

PROGETTI DI “RICERCA CORRENTE 20xx”
RELAZIONE FINALE

N. identificativo progetto: IZS LT 09/22 RC

Progetto presentato da:

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
LAZIO E TOSCANA “M. ALEANDRI”

Area tematica: Sicurezza Alimentare

Titolo del progetto: Ocratossina A nuova normativa e nuove prospettive. Sviluppo e validazione interlaboratorio di un metodo per la determinazione multi-matrice dell'OTA per il monitoraggio e la valutazione dell'esposizione correlata al consumo di alimenti inclusi nella nuova normativa presente e futura.

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute

Responsabile Scientifico: Dott.ssa Katia Russo

SINTESI

Titolo: Ocratossina A nuova normativa e nuove prospettive. Sviluppo e validazione interlaboratorio di un metodo per la determinazione multi-matrice dell'OTA per il monitoraggio e la valutazione dell'esposizione correlata al consumo di alimenti inclusi nella nuova normativa presente e futura

Parole chiave: Octaossina A, Nuove matrici, PT, IVS

Testo

L'ocratossina A (OTA) è una micotossina comune prodotta dal metabolismo secondario di diverse specie appartenenti ai generi *Aspergillus* e *Penicillium*. Diversi studi hanno riportato i suoi numerosi effetti tossici ed è stata classificata dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro nel Gruppo 2B, come possibile cancerogeno per l'uomo.

L'assunzione con la dieta rappresenta la principale fonte di esposizione per l'uomo. Infatti, date le sue caratteristiche peculiari di elevata stabilità e resistenza all'acidità e alle alte temperature, una volta che un alimento è contaminato dall'ocratossina A è difficile eliminare totalmente la molecola. L'importanza di questa micotossina si riflette nell'ampia gamma di prodotti che possono essere contaminati. Per quanto riguarda la carne e i prodotti a base di carne, la contaminazione può essere indiretta, quando gli animali vengono alimentati con mangimi contaminati, oppure diretta, quando l'OTA è prodotta da funghi che si sviluppano esternamente sui prodotti a base di carne durante il periodo di maturazione. Infatti, *Penicillium spp.* costituisce la parte principale del microbiota di alcuni prodotti come salami, prosciutti e diversi tipi di formaggi.

Limiti massimi per l'ocratossina A negli alimenti sono stabiliti per una vasta gamma di prodotti dalla normativa europea (Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. OJ L 364, 20.12.2006, p. 5–24; COMMISSION REGULATION (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006). Tuttavia, negli ultimi anni sono stati riscontrati livelli elevati di ocratossina A in alimenti per i quali non sono stati fissati livelli massimi.

L'EFSA nel 2020 ha aggiornato il parere del 2006 sull'ocratossina A (OTA) negli alimenti. L'OTA provoca tossicità renale in diverse specie animali e tumori renali nei roditori. L'OTA è genotossica in vitro e in vivo; tuttavia, i meccanismi della genotossicità non sono chiari. **Meccanismi** di azione genotossica e non genotossica, diretti e indiretti, potrebbero contribuire alla formazione del tumore. Studi recenti hanno sollevato una forte criticità sugli effetti di cancerogenicità renale ed EFSA ha quindi concluso che, per gli effetti non neoplastici e neoplastici dell'OTA, è necessario applicare un approccio MOE per la valutazione del rischio ed ha suggerito le lesioni renali microscopiche e

l'aumentata incidenza combinata di adenomi e carcinomi nei ratti maschi quali punti di riferimento per gli effetti non neoplastici e neoplastici dell'OTA, associando rispettivamente una BMDL10 di 4,73 µg/kg peso corporeo al giorno per gli effetti non neoplastici e una BMDL10 di 14,5 µg/kg peso corporeo al giorno per gli effetti neoplastici.

Il valore di esposizione mediana all'OTA nei bambini allattati al seno è risultato nell'intervallo 1,7–2,6 ng/kg pc al giorno, con valori di esposizione al 95° percentile da 5,6 a 8,5 ng/kg pc al giorno per lattanti con consumo medio e alto di latte materno, rispettivamente. Confrontando le stime di esposizione con il valore di BMDL10 ottenuto sulla base dell'endpoint non neoplastico, si ottiene un MOE di oltre 200 nella maggior parte dei gruppi di consumatori, indicando una bassa preoccupazione per la salute, con l'eccezione dei MOE calcolati per i forti consumatori nelle fasce di età più giovani, indicando un possibile problema di salute. Confrontando invece le stime di esposizione con il BMDL10 individuato per gli effetti neoplastici, i valori di MOE risultano inferiori a 10.000 per quasi tutti gli scenari di esposizione, compresi i bambini allattati al seno, indicando un possibile problema per la salute in caso di genotossicità diretta. EFSA sottolinea nel parere che l'incertezza associata a questa valutazione è alta e che c'è il rischio di una sovrastima.

