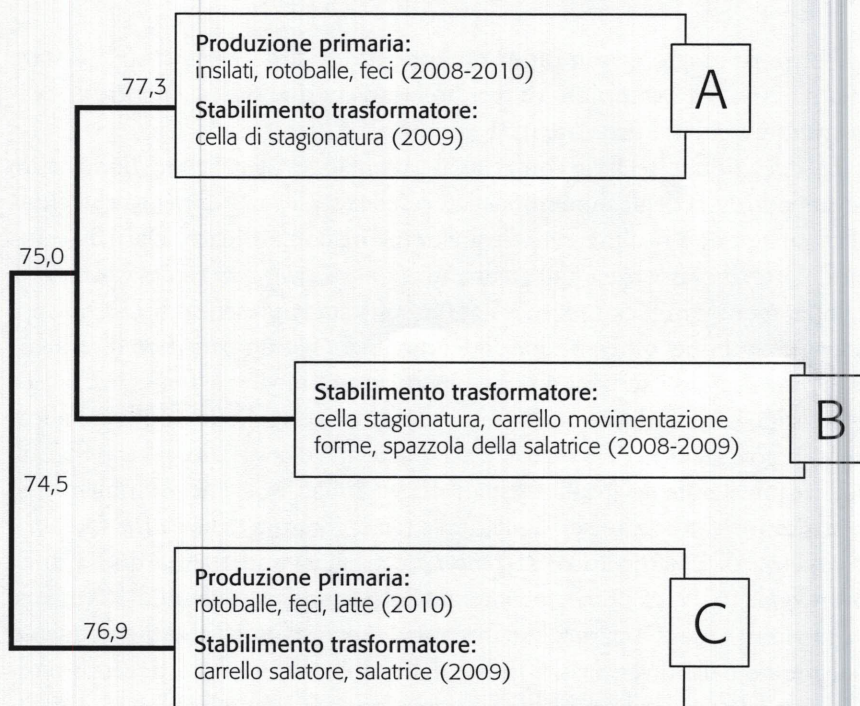


non è stato infrequente notare come alcune superfici siano risultate positive in più visite successive: ripiani della cella stagionatura, spazzola della salinatrice e ruote del carrello per la movimentazione delle forme. Inoltre, il microrganismo è stato isolato anche da attrezzature quali la foratrice, la salatrice e dalle ruote dei carrelli, evidenziando la possibilità e la criticità della potenziale diffusione del patogeno all'interno dello stabilimento e tra le diverse forme in stagionatura. L'applicazione delle tecniche di tipizzazione ai ceppi isolati ha permesso di evidenziare come l'ambiente "azienda zootecnica" sia caratterizzato da profili comuni a più aziende sia nei campioni di alimenti che in quelli di feci. Questo risultato potrebbe indicare la presenza di ceppi diffusi tra i conferenti che trovano negli ambienti zootecnici una nicchia di adattamento. Invece, pur considerando un numero molto alto di isolati, non è stato mai possibile individuare nel latte prodotto dalle lattifere lo stesso profilo individuato nelle feci o negli alimenti. L'analisi genotipica degli isolati provenienti dalla produzione primaria (latte, feci ed alimenti per le lattifere) e dal caseificio infatti, ha permesso di riscontrare come non ci siano genotipi uguali nei due comparti, impedendo di poter osservare in maniera diretta la trasmissione dei microrganismi e di poter inequivocabilmente identificare le eventuali fonti di trasmissione. Questo risultato sembrerebbe indicare che non ci siano criticità costanti nelle procedure, tali da consentire frequenti e ripetute contaminazioni nel tempo. Tuttavia, i livelli di similitudine tra gli isolati della produzione primaria e del caseificio (superiori all'80%), sono l'evidenza di quanto essi, pur distinti, siano geneticamente omogenei (Figura 3).

Figura 3

Dendrogramma generato dall'elaborazione dei risultati delle Rep-PCR: tutti gli isolati ($n = 82$) di *L. monocytogenes* sono geneticamente omogenei (similitudine minima 74,5%). Si osserva un'ulteriore suddivisione in 3 gruppi a similitudini più elevate. Di questi, due comprendono ceppi provenienti dalla produzione primaria e dallo stabilimento trasformatore che tra di loro sono molto simili: 77,3% (A) e 76,9% (C). Il gruppo B invece mostra come elevate percentuali di similitudine (79,3%) siano state osservate tra isolati raccolti in 3 sopralluoghi differenti eseguiti presso lo stesso caseificio, indice di probabile persistenza del ceppo.



