi hanno definito limiti massimi ammissibili (MRL) di AFM<sub>1</sub> nel latte.

In Europa sono stati definiti limiti di 50 ng kg<sup>-1</sup> (Regolamento CE 1881/2006 e successive modifiche), mentre negli Stati Uniti la FDA ha definito un limite massimo di 500 ng kg<sup>-1</sup> (U.S. Food and Drug Administration, 2011). Il latte crudo destinato alla produzione di latte alimentare o alla trasformazione deve risultare conforme ai limiti e non è consentita la diluizione del latte non conforme. La frequenza del controllo analitico per la ricerca di Aflatossine nel latte degli allevamenti, in assenza di situazioni palesi di crisi, è tuttavia contenuta per ragioni economiche. Il rischio ed i livelli di contaminazione sono comunque mitigati dalle modalità di raccolta del latte crudo. Il livello di contaminazione del latte degli allevamenti è piuttosto differente e, in seguito alla miscelazione durante le operazioni di raccolta, tende comunque a ridursi. I valori riscontrati nel latte di autocisterna e, quindi, nel tank dello stabilimento, mostrano una progressiva riduzione della concentrazione di l'AFM<sub>1</sub> (effetto diluizione). L'AFM<sub>1</sub> è particolarmente resistente ai trattamenti termici di risanamento del latte (termizzazione, pastorizzazione, UHT). Inoltre è stato dimostrato che l'AFM<sub>1</sub> si lega alle caseine del

latte ripartendosi in maniera disomogenea tra siero e cagliata, con concentrazioni maggiori nella cagliata (Govaris et al., 2001; Kamkar et al., 2005). Al termine del processo di caseificazione il livello finale di AFM<sub>1</sub> presente nel formaggio è pari a 3-8 volte il valore originariamente presente nel latte. Il fattore di arricchimento dipende dalla tipologia di formaggio, da 2,5 a 3,3 volte nei formaggi molli fino a 3,9-5,8 volte nei formaggi duri (Yousef and Marth, 1989). Nei formaggi ovis e caprini si rileva una concentrazione pari a 4,3-5,6 volte quella iniziale nel latte (Kaniou-Grigoriadou et al., 2005). Sebbene siano stati riportati diversi studi che rendono evidente il rischio associato alla contaminazione da AFM<sub>1</sub> in diversi prodotti lattiero caseari, non tutti i paesi hanno definito criteri di accettabilità per i prodotti a base di latte. Limiti specifici massimi ammissibili di AFM<sub>1</sub> sono stati fissati a 200 ng Kg<sup>-1</sup> (Olanda) e a 250 ng Kg<sup>-1</sup> (Svizzera, Austria e Turchia). In Italia, il Ministero della Salute, in seguito all'emergenza aflatossina del 2003, aveva definito, per i formaggi a pasta dura tipo grana, un limite provvisorio di 450 ng Kg<sup>-1</sup> (Ministero della Salute, 2004). Tale limite, pari a 150 ng/kg per i formaggi molli e 275 ng/kg per i formaggi duri, era stato individuato tenendo conto del fattore di concentrazione del latte individuato per questa tipologia di formaggio, in

ottemperanza al Regolamento Comunitario in materia di quote latte (GURI, 2003). Il sistema di monitoraggio e di autocontrollo si è fondato sulla tecnica immunoenzimatica ELISA di tipo competitivo indiretto, in quanto semplice, rapida, sensibile ed adatta ad un monitoraggio costante. La metodica di riferimento per la conferma delle AFM1 è il metodo cromatografico (HPLC).

L'allevamento ovino e caprino da latte e la loro trasformazione, rivesto per la Sardegna un indiscusso ruolo economico e sociale. Le prerogative nutrizionali delle produzioni regionali sono strettamente legate al territorio, alle tecniche di allevamento e alla qualità della materia prima. Il Pecorino Romano rappresenta il prodotto più rappresentativo del comparto lattiero-caseario della Sardegna, per la forte caratterizzazione del marchio e del prodotto, la tradizione ed i volumi di produzione ed esportazione. L'accesso e la competitività sui mercati internazionali richiedono la piena conformità degli alimenti ai requisiti normativi, incluso il possesso di caratteristiche sanitarie e di sicurezza alimentare certificabili della filiera e del prodotto. Occorre adottare inoltre un approccio preventivo per quanto attiene i rischi per il consumatore o la conformità a requisiti di legge. Incidenti di sicurezza alimentare sostengono campagne mediatiche con ampia diffusione di informazioni e ricadute negative derivanti dalla

pubblicità avversa. Si innescano contenziosi o meccanismi onerosi di ritiro e richiamo che, nel caso di prodotti destinati all'esportazione, possono comportare l'esclusione dal mercato. È responsabilità dell'intero comparto adottare strategie adeguate a contenere i rischi per il consumatore, partendo dalla produzione primaria, attraverso un sistema di garanzia della sicurezza che comprenda un approccio integrato di filiera.

Recenti crisi che hanno interessato il settore alimentare a seguito di contaminazione con sostanze ad accertata o potenziale cancerogenicità (diossine nelle carni suine, contaminazione da aflatossine nel latte), hanno suscitato nell'opinione pubblica allarmismi più o meno giustificati. In questo contesto sono fondamentali strategie volte a riacquistare la fiducia del consumatore. Nel corso degli ultimi dieci anni in Italia si sono verificate due crisi legate alla contaminazione del latte, nel 2003 e 2012, legate a particolari condizioni climatiche nel periodo estivo, con diffusa contaminazione e sviluppo di miceti nel mais. Le sequele della crisi che ha interessato il Nord Italia hanno poi raggiunto anche la Sardegna, sul cui mercato sono stati poi commercializzate partite di mangimi contaminate. L'attivazione di azioni di monitoraggio da parte delle AUSL o in autocontrollo ha evidenziato la contaminazione di latte bovino e, raramente, ovino.

