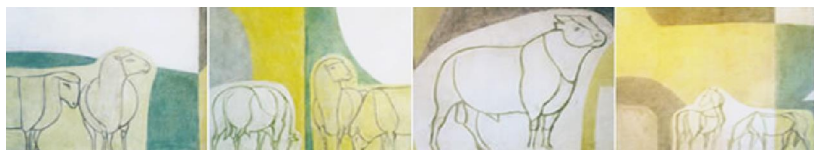


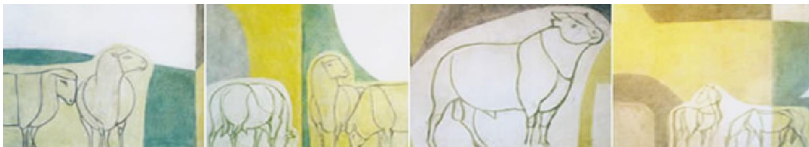
# ANALISI DI MICOTOSSINE



Dario Lucchetti 03/12/2014 %Benessere animale,  
qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza  
alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine

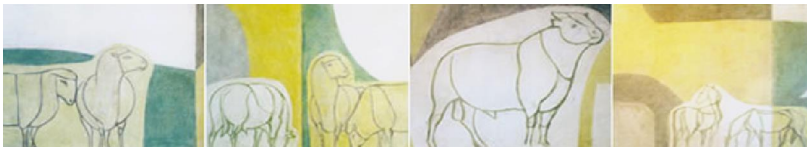
- Le micotossine nella storia
- Rischio associato
- Cosa sono le micotossine
- Campionamento
- Analisi in screening e conferma
- Risultati
- Obiettivi futuri



Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale,  
qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza  
alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine: cenni storici

La conquista della terra da parte della specie umana è stato un processo che è avvenuto lentamente e che nel corso dei millenni ha visto l'uomo progressivamente arricchire la propria esperienza biologica attraverso la conquista di nuovi e sempre più vasti areali e ambienti tra loro molto diversi.

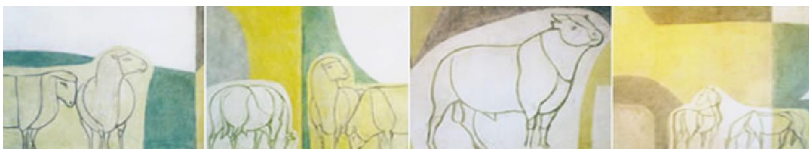


Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio



# Analisi di Micotossine: cenni storici

Un momento di grande rilievo in questa fase evolutiva è stato certamente quello dell'avvento delle prime forme di agricoltura nel Neolitico, 10-15.000 anni fa, che consentì di assicurare maggiori disponibilità alimentari. Il passaggio da una fase nella quale le risorse alimentari derivavano dalla raccolta di frutti, radici, molluschi, insetti o dalla caccia, magari già realizzata in modo selettivo per assicurare il mantenimento delle disponibilità venatorie, al pascolo di greggi di erbivori, alla coltivazione dei terreni, ha rappresentato un modo per assicurare migliori disponibilità alimentari e ha comportato una rilevante rivoluzione alimentare, con l'introduzione dei cereali



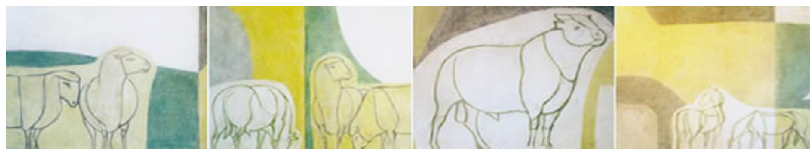
Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio



# Analisi di Micotossine: cenni storici

L'esempio più rilevante è rappresentato dall'Egitto ove le periodiche inondazioni del Nilo assicuravano una adeguata fertilizzazione.

Anche questo sistema produttivo, che pur rappresentava una importante evoluzione, rispetto alla fase di raccolta e alla pastorizia, non era esente da problemi, costituiti soprattutto dalla variabilità climatica, che condizionava la qualità e l'abbondanza dei raccolti

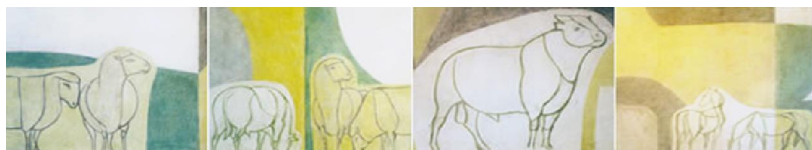


Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine: cenni storici



In questo ambito potrebbero essere inquadrare le piaghe descritte nell'Antico Testamento (Esodo 7, 14-13,16) e che afflissero gli egiziani, si stima fra il 1250-1300 a.C. (acqua mutata in sangue, invasione di rane, zanzare, mosche velenose, pestilenza fra il bestiame, pustole/piaghe, grandine, locuste, tenebre, morte dei primogeniti degli egiziani). **Probabilmente alcune potrebbero essere in relazione con i cereali contaminati da micotossine, che potrebbero aver provocato malattie o per azione diretta a seguito di ingestione di alimenti contaminati, o per inalazione**

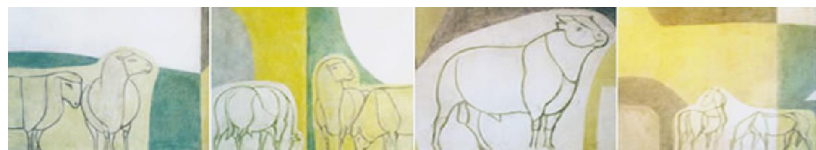


Dario Lucchetti 03/12/2014 %Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio



# Analisi di Micotossine: cenni storici

Le epidemie erano un fatto ricorrente; fra il 1400 e il 1500 le cronache ne riportano ben 1790, accompagnate spesso da gravi carestie, anche se non sempre è chiaro il rapporto causa-effetto fra carestia e il manifestarsi di una epidemia. L'ergotismo epidemico assunse tale importanza nel medioevo e nei secoli successivi, da essere compreso fra le pestilenze, sospettato di essere una malattia infettiva trasmissibile e diffusiva. Peraltro l'infezione e la diffusibilità esistevano, ma non avvenivano direttamente attraverso l'uomo, bensì attraverso la contaminazione dei cereali; l'uomo ne subiva la conseguenza tossica per via alimentare, consumando pane di segale e prodotti derivati contaminati dal fungo.

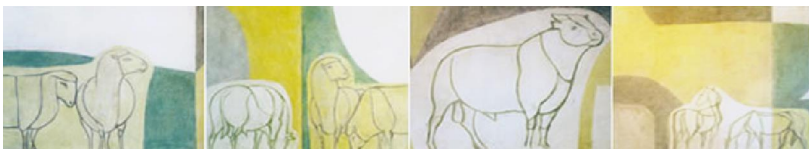


Dario Lucchetti 03/12/2014 %Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine: cenni storici

L'andamento di varie epidemie, ad un'analisi epidemiologica attenta, manifestava un comportamento definibile *«bizzarro»*.

Matossian, nell'intento di comprenderne le ragioni, ha analizzato il succedersi delle epidemie a partire dall'Alto Medio Evo, in relazione con l'alternarsi delle situazioni climatiche e ha tratto la convinzione di una possibile relazione più con la qualità dei cibi che con la quantità; tanto è vero che, in situazioni di abbondanza di cereali si riscontrava, a volte, una incidenza più frequente della peste, specie della peste bubbonica. **Il fatto viene spiegato con la proliferazione di topi nei granai, quando i cereali venivano conservati più a lungo del solito e spesso venivano alterati da attacchi di insetti e di muffe.**





# Analisi di Micotossine: cenni storici

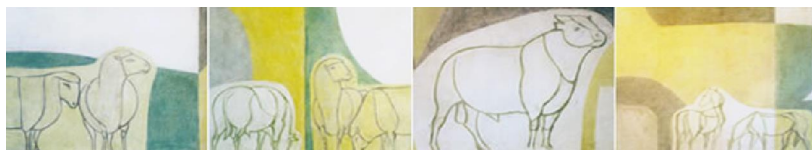
Nei due anni precedenti la comparsa della grande pandemia che colpì l'Europa fra il 1348 e 1350, il clima era stato estremamente

piovoso, freddo, umido, i raccolti scarsi e di cattiva

qualità. Inoltre, a causa delle poche giornate di sole, non sempre avevano potuto essere essiccati

adeguatamente. La pandemia colpì non solo l'uomo ma anche, e in modo evidente, i topi e si

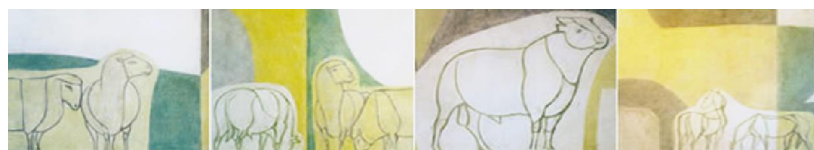
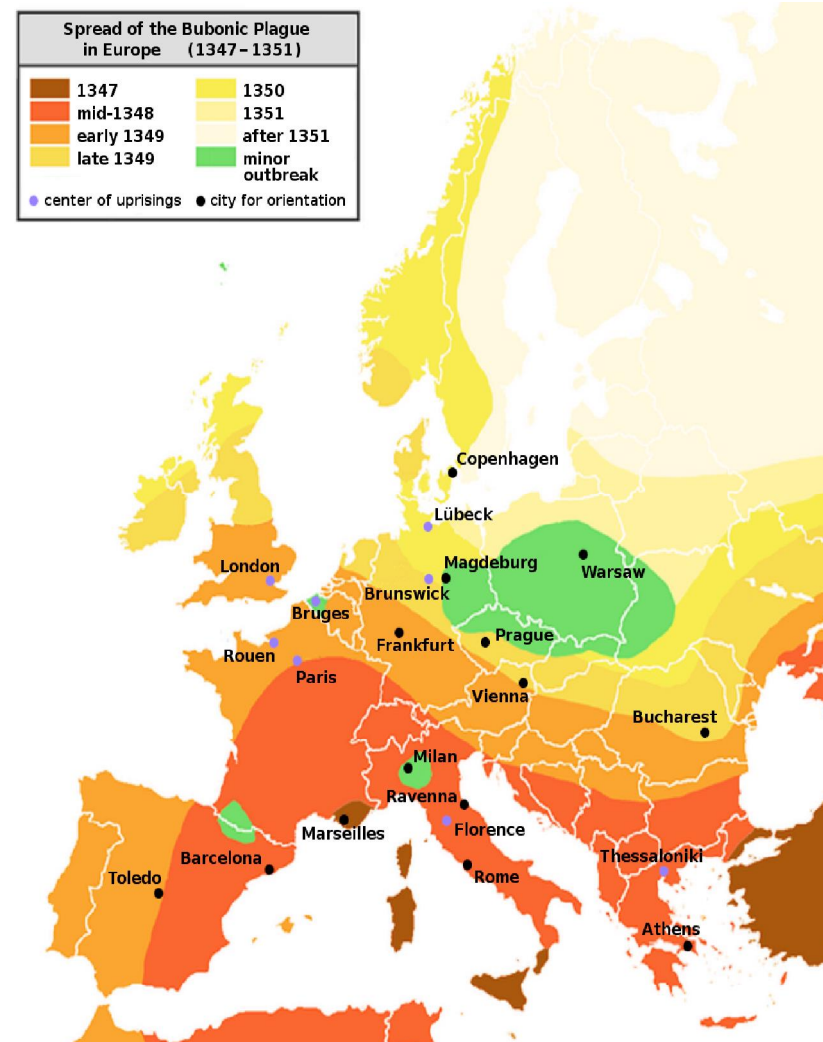
ebbe anche una elevata mortalità fra cavalli, bovini, pecore, capre, e altri animali domestici.



Dario Lucchetti 03/12/2014 %Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine: cenni storici

Condizioni climatiche caratterizzate da elevata piovosità, alta umidità e temperature relativamente basse erano risultate estremamente favorevoli allo sviluppo di muffe responsabili della produzione di varie micotossine sui cereali in campo e in magazzino. I paesi a clima più secco e freddo nello stesso periodo (Islanda, il nord della Norvegia e della Svezia, la Finlandia, larghe aree della Russia o dei Balcani) furono colpiti dalla pandemia in ritardo, solo quando si verificarono condizioni di elevata piovosità. Nei territori a clima secco quindi la pandemia non si diffuse e non causò elevata mortalità, nonostante i commerci e gli spostamenti degli abitanti rendessero il contagio possibile.



Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio



# Analisi di Micotossine: cenni storici

I medici inglesi avevano evidenziato, a metà del diciassettesimo secolo, una relazione fra la

dieta a base di segale e una serie di disturbi nervosi anche gravi, con manifestazioni

caratterizzate da convulsioni e allucinazioni, che facevano considerare le persone colpite

indemoniate. A volte gli ammalati erano sottoposti a pratiche esorcistiche. In alcune situazioni

queste manifestazioni nervose portarono anche a processi con l'accusa di stregoneria.

