



Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

**QUALITA' DEL LATTE E DEI DERIVATI DEGLI OVINI E DEI CAPRINI:  
AGGIORNAMENTI SULLE ATTIVITA' DI RICERCA DEL CRELDOC**

# **AFLATOSSINA M1 NEL LATTE E NEI FORMAGGI OVINI E CAPRINI**

Roma 11 ottobre 2018

Carlo Boselli



## LE MICOTOSSINE

Sono sostanze chimiche prodotte dal metabolismo secondario di funghi filamentosi microscopici (*Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*) che possono svilupparsi su numerose specie vegetali (penetrazione e persistenza).

Tali metaboliti possono contaminare sia le piante in pieno campo sia le granaglie in fase di conservazione in magazzino o nei silos aziendali e se ingerite dagli animali possono causare manifestazioni di tossicità acuta e cronica.

Alcuni alimenti sono più suscettibili di altri alla crescita fungina.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

## Principali Funghi e relative micotossine prodotte

Fungo produttore			
<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>			
Derivati dal metabolismo animale di Aflatossina B1 e B2			
<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Aspergillus carbonarius</i>			

Fonte bibliografica: web site <http://www.bioasis.net/laboratorio-analisi-agroalimentari/micotossine>



## Micotossine e riferimenti normativi

<b>Micotossina</b>	<b>Riferimento Normativo</b>	<b>Riferimento Normativo Prodotti Uso Zootecnico</b>
Aflatossine B1,B2,G1,G2	<i>Reg CE 165/2010</i>	Reg CE 574/2011
Aflatossina M1	<i>Reg CE 165/2010</i>	/
Ocratossina A	<i>Reg CE 1881/2006</i>	DECRETO MINISTERO DELLA SALUTE del 15/05/2006: "Determinazione dei limiti di ocratossina A negli alimenti per animali"
Deossinivalenolo o Vomitossina (facente parte del gruppo dei Tricoteceni)	<i>Reg CE 1126/2007</i>	RACCOMANDAZIONE DELLA COMMISSIONE EUROPEA DEL 17 AGOSTO 2006
Nivalenolo (facente parte del gruppo dei Tricoteceni)	<i>Reg CE 1126/2007</i>	RACCOMANDAZIONE DELLA COMMISSIONE EUROPEA DEL 17 AGOSTO 2006
Tossina T-2 e HT-2 (facente parte del gruppo dei Tricoteceni)	<i>RACCOMANDAZIONE DELLA COMMISSIONE EUROPEA del 27/03/2013 relativa "alla presenza di tossine T-2 e HT- 2 nei cereali e nei prodotti a base di cereali"</i>	RACCOMANDAZIONE DELLA COMMISSIONE EUROPEA DEL 17 AGOSTO 2006
Zearalenone	<i>Reg CE 1126/2007</i>	RACCOMANDAZIONE DELLA COMMISSIONE EUROPEA DEL 17 AGOSTO 2006
Fumonisine	<i>Reg CE 1126/2007</i>	RACCOMANDAZIONE DELLA COMMISSIONE EUROPEA DEL 17 AGOSTO 2006

Fonte bibliografica: web site <http://www.bioasis.net/laboratorio-analisi-agroalimentari/micotossine>



## La scoperta delle Aflatossine

### History

#### Turkey X Disease

- ☛ Death of about 100,000 turkey poultry birds ---- United Kingdom in 1960 ---- ingestion of a poultry feed containing Brazilian groundnut cake ---- AFLATOXIN
- ☛ Chemical and microbiological investigations ---- toxic effects produced by the Brazilian groundnut cake ---- presence of quantities of four secondary metabolites ---- *Aspergillus flavus* in the diet

(Agrios, 2000)



12/11/2013



Cornell University



Cornell University



Dr. Jaime Ruiz

Fonte: <http://image.slidesharecdn.com/mycotoxinpptbyarchanam-131211020720-phpapp01/95/mycotoxin-ppt-by-archana-m-madalagi-7-638.jpg>  
Accesso 06/10/2018





## La scoperta delle Aflatossine

E' attribuita alla X-TURKEY DISEASE (malattia ignota del tacchino), sindrome che nei primi anni sessanta provocò, nel Regno Unito, la morte di decine di migliaia di tacchini, fagiani, pernici e suinetti.