Nel settore dei piccoli ruminanti l'analisi in autocontrollo per le aflatossine è condotta dagli stabilimenti con frequenza piuttosto variabile in dipendenza di volumi di latte trasformato e dimensioni economiche. I dati disponibili in bibliografia indicano un basso rischio di contaminazione da Aflatossina nel latte di queste specie, anche a livello regionale, mentre non è stato avviato un programma esteso di monitoraggio nei formaggi della Sardegna.

Il presente progetto si propone di attuare un esteso programma finalizzato al monitoraggio della contaminazione da Aflatossina M<sub>1</sub> nel Pecorino Romano, il cui obiettivo è di acquisire dati scientifici per la valutazione del rischio e per fornire agli operatori del settore ed al consumatore evidenze e garanzie sulla sicurezza. Allo scopo di confrontare l'attuale livello e distribuzione delle contaminazioni da Aflatossine nel Pecorino Romano e in altri formaggi a lunga maturazione saranno analizzati campioni di Parmigiano Reggiano e Grana Padano.



## **Materiali e metodi**

### *Prelievo dei campioni*

Al fine di tenere conto della stagionalità di produzione del Pecorino Romano, per tutte le 3 tipologie di formaggio sono stati acquisiti campioni di formaggio rappresentativi di 3 periodi produttivi nel corso della stagione casearia: inizio (Gennaio/Febbraio), metà (Marzo/Aprile), fine (Maggio/Giugno). Sono stati prelevati un totale di 180 campioni di formaggio stagionato dei quali: 108 Pecorino Romano PDO (PR), 40 Grana Padano PDO (GP) e 32 Parmigiano Reggiano PDO (PRG), sui quali è stata determinata la presenza dell'aflatossina M<sub>1</sub>. I tempi di maturazione variavano da un minimo di 8 mesi per il PR a un minimo di 12 mesi per il GP ed il PRG. I campioni di PR erano prelevati da n. 6 differenti caseifici industriali della Sardegna che trasformano latte ovino, mentre i campioni di GP e PRG provenivano da due caseifici dei rispettivi consorzi di tutela. Mensilmente nel periodo compreso tra gennaio e giugno venivano prelevati campioni di formaggio appartenenti a 3 differenti lotti di produzione. I campioni venivano spediti presso il Settore di Ispezione degli Alimenti del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università degli studi di Sassari, dove venivano eseguite due aliquote, una per la

determinazione dei parametri chimico fisici e di composizione e l'altra destinata alla determinazione dell'aflatossina M<sub>1</sub>.

#### *Analisi chimico-fisiche del formaggio*

Le analisi di composizione e fisico-chimiche dei formaggi venivano eseguite presso il Settore di Ispezione degli Alimenti. Tutti i campioni (500 g senza la crosta superficiale) sono stati macinati in sterilmixer (PBI International, Mi, Italy) e conservati in buste sterili al buio a -20 °C prima dell'analisi. Le analisi del contenuto di grasso, proteine e umidità nei campioni di PR sono state effettuate mediante il near infrared trasmittance (FoodScan Lab, Foss Electric, Danimarca). L'attività dell'acqua (aw) è stata determinata utilizzando Aqua Lab (Decagone Devices, Inc., USA) e Il pH misurato mediante determinazione potenziometrica (GLP 22, Crison Instruments, Spagna).

#### *Preparazione dei campioni*

Le aliquote di formaggio macinate destinate alla determinazione del contenuto in aflatossina M<sub>1</sub> venivano inviate congelate a -20°C presso il laboratorio dell'Associazione Regionale Allevatori della Sardegna dove venivano eseguite l'estrazione e la purificazione per la successiva analisi. A 10±0.05 g di campione di formaggio macinato, pesati in un tubo da centrifuga in polistirene da 50 mL, venivano aggiunti 10 mL di acqua

mQ (Millipore, Mi, Italy) e 10 mL di una soluzione al 10% di acido formico (Sigma-Aldrich, Mi, Italy) in acetonitrile (Carlo Erba, Mi, Italy). La sospensione veniva tenuta in agitazione mediante vortex LP (ThermoFisher Scientific, Cleveland, OH, USA) per 30 sec e successivamente posta in un agitatore orizzontale (Scharlab, Mi, Italy) per 1h. Al termine veniva aggiunta a campione una confezione prepesata di ECQUEU7-MP (UCT, Bristol, PA, USA) costituita da 4g MgSO<sub>4</sub> anidro, 1g NaCl e 1,5g di tampone citrato di trisodio (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> · 2H<sub>2</sub>O). La miscela è stata agitata vigorosamente per 1 min e successivamente sottoposta a centrifugazione a 3500 rpm/min per 5 min a +4 °C (LMC-4200R). Al termine veniva recuperato e misurato il surnatante in acetonitrile e trasferito in un tubo da centrifuga da 15 mL contenente i sorbenti C18 (0.25 g) e PSA (0.4 g) (QuEChERS UCT, Bristol, PA, USA). Successivamente la miscela veniva sottoposta a vigorosa agitazione per 1 min e, al termine, centrifugata a 3500 rpm per 5 min. 2 mL del campione venivano trasferiti in una vial ambrata e portato a secco a +40 °C in leggero flusso di azoto. L'estratto veniva ricostituito mediante 500 µL di H<sub>2</sub>O:MeOH (1:1 v/v), agitato mediante vortex per 1 min, e filtrato con filtro per siringa da 0,25 µm. Al filtrato venivano aggiunti ulteriori 500 µL di H<sub>2</sub>O:MeOH (1:1 v/v).

## *HPLC MS/MS*

Condizioni cromatografiche. Un'aliquota di 60 µL del campione estratto veniva iniettata in un Cromatografo Liquido (LC) Agilent 1100 series (Agilent Technologies, Mi, Italy), dotato di pompa quaternaria, degassatore, auto campionatore e vano colonna termostato. La separazione veniva realizzata utilizzando una colonna analitica Kinetex C18 5µm (4.6x150mm) alla temperatura di +30°C, utilizzando per l'eluizione la fase mobile costituita da acqua-metanolo-acetonitrile (46:33:21) con l'aggiunta dello 0.01 % di acido formico ad un flusso di 0.20 mL/min.