I processi per stregoneria, fra la fine del 1550 e la prima metà del 1600, furono

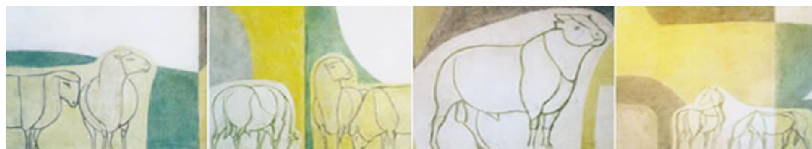
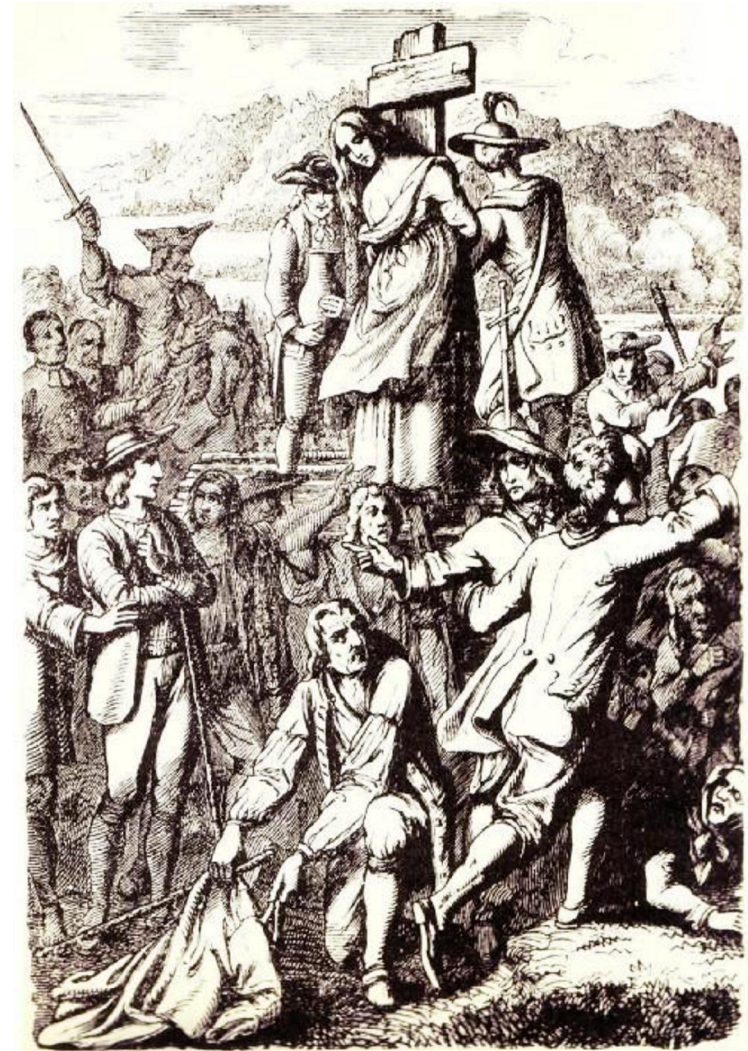
particolarmente concentrati nelle zone dove prevalente era il consumo di segale. La segale, in

condizioni climatiche sfavorevoli, può essere facilmente contaminata dalla *Claviceps purpurea* i

cui sclerozi contengono vari alcaloidi, alcuni dei quali ad effetto allucinogeno. Sono le aree a

nord delle Alpi, caratterizzate in quel periodo da clima freddo e particolarmente umido, ove

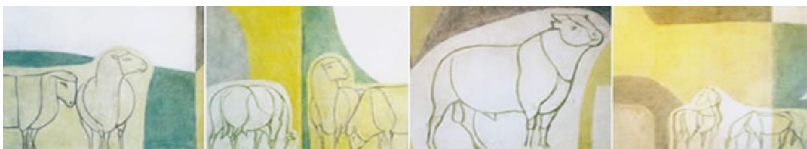
questi episodi raggiunsero una particolare intensità



Dario Lucchetti 03/12/2014 %Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine: cenni storici

In Inghilterra, nello stesso periodo storico, si era verificata una situazione di bassa fertilità ad andamento variabile condizionata dal modificarsi del rapporto fra il prezzo della segale e quello del frumento. La fertilità diminuiva quando il prezzo del frumento era elevato e aumentava il consumo di segale. La segale era il cereale base per la preparazione del pane, che anche le madri allattanti consumavano. Gli alcaloidi della segale cornuta, eliminati con il latte, determinavano una elevata mortalità dei neonati. Alcuni medici francesi avevano già preso coscienza di questa situazione tanto che, all'inizio del 1600, consigliavano alle madri allattanti di consumare pane bianco per evitare che i loro bambini avessero *õspasmiõ*.



Dario Lucchetti 03/12/2014 %Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio

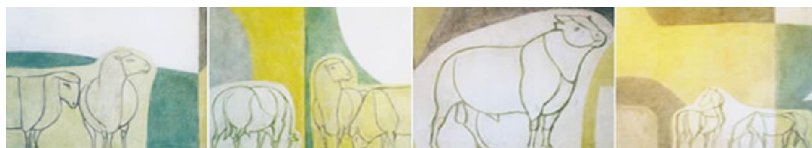


# Analisi di Micotossine: cenni storici

Significativo è il fatto che la situazione migliorò drasticamente all'aumentare della percentuale di frumento nella dieta a scapito di altri cereali e soprattutto della segale. La quota del frumento utilizzato nell'alimentazione è passata in certe zone dal 30% circa nel periodo 1300-1350 a quasi l'80% nel periodo 1450-1500

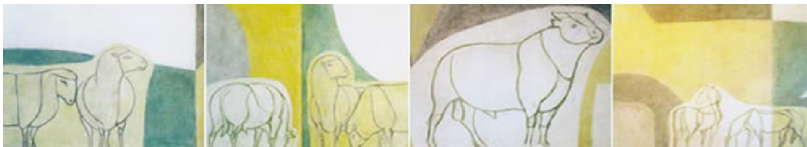


Anni	Percentuale di frument
1300-1350	30,8
1350-1400	51,5
1400-1450	66,0
1450-1500	78,8



Dario Lucchetti 03/12/2014 %Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine: cenni storici



Dario Lucchetti 03/12/2014 %Benessere animale,  
qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza  
alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine : analisi del rischio

Le micotossine sono un problema che viene da lontano, ma del quale, solo di recente, si è

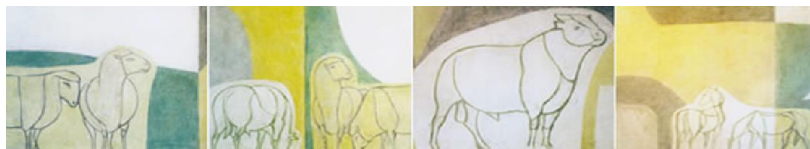
preso coscienza.

L'approccio scientifico inizia negli anni '60 a seguito della sindrome che colpì un elevato

numero di tacchini in Inghilterra (Turkey X disease).

A prescindere dalle notazioni storiche - che associano la probabile presenza di micotossine a

situazioni patologiche gravi che hanno colpito intere popolazioni - possiamo chiederci perché le micotossine siano un problema.



Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio



# Analisi di Micotossine : analisi del rischio

Ormai è accertato che le micotossine agiscono sull'organismo animale per ingestione, inalazione o per semplice contatto, esplicando una serie di effetti:

ó citotossico, teratogeno, cancerogeno, danni al DNA

ó epato-nefro-enterotossico

ó dermatossico, emorragico

ó estrogenosimile

ó neurotossico, ecc.

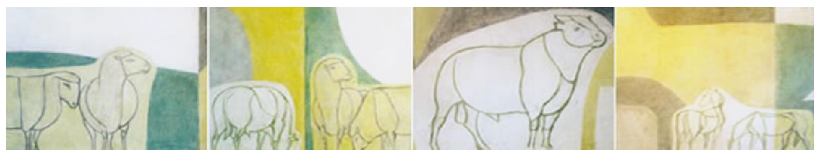
ó immunosoppressore



Solo in alcuni casi sono chiari i rapporti di causa effetto fra la presenza di una micotossina e

una manifestazione patologica.

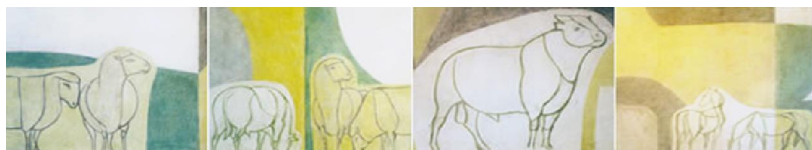
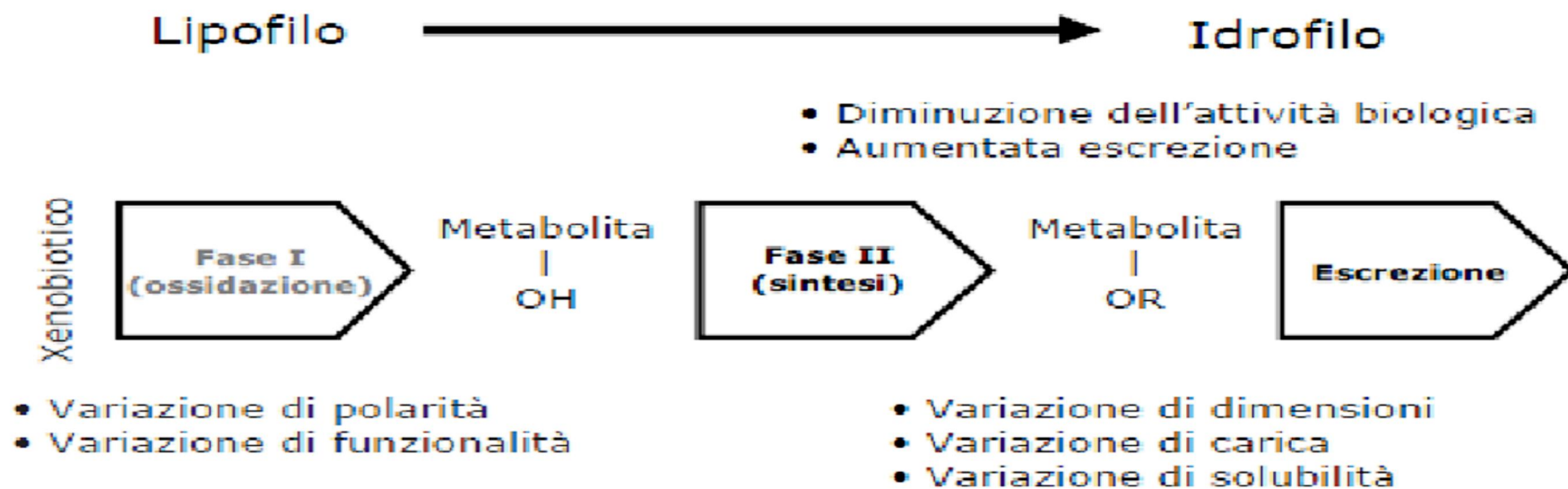
Probabilmente è l'effetto immunosoppressore il più subdolo, in quanto predispone ad una serie di malattie di altra origine, con conseguenze epidemiologiche difficilmente valutabili.



Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine : analisi del rischio

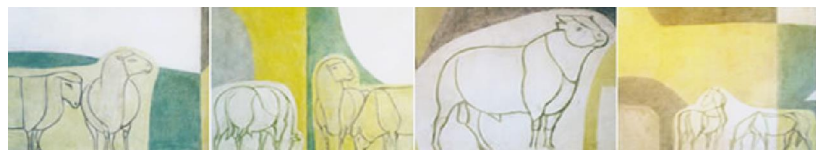
L'organismo animale non sembra disporre di molti meccanismi di difesa nei riguardi di queste molecole; in vari casi sono attivi processi di trasformazione, che hanno come obiettivo quello di favorire l'eliminazione delle molecole stesse, magari aumentandone la solubilità in acqua. La suscettibilità nei riguardi delle varie micotossine è molto differenziata in funzione della specie e del momento fisiologico.



Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine : analisi del rischio

La sicurezza alimentare riveste un ruolo sempre più rilevante nel complesso panorama della salute umana. Tale rilevanza ha spinto le organizzazioni internazionali, comunitarie e nazionali ad affrontarne sistematicamente i diversi aspetti attraverso le procedure dell'analisi del rischio, quali codificate per la prima volta dalla FAO/WHO nel 1995

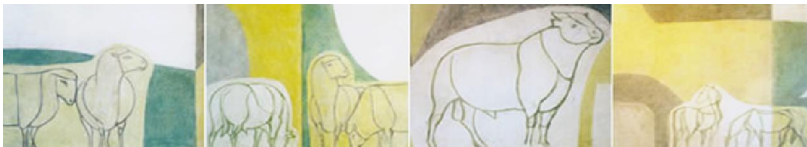


Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio



# Analisi di Micotossine : analisi del rischio

Storicamente l'analisi del rischio, da effettuarsi singolarmente per ogni agente chimico, fisico o biologico che possa provocare un danno all'uomo, agli animali o all'ambiente, è stata staticamente e settorialmente scomposta nelle tre fasi relative alla valutazione, gestione e comunicazione del rischio



Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio

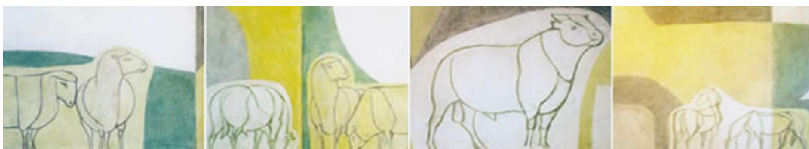
# Analisi di Micotossine : analisi del rischio

Recentemente è stata evidenziata la necessità che i vari elementi dell'analisi del rischio non siano considerati domini a se stanti, ma che debbano essere riguardati come elementi del ciclo

del rischio. In particolare è stato riconosciuto che la comunicazione del rischio deve rappresentare la piattaforma su cui sia la valutazione che la gestione del rischio si devono

sviluppare e con cui devono interagire e confrontarsi. Inoltre in questa nuova concezione la gestione e la valutazione del rischio svolgono attività interattive e iterative, risultando in opzioni

sempre più mirate ed efficaci. **L'interattività comporta lo scambio di *inputs* e di *outputs* tra contributi scientifici e gestionali, mentre l'iteratività comporta la rivisitazione progressiva e periodica della situazione relativa all'agente studiato**, sulla base di mutate condizioni e/o di nuove acquisizioni.