Tale dato conferma l'ipotesi di una possibile contaminazione dell'ambiente "caseificio" da parte di ceppi provenienti dal latte, probabilmente a seguito di una non corretta gestione delle prime fasi di lavorazione, dove è fondamentale il rispetto delle buone pratiche igieniche (GHP) e delle buone pratiche di lavorazione (GMP) per evitare che *Listeria* possa essere introdotta in stabilimento. L'uniformità genetica che si riscontra nei ceppi isolati dal caseificio fa inoltre presupporre che tali ceppi siano in grado di adattarsi, una volta entrati in caseificio, alle specifiche condizioni ambientali, diventando poi parte della "house flora", ma differenziandosi dai "progenitori" da cui hanno avuto origine, ovvero i "ceppi di allevamento". A sostegno di questa ipotesi, studi recenti hanno evidenziato come le sequenze di *comK* di ceppi di *L. monocytogenes* siano diverse a seconda del caseificio da cui provengono ed al quale i ceppi si sono adattati (Verghese *et al.*, 2011). Infatti oltre ad aver evidenziato una sovrapposibilità delle frequenze di isolamento nelle diverse visite, riconducibile verosimilmente a ceppi *residenti*, non è stato altresì infrequente ritrovare profili identici in sopralluoghi differenti, indicazione e conferma della persistenza del microrganismo negli ambienti di lavorazione. Le cause sono verosimilmente da ricercare in una scarsa efficacia del piano di sanificazione, oppure nella capacità del microrganismo di formare biofilm e dunque resistere ai trattamenti sanificanti, con conseguente persistenza nel tempo e disseminazione all'interno del caseificio, come può evidenziare la presenza di ceppi caratterizzati dallo stesso profilo in superfici/attrezzature differenti (foratrice, la salatrice, le ruote dei carrelli, la taglierina, assi di stagionatura).

■ Conclusioni

In conclusione, data l'elevata capacità di *L. monocytogenes* di colonizzare gli ambienti di produzione del Gorgonzola DOP e di persistere anche a seguito dell'applicazione delle corrette procedure di sanificazione, i risultati presentati hanno rilevato un'elevata similitudine tra i ceppi in produzione primaria ("progenitori") e quelli in stabilimento di trasformazione. In considerazione delle particolari condizioni di stagionatura, indispensabili al fine di ottenere un prodotto dalle ottimali caratteristiche organolettiche, è indispensabile sottolineare che per limitare la diffusione di *Listeria*, soprattutto *L. monocytogenes*, sia fondamentale il rispetto non solo delle GHP e delle GMP, ma di tutte le altre buone pratiche agricole (GAP) a livello della produzione primaria, soprattutto durante il processo di insilamento. A tal proposito sarebbero auspicabili futuri progetti di ricerca volti a studiare formulazioni di materiali innovativi per la realizzazione di imballaggi per le rotoballe o per i teli di copertura delle trincee, che consentano all'insilato di fermentare correttamente e raggiungere quei livelli di pH, di anaerobiosi e di a_w indispensabili per inibire la crescita di *Listeria*.



Figura 4

Bibliografia

- Fox E., O'Mahony T., Clancy M., Dempsey R., O'Brien M., Jordan K., 2009. *Listeria monocytogenes* in the Irish dairy farm environment. *Journal of Food Protection*, 72:1450–1456.
- Hassan Z., Purwati E., Radu S., Rahim R.A., Rusul G., 2001. Prevalence of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* in meat and fermented fish in Malaysia. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 32:402-407.
- Low J.C., Donachie W., 1997. Review: A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *The Veterinary Journal*, 153:9-29.
- Verghese B., Lok M., Wen J., Alessandria V., Chen Y., Kathariou S., Knabel S., 2011. comK pro-phage junction fragments as markers for *Listeria monocytogenes* genotypes unique to individual meat and poultry processing plants and a model for rapid niche-specific adaptation, biofilm formation, and persistence. *Applied Environmental Microbiology*, 77:3279-3292.

Le aflatossine nella filiera latte, un problema sempre in agguato: punti critici e indicazioni per il contenimento del rischio

Dopo l'esperienza dell'annata 2003 in cui, a seguito di una di raccolta del mais caratterizzata da livelli di contaminazione da aflatossina B₁ (AFB₁) particolarmente elevati, molte aziende da latte hanno superato il limite europeo di aflatossina M₁ (AFM₁) nel latte, è nata l'esigenza di cercare di ampliare la conoscenza dei fattori implicati nella contaminazione di questa micotossina negli alimenti zootecnici e i meccanismi di passaggio nel latte e nei prodotti derivati.