Condizioni di rilevazione. La rivelazione e la quantificazione dell'AFM<sub>1</sub> era determinata utilizzando uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo Agilent 6410 (Agilent Technologies, Mi, Italy) con sorgente ionica. I parametri per l'acquisizione dei dati (i.e. ioni precursori, prodotti ionici, sosta, frammentatore, energia di collisione e polarità) sono ottimizzati per l'AFM<sub>1</sub> e sono riportati nella tabella 1. La quantificazione dell'AFM<sub>1</sub> veniva determinata in Multiple Reaction Monitoring (MRM) attraverso la scansione di due reazioni di frammentazione con i seguenti parametri: voltaggio spray del capillare (4000 V positivo), gas N<sub>2</sub> nebulizzato a +340 °C ad un flusso di 8 L/min e 40

PSI, ionizzazione elettrospray (ESI, positiva). La transizione dello ione 329,1>273,1 è stata utilizzata per la quantificazione.

Validazione del metodo. Il metodo sviluppato è stato convalidato dalla procedura di controllo di qualità effettuata presso i laboratori dell'Associazione Regionale Allevatori della Sardegna. I parametri presi in considerazione erano: linearità strumentale, limite di rilevazione (LOD) e di quantificazione (LOQ), recupero e precisione (espressa come deviazione standard relativa percentuale, RDS%). È stato valutato l'effetto matrice mediante l'analisi di differenti curve di calibrazione effettuate sulle 3 diverse matrici PR, GP e PRG. L'aflatossina M<sub>1</sub> è stata quantificata mediante una procedura di calibrazione con matrice interna. Le soluzioni di calibrazione utilizzate per le curve accoppiate alle 3 matrici sono state preparate in estratto di formaggio non contaminato (bianco) addizionate con AFM<sub>1</sub> a concentrazioni di 25, 50, 100, 200 e 400 ng/kg. La linearità del metodo è stata stimata mediante l'analisi di sei soluzioni di calibrazione (standard corrispondenti a solvente e matrice) effettuate in triplicato nell'intervallo da 30 ng/kg a 300 µg/kg. LOD e LOQ sono stati calcolati analizzando gli standard matriciali abbinati al livello di calibrazione più basso e sono stati determinati come la concentrazione più bassa dell'analita che produce picchi cromatografici a S/N di 3 e 10, rispettivamente. La

validazione del metodo analitico è stata effettuata mediante la determinazione dei recuperi di aflatoossina  $M_1$  da campioni di bianco artificialmente addizionati con aflatoossina  $M_1$ . Per i 3 diversi tipi di formaggio sono stati scelti due livelli di fortificazione con aflatoossina  $M_1$ : 30 e 300 ng/kg sui campioni privi di aflatoossina (bianco). Per ogni tipo di formaggio, gli esperimenti di recupero sono stati eseguiti in triplicato per ogni livello di concentrazione. Campioni addizionati con aflatoossina  $M_1$  sono stati lasciati per una notte a temperatura ambiente per consentire l'evaporazione del solvente e l'equilibrio tra analita e matrice. La ripetibilità del metodo è stata determinata come deviazione standard relativa percentuale (RSD %) del contenuto di micotossine in 3 campioni fortificati a 10, 30 e 300 ng/kg di ciascun tipo di formaggio.

## **Risultati**

### *Composizione chimico-fisica*

I risultati sui parametri composizione chimico-fisica (sostanza secca, umidità, grasso, proteine e NaCl), pH e  $a_w$  del Pecorino Romano, Grana Padano e Parmigiano reggiano sono riportati nelle tabelle 2, 3 e 4.

### *Validazione metodo*

La percentuale di recupero medio dell'aflatossina  $M_1$  rientra nel limite di accettabilità, compresa tra il 74,43 e il 97,01% per le diverse matrici con RDS% compreso tra 1,44 e 8,00. Le regressioni lineari ottenute dalle curve di calibrazione per le diverse matrici utilizzate, hanno mostrato valori di linearità con  $R^2 > 0,997$ . La metodica ha mostrato una ripetibilità per i 3 livelli di fortificazione valutata con l'RDS% compreso tra 0,53 e 8,00.

I valori di LOD e LOQ sono risultati rispettivamente di 10 e 30 ng/Kg con valori di RDS% pari a 0,52%.

### *Determinazione dell'aflatossina $M_1$*

L'aflatossina  $M_1$  è stata determinata a concentrazioni  $> 30$  ng/kg in 6/108 campioni di Pecorino Romano (5,6%), con valori medi di  $68,5 \pm 24,6$  ng/kg. Nel Grana

144

Padano l'aflatossina M<sub>1</sub> è stata rilevata in 11/40 campioni di GP (27.5%), con valori medi di 56,2±18,8 ng/kg, mentre non è mai stata rilevata nei campioni di Parmigiano Reggiano.

I range di concentrazione dell'AFM<sub>1</sub> rilevata erano compresi tra 35,1 e 90,1 ng/kg per il PR e tra 39.1 e 96.0 per GP (tabelle 5, 6 e 7). Nessuno dei campioni analizzati raggiungeva o eccedeva il massimo limite di aflatossina M<sub>1</sub> (275 ng/kg) ammesso dalla legislazione italiana per i formaggi a pasta dura.