La ricerca di una spiegazione a tale evento portò ad evidenziare come tutti gli animali deceduti avessero ricevuto una alimentazione a base di farina di arachidi proveniente dal Brasile, e che farine e particolari organi interni prelevati dagli animali deceduti risultassero fluorescenti.

Le molecole responsabili della fluorescenza furono quindi isolate ed attribuite denominazioni dipendenti dalla muffa produttrice (tossine di *Aspergillus flavus* da cui Aflatossine), dalla particolare fluorescenza data alla luce di Wood (365 nm) e dal particolare alimento di ritrovamento.



Fonte immagine: sito web [www.wikipedia.it](http://www.wikipedia.it)



## LE AFLATOSSINE

Negli alimenti

Aflatossina B1 (blue)

Aflatossina B2

Aflatossina G1 (green)

Aflatossina G2

Nel latte e derivati

Aflatossina M1 (milk)

Aflatossina M2 (milk)

Negli alimenti zootecnici contaminati da funghi, la crescita del micelio fungino necessita di una temperatura compresa tra 36 e 38 °C, una umidità del substrato del 30% ed una umidità ambientale dell'85%.



## AFLATOSSINE E LEGISLAZIONE INTERNAZIONALE

**Table 1**  
Regulation on aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products in different countries.

Country	Milk (µg/kg)	Dairy products (µg/kg)
USA	0.50	0.50
EU <sup>a</sup>	0.05	0.05
Austria	0.05, 0.01 (pasteurized infant milk)	0.02 (butter), 0.25 (cheese), 0.4 (powdered milk)
France	0.05, 0.03 (for children <3 years)	—
Switzerland	0.05	0.025 (milk whey and products) 0.25 (cheese) 0.02 (butter)
Bulgaria	0.50	0.10 (powdered milk)
Brazil	—	0.50 (liquid milk), 5.0 (powdered milk)
Check Republic	0.05	—
Romania	0	0
Turkey <sup>b</sup>	0.05	0.25 (cheese)
Argentina	0.05	0.50 (milk products)
Honduras	0.05	0.25 (cheese)
Egypt	0	0
Nigeria	1	—
Iran	0.50	—

<sup>a</sup> EU Regulation 466/2001.

<sup>b</sup> Sarimehmetoglu, Kupulu, and Celik (2004).

Iqbal, S. Z., Jinap, S., Pirouz, A. A., & Ahmad Faizal, A. R. (2015). **Aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: a review**. *Trends in Food Science & Technology*, 46(1), 110-119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2015.08.005>. **Fonte: Researchgate**





## AFLATOSSINE E LEGISLAZIONE COMUNITARIA

L 50/12

IT

Gazzetta ufficiale dell'Unione europea

27.2.2010

Prodotti alimentari <sup>(1)</sup>		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>(3)</sup> <sup>(7)</sup>	0,10	—	—
2.1.16.	Alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento, compresi il latte per lattanti e il latte di proseguimento <sup>(4)</sup> <sup>(8)</sup>	—	—	0,025

Fonte Normativa: Regolamento (UE) n. 165/2010 della Commissione, del 26 febbraio 2010



## LE AFLATOSSINE

Lo IARC (Agenzia Internazionale Ricerca sul Cancro) ha classificato numerose sostanze in base alla cancerogenicità.

La classificazione è la seguente:

1 = cancerogena per l'uomo

2A = probabilmente cancerogena per l'uomo

2B = possibilmente cancerogena per l'uomo

3 = non classificabile come cancerogena per l'uomo

L'aflatossina B1 ha come classificazione 1, l'aflatossina M1 come 2B.



## LE AFLATOSSINE

Dall'assunzione di aflatossina B1 e B2 con la dieta, al passaggio della parete ruminale nei poligastrici o dello stomaco nei monogastrici sono soggette a processi enzimatici di biotrasformazione (parziale o completa) che modificandone la struttura ne alterano anche la tossicità e le vie di escrezione.

I principali metaboliti sono: l'aflatossina M1 e l'aflatossina M2, (secrete per via biliare, urinaria e mammaria), l'aflatossicolo, l'aflatossina B2a, l'aflatossina P1 e l'aflatossina Q1, escreti per via biliare (in forma di aflatossina B1-glutathione).