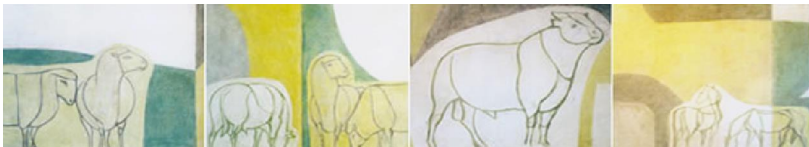
Dario Lucchetti 03/12/2014 %Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio



# Analisi di Micotossine : cosa sono

Le tossine naturali sono un insieme complesso e variegato di composti chimici suddivisi in due categorie. La prima è rappresentata dalle **fitotossine**, metaboliti delle piante che agiscono come antiparassitari naturali e spesso risultano nocivi per l'uomo. La seconda categoria comprende le **tossine prodotte da microrganismi parassiti** che possono infestare le piante.

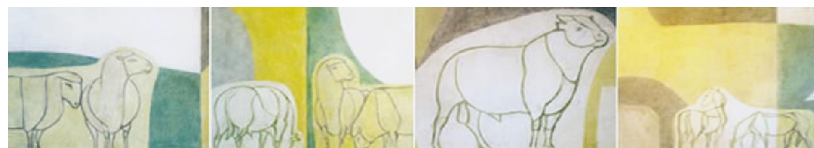
Entrambe queste classi costituiscono un serio problema per la salute dell'uomo, sul quale negli ultimi anni si è focalizzata l'attenzione da parte del mondo scientifico. Per quanto riguarda le tossine prodotte dai parassiti presenti negli alimenti, attualmente suscitano grande interesse le micotossine. A partire dagli anni '60 si è iniziato a comprendere che la contaminazione di muffe può essere responsabile di gravi problemi per la salute pubblica. Oggi si ritiene che sono circa quaranta le sindromi patologiche dell'uomo e degli animali nelle quali si sospetta siano coinvolte micotossine ingerite con gli alimenti.



Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine : cosa sono

Micotossine	Effetto tossico	Prodotto contaminato
Patulina	Epatiti (carcinogenesi)	Frutta e derivati
Acido penicillico		Mais e altri cereali, legumi
Sterigmatocistina		Cereali, caffè crudo
Roquefortina	Disturbi nervosi	Formaggi erborinati
Pretossina	Mutagenesi	
Acido tenuazonico	Citotossicità	Pomodoro, frutta e relative conserve alimentari, girasole
Rubratossine	Epatiti, emorragie	Cereali, legumi
Aflatossine (B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> )	Epatiti, nefriti	Arachidi e altri legumi, mais e altri cereali, noci e mandorle diverse, semi oleosi, frutta secca
Aflatossine (M <sub>1</sub> , M <sub>2</sub> )	Derivati del metabolismo animale di aflatossina B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub>	Latte e derivati
Zearalenone	Iperestrisimo Ipofertilità	Mais e altri cereali
Ocratossina A e B	Nefriti Epatiti	Orzo, mais e altri cereali Pane, pasta e prodotti da forno
Tricoteceni	Dermatiti, emorragie	Mais, orzo e altri cereali
Tossina T-2	Leucopenia, vomito	
Deossinivalenolo	Disturbi nervosi	
Diacetossiscirpenolo	Cardiopatie, inappetenza	
Fusarina	Mutagenesi, carcinogenesi	Mais
Moniliformina	Citotossicità	
Alcaloidi di Claviceps	Ergotismo	Cereali
Citrinina	Epatiti, nefriti	
Piperazine, Chetomine	Citotossicità	Mais e altri derivati
Viomelleina	Nefriti	Orzo e altri cereali
Acido ciclopiazonico	Astenia, paralisi	Cereali, formaggi, arachidi

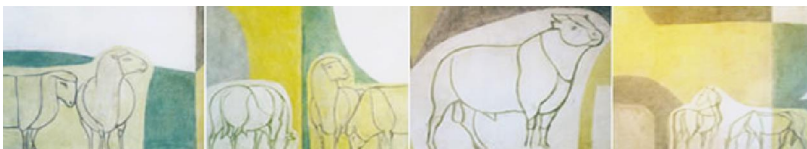
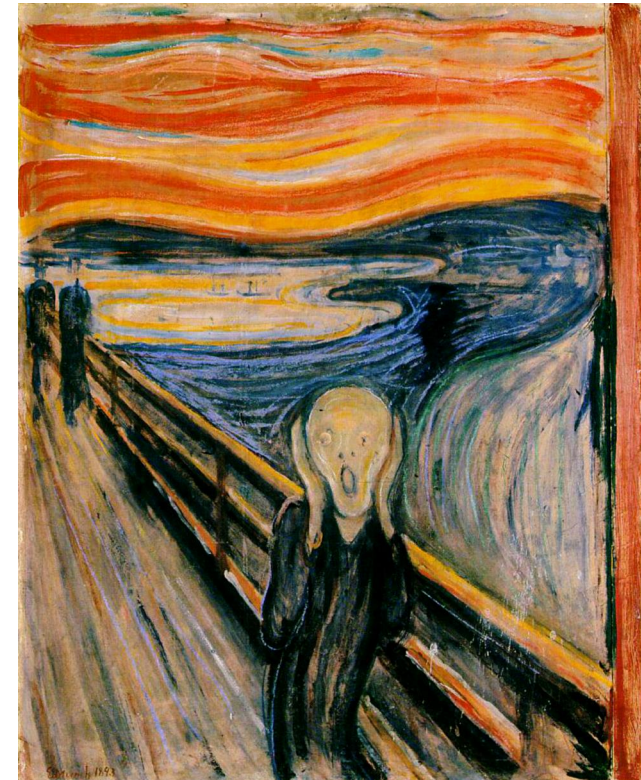


Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio



# Analisi di Micotossine : cosa sono

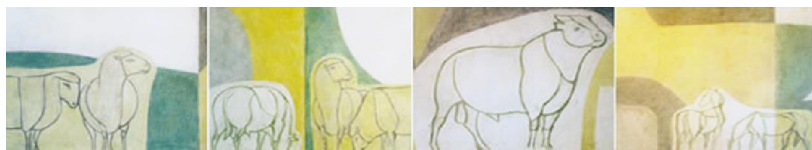
Attualmente sono note più di **300 micotossine**, anche se la maggior parte delle ricerche è concentrata su Aflatossine, Ocratossine, Tricoteceni, Zearalenone, Fumonisine. Solo il 7% delle micotossine identificate si ritrovano negli alimenti a livelli significativamente elevati tali da costituire un pericolo per la salute umana.



Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio

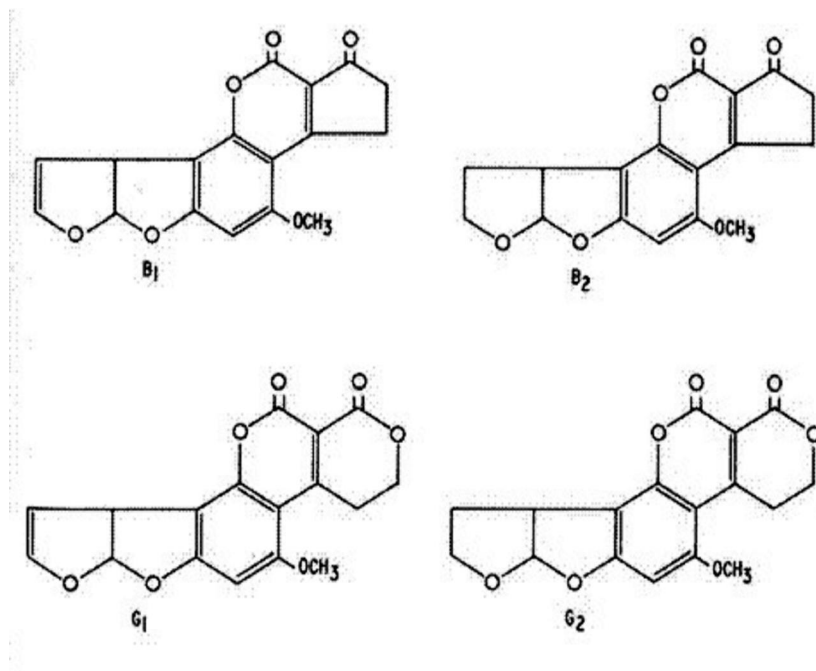
# Analisi di Micotossine : cosa sono

In qualità di contaminanti pressoché ubiquitari delle materie prime con le quali vengono confezionati i mangimi destinati alle specie da reddito, le micotossine rappresentano un problema sanitario di primaria importanza. **I moderni controlli di qualità e l'applicazione di standard internazionali per la coltivazione delle foraggere e la preparazione dei mangimi hanno in larga misura eliminato la comparsa di episodi intossicazionali a carattere epidemico.** Tuttavia, la presenza di concentrazioni relativamente basse di varie micotossine condiziona in tali specie la comparsa di sindromi tossiche spesso insidiose e di difficile diagnosi, caratterizzate per lo più da un calo della produttività e da immunodepressione. **Di particolare rilievo è la presenza di sinergismi fra diverse micotossine (ad es. DON+Zearalenone),** non ancora ben documentata in tutte le specie, che determina sovente un notevole abbassamento dei valori soglia ritenuti *safe* riportati in letteratura per ciascuna micotossina.



Dario Lucchetti 03/12/2014 %Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine : cosa sono



## AFLATOSSINE

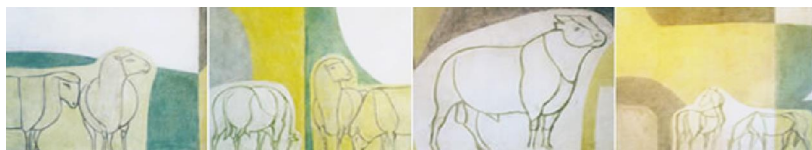
**Fungo produttore:** *Aspergillus flavus*  
e *A. parasiticus* (funghi da stoccaggio)

**Temperatura, limiti di produzione:**  
T<sub>min</sub>=10 °C e T<sub>max</sub>=41 °C  
T<sub>ott</sub>=25-30 °C

**Acqua libera (aw), valori minimi di produzione:** (aw)<sub>min</sub>=0,80

**Prodotti contaminati:** mais e altri cereali, arachidi e altri legumi, loro derivati,  
noci, mandorle, semi oleosi, frutta secca, latte e derivati

**Tossicità:** cancerogene per l'uomo (Gruppo 1, WHO), epatotossiche, nefrotossiche, immunosoppressive



Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio



# Analisi di Micotossine : cosa sono

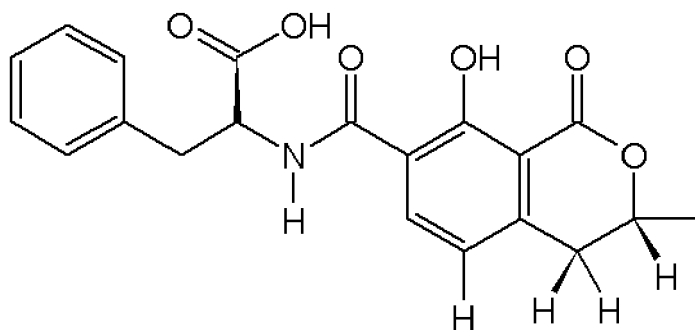
**Fungo produttore:** *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum*  
(funghi da stoccaggio)

**temperatura, limiti di produzione:**  
**Tmin=4 °C e Tmax=37 °C**  
**Tott=20-30 °C**

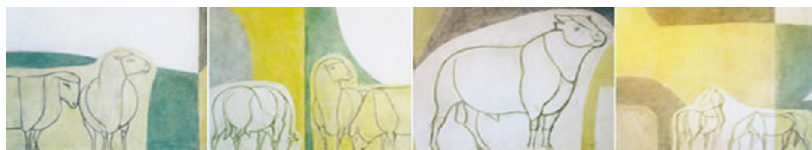
**Acqua libera (aw), valori minimi di produzione:** (aw)min=0,90

**Prodotti contaminati:** mais e altri cereali, loro derivati

**Tossicità:** potenzialmente cancerogene (Gruppo 2, WHO), epatotossiche e nefrotossiche

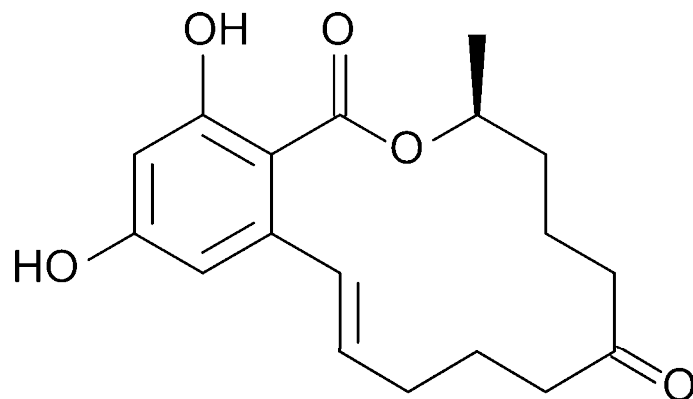


OCRATOSSINA A



Dario Lucchetti 03/12/2014 %Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine : cosa sono



ZEARALENONE

**Fungo produttore:** *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* e *F. crookwellense*  
(funghi da campo, caratteristici dei climi freschi e umidi)

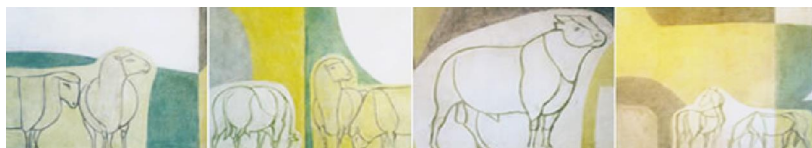
**Temperatura, limiti di produzione:**  
Tmin=10 °C e Tmax=30 °C  
Tott=19-20 °C