Il progetto intende colmare la mancanza di metodi per la determinazione dell'OTA in nuove matrici normate, oltre a fornire informazioni preziose per la definizione di nuovi limiti attraverso studi di distribuzione dell'OTA in selezionati alimenti, analisi di monitoraggio e stime di esposizione.

Il progetto intende colmare la mancanza di metodi per la determinazione dell'OTA in nuove matrici normate, oltre a fornire informazioni preziose per la definizione di nuovi limiti attraverso studi di distribuzione dell'OTA in alimenti selezionati, analisi di monitoraggio e stime di esposizione. La determinazione analitica avverrà in LC-MS/MS; il metodo sarà adeguato per il trasferimento alla determinazione tramite sistemi con rilevatori tradizionali (FLD).

Obiettivi prefissati:

Sviluppo e validazione in-house del metodo analitico multi-matrice (pre-trial validazione laboratorio IZS e ISS), studio di validazione interlaboratorio (IVS) del metodo analitico multi-matrice, incluso reperimento e caratterizzazione del materiale, studio di omogeneità e stabilità, reclutamento partecipanti, spedizione materiale, analisi statistica dei risultati e stesura del report di validazione. Studio di distribuzione dell'OTA nel prosciutto (parte grassa/parte magra), studio di distribuzione dell'OTA nel formaggio (parte esterna/parte interna).

Monitoraggio su scala nazionale sui prodotti selezionati (prosciutto e altri prodotti a base di carne di maiale e formaggi di diverse categorie), stima degli scenari di esposizione e valutazione del rischio.

Risultati attesi:

- Metodo analitico multi-matrice adeguato allo scopo del controllo ufficiale;

- Identificazione del corretto metodo di campionamento per prosciutto e formaggio sulla base degli studi di distribuzione dell'OTA;
- Produzione di dati su categorie di prodotti di alto interesse per la dieta italiana e di grande valore economico per le produzioni nazionali;
- Definizione dell'esposizione della popolazione all'OTA. Produzione di dati su categorie di prodotti di alto interesse per la dieta italiana e di grande valore economico per le produzioni nazionali;
- Definizione dell'esposizione della popolazione all'OTA.

SUMMARY

Title: Ochratoxin A: New Regulation and New Perspectives. Development and Interlaboratory Validation of a Multi-Matrix Method for the Determination of OTA for Monitoring and Assessment of Exposure Related to the Consumption of Foods Included in Current and Future Regulation

Keywords: Ochratoxin A, New Matrices, PT, IVS

Testo in inglese

Ochratoxin A (OTA) is a common mycotoxin produced as a secondary metabolite by several species belonging to the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. Various studies have reported its numerous toxic effects, and it has been classified by the International Agency for Research on Cancer in Group 2B, as a possible human carcinogen. Dietary intake represents the main source of human exposure. In fact, due to its peculiar characteristics of high stability and resistance to acidity and high temperatures, once a food is contaminated with ochratoxin A, it is difficult to completely eliminate the molecule. The importance of this mycotoxin is reflected in the wide range of products that can be contaminated. Regarding meat and meat-based products, contamination can be indirect, when animals are fed contaminated feed, or direct, when OTA is produced by fungi that grow externally on meat-based products during the maturation period. Indeed, *Penicillium* spp. constitutes the main part of the microbiota of certain products such as salami, ham, and various types of cheese.

Maximum limits for ochratoxin A in food are established for a wide range of products by European legislation (Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. OJ L 364, 20.12.2006, p. 5–24; COMMISSION REGULATION (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in

food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006). However, in recent years, high levels of ochratoxin A have been found in foods for which maximum levels have not been established.