## **Discussione**

Il monitoraggio della contaminazione da aflatossina M<sub>1</sub> nel latte ovino incontra diverse limitazioni che rendono difficile acquisire dati attendibili sulla reale prevalenza dei livelli di micotossina. Per quanto riguarda i campioni effettuati nell'ambito dei controlli ufficiali, il Piano Nazionale di Monitoraggio dei Residui e i più recenti piani straordinari riguardanti il controllo delle contaminazioni da Aflatossine prevedono l'acquisizione di dati su un numero molto limitato di campioni. Per quanto riguarda invece l'effettuazione di analisi in ambito di autocontrollo da parte delle aziende che operano nella filiera, esistono limitazioni di ordine pratico ed economico. La filiera del latte ovino è infatti caratterizzata da un elevato numero di aziende primarie, che rende oneroso il monitoraggio del latte di massa a livello di singola azienda. L'adozione di strategie alternative, come ad esempio il monitoraggio del latte di autocisterna, è dimostrato essere poco efficace nel settore ovino, poiché rappresentativo di molte aziende e pertanto più suscettibile dell'effetto diluizione (Viridis et al., 2014). È noto che nel corso del processo di caseificazione le aflatossine non vengono inattivate, ma addirittura si ha un fenomeno di concentrazione che varia da 2,5 fino a 5,8 volte a seconda della tipologia di formaggio (Yousef and Marth, 1989; Govaris et al., 2001; Kamkar et al., 2005; Kaniou-

Grigoriadou et al., 2005; Manetta et al., 2009; Rubio et al., 2011). Pertanto, il seguente lavoro si proponeva di attuare un programma di monitoraggio della contaminazione da aflatossina M<sub>1</sub> nella filiera ovina utilizzando il formaggio come prodotto sentinella. Poiché il Pecorino Romano rappresenta il prodotto più rappresentativo del comparto lattiero-caseario della Sardegna, sia per tradizione che per volumi di produzione ed esportazione, è stato individuato come formaggio tipo per effettuare il monitoraggio dell'aflatossina M<sub>1</sub> nella filiera ovina. Fattore aggiuntivo che giustifica la ricerca di aflatossina nel Pecorino Romano è la necessità di accedere e competere sui mercati internazionali che richiedono la piena conformità degli alimenti ai requisiti normativi, incluso il possesso di caratteristiche sanitarie e di sicurezza alimentare certificabili della filiera e del prodotto.

L'acquisizione di tali dati consentirà di effettuare una valutazione del rischio su base scientifica e fornire agli operatori del settore ed al consumatore evidenze e garanzie di sicurezza. Infatti, in bibliografia, i dati relativi alla contaminazione da aflatossina nel Pecorino Romano sono limitati. In precedenti lavori l'AFM<sub>1</sub> è stata rilevata con una prevalenza compresa tra 9,4% e 50% dei campioni di formaggio pecorino analizzati con concentrazioni comprese tra 55-190 ng/Kg (Minervini et al., 2001; Montagna et al., 2008;

Cossu et al., 2011; Anfossi et al., 2012). Altri autori hanno osservato che il fattore di concentrazione dell'AFM<sub>1</sub> nel formaggio pecorino stagionato per 12 mesi ottenuto da latte naturalmente contaminato era compreso nel range 3,80–4,41 (Pecorelli et al., 2018). Il lavoro si proponeva come ulteriore obiettivo quello di effettuare un confronto del livello di rischio di contaminazione da aflatossina M<sub>1</sub> tra il Pecorino Romano e altri formaggi a lunga maturazione rappresentativi delle produzioni a latte vaccino quali Parmigiano Reggiano e Grana Padano. In uno studio condotto sul formaggio Grana Padano a lunga maturazione, la concentrazione dell'AFM<sub>1</sub> nel formaggio era di 4,5 volte rispetto a quella del latte naturalmente contaminato (Manetta et al., 2009). In uno studio effettuato su 223 campioni di formaggio Grana Padano, la maggior parte dei campioni (91%) erano nel range di concentrazione di AFM<sub>1</sub> compreso tra 5-100 ng/kg e solo 15 (6.7%) nel range compreso tra 100-250 ng/kg (Pietri et al., 1997).

In Italia, il Ministero della Salute, in seguito all'emergenza aflatossina del 2003, aveva definito, per i formaggi a pasta dura tipo grana, un limite provvisorio di 450 ng kg<sup>-1</sup> (Ministero della Salute, 2004). Tale limite era stato individuato tenendo conto del fattore di concentrazione del latte individuato per questa tipologia di formaggio, in ottemperanza al Regolamento Comunitario in materia di quote latte (GURI, 2003). Con la nota

DGISAN n. 28454 del 3/7/2013) in Italia è stato fissato un limite nei formaggi a pasta dura pari a 275 ng/Kg. Sulla base dei dati ottenuti nel presente lavoro si può osservare che complessivamente tutte le tre tipologie di formaggi a lunga maturazione hanno evidenziato livelli di contaminazione abbondantemente entro i limiti. Tale dato è indicativo che le misure preventive adottate nella filiera del latte ed i programmi di monitoraggio sono in grado di ridurre il rischio di contaminazione da aflatossina nei formaggi. Tuttavia, si possono osservare differenze tra le tre DOP. Nei campioni di Pecorino Romano il numero di campioni con livelli inferiori alla sensibilità del metodo (<30,00 ng/Kg) era del 94,44% a fronte del 72,50% e del 100% osservati rispettivamente per Grana Padano e Parmigiano Reggiano. Valori sovrapponibili sono stati osservati in uno studio precedente condotto su formaggi prodotti da latte vaccino a breve, media e lunga stagionatura (Montagna et al., 2008) in cui le percentuali di contaminazione erano comprese tra 16,1%-33,3%.

Tali dati sono giustificati nel caso del Pecorino Romano dalla peculiarità della filiera del latte ovino rispetto a quella del latte vaccino. Il sistema di allevamento tradizionale delle pecore da latte in Sardegna prevede un'alimentazione prevalentemente al pascolo con integrazioni di mangimi esclusivamente nei periodi di siccità, fattore che

riduce il livello di ingestione di aflatossina con gli alimenti zootecnici. Gli ovini sono inoltre caratterizzati da un livello di escrezione dell'aflatossina ingerita (carry-over) inferiore rispetto alle bovine da latte. Un ulteriore fattore è legato al sistema di gestione della raccolta del latte profondamente diverso tra le due specie di ruminanti da latte. Il settore ovino è caratterizzato da numerose aziende con livelli di produzione per singolo capo nettamente inferiori rispetto a quello bovino. Questo implica che il latte di autocisterna del “giro” di raccolta, è rappresentativo di un numero maggiore di aziende, aumentando il fattore di diluizione nel latte di massa (Barbiroli et al., 2007; Montagna et al., 2008; Hussain et al., 2010; Fallah et al., 2011; Viridis et al., 2014). Discorso a parte merita il Parmigiano Reggiano in cui i livelli di gestione dell'intera filiera sono estremamente più rigorosi e pertanto il livello di controllo ha degli standard paragonabili a quelli del Pecorino Romano.