## Aflatossine ed effetti tossici

Gli effetti tossici sono dose e tempo-dipendenti, in base al livello e alla durata dell'esposizione a questi composti si possono evidenziare due forme di aflatossicosi

**Aflatossicosi acuta:** anoressia, ittero, emorragie interne, elevata mortalità

**Aflatossicosi cronica:** cattivo stato di salute, calo produttività, immunosoppressione



## AFLATOSSINE

Reazione di prima fase: nel metabolismo dell'aflatossina B1 è ossidata per effetto degli enzimi microsomiali (fegato). La biotrasformazione è attuata dalle ossidasi a funzione mista citocromo P450 dipendenti (CYP450), enzimi microsomiali con funzione detossificante. Viene convertita in diversi metaboliti come l'aflatossina Q1, l'aflatossina P1, l'aflatossina B2a, le aflatossine M1 e M2, aflatossicolo ed intermedi epossidi.

Reazione di seconda fase: Il processo di detossificazione delle aflatossine aumenta l'idrosolubilità e la polarità dei composti favorendone l'escrezione attraverso la bile ed in minor misura attraverso le urine e il latte; questa fase si sviluppa prevalentemente attraverso due reazioni: il B1 8.9-eossido viene legato al glutathione ed in misura minore trasformato in aflatossicolo; mentre gli altri metaboliti vengono coniugati con l'acido glicuronico.



