

PROGETTI DI “RICERCA CORRENTE 2021”
RELAZIONE FINALE

N. identificativo progetto: IZS LT IZS 01/21 RC
“STRATEGICA”

Progetto presentato da:

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE

LAZIO E TOSCANA “M. ALEANDRI”

Area tematica: Sicurezza Alimentare

Titolo del progetto: Studio sulla contaminazione da aflatossina M1, aflatossicolo e sterigmatocistina nei formaggi ovini, caprini e bufalini ai fini della valutazione dell’esposizione per il consumatore.

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute

Responsabile Scientifico: Carlo Boselli

Studio sulla contaminazione da aflatossina M₁, aflatossicolo e sterigmatocistina nei formaggi ovini, caprini e bufalini ai fini della valutazione dell'esposizione per il consumatore.

Parole chiave: a) Aflatossina M₁ b) sterigmatocistina; c) aflatossicolo; d) fattore di concentrazione; e) daily intake

L'aflatossina M₁ (AFM₁) è rilevante per la sicurezza della filiera casearia e il suo tenore massimo nel latte è stabilito in 0,050 µg/kg, mentre per il suo metabolita aflatossicolo (AFL) e per la micotossina analoga sterigmatocistina (STC), con proprietà tossicodinamiche paragonabili, le informazioni di occurrence negli alimenti sono ancora frammentarie.

L'obiettivo iniziale del progetto di ricerca strategica (IZS LT IZS 01/21 RC) è stato lo sviluppo, la validazione e l'applicazione di un metodo analitico, in grado di determinare simultaneamente AFM₁, STC, AFL, in diversi prodotti lattiero-caseari di origine bufalina, ovina e caprina. Il metodo ha impiegato colonnine di Immunoaffinità (IAC) selettive per AFM₁, AFL e STC e standard interni marcati isotopicamente (ILIS), che si sono rivelati elementi imprescindibili al fine di ottenere un metodo analitico standardizzato, sensibile (LOQ: 1 ng/kg, 5 ng/kg e 0,5 ng/kg µg/kg per AFM₁, AFL e STC rispettivamente), robusto e con soddisfacenti performances in termini di accuratezza e precisione. Il metodo sviluppato è stato utilizzato da tutti i laboratori coinvolti nella ricerca, al fine di ottenere dei risultati coerenti fra loro testati successivamente in uno specifico PT.

L'obiettivo successivo è stato determinare i fattori di concentrazione, per i formaggi ed i derivati del siero, ottenuti da caseificazioni sperimentali, utilizzando latte naturalmente contaminato da AFM₁. I risultati hanno mostrato valori comparabili a quelli normati (3, 5,5), sia per i formaggi a pasta molle e semimolle (2,2, 2,94 e 3,19 per specie bufalina, ovina e caprina rispettivamente) sia per quelli a pasta semidura, dura (4,41, 4,54 per specie ovina e caprina rispettivamente). Per quanto riguarda il metodo di produzione della mozzarella, è stato confermato che l'uso di acqua bollente durante il processo di filatura è stato efficace nel ridurre parzialmente la concentrazione di AFM₁ nella cagliata. Il campionamento dei prodotti presenti sul mercato, ha riguardato complessivamente 440 campioni di formaggio a base di latte ovino (n=186, 42%) caprino (n=149, 34%) e bufalino (n=105, 24%). La presenza di AFM₁ e sterigmatocistina (concentrazione superiore al LOD) è stata rilevata in circa la metà dei campioni totali, mentre l'AFL non è mai stato rilevato. I formaggi derivanti da latte ovino sono risultati quelli maggiormente contaminati rispetto a quelli prodotti con latte delle altre due specie.

La concentrazione media di aflatossina M₁ per le tre specie è variata da 5-9 ng/kg (stime lower bounds) a 7,7-12 ng/kg (stime upper bounds). Per la sterigmatocistina, la concentrazione è variata da 3-10 ng/kg (lower bounds) a 6,8-13 ng/kg (upper bounds). L'aflatossicolo non è mai stato ritrovato al di sopra del limite di rilevazione.

L'obiettivo finale, di analizzare l'esposizione del consumatore è stato raggiunto utilizzando il Margin Of Exposure (MOE). Si è preso in considerazione solo il consumo di formaggi realizzati con latte delle specie selezionate e un livello medio di contaminazione. I dati ottenuti hanno mostrato risultati al di sotto della soglia di 10,000, che viene considerata la soglia di "concern".

Simulando consumi elevati, i valori sono risultati non inferiori a 60,000 per l'AFM₁ e sono risultati ancora più elevati per la sterigmatocistina (sempre superiori a 7×10^7), in considerazione di un point of reference maggiore. Le classi con i valori più bassi sono quelle relative alle sub-popolazioni più giovani. Va osservato che nella stima non è stato incluso il possibile apporto di micotossine da altre fonti di cibo potenzialmente contaminato, come il latte per l'AFM₁ o cereali e legumi per la sterigmatocistina.