I dati ottenuti evidenziano che il rischio aflatossine associato al Pecorino Romano è basso. Tale aspetto è fondamentale in un'ottica di promozione del prodotto sui mercati nazionale ed internazionale, particolarmente sensibili alle problematiche di sicurezza alimentare. L'impatto potenziale dei risultati si potrà riflettere su tutto il comparto

caseario ovino della Sardegna, soprattutto in considerazione del fatto che il Pecorino Romano rappresenta il prodotto principale per volumi di produzione ed esportazione.

### **Riferimenti bibliografici**

1. Anfossi L., Baggiani C., Giovannoli C., D'arco G., Passini C., Giraudi G. (2012). Occurrence of Aflatoxin M1 in Italian Cheese: Results of Survey Conducted in 2010 and Correlation with Production Season, Milking Animals and Maturation of Cheese, *Food Control*, 25,125-130.
2. Applebaum R.S., Brackett R.E., Wiseman D.W., Marth E. H. (1982). Aflatoxins: toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk products. *Journal of Food Protection*, 45, 752-777.
3. Bakirci I. (2001). A study on the occurrence of Aflatoxin M1 in milk and milk products produced in Van province of Turkey. *Food Control*, 12, 47–51.
4. Baptista A.S., Horii J., Baptista A.S. (2004). Fatores físico-químicos e biológicos ligados a produção de micotoxinas. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, 22, 1-14.

5. Barbiroli, A., Bonomi, F., Benedetti, S., Mannino, S., Monti, L., Cattaneo, T., et al. (2007). Binding of aflatoxin M1 to different protein fractions in ovine and caprine milk. *Journal of Dairy Science*, 90, 532-540.
6. Battacone G., Nudda A., Palomba M., Pascale M., Nicolussi P., Pulina G. (2005). Transfer of Aflatoxin B1 from feed to milk and from milk to curd and whey in dairy sheep fed artificially contaminated concentrates. *Journal of Dairy Science*, 88, 3063–3069.
7. Brackett R.E., Marth E.H. (1982). Fate of Aflatoxin M1 in Parmesan and Mozzarella cheese. *Journal of Food Protection*, 45, 597–600.
8. CE (2006). Regolamento (CE) No. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari;
9. Codex Alimentarius Commission. (2001). Comments submitted on the draft maximum level for aflatoxin M1 in milk. The Netherlands: Hague: Codex Committee on Food Additives and Contaminants (33rd session).
10. Commission Regulation (EC) No. 1881/2006. (2006). Commission

Directive 2006/1881/EC of 19 December 2006, setting maximum levels for certain contaminants in food stuffs. Official Journal of the European Communities, L364, 5–24.

11. Cossu F., Scarano C., Moniello G., Spanu C., Pittau D., Viridis S., De Santis

EPL (2011). Determinazione dell'aflatossina m1 nel latte e nei formaggi ovine. A.I.V.I online, 1, 93-97.

12. Creepy E.E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of

mycotoxins in Europe. Toxicology Letters, 127, 19–28.

13. Dashti B., Al-Hamli S., Alomirah H., Al-Zenki S., Bu Abbas A., Sawaya W.

(2009) Levels of aflatoxin M1 in milk, cheese consumed in Kuwait and occurrence of total aflatoxin in local and imported animal feed. Food Control, 20, 686–690.

14. De Iongh, H., R. O. Vles, and G. J. Van Pelt. 1964. Milk of mammals fed an

aflatoxin-containing diet. Nature 202:466–467.

15. Deveci O. (2007) Changes in the concentration of aflatoxin M1 during

manufacture and storage of White Pickled cheese. Food Control, 18, 1103–1107.



16. Elsanhoty R.M., Salam S.A., Ramadan M.F., Badr F.H. (2014).  
Detoxification aflatoxin M1 in yoghurt using probiotics and lactic acid  
bacteria. Food Control, 43, 129-134.
17. Frobish R.A., Bradley B.D., Wagner D.D., Long-Bradley P.E., Hairstone H.  
(1986). Aflatoxin Residues in Milk of Dairy Cows after Ingestion of  
Naturally Contaminated Grain. Journal of Food Protection, 49, 781-785.
18. Galvano F., Galofaro V., Galvano G. (1996). Occurrence and Stability of  
Aflatoxin M1 in Milk and Milk Products: A Worldwide Review. Journal of  
Food protection, 59, 1079-1090.
19. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana 13. (GURI) 2003. Decreto MIPAF  
21 gennaio 2003, Modalità di applicazione del Regolamento CE n.1392/2001 in  
materia di quote latte. Serie generale, n.57 del 10 marzo 2003;
20. Goto T., Hsieh D.P. (1985). Fractionation of radioactivity in the milk of  
goats administered <sup>14</sup>C-Aflatoxin B1. Journal of AOAC, 68, 456–458.
21. Govaris A., Roussi V., Koidis P.A., Botsoglou N.A. (2001). Distribution  
and stability of aflatoxin M1 during processing, ripening and storage of  
Telemes cheese. Food Additives and Contaminants, 18, 437- 443.

22. International Agency for Research on Cancer. (2002). Monograph on the evaluation of carcinogenic risks in humans: Some traditional herbal medicines, some mycotoxins. In Naphthalene and styrene, Vol. 82. Lyon, France: IARC, pp. 171 e 274;
23. International Agency for Research on Cancer. (2012). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Chemical agents and related occupations, 100F pp. 224e248. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
24. Italian Health Department (2004) Sampling and analytical methods for aflatoxin detection in cheese (24 August 2004) D.G.V.A/IX/25664/f.5.b.b.2/P.
25. Kamkar A., Karim G., Aliabadi F.S., Khaksar R. (2008) Fate of aflatoxin M1 in Iranian white cheese processing. Food and Chemical Toxicology, 46, 2236–2238.
26. Kaniou-Grigoriadou I., Eleftheriadou A., Mouratidou T., Katikou P. (2005). Determination of Aflatoxin M1 in ewe's milk samples and the produced curd and Feta cheese. Food Control, 16, 257–261.