In 2020, EFSA updated its 2006 opinion on ochratoxin A (OTA) in food. OTA causes renal toxicity in several animal species and renal tumors in rodents. OTA is genotoxic both in vitro and in vivo; however, the mechanisms of genotoxicity are unclear. Genotoxic and non-genotoxic mechanisms of action, both direct and indirect, may contribute to tumor formation. Recent studies have raised strong concerns about renal carcinogenic effects, and EFSA therefore concluded that, for both non-neoplastic and neoplastic effects of OTA, a Margin of Exposure (MOE) approach is necessary for risk assessment. EFSA suggested microscopic renal lesions and the increased combined incidence of adenomas and carcinomas in male rats as reference points for non-neoplastic and neoplastic effects of OTA, respectively, associating a BMDL10 of 4.73 µg/kg body weight per day for non-neoplastic effects and a BMDL10 of 14.5 µg/kg body weight per day for neoplastic effects.

The median exposure value to OTA in breastfed infants was found to be in the range of 1.7–2.6 ng/kg bw per day, with 95th percentile exposure values from 5.6 to 8.5 ng/kg bw per day for infants with average and high breast milk consumption, respectively. Comparing exposure estimates with the BMDL10 value obtained based on the non-neoplastic endpoint, an MOE of over 200 is obtained in most consumer groups, indicating low health concern, with the exception of MOEs calculated for heavy consumers in younger age groups, indicating a possible health issue. Conversely, when comparing exposure estimates with the BMDL10 identified for neoplastic effects, MOE values are below 10,000 for almost all exposure scenarios, including breastfed infants, indicating a possible health concern in the case of direct genotoxicity. EFSA emphasized in its opinion that the uncertainty associated with this assessment is high and that there is a risk of overestimation.

The project aims to fill the gap in methods for the determination of OTA in newly regulated matrices, as well as to provide valuable information for the definition of new limits through studies on the distribution of OTA in selected foods, monitoring analyses, and exposure estimates.

Analytical determination will be carried out using LC-MS/MS; the method will be suitable for transfer to determination using systems with traditional detectors (FLD).

Planned Objectives:

- In-house development and validation of the multi-matrix analytical method (pre-trial validation at IZS and ISS laboratories).
- Interlaboratory validation study (IVS) of the multi-matrix analytical method, including procurement and characterization of material, homogeneity and stability study, participant recruitment, material shipment, statistical analysis of results, and drafting of the validation report.
- Study of OTA distribution in ham (fatty part/lean part).

- Study of OTA distribution in cheese (outer part/inner part).
- National-scale monitoring of selected products (ham and other pork-based products and cheeses of different categories), estimation of exposure scenarios, and risk assessment.

Expected Results:

- Multi-matrix analytical method suitable for official control purposes.
- Identification of the correct sampling method for ham and cheese based on OTA distribution studies.
- Production of data on product categories of high interest for the Italian diet and of great economic value for national production.
- Definition of population exposure to OTA.

INTRODUZIONE

La prima fase del progetto è stata indirizzata allo studio bibliografico e, in particolare, si è verificato lo stato dell'arte sui metodi attualmente disponibili per la determinazione dell'ocratossina A in matrici non convenzionali.

Risulta evidente come, per la determinazione dell'OTA nelle matrici di interesse, sia necessario sviluppare un metodo in spettrometria di massa altamente selettivo e sensibile, ma che sia facilmente utilizzabile e trasferibile e che quindi sia il meno possibile operatore-dipendente. È stato quindi sviluppato un metodo in-house validato secondo la normativa comunitaria vigente.

Prodotti chimici e reagenti

L'acetonitrile e il metanolo per gradienti LC sono stati acquistati da Merck KGaA (Darmstadt, Germania).

N-esano e acetato di ammonio sono stati ottenuti da Carlo Erba® Reagents S.r.l. (Cormano, Milano, Italia), mentre l'acido acetico da VWR International (Radnor, Pennsylvania, Stati Uniti). L'acqua ultrapura è stata prodotta mediante un sistema Millipore Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

Lo standard analitico di riferimento dell'OTA (100 µg/mL) è stato ottenuto da Pribolab (Biopolis Rd, Singapore) ed è stato conservato a -20 °C. Le soluzioni di lavoro sono state preparate giornalmente sciogliendo la quantità appropriata di soluzione standard di OTA in metanolo.

La soluzione di estrazione è stata preparata poco prima dell'uso mescolando H₂O:CH₃CN (20:80, v/v) acidificata con l'1% di CH₃COOH.