Un'ultima analisi riguarda la contaminazione da sterigmatocistina. Nelle nostre caseificazioni sperimentali, utilizzando latte naturalmente contaminato da AFM₁, la STC è stata trovata sia nel latte

che nei prodotti derivati, ma solo nella specie bufalina, nel 67% (8/12) delle caseificazioni, pertanto è considerata una contaminazione primaria.

Nei prodotti acquistati sul mercato (GDO, Discount, caseifici, etc.), la sterigmatocistina sebbene presente anche all'interno dei formaggi in basse concentrazioni, è stata rilevata anche sulla parte esterna del formaggio e a volte anche ad elevate concentrazioni. In questo caso la contaminazione era prevalentemente di tipo secondario, verosimilmente avvenuta durante la fase di conservazione e stagionatura. In questo contesto l'igiene dei locali di stagionatura e la pulizia esterna delle forme di formaggio, sono processi cruciali minimizzare il rischio di contaminazione da STC.

Pertanto, la gestione e la mitigazione del rischio legato all'esposizione di AFM₁ e STC è di interesse per gli attori della filiera, oltre che per le autorità preposte al controllo ufficiale, anche se i livelli di queste due tossine nei prodotti in commercio sono sempre stati ai limiti massimi imposti dal legislatore.

SUMMARY

Study on Aflatoxin M₁, Aflatoxicol and Sterigmatocystin contamination in sheep, goat and buffalo cheeses to assess consumer exposure.

Key words: a) Aflatoxin M₁ b) sterigmatocystin; c) aflatoxicol; d) enrichment factor; e) daily intake

AFM₁ is relevant to the dairy chain and its maximum level in milk is set at 0.050 µg/kg, while for the other two molecules (AFL, STC), with comparable toxicodynamic properties, the information on their presence in food is still fragmentary.

The initial objective of the strategic research (IZS LT IZS 01/21 RC) was to develop, validate and apply an analytical method for the simultaneous determination of AFM₁, STC and AFL in dairy products of buffalo, sheep and goat origin. The method used immunoaffinity columns (IAC) selective for AFM₁, AFL and STC and isotopically labelled internal standards (ILIS), which proved to be essential elements to obtain a standardized, sensitive (LOQ: 1 ng/kg, 5 ng/kg and 0.5 ng/kg µg/kg for AFM₁, AFL and STC, respectively), robust analytical method with satisfactory performance in terms of accuracy and precision. The method developed was used by all the laboratories involved in the research to obtain mutually consistent results, which were then validated in a specific proficiency test. The next objective was to determine the Enrichment Factors (EF) for cheeses and whey products obtained from experimental cheese making with milk naturally contaminated with AFM₁. The results showed values comparable to the standard values (EF 3.0 and 5.5), both for soft and semi-soft cheeses (2.2, 2.94 and 3.19 for buffalo, sheep and goat respectively) and for semi-hard and hard cheeses (4.41, 4.54 for sheep and goat). With regard to the mozzarella production process, a partial effect in reducing the AFM₁ concentration from the curd was confirmed by the use of hot water during the stretching process.

A total of 440 samples of cheeses made from ewe's milk (n=186, 42%), goat's milk (n=149, 34%) and buffalo milk (n=105, 24%) were analyzed. The presence of AFM₁ and sterigmatocystin (concentration above the LOD) was detected in about half of the total samples, while AFL was never detected. Cheeses made from sheep's milk were more contaminated than those made from milk of the other two species.

The average concentration of aflatoxin M₁ for the three species ranged from 5-9 ng/kg (lower limit estimates) to 7.7-12 ng/kg (upper limit estimates). For sterigmatocystin the concentration ranged from 3-10 ng/kg (lower limits) to 6.8-13 ng/kg (upper limits). Aflatoxicol was never found above the limit of detection.

The final objective of analyzing consumer exposure was achieved using the Margin Of Exposure (MOE), taking into account only the consumption of cheeses made with milk from the selected

species and an average level of contamination, the data obtained showed results below the threshold of 10,000, which is considered to be the threshold of 'concern' two species.

When high consumption was simulated, the values were no lower than 60,000 for AFM₁ and even higher for sterigmatocystin (still above 7×10^7), given a higher reference point. The classes with the lowest values are those of the youngest subpopulations. It should be noted that the possible intake of mycotoxins from other potentially contaminated food sources, such as milk for AFM₁ or cereals and legumes for sterigmatocystin, was not included in the estimation.

A final analysis concerns sterigmatocystin contamination. In our experimental cheesemaking, using milk naturally contaminated with AFM₁, STC was found in both milk and derived products, but only in the buffalo species, in 67% (8/12) of the cheesemaking, so it is considered a primary contamination. In products purchased on the market (Large-scale retail trade, discount stores, dairies, etc.), sterigmatocystin was also found in low concentrations inside the cheese, but also on the outside of the cheese, sometimes in high concentrations. In this case, the contamination was mainly secondary and probably occurred during storage and ripening. In this context, the hygiene of the ripening rooms and the cleaning of the outside of the cheeses are crucial processes to minimize the risk of STC contamination.

The management and mitigation of the risk associated with exposure to AFM₁ and STC is therefore of interest to those involved in the supply chain as well as the authorities responsible for official controls, even though the levels of these two toxins in products on the market have always been within the maximum limits set by current legislation.