**Acqua libera (aw), valori minimi di produzione:** (aw)min=0,95

**Prodotti contaminati:** mais e altri cereali, loro derivati

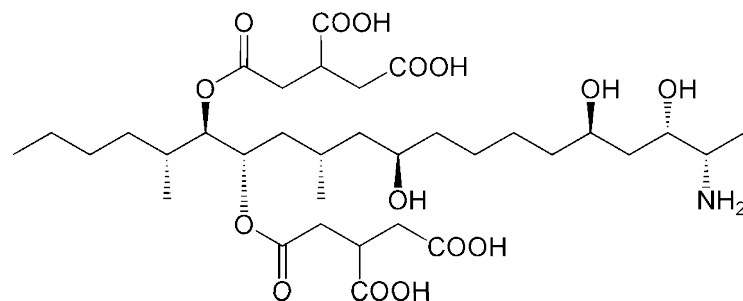
**ossicità:** negli animali allevati determina uno sconvolgimento delle attività

**ormonali legate alla riproduzione** (iperestrisimo, ipofertilità e calo della produzione)



Dario Lucchetti 03/12/2014 %Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine : cosa sono



FUMONISINA

Fungo produttore: *Fusarium proliferatum*, *F. verticillioides* e *F. moniliforme*  
(funghi da campo, caratteristici dei climi caldi e secchi)

Temperatura, limiti di produzione: T<sub>min</sub>=12 °C e T<sub>max</sub>=24 °C  
T<sub>ott</sub>=18-20 °C

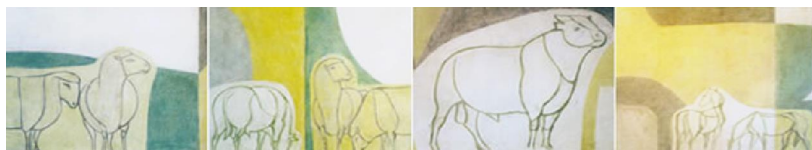
Acqua libera (a<sub>w</sub>), valori minimi di produzione: (a<sub>w</sub>)<sub>min</sub>=0,95

Prodotti contaminati: mais e altri cereali, loro derivati

Tossicità: potenzialmente cancerogene per l'uomo (Gruppo 2, WHO), epatotossiche, nefrotossiche e immunosoppressive

(2S,2'S)-2,2'-{[(5S,6R,7R,9R,11S,16R,18S,19S)-19-amino-11,16,18-trihydroxy-5,9-dimethylcosane-6,7-diyl]bis[oxy(2-oxoethane-2,1-diyl)]}disuccinic acid

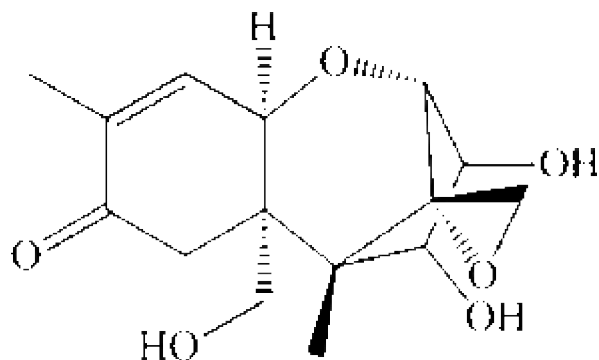
(2R,2'R)-2,2'-{[(5R,6S,7S,9S,16R,18S,19S)-19-amino-16,18-dihydroxy-5,9-dimethylcosane-6,7-diyl]bis[oxy(2-oxoethane-2,1-diyl)]}disuccinic acid



Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio



# Analisi di Micotossine : cosa sono



DEOSSINIVALENOLO

**Fungo produttore:** *Fusarium sporotrichioides*, *F. poae*, *F. graminearum* e *F. culmorum* (funghi da campo, caratteristici delle zone temperate ad elevata umidità relativa)

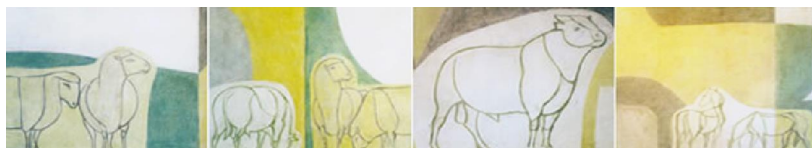
**Temperatura, limiti di produzione:**  
deossinivalenolo Tott=28 °C  
tossina T-2 Tott=6-12 °C

**Acqua libera (aw), valori minimi di produzione:** (aw)min=0,95

**Prodotti contaminati:** mais e altri cereali, loro derivati

**ossicità:** Vomito, rifiuto del cibo, gastroenteriti ulcerative, edemi polmonari, emorragie intestinali, immunosoppressione

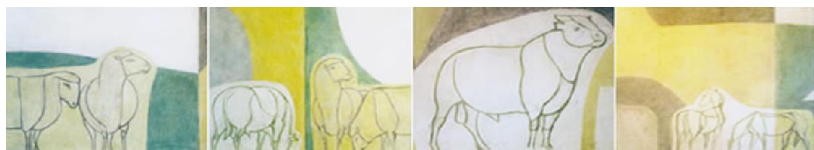
Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio



# Analisi di Micotossine : cosa sono

Valori che condizionano lo sviluppo dei funghi

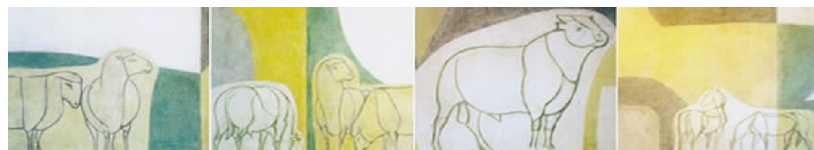
	min	max	ottimale
Temp °C	-3,0	60	<b>20-35</b>
$a_w$	0,65	0,99	<b>0,80-0,95</b>
O <sub>2</sub> %	0,14	-	<b>&gt;2,0</b>
pH	2,0	8,0	<b>4,8-6,5</b>
CO <sub>2</sub> %	-	> 15,0	<b>&lt;10</b>



Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine : campionamento

Un campionamento inadeguato VANIFICA IL LAVORO  
E GLI SFORZI DEGLI ANALISTI E RENDE DUBBIO IL  
RISULTATO DI ANALISI  
L'ATTUAZIONE DI OPPORTUNI PIANI DI  
CAMPIONAMENTO DEVE RISULTARE PRIORITARIO  
DA PARTE DI TUTTI GLI OPERATORI DEL SETTORE



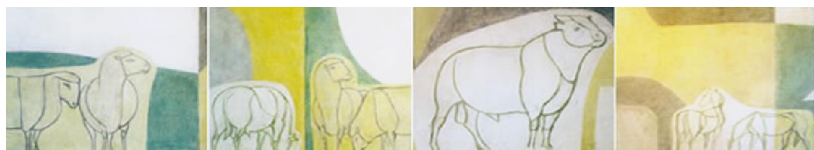
Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale,  
qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza  
alimentare: normativa e controlli di laboratorio



# Analisi di Micotossine : campionamento

## CAMPIONAMENTO: PERCHE'

**Il principale obiettivo di un buon campionamento è quello di raccogliere dati che consentano di generalizzare all'intera popolazione i risultati ottenuti dal campione. Questo processo di generalizzazione è detto «inferenza»**



Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine : campionamento

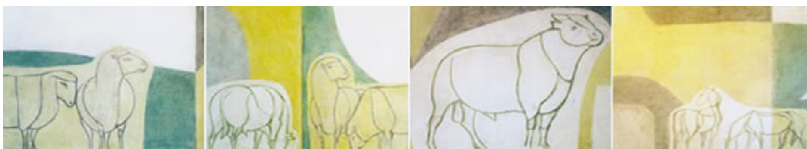
## **Campionamento Teoria (2)**

Raramente in uno studio è possibile esaminare ogni singolo elemento dell'intera popolazione

- risorse disponibili (economiche, di personale, di laboratori ecc.);
- l'intera popolazione da studiare non è fisicamente raggiungibile o addirittura non è del tutto nota;
- il numero di individui che compongono la popolazione da studiare è talmente elevato che lo studio di ognuno di essi è fattibile solo teoricamente.

**Scegliere un campione da una popolazione significa effettuare un «campionamento»**

**Il campionamento introduce sempre un ERRORE  
ERRORE DI CAMPIONAMENTO**

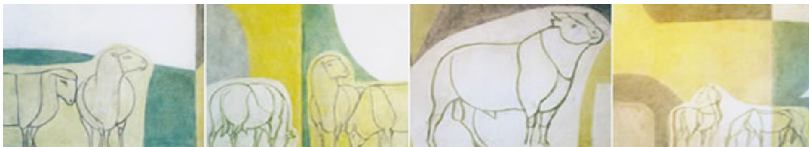


Dario Lucchetti 03/12/2014 %Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine : campionamento

**Il principio generale di un buon campionamento prevede che ciascuna unità della popolazione abbia la stessa probabilità di essere scelta. In tal caso il campione viene detto «randomizzato» o «casuale».**

**Un campionamento randomizzato offre il vantaggio di fornire un campione privo di errori sistematici (bias) e consente di trasferire l'attendibilità dei risultati forniti dal campione a tutta la popolazione.**





# Analisi di Micotossine : campionamento

## Distribuzione omogenea delle proteine

12	11	14	12	11	10	13	11
13	11	10	12	13	12	13	11
12	13	10	10	13	12	12	14
14	11	14	12	11	11	13	12
14	12	11	13	13	10	11	11
12	14	12	14	12	10	14	13
13	13	11	11	13	11	14	13
12	11	12	13	12	12	12	12

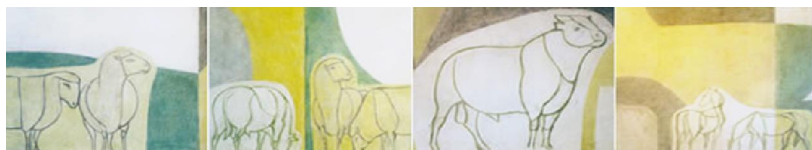


Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale,  
qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza  
alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine : campionamento

## Distribuzione eterogenea delle micotossine

0	0	0	0	0	0	<b>100</b>	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	<b>80</b>	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	<b>2000</b>	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0

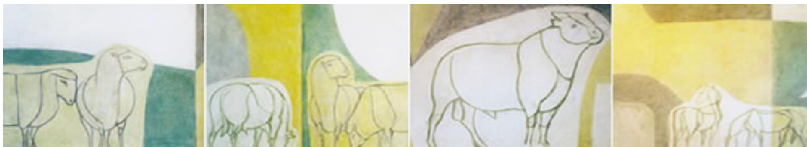


Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale,  
qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza  
alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine : campionamento

## **Campionamento**

### **Tipi di errore connessi con la filiera analitica**



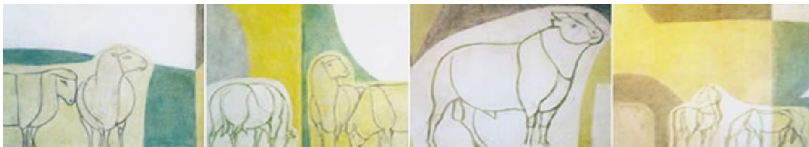
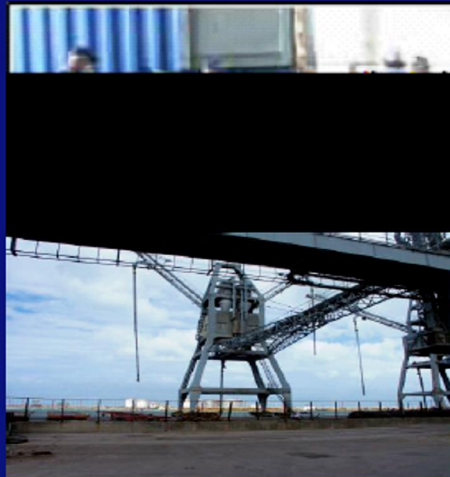
Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale,  
qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza  
alimentare: normativa e controlli di laboratorio



# Analisi di Micotossine : campionamento

## CAMPIONAMENTO: DOVE

- **Stive di nave (materiale sfuso o in sacchi)**
- **Camion**
- **Container**
- **Vagoni ferroviari**
- **Autotreni**
- **Silos**
- **Cisterne**
- **Impianti di lavorazione**
- **Depositi, magazzini**
- **Aziende agricole/zootecniche**
- **Dettaglio (pacchetti)**



Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine : campionamento

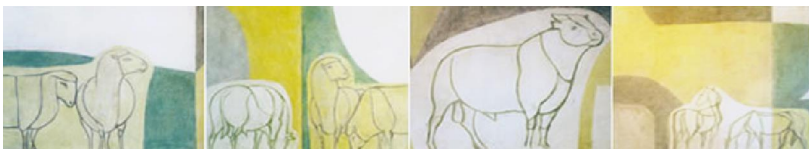
## MODALITÀ DI PRELIEVO

**Il presupposto è che ogni campione elementare deve avere la stessa probabilità di essere scelto (campionamento casuale).**

- **Campionamento statico prelievo in punti diversi di una massa stoccata con l'ausilio di opportune sonde**

- **Campionamento dinamico prelievo a tempi diversi di una massa in movimento**

**Le operazioni di campionamento devono essere condotte in condizioni idonee sia per la sicurezza degli operatori che per la protezione del campione da contaminazioni esterne**