27. Kiermeier F., Buchner M. (1977). Distribution of Aflatoxin M1 in whey and curd during cheese processing. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 30, 82–86.
28. Klich M.A. (2007). *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*, 8, 713–722.
29. Koehler P.E., Hanlin R.T., Beraha L. (1975). Production of Aflatoxins B1 and G1 by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* Isolated from Market Pecans. *Applied Microbiology*, 30, 581-583.
30. Lee, N. A., Wang, S., Allan, R. D., & Kennedy, I. R. (2004). A rapid aflatoxin B1 ELISA: development and validation with reduced matrix effects for peanuts, corn, pistachio, and soybeans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2746 e 2755;
31. Manetta A.C., Di Giuseppe L., Giammarco M., Fusaro I, Simonella A., Gramenzi A., Formigoni A. (2005) High performance liquid chromatography with post-column derivatisation and fluorescence detection for sensitive determination of aflatoxin M1 in milk and cheese. *Journal of Chromatography A*, 1083, 219–222.

32. Manetta A.C., Giammarco M., Di Giuseppe L., Fusaro I., Gramenzi A., Formigoni A., Vignola G., Lambertini L. (2009). Distribution of aflatoxin M<sub>1</sub> during Grana Padano cheese production from naturally contaminated milk. *Food Chemistry*, 113, 595–599.
33. Massey T.E., Stewart R.K., Daiels J.M., Ling L. (1995). Biochemical and molecular aspects of mammalian susceptibility to aflatoxin B<sub>1</sub> carcinogenicity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 208, 213–227.
34. Ministero delle Politiche Agricole e Forestali. (2001). Nota 30652 del 17.07.2013: aflatossine M<sub>1</sub> in prodotti lattiero-caseari. Applicabilità dei coefficienti di trasformazione in equivalente latte nei formaggi di cui all'allegato 2 del DM 31 luglio 2001 del MIPAAF - Rettifica nota DGISAN n. 28454 del 3/7/2013.
35. Ministero della Salute, 2004. Nota D.G.V.A/IX/25664/f.5.b.b.2/P "Metodi di campionamento e di Analisi per la ricerca di aflatossine nei formaggi";
36. Montagna, M. T., C. Napoli, O. De Giglio, R. Iatta, and G. Barbuti. 2008. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in dairy products in southern Italy. *Int. J. Mol.*

Sci. 9:2614–2621;

37. Nageswara Rao, S. B., & Chopra, R. C. (2001). Influence of sodium bentonite and activated charcoal on Aflatoxin M<sub>1</sub> excretion in milk of goats. *Small Ruminant Research*, 41, 203–213.

38. Oruc H.H., Cibik R., Yilmaz E., Kalkanli O. (2006). Distribution and stability of Aflatoxin M<sub>1</sub> during processing and ripening of traditional white pickled cheese. *Food Additives and Contaminants*, 23, 190–195.

39. Ronchi B., Danieli P.P., Vitali A., Sabatini A., Bernabucci U., Nardone A. (2005). Evaluation of AFB<sub>1</sub>/AFM<sub>1</sub> carry-over in lactating goats exposed to different levels of AFB<sub>1</sub> contamination. In Proc 56th Ann Meet EAAP, Uppsala, Sweden, 1-10.

40. Scudamore KA. (2005). Prevention of ochratoxins a in commodities and likely effects of processing fractionation and animal feeds. *Food Addit Contam.*, 1, 17–25.

41. Shahbazi, Y., Ahmadi, F., & Fakhari, F. (2016). Voltammetric determination of Pb, Cd, Zn, Cu and Se in milk and dairy products collected from Iran: An emphasis on permissible limits and risk assessment of

- exposure to heavy metals. Food Chemistry, 192, 1060-1067.
42. Skrbic B., Antic I., & Zivancev, J. (2015). Presence of aflatoxin M1 in white and hard cheese samples from Serbia. Food Control, 50, 111-117.
43. Stoloff, L. (1980). Aflatoxin in perspective. Journal of Food protection, 43, 226–230;
44. Minervini F., Visconti A., Bottalico A., Montagna M.T., 2001. Presenza di aflatossina M1 in formaggi dell'Italia Meridionale. Ind. Alim. 40: 513-516.
45. Torkar, K. D., and A. Vengušt. 2008. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia. Food Contr. 19:570–577;
46. U.S. Food and Drug Administration, FDA. (2011). Guidance for industry: Action levels for poisonous or deleterious substances in human food and animal feed;
47. van Egmond, H.P. (1983). Mycotoxins in dairy product. Food Chemistry, 11, 289–307.
48. Veldman A., Meijs J.A.C., Borggreve G.J., Heeres-van der Tol J.J. (1992). Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. Animal Science, 55, 163-168.

49. Viridis, S., Corgiolu, G., Scarano, C., Pilo, A.L., De Santis E.P.L. (2008). Occurrence of Aflatoxin M1 in tank bulk goat milk and ripened goat cheese. *Food Control*, 19, 44–49;
50. Yiannikouris A., Jouany J.P. (2002). Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research*, 51, 81-99.
51. Yousef A.E., Marth E.H. (1989). Stability and degradation of Aflatoxin M1. In van Egmond, H.P. (Ed.), *Mycotoxins in dairy products* pp. 127–161.
52. Pecorelli, I., Branciarri, R., Ortenzi, R., Ciriacci, M., Checcarelli, S., Roila, R., ... & Valiani, A. (2018). Evaluation of the concentration factor of aflatoxin M1 in a semi-hard Pecorino cheese obtained from naturally contaminated milk. *Food Control*, 85, 194-198.
53. Pietri, A., Bertuzzi, T., Bertuzzi, P., & Piva, G. (1997). Aflatoxin M1 occurrence in samples of Grana Padano cheese. *Food Additives & Contaminants*, 14(4), 341-344.