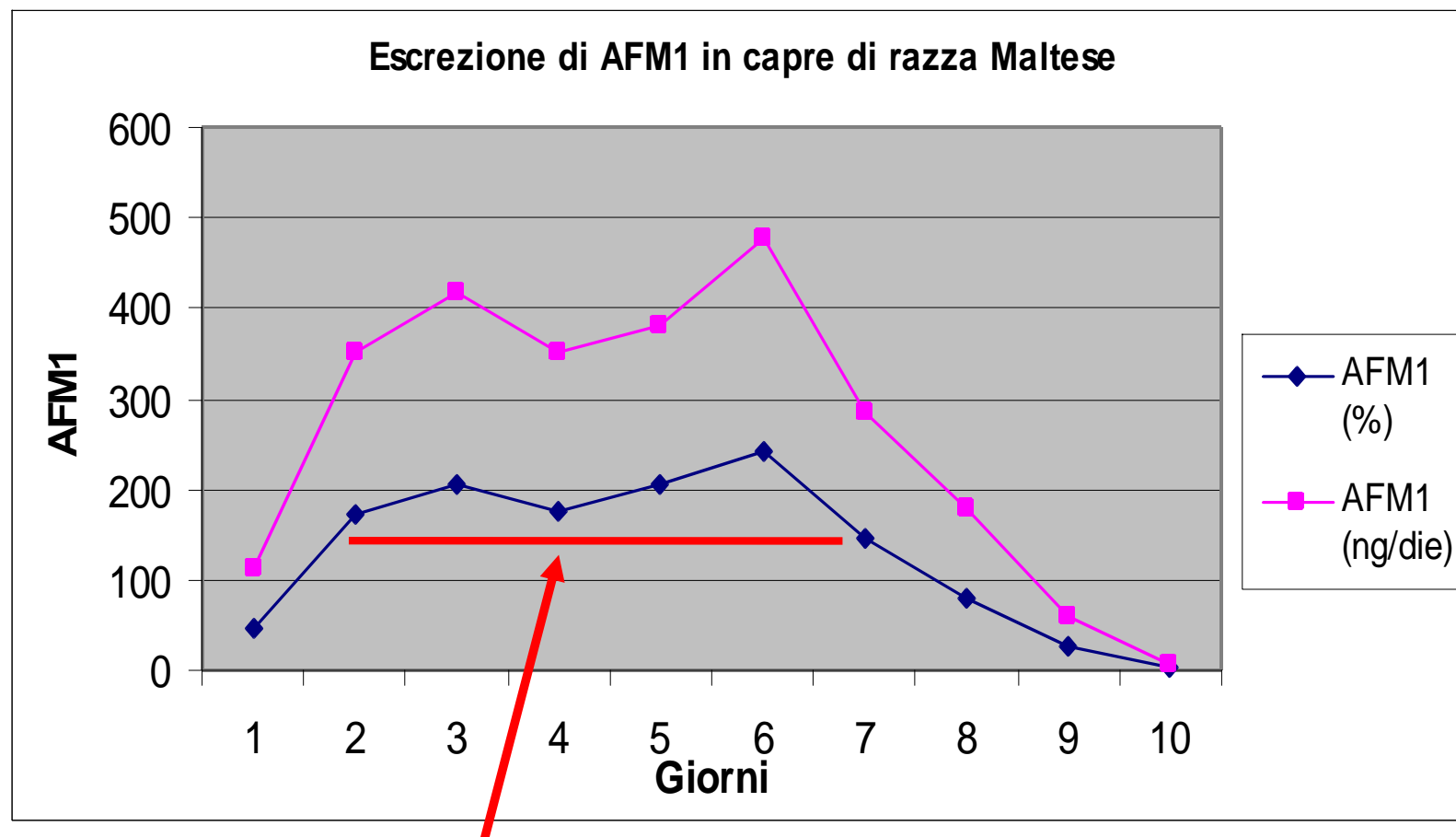


## La biotrasformazione ed il passaggio nel latte: Il Carry over

Il Carry Over (%) rappresenta in termini percentuali la quantità di  $AFM_1$  (biotrasformata) eliminata con il latte (durante il periodo di plateau) rispetto alla quantità di  $AFB_1$  ingerita con la razione.

Varia nelle diverse specie animali soprattutto in relazione alla quantità di  $AFB_1$  assunta, è generalmente superiore nella bovina da latte (1-3%) rispetto alla bufala (0,3 - 0,5%), ai piccoli ruminanti (1%) ed alla specie asinina (0.02%).





Plateau: giorni in cui l'eliminazione di AFM1 non mostra differenze significative



## CICLO DELLE AFLATOSSINE



**AFB1+AFB2**

**Ingestione**



**AFM1+AFM2**

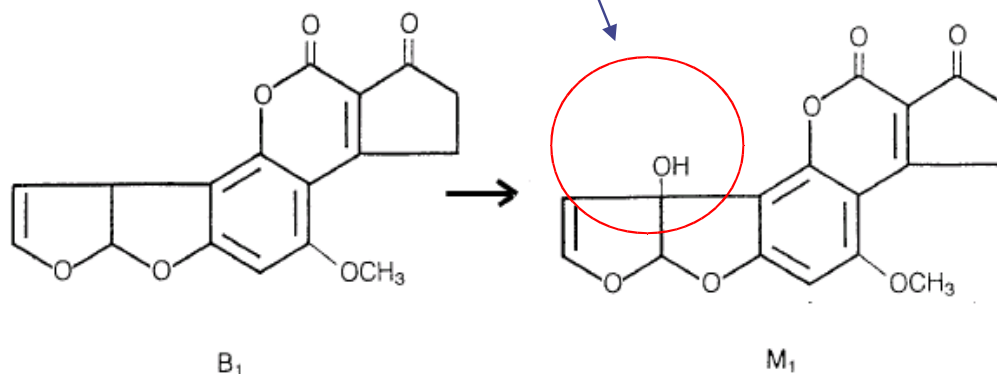
**AFB1**

**Escrezione**



**Alimentazione  
umana**

**Idrossilazione a  
livello epatico**



*Nella specie bufalina oltre alla AFM1 è stata  
rilevata anche la presenza di di AFB1*



## Il Carry Over e la sua variabilità

La variabilità nella escrezione dell'AFM<sub>1</sub> eliminata con il latte è influenzata da numerosi fattori quali

- La concentrazione di AFB1 ingerita con la razione
- L'attività metabolica individuale
- L'attività ruminale
- La specie animale
- La razza
- Il livello produttivo (eliminazione > durante la prima fase della lattazione)
- Eventuali infezioni mammarie (> permeabilità degli alveoli)