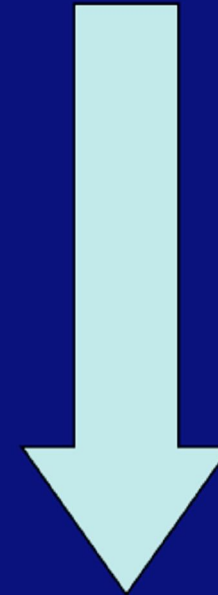
Dario Lucchetti 03/12/2014 %Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio

## CAMPIONAMENTO STATICO

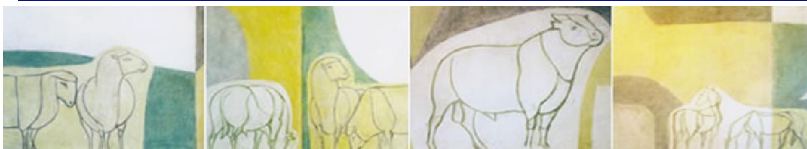
- Sili
- Vagoni
- Sacchi
- Confezioni

Difficoltà

+



—



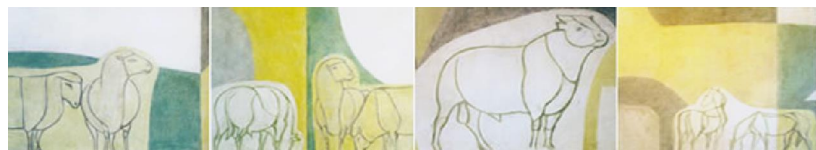


# Analisi di Micotossine : campionamento

Tabella 2

**Numero di campioni elementari da prelevare in funzione del peso della partita di cereali e di prodotti derivati**

Peso della partita (t)	Numero di campioni elementari	Peso del campione globale (kg)
$\leq 0,05$	3	1
$> 0,05 - \leq 0,5$	5	1
$> 0,5 - \leq 1$	10	1
$> 1 - \leq 3$	20	2
$> 3 - \leq 10$	40	4
$> 10 - \leq 20$	60	6
$> 20 - \leq 50$	100	10

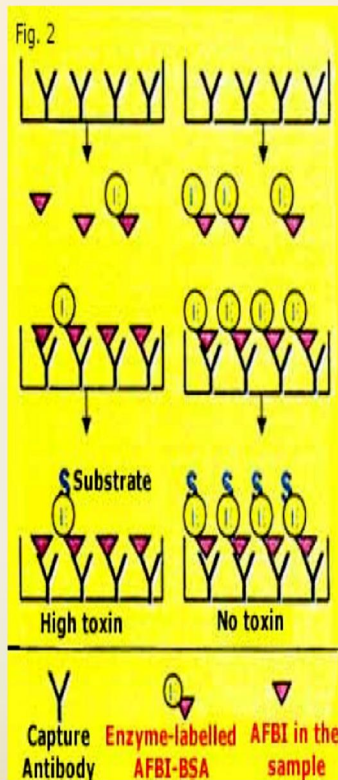


Dario Lucchetti 03/12/2014 %Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine : METODI screening

## ELISA principles

### Direct competitive ELISA

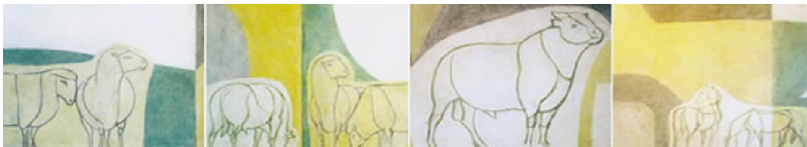


The antibody is coated on to the wells of the ELISA plate. The test sample and the enzyme-labelled mycotoxin conjugate are added to the wells. If no toxin is present in the sample, the enzyme labelled toxin will bind to the capture antibody coated to the wells. If toxin is present in the sample, it will compete with the labelled toxin for binding to the antibody. During washing procedures any unbound enzyme will be washed away. On the addition of substrate, a colour will develop, the intensity of which is proportional to the amount of mycotoxin-enzyme bound to the well; i.e., the colour intensity decreases with increasing concentrations of the toxin in the sample.

Procedure di screening:

POS CHI 038 INT Aflatossina M1

POS CHI 037 INT Aflatossina B1



Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio

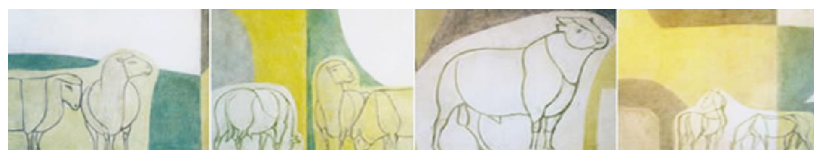
# Analisi di Micotossine : METODI screening

**Aflatossine M1**: il campione deve essere sottoposto ad analisi di conferma se  

$$\%Abs(B/Bo)_x < \%Abs(B/Bo)_{fort.sess.analisi} \cdot 13,5$$

**Aflatossine B1**: il campione deve essere sottoposto ad analisi di conferma se  

$$\%Abs(B/Bo)_x < \%Abs(B/Bo)_{mf\ 0,007} + 2 \times 7,6(std\ 0,007)$$



Dario Lucchetti 03/12/2014 ~~B~~ Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio



# Analisi di Micotossine : METODI conferma

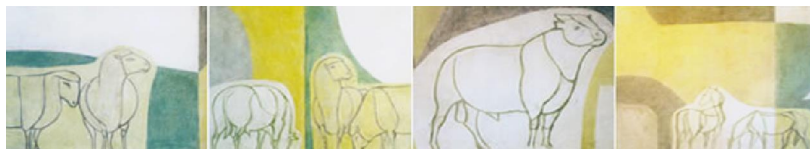
Procedure di conferma:

POS CHI 036 INT Aflatossina M1

POS CHI 029 INT Aflatossina B1, Aflatossina B2, Aflatossina G1, Aflatossina G2, Ocratossina A, Zearalenone

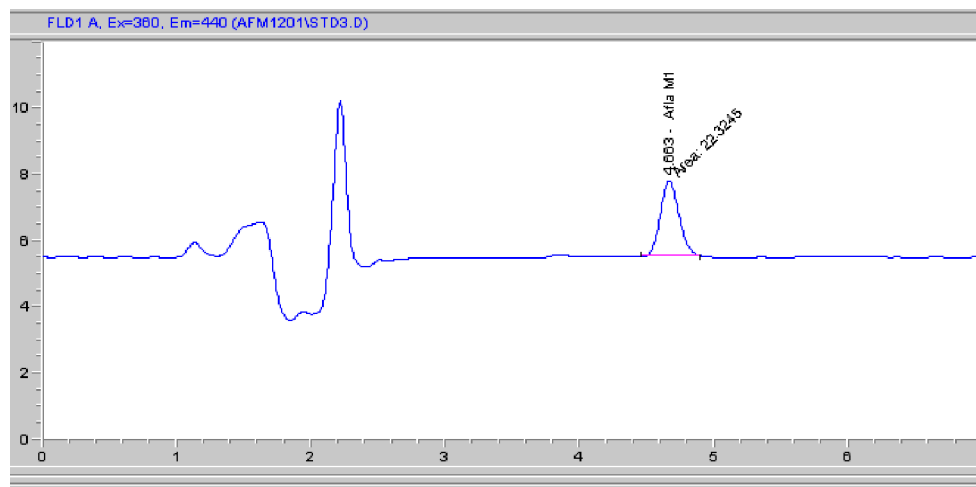
POS CHI 019 INT Deassinivalenolo

POS CHI 027 INT Fumonisina B1, Fumonisina B2



Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine : METODI conferma



Detector FLD Ex= 360 nm Em=440 nm

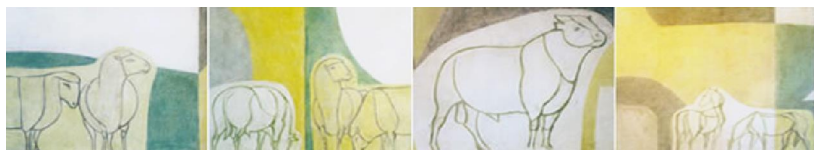
HPLC isocratico

Latte: 50 g di campione

Formaggio: 10 g di campione + 10 g terra di diatomee  
+100 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$   
Estrazione 2 ml  $\text{CH}_3\text{OH}$  + 6 ml  $\text{H}_2\text{O}$

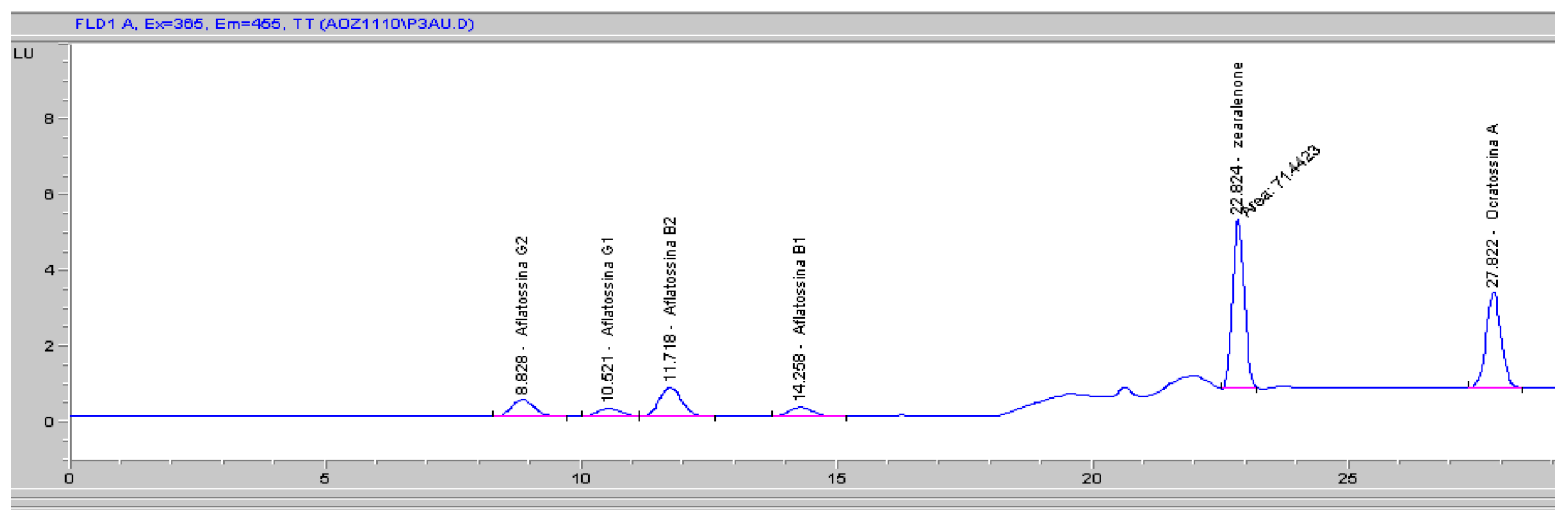
Purificazione su IAC

Eluizione con 2,5 ml  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{CN}$



Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale,  
qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza  
alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine : METODI conferma



Detector FLD

Derivatizzazione postcolona UVE

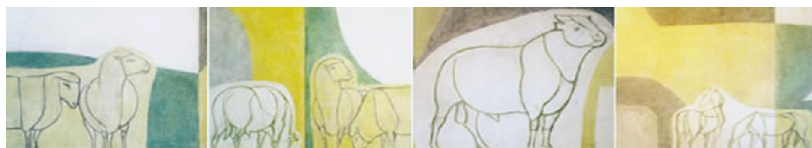
HPLC gradiente

Alimenti: 25 g di campione +80 ml CH<sub>3</sub>OH 80%

Diluizione del campione 1:5

Purificazione su IAC

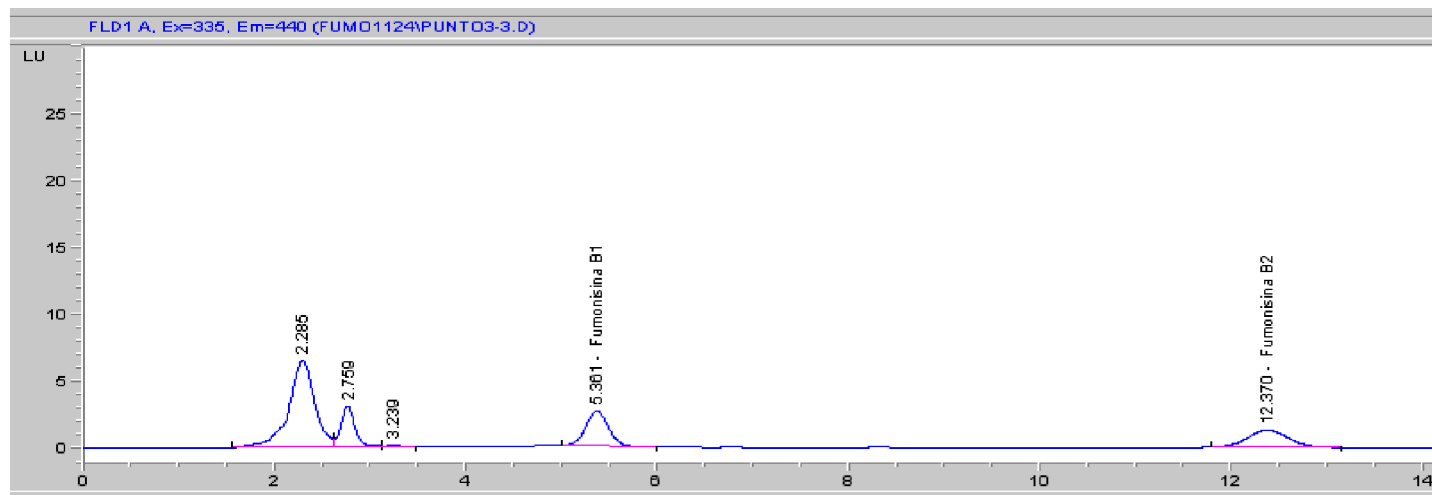
Eluizione 3 ml Acido acetico 0,1% : CH<sub>3</sub>OH (1:1)



Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale,  
qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza  
alimentare: normativa e controlli di laboratorio



# Analisi di Micotossine : METODI conferma



Detector FLD

Derivatizzazione precolonna OPA/MCE

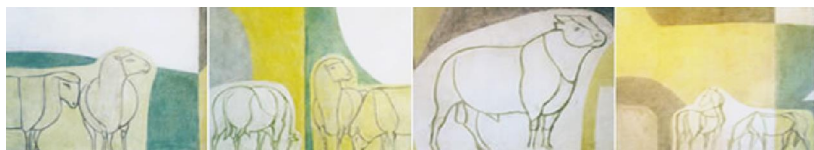
HPLC gradiente

Alimenti per animali: 25 g di campione +80 ml CH<sub>3</sub>OH 80%

Diluizione del campione 1:5

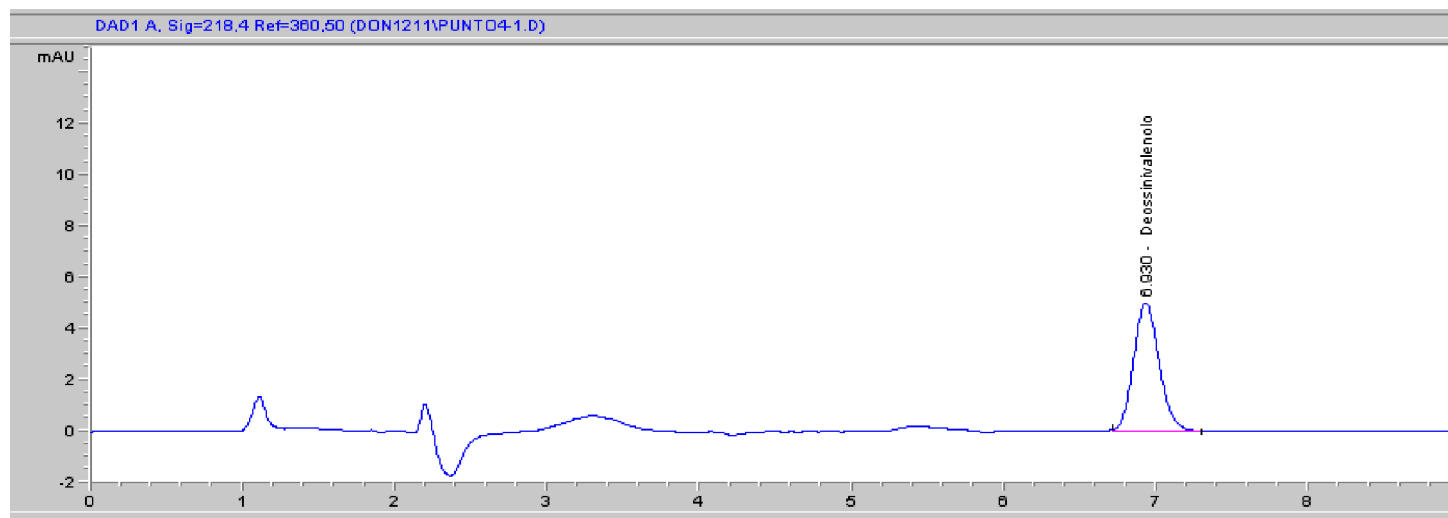
Purificazione su IAC

Eluizione 2 ml CH<sub>3</sub>OH



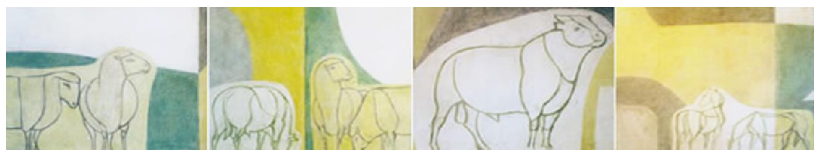
Dario Lucchetti 03/12/2014 %Benessere animale,  
qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza  
alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine : METODI conferma



Detector DAD  
HPLC isocratico

Alimenti per animali: 50 g di campione +200 ml H<sub>2</sub>O  
Purificazione su IAC  
Eluizione 1,5 ml CH<sub>3</sub>OH



Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale,  
qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza  
alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine : risultati

analyte	assigned value, $x_a$ $\mu\text{g/kg}$	number of scores, $ z  \leq 2$	total number of scores	% $ z  \leq 2$
AFB <sub>1</sub>	4.91	66	73	90
DON	1058	61	76	80
ZON	212	66	74	89
OTA	2.87	59	73	81
FB <sub>1</sub>	467	42	49	86
FB <sub>2</sub>	464	42	49	86
Total Fumonisin	912	46	55	84

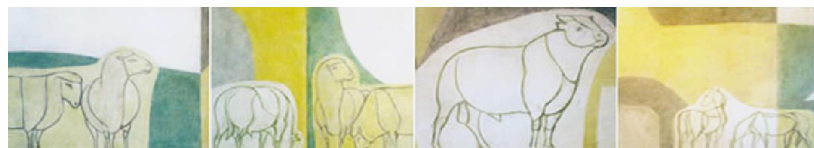
Campione di mais

Micotossine al  
momento non  
Analizzate in  
dipartimento

$$z = \frac{(x - x_a)}{\sigma_p}$$

where  $x$  = the participant's reported result,  
 $x_a$  = the assigned value  
 and  $\sigma_p$  = the standard deviation for proficiency.

$Z < 2$  accettabile  
 $2 < Z < 3$  questionabile  
 $Z > 3$  inaccettabile



Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale,  
 qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza  
 alimentare: normativa e controlli di laboratorio



# Analisi di Micotossine : risultati

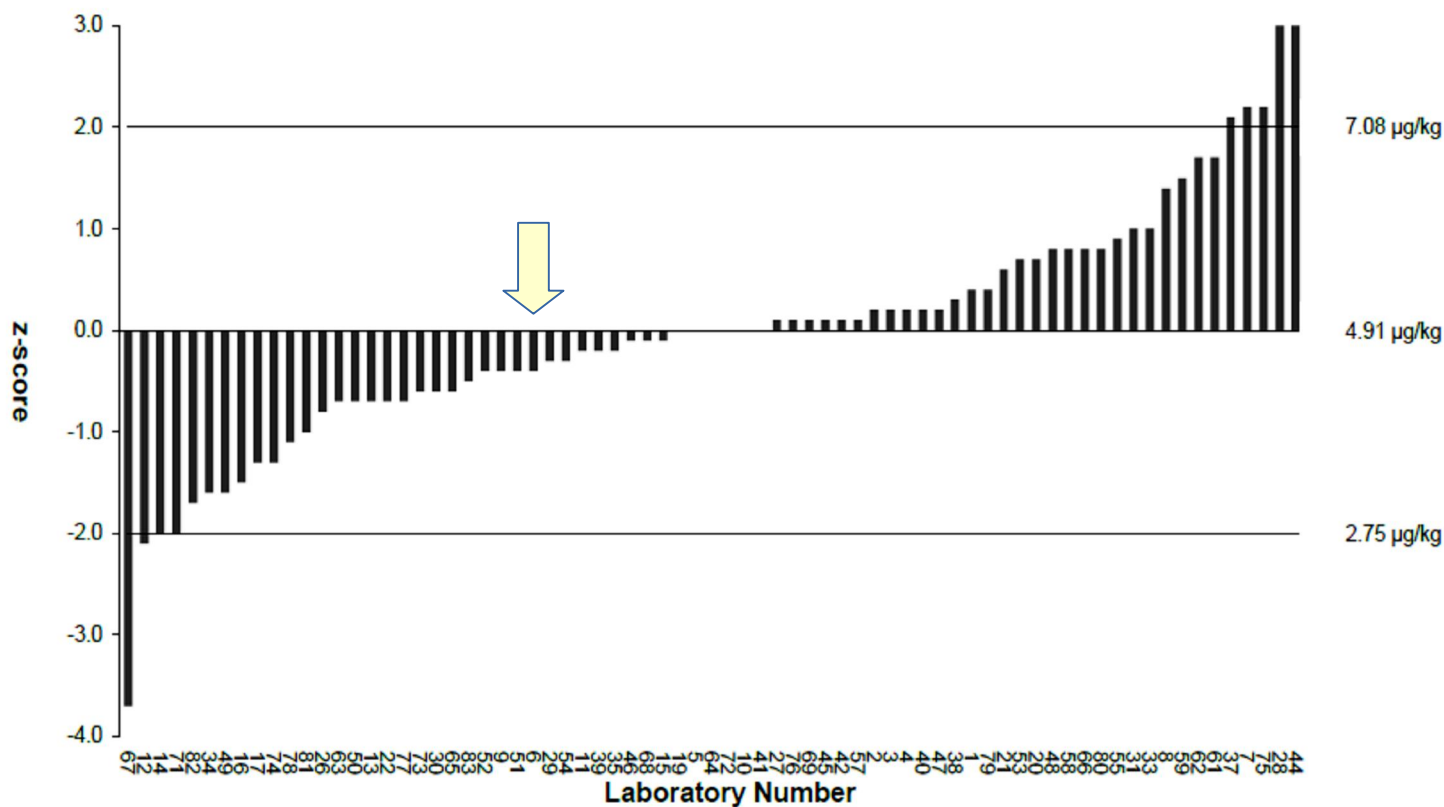
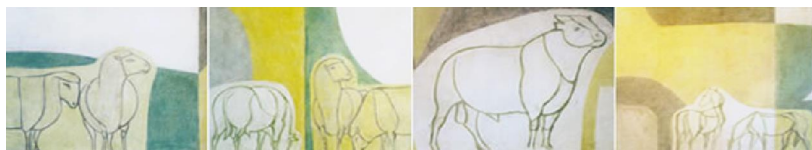


Figure 1: z-Scores for AFB<sub>1</sub>



Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine : risultati

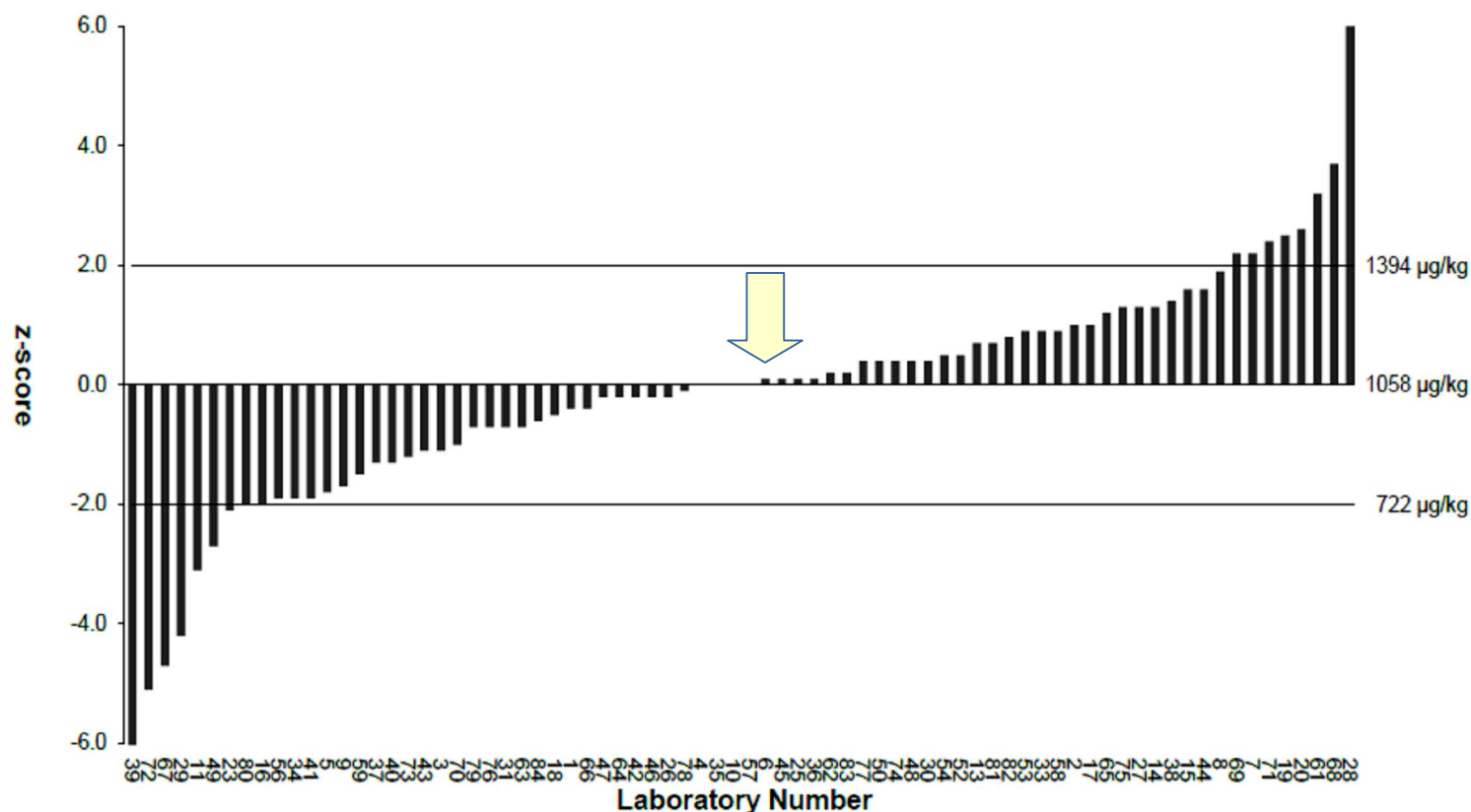
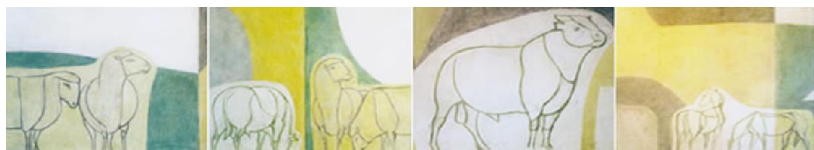