## **Tabelle e figure**

**Tabella 1.** Spettrometria di massa: parametri per l'acquisizione dei dati ottimizzati per

l'AFM<sub>1</sub>

<b>PRECURSOR ION</b>	<b>PRODUCT ION (m/z)</b>	<b>DWELL</b>	<b>FRAGMENTOR</b>	<b>COLLISION ENERGY</b>	<b>POLARITY</b>
329	329,1>273,1	200	182	30	Pos
329	329,1>259,1	200	182	30	pos



**Tabella 2.** Proprietà intrinseche e composizione fisico-chimica del Pecorino Romano in differenti mesi di produzione

Parametri	Mese produzione					
	gennaio	febbraio	marzo	aprile	maggio	giugno
pH	5.44±0.05 <sup>a</sup>	5.49±0.17 <sup>a</sup>	5.51±0.09 <sup>b</sup>	5.41±0.14 <sup>a</sup>	5.47±0.13 <sup>ab</sup>	5.50±0.11 <sup>b</sup>
a <sub>w</sub>	0.873±0.001 <sup>a</sup>	0.878±0.013 <sup>a</sup>	0.863±0.014 <sup>ab</sup>	0.862±0.027 <sup>ab</sup>	0.862±0.016 <sup>ab</sup>	0.856±0.025 <sup>b</sup>
umidità (%)	31.78±1.59 <sup>a</sup>	32.03±1.65 <sup>a</sup>	31.55±1.41 <sup>a</sup>	31.99±0.98 <sup>a</sup>	31.61±1.25 <sup>a</sup>	30.92±3.21 <sup>a</sup>
grasso (%)	30.04±1.32 <sup>a</sup>	33.97±1.21 <sup>a</sup>	33.77±1.14 <sup>ab</sup>	33.08±1.41 <sup>b</sup>	34.30±1.08 <sup>ac</sup>	35.06±1.59 <sup>c</sup>
proteine (%)	27.37±0.81 <sup>a</sup>	26.30±0.95 <sup>a</sup>	26.37±0.98 <sup>a</sup>	26.44±1.07 <sup>a</sup>	25.89±0.89 <sup>a</sup>	25.24±1.38 <sup>a</sup>
NaCl	4.89±0.46 <sup>a</sup>	4.73±0.79 <sup>a</sup>	5.08±0.87 <sup>a</sup>	5.21±1.31 <sup>a</sup>	5.18±0.85 <sup>a</sup>	5.51±1.18 <sup>b</sup>

I valori nella stessa riga con lettera diversa hanno differenze statisticamente significative (P<0.05)

**Tabella 3.** Proprietà intrinseche e composizione fisico-chimica del Grana Padano in differenti mesi di produzione

Parametri	Mese produzione					
	gennaio	febbraio	marzo	aprile	maggio	giugno
pH	5.55±0.32 <sup>a</sup>	5.39±0.29 <sup>a</sup>	5.53±0.37 <sup>a</sup>	5.45±0.19 <sup>a</sup>	5.56±0.31 <sup>a</sup>	5.65±0.62 <sup>b</sup>
a <sub>w</sub>	0.914±0.001 <sup>ab</sup>	0.914±0.001 <sup>ab</sup>	0.908±0.012 <sup>a</sup>	0.904±0.011 <sup>a</sup>	0.912±0.011 <sup>ab</sup>	0.922±0.006 <sup>a</sup>
umidità (%)	29.86±1.96 <sup>a</sup>	29.04±2.48 <sup>a</sup>	28.60±3.47 <sup>a</sup>	29.90±0.39 <sup>a</sup>	30.22±4.83 <sup>a</sup>	30.57±1.68 <sup>a</sup>
grasso (%)	31.92±1.72 <sup>a</sup>	32.81±1.35 <sup>a</sup>	32.12±2.65 <sup>a</sup>	31.68±1.40 <sup>a</sup>	30.83±3.93 <sup>a</sup>	31.79±1.02 <sup>a</sup>
proteine (%)	33.36±0.61 <sup>a</sup>	33.41±0.46 <sup>a</sup>	34.19±0.46 <sup>a</sup>	33.91±0.46 <sup>a</sup>	33.87±0.46 <sup>a</sup>	33.20±0.61 <sup>a</sup>
NaCl	1.34±0.19 <sup>a</sup>	1.60±0.11 <sup>a</sup>	1.76±0.20 <sup>bc</sup>	1.78±0.38 <sup>bc</sup>	1.65±0.11 <sup>b</sup>	1.36±0.29 <sup>a</sup>

I valori nella stessa riga con lettera diversa hanno differenze statisticamente significative (P<0.05)

**Tabella 4.** Proprietà intrinseche e composizione fisico-chimica del Parmigiano Reggiano in differenti mesi di produzione

Parametri	Mese produzione					
	gennaio	febbraio	marzo	aprile	maggio	giugno
pH	5.36±0.17 <sup>a</sup>	5.34±0.22 <sup>a</sup>	5.36±0.18 <sup>a</sup>	5.40±0.21 <sup>a</sup>	5.32±0.21 <sup>a</sup>	5.36±0.13 <sup>a</sup>
a <sub>w</sub>	0.901±0.019 <sup>a</sup>	0.893±0.049 <sup>a</sup>	0.894±0.012 <sup>a</sup>	0.904±0.037 <sup>a</sup>	0.912±0.011 <sup>a</sup>	0.899±0.019 <sup>a</sup>
umidità (%)	28.08±3.82 <sup>a</sup>	28.36±2.38 <sup>a</sup>	28.54±2.23 <sup>a</sup>	28.53±3.40 <sup>a</sup>	29.20±0.41 <sup>a</sup>	28.95±1.97 <sup>a</sup>
grasso (%)	35.31±2.93 <sup>a</sup>	35.59±2.18 <sup>a</sup>	35.16±1.86 <sup>a</sup>	34.97±2.65 <sup>a</sup>	33.84±0.87 <sup>a</sup>	32.94±1.58 <sup>a</sup>
proteine (%)	32.01±1.28 <sup>a</sup>	31.63±0.57 <sup>a</sup>	31.56±1.27 <sup>a</sup>	31.97±1.37 <sup>a</sup>	32.18±0.56 <sup>a</sup>	33.19±1.76 <sup>a</sup>
NaCl	1.80±0.21 <sup>a</sup>	1.81±0.15 <sup>a</sup>	1.89±0.25 <sup>a</sup>	1.84±0.20 <sup>a</sup>	1.87±0.21 <sup>a</sup>	1.87±0.29 <sup>a</sup>