## ***RICERCA CORRENTE IZSLT***

*Disegno sperimentale: due gruppi di ovicapriini*

*Capre di razza Maltese (n=5)*

*Pecore di razza Comisana (n=5)*

*Alimentate con dose giornaliera di circa 58  $\mu$ g capo die di AFB1*

*per 6 giorni*

*Durata della prova 10 giorni*

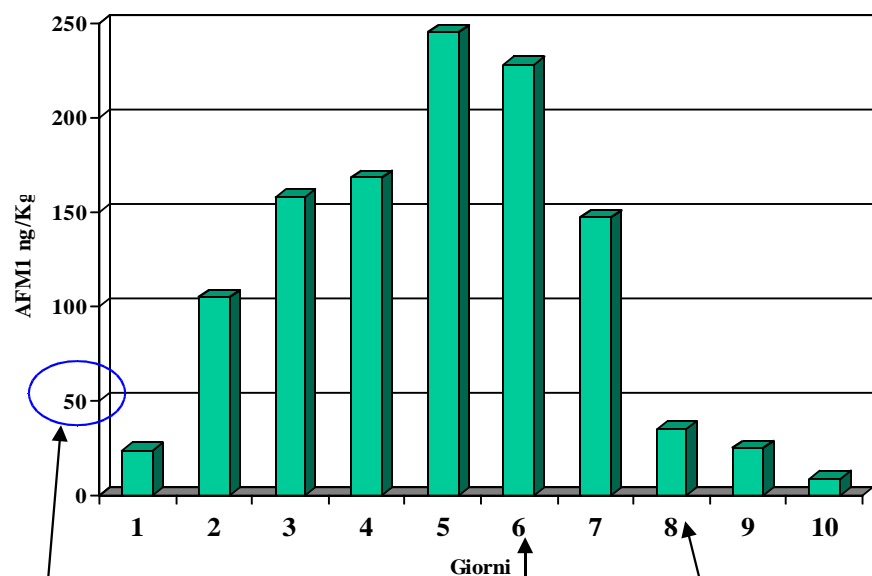
*Raccolta individuale del latte con registrazione della produzione (mattina e sera)*

***Determinazione dell'AFM1 nel latte previa estrazione con colonne immunoaffini e rilevazione con metodica HPLC***





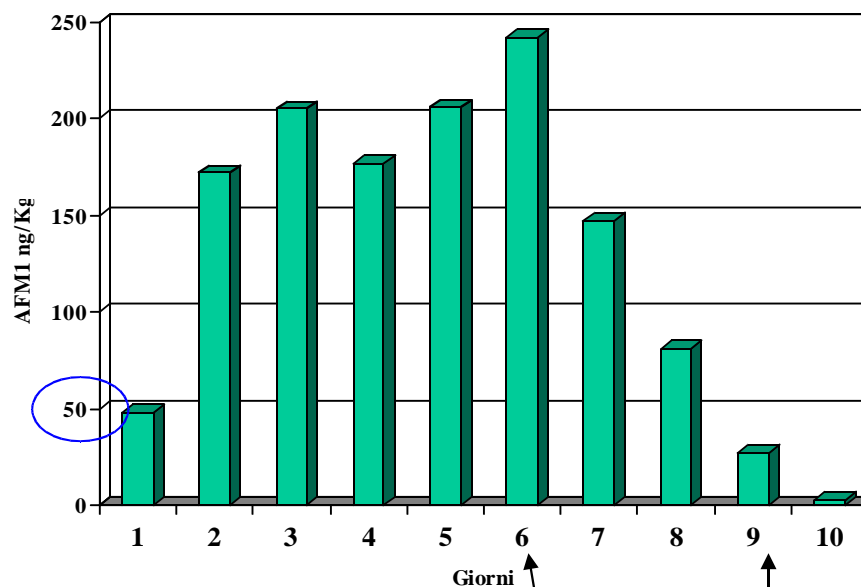
## Andamento della concentrazione media di AFM1 nel latte



Limite  
di legge

Ultima  
somministrazione

Rientro nel  
limite di legge



Ultima  
somministrazione

Rientro nel  
limite di legge

**OVINI**

Carry over = Ovini 0.72%

Caprini 0.68%

**CAPRINI**





## Determinazione del rapporto Escreta/Ingesta: esempio numerico

### Latte di Capra

Durata del periodo sperimentale = 10 giorni

AFB1 ingesta nel periodo di studio (6 giorni) 58000 ng capo die

AFM1 escreta nel periodo di studio (10 giorni)

$\text{Ingesta/Escreta} = \text{ng AFM1 escreta} / \text{ng AFB1 ingesta} * 100$

$\text{Ingesta/Escreta} = 2.516 \text{ ng AFM1} / 348.000 \text{ ng AFB1} * 100 = 0,72\%$