Figure 2: z-Scores for DON



Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine : risultati

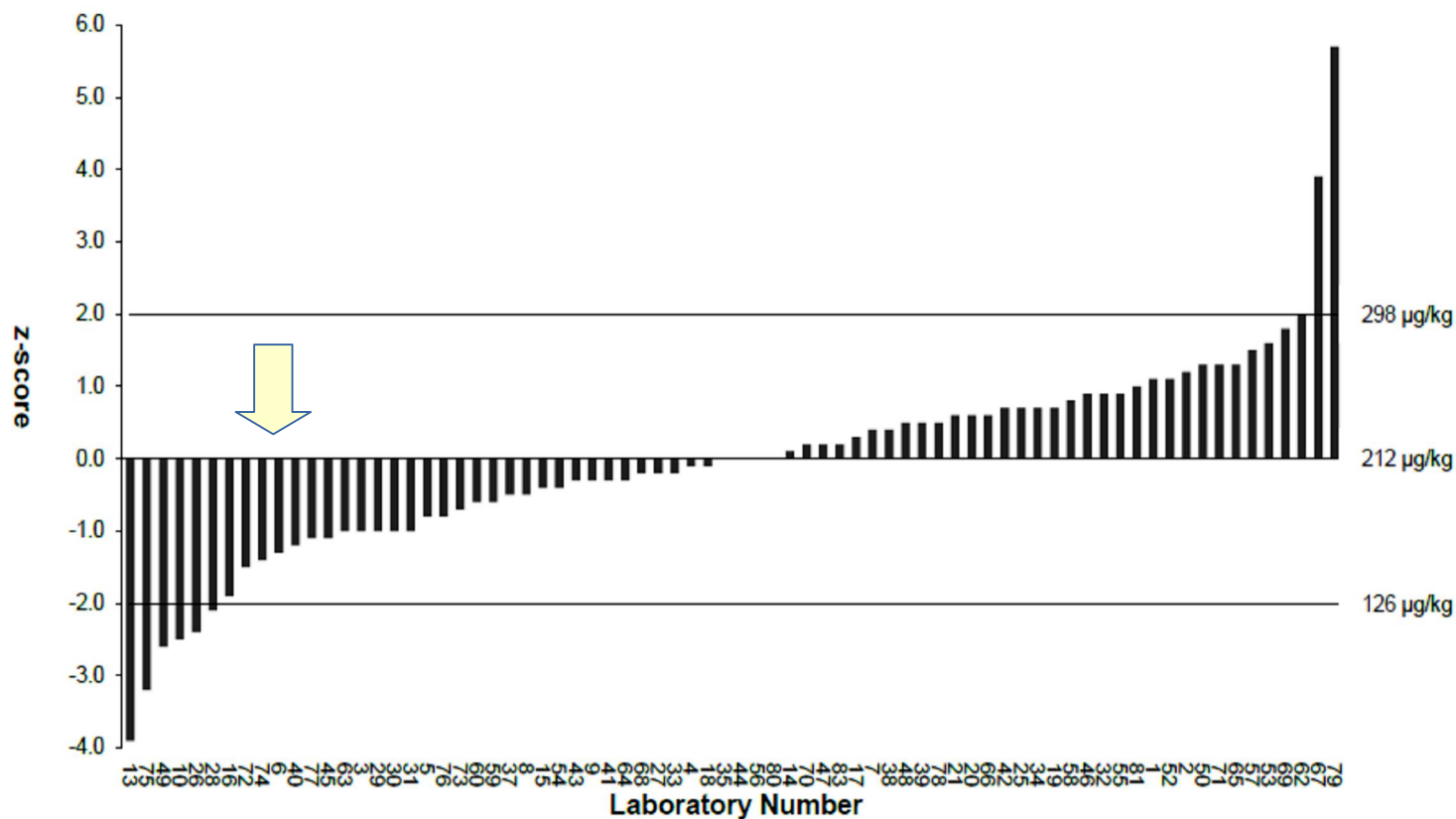
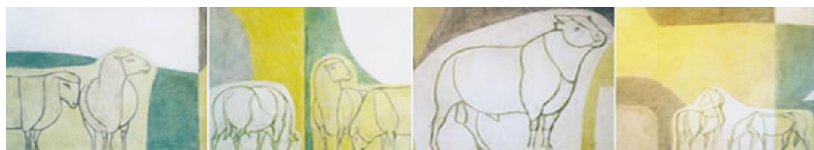


Figure 3: z-Scores for ZON



Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio



# Analisi di Micotossine : risultati

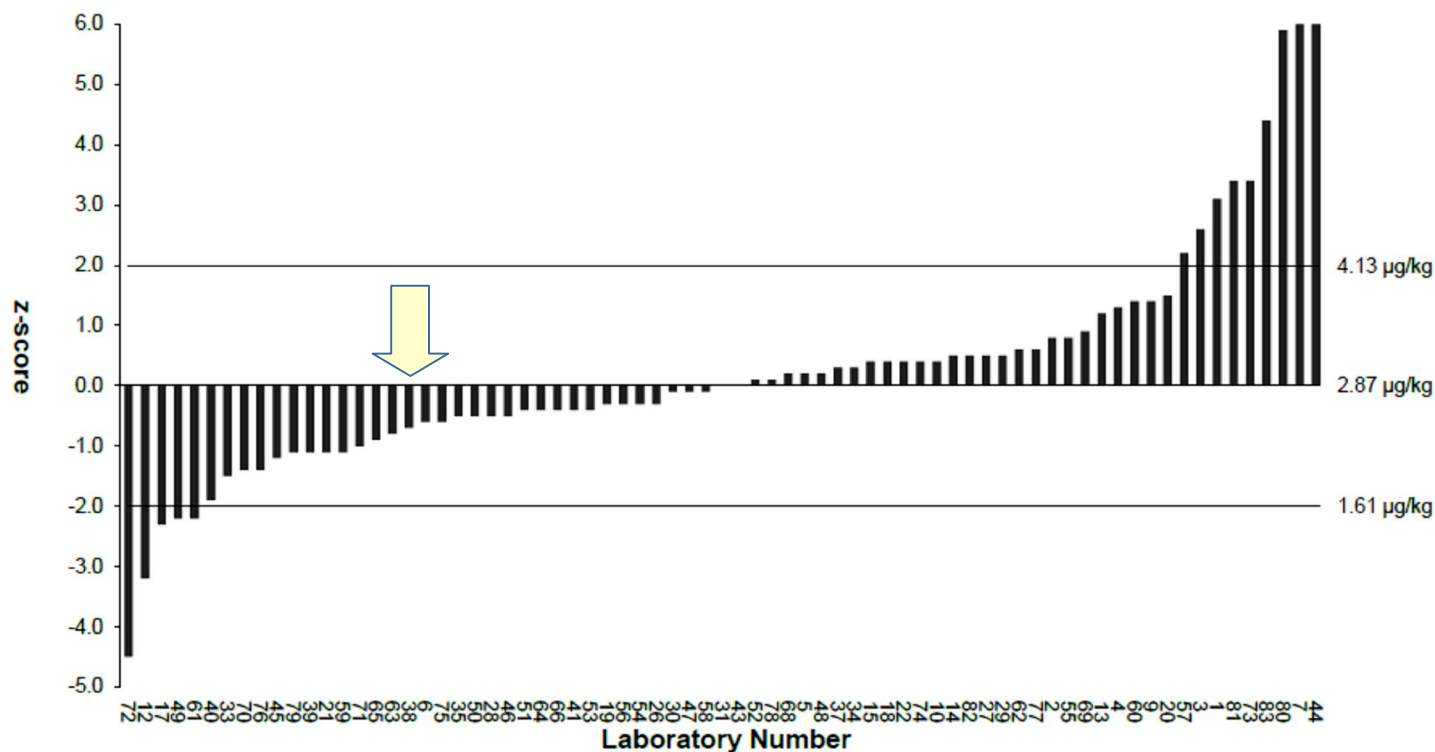
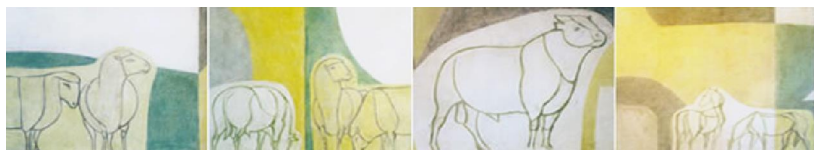


Figure 4: z-Scores for OTA



Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine : risultati

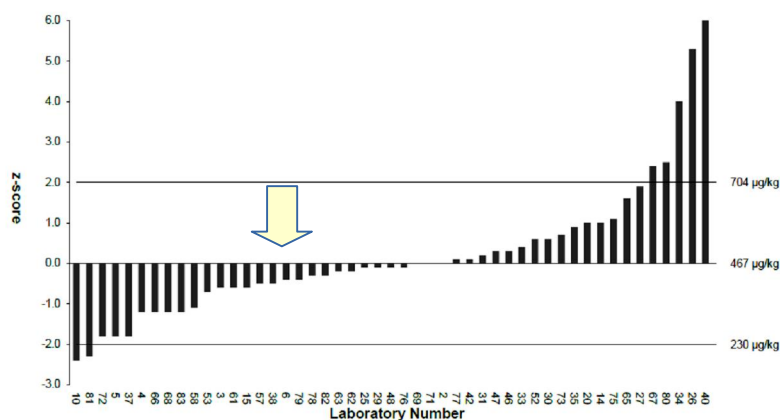


Figure 5: z-Scores for FB<sub>1</sub>

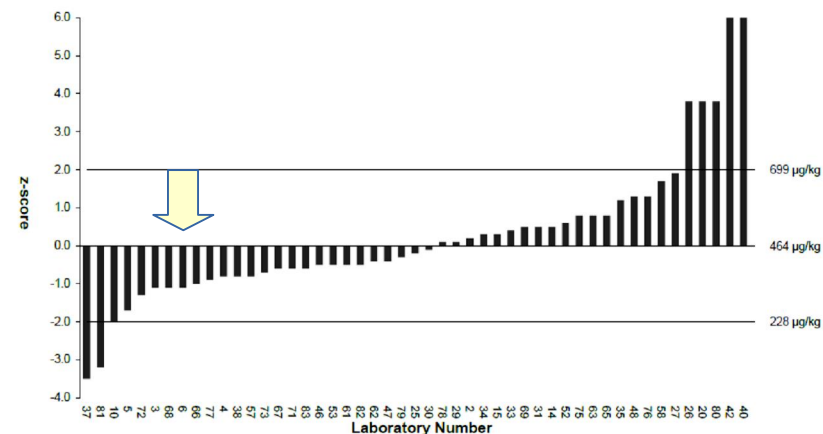


Figure 6: z-Scores for FB<sub>2</sub>

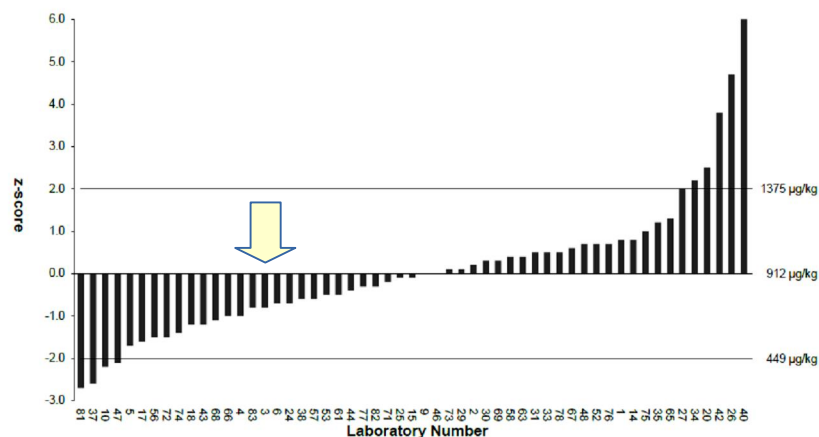
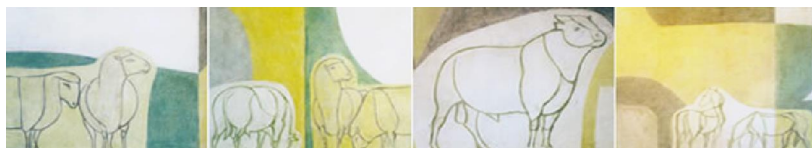


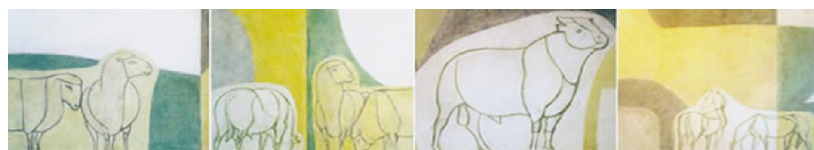
Figure 7: z-Scores for Total Fumonisin



Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale,  
qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza  
alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine : risultati

<b>TOSSINA</b>	<b>Conc assegnata <math>\mu\text{g/kg}</math></b>	<b>risultato <math>\mu\text{g/kg}</math></b>	<b>Z-score</b>
AFB1	4,91	4,51	-0,4
ZEA	212	157	-1,3
OTA	2,87	2,49	-0,6
DON	1058	1070	0,1
FB1	467	415	-0,4
FB2	464	338	-1,7
FB tot	912	517,4	-1,7



Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio



# Analisi di Micotossine : obiettivi futuri

## 1) Doppia Estrazione

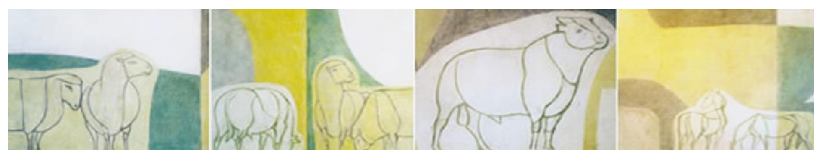
## 2) Purificazione su colonnine ad immunoaffinità multi-anticorpo

Basata sull'uso di nuove colonnine ad immunoaffinità (**Vicam**, **MYCO6in1™**) contenenti anticorpi per aflatossine, ocratossina A, fumonisine, deossinivalenolo, zearalenone, tossine T-2 e HT-2.