I valori nella stessa riga con lettera diversa hanno differenze statisticamente significative (P<0.05)

**Tabella 5.** Ripartizione del contenuto di AFM<sub>1</sub> per classi di frequenza nel Pecorino Romano (n. 108 campioni)

<b>Classe - ng/Kg</b>	<b>Frequenza</b>	<b>% cumulativa</b>
0,00-<30,00-	102	94,44%
30,00-<50,00	1	97,22%
50,00-<70,00	2	99,07%
70,00-<100,00	3	100,00%

**Tabella 6.** Ripartizione del contenuto di AFM<sub>1</sub> per classi di frequenza nel Grana Padano (n. 40 campioni)

<b>Classe - ng/Kg</b>	<b>Frequenza</b>	<b>% cumulativa</b>
0,00-<30,00-	29	72,50%
30,00-<50,00	6	87,50%
50,00-<70,00	2	95,00%
70,00-<100,00	3	100,00%

**Tabella 7.** Ripartizione del contenuto di AFM<sub>1</sub> per classi di frequenza nel Parmigiano Reggiano (n. 32 campioni)

<b>Classe - ng/Kg</b>	<b>Frequenza</b>	<b>% cumulativa</b>
0,00-<30,00-	32	100,00%
30,00-<50,00	0	100,00%
50,00-<70,00	0	100,00%
70,00-<100,00	0	100,00%

## CONCLUSIONI FINALI

Nel corso degli ultimi quindici anni in Italia si sono verificate due crisi legate alla contaminazione del latte, nel 2003 e 2012, a particolari condizioni climatiche nel periodo estivo, con diffusa contaminazione e sviluppo di miceti nel mais. Le sequele della crisi che ha interessato il Nord Italia hanno poi raggiunto anche la Sardegna, sul cui mercato sono stati poi commercializzate partite di mangimi contaminate da AFM<sub>1</sub>. L'attivazione di azioni di monitoraggio da parte delle AUSL o in autocontrollo ha evidenziato la contaminazione di latte bovino e, raramente, ovino. Tuttavia, anche se i dati riportati in letteratura indicano un basso rischio di contaminazione da aflatossina nel latte ovino, è necessario incrementare i programmi di monitoraggio che coinvolgano l'intera filiera a partire dal latte crudo fino al prodotto finito. L'obiettivo generale della presente tesi è stato quello di acquisire dati scientifici per la valutazione del rischio e per fornire agli operatori del settore alimentare ed al consumatore finale evidenze e garanzie sulla sicurezza dei prodotti ottenuti dai caseifici della regione Sardegna che trasformano latte ovino.

I dati ottenuti hanno permesso di confermare il minore rischio di contaminazione

da aflatossina M<sub>1</sub> della filiera ovina rispetto a quella del latte bovino. Emerge tuttavia, la necessità di implementare i programmi di monitoraggio dei livelli di contaminazione da aflatossina M<sub>1</sub> attualmente adottati nella regione Sardegna. In considerazione dell'elevato numero di allevamenti che caratterizzano il settore ovino da latte, per essere maggiormente rappresentativo, il monitoraggio dovrebbe essere condotto su un numero molto più elevato di campioni. Dovrebbe essere incentivato un più largo impiego di metodi di screening rapidi, limitando l'utilizzo dell'HPLC come metodo di conferma. Le peculiarità dell'allevamento ovino rendono necessaria l'adozione di strategie di monitoraggio specifiche. In particolare questo è caratterizzato da un elevato numero di aziende di pecore da latte che spesso conferiscono limitati quantitativi di latte agli stabilimenti di trasformazione. Per contenere i costi, gli operatori del settore alimentare devono aumentare i controlli condotti sul latte di autocisterna e di silo, fattore questo che amplifica il potenziale effetto diluizione del contaminante nel latte conferito. Si osserva pertanto, una riduzione della prevalenza di contaminazione e dei livelli di concentrazione di aflatossina M<sub>1</sub> passando dai campioni di massa aziendale, al latte di autocisterna fino a quello di silo. Quindi, nell'adozione di un programma di monitoraggio dei livelli di contaminazione da aflatossina M<sub>1</sub> nel latte ovino è necessario definire un livello di



attenzione più restrittivo di quanto stabilito nel latte di massa di vacca.

L'aflatossina  $M_1$  presente nel latte è in grado di legarsi alle caseine e al termine del processo di caseificazione il livello finale è circa 4-6 volte superiore a quello del latte. Pertanto, a livello internazionale sono stati stabiliti limiti specifici ammissibili di aflatossina  $M_1$  nel formaggio. Per quanto riguarda i formaggi a pasta dura il DGISAN n. 28454 del 3/7/2013 ha fissato il limite massimo ammissibile (LMR) di  $AFM_1$  pari a 275 ng/Kg. La presente tesi si proponeva di attuare un esteso programma finalizzato al monitoraggio delle contaminazioni da aflatossina  $M_1$  nel Pecorino Romano e dimostrare con dati scientifici il minore rischio di contaminazione in confronto ad altre tipologie di formaggi a lunga maturazione come Parmigiano Reggiano e Grana Padano. I dati acquisiti hanno consentito di confermare che il Pecorino Romano è in grado di garantire un elevato livello di sicurezza relativo alla contaminazione da aflatossine. Tali evidenze rappresentano un sicuro vantaggio competitivo per il Pecorino Romano nei confronti dei due principali formaggi italiani, in un'ottica di promozione del prodotto sui mercati nazionale ed internazionale, particolarmente sensibili alle problematiche di sicurezza alimentare.