## Determinazione del Carry Over: esempio numerico

### Latte di Capra

Durata del periodo di plateau = 5 giorni

AFB1 ingesta nel periodo di plateau (5 giorni)

AFM1 escreta nel periodo di plateau (5 giorni)

$\text{Carry Over} = \text{ng AFM1 escreta} / \text{ng AFB1 ingesta} * 100$

$\text{Carry Over} = 1.977 \text{ ng AFM1} / 290.000 \text{ ng AFB1} * 100 = 0,68\%$



## Carry over AFM1/AFB1 e bibliografia

**Carry Over pecora = 0,72%**

**Carry Over capra = 0,68%**

Battacone et al. (2009), riportano per gli ovini, valori di Carry Over variabili (1,30-2,90%) per dosi crescenti di AFB1 somministrata (1,5 e 7,5 µg/die rispettivamente) in contrasto con un precedente studio (JDS, 2003) in cui riportava valori di Carry over inferiori (0,25%-0,54%) per dosi elevate di AFB1 somministrata.

Ronchi et al. (2005), riportano per i caprini, valori di Carry Over variabili fra 0,80% e 1,14% per dosi crescenti di AFB1 somministrata (9,1 e 27,4 µg/die rispettivamente)



## Aflatossina M1 dal latte al formaggio

Durante il processo di caseificazione, l'AFM1 si ripartisce tra cagliata e siero. Diverse sperimentazioni condotte hanno evidenziato che la quantità di AFM1 nel formaggio costituisce una quota variabile ma compresa fra il 50-60% di quella presente nel latte.

La rimanente quota rimane nel siero.

Nel formaggio AFM<sub>1</sub> ha una elevata affinità per la frazione caseinica

Valori bibliografici evidenziano che la concentrazione risulta mediamente più alta rispetto al latte di partenza di circa 2,5-5,5 volte anche in relazione al tipo di formaggio (fresco o stagionato).





## Aflatossine nei formaggi

Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione, del 19 dicembre 2006, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari

**Art.2/1 – Nell'applicare i tenori massimi .. ai prodotti alimentari essiccati, diluiti, trasformati o composti da più di un ingrediente, si tiene conto di quanto segue:**

- a) modifiche della concentrazione del contaminante causate dai processi di essiccazione o di diluizione;**
- b) modifiche della concentrazione del contaminante causate dalla trasformazione;**
- c) le proporzioni relative degli ingredienti nel prodotto;**
- d) il limite analitico di quantificazione.**





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

## Fattore di concentrazione

### PARERE N. 13 DEL 10-06-2013

*Problematiche Aflatossina M1 nei formaggi – Applicabilità dei coefficienti di trasformazione in equivalente latte (All. 2, D.M. 31 luglio 2003 del ministero delle Politiche Agricole e Forestali)*

### RACCOMANDA

l'adozione, in via provvisoria sulla base delle evidenze ad oggi disponibili dei seguenti coefficienti di concentrazione quali valori di riferimento:

3,0 per i formaggi a pasta tenera e prodotti derivati dal siero

5,5 per i formaggi a pasta dura

### AUSPICA

L'avvio di studi ad hoc per la definizione di puntuali coefficienti di concentrazione per ciascuna delle principali tipologie di prodotti caseari.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

## Fattore di concentrazione

**Valori medi emersi da prove condotte nell'ambito della Ricerca Corrente  
IZSLT -(AFM1 Formaggio/AFM1 presente nel latte)-**

**Formaggi freschi di pecora FC medio 1,3**

Con latte equivalente (a  $0,05 \mu\text{g/kg}$ ) FC 1,9 (umidità del 59%)

**Formaggi freschi di capra FC 1,4**

Con latte equivalente (a  $0,01 \mu\text{g/kg}$ ) FC 2,5 (umidità del 60%)

**Mozzarella di bufala FC 1,7**

Con latte equivalente (a  $0,032 \mu\text{g/kg}$ )



## In conclusione

Questa è la situazione emersa dai controlli sul latte ovino negli ultimi anni eseguita presso i ns laboratori

Valori di AFM1	Numerosità	(%) sul totale dei campioni
$> 0,050 \mu g/kg$	6	0,55
$> 0,030 \leq 0,050 \mu g/kg$	8	0,74
$\leq 0,030 \mu g/kg$	1072	98,71



# GRAZIE DELL'ATTENZIONE