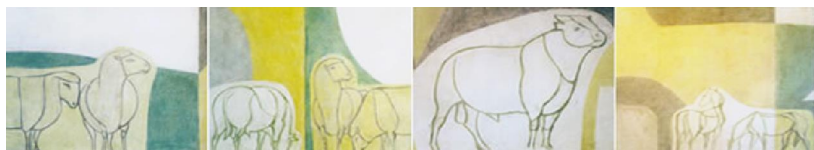
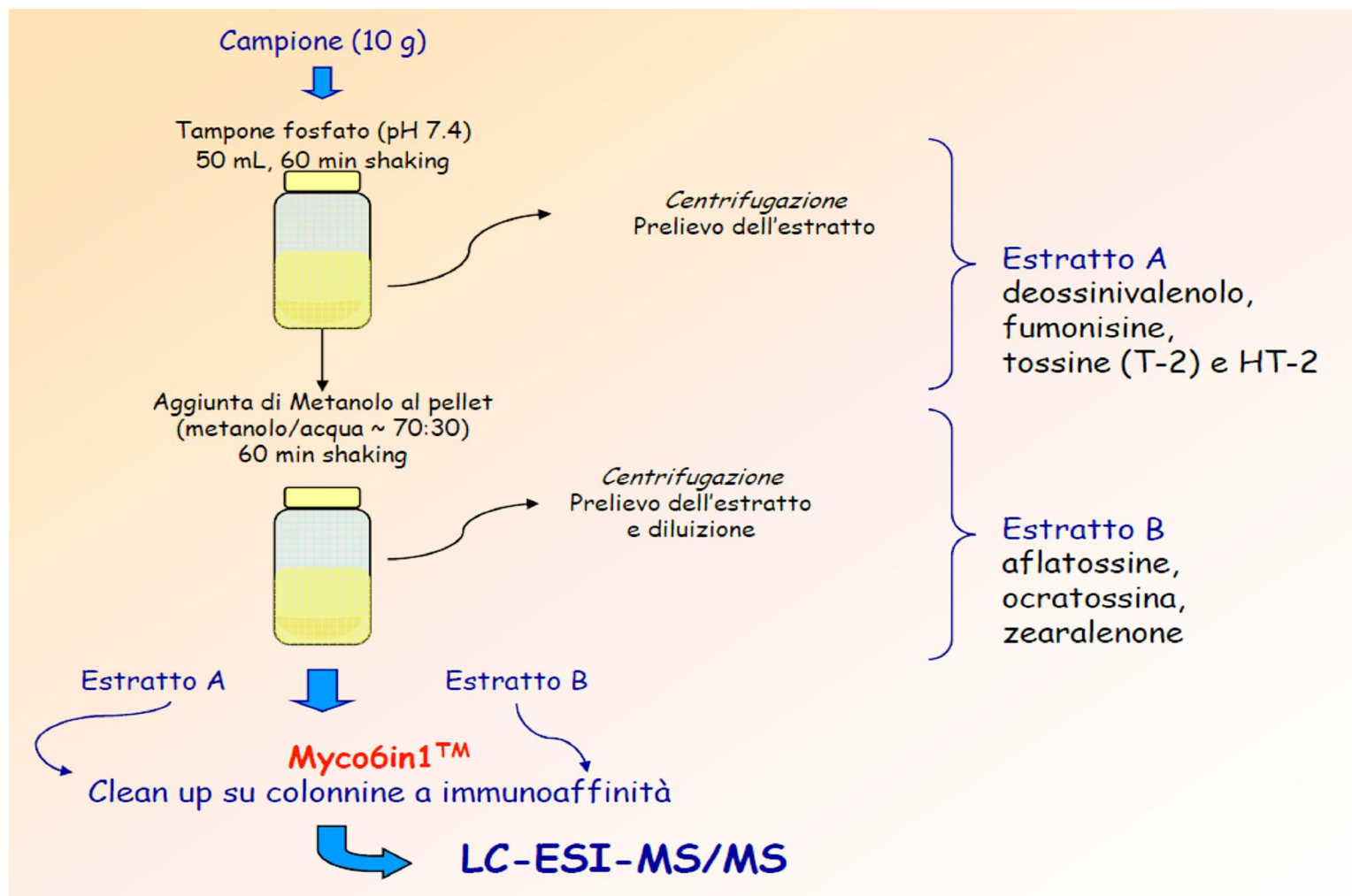
**MYCO6in1**  
LC/MS/MS

## 3) Rivelazione mediante LC-ESI-MS/MS



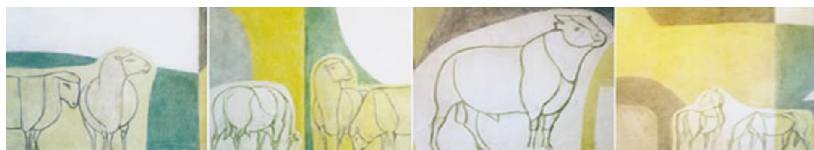
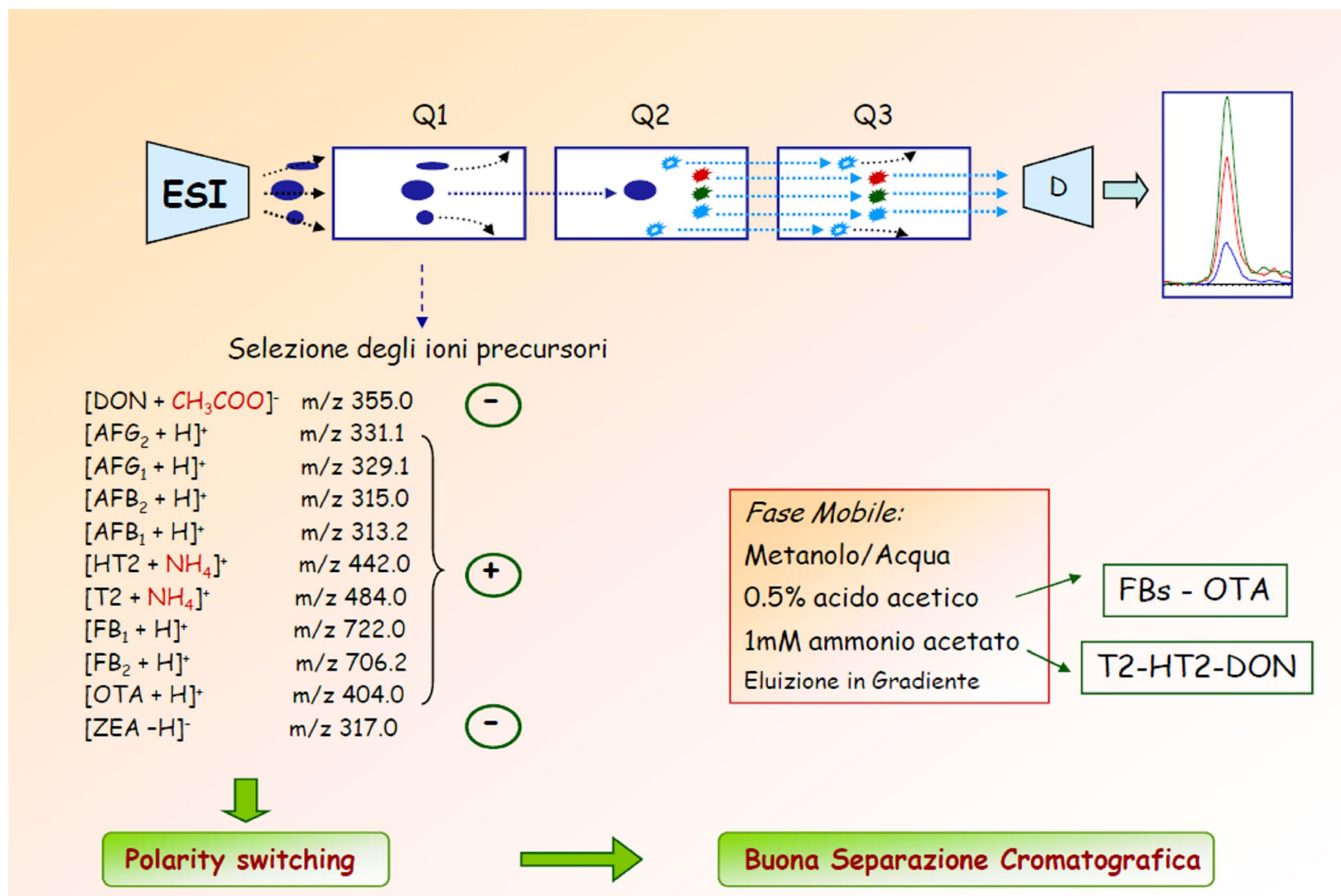
Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio

# Analisi di Micotossine : obiettivi futuri



Dario Lucchetti 03/12/2014 % Benessere animale, qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza alimentare: normativa e controlli di laboratorio

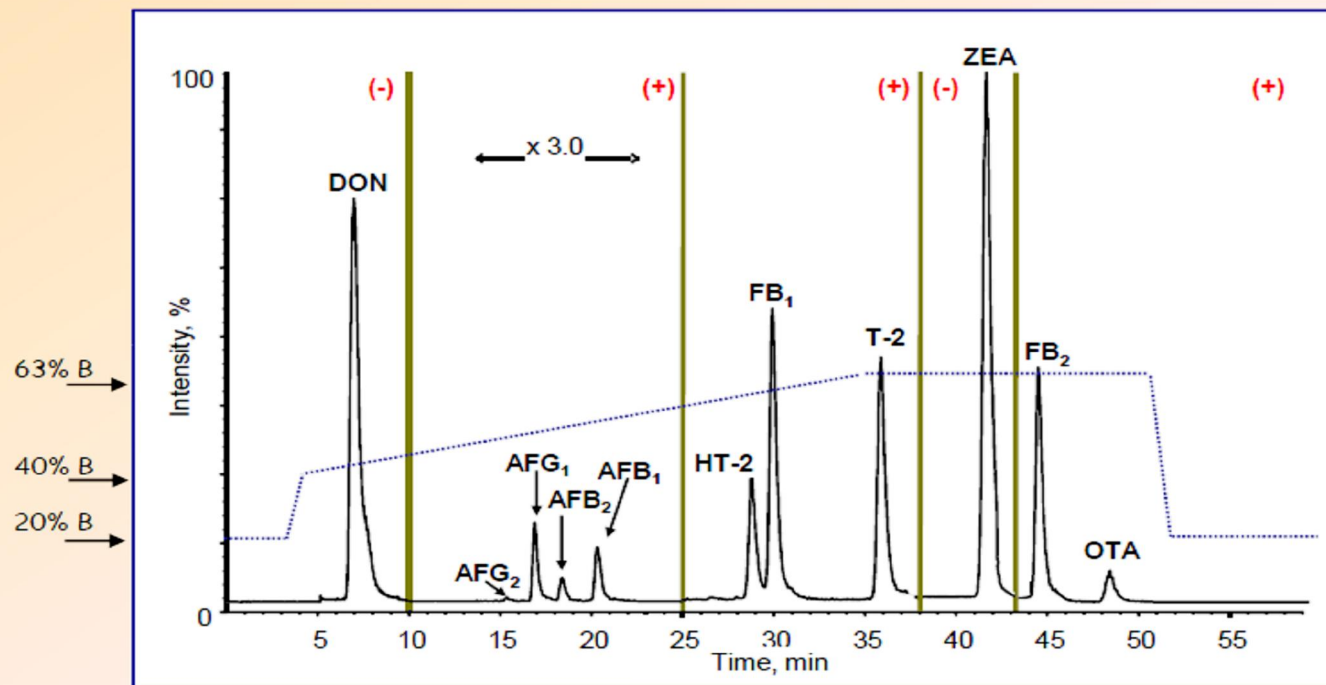
# Analisi di Micotossine : obiettivi futuri



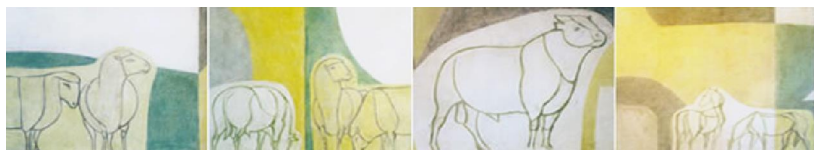
Dario Lucchetti 03/12/2014 %Benessere animale,  
 qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza  
 alimentare: normativa e controlli di laboratorio



# Analisi di Micotossine : obiettivi futuri



Colonna: Gemini RP18 (150 × 2.0 mm, 5 µm) Phenomenex  
 Flusso: 200 µl/min  
 Column oven: 40 °C  
 Solv A: H<sub>2</sub>O, 0.5% acido acetico, 1mM AcNH<sub>4</sub>  
 Solv B: CH<sub>3</sub>OH, 0.5% acido acetico, 1mM AcNH<sub>4</sub>  
 Volume iniettato: 20µl (100 mg matrice)



Dario Lucchetti 03/12/2014 %Benessere animale,  
 qualità delle produzioni zootecniche e sicurezza  
 alimentare: normativa e controlli di laboratorio