Le aflatossine sono dei metaboliti secondari prodotti da funghi filamentosi del genere *Aspergillus* e in particolare da *A. flavus* e *A. parasiticus*. Sono un gruppo di micotossine altamente tossiche, mutagene e cancerogene presenti in materie prime ed alimenti di origine vegetale nelle quattro forme B₁, B₂, G₁ e G₂. La più diffusa delle quattro, l'aflatossina B₁ (AFB₁), è classificata come agente cancerogeno di classe 1 dalla Associazione Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC). La direttiva EC 194/97 fissa i limiti massimi ammissibili per questi contaminanti in materie prime destinate al consumo umano, sia in termini di sola contaminazione da AFB₁, sia in termini di contaminazione complessiva da aflatossine totali. Parte dell'AFB₁ ingerita con gli alimenti si trasforma in AFM₁ e passa (*carry-over*) nel latte e suoi derivati destinati all'alimentazione umana (Munksgaard *et al.*, 1987). La non completa coerenza dei limiti europei per quanto riguarda gli alimenti destinati all'alimentazione delle bovina da latte rispetto ai limiti ammessi nel latte pone l'obbligo per gli allevatori di valutare, con estrema attenzione, gli alimenti che entrano in razione per evitare il superamento del limite nel latte (Borreani e Tabacco, 2004).

Infatti al limite di 50 ppt (parti per trilione, ng/kg) di AFM₁ nel latte corrispondono limiti di 5 ppb (parti per miliardo, µg/kg) di AFB₁ nei mangimi finiti e a 20 ppb (20 µg/kg) per le materie prime utilizzate sulle vacche da latte. Il limite di 5 ppb di AFB₁ negli alimenti zootecnici fissato nel dicembre 1991 dalla UE si basava sulla considerazione che in media il passaggio di AFM₁ nel latte fosse intorno al 2%. Ma studi successivi (Veldman *et al.*, 1992) hanno messo in evidenza che tale limite non sempre è cautelativo per ottenere latte

Giorgio Borreani
Ernesto Tabacco
Dipartimento di Agronomia,
Selvicoltura e Gestione del Territorio -
Università di Torino

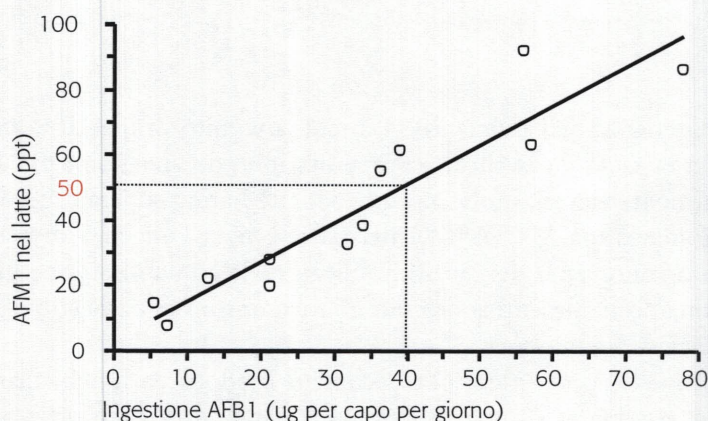
Laura Cavallarin
Sara Antoniazzi
ISPA-CNR, sezione di Torino

Daniele Giaccone
Associazione Regionale Allevatori
del Piemonte - Torino

Roberto Arru
Associazione Regionale
Produttori Latte del Piemonte - Torino

Figura 1

Relazione tra ingestione complessiva giornaliera di AFB₁ e concentrazione di AFM₁ nel latte. Fonte: Veldman *et al.*, 1992.



Considerando che l'ingestione di sostanza secca media di una bovina da latte è compresa tra i 20 e i 23 kg al giorno, ne risulta che il contenuto medio di AFB₁ della razione deve essere inferiore a 2 ppb. Come si comprende, alimenti entro i limiti di legge (tra i 2 e i 5 ppb di AFB₁) possono dare contaminazioni di AFM₁ del latte oltre i 50 ppt (quindi oltre i limiti legge!).

Queste considerazioni impongono la massima attenzione nel monitoraggio di tutti gli alimenti che entrano nelle razioni di bovine da latte, in quanto la responsabilità rischia di cadere solo sull'allevatore senza possibilità di rivalsa su altri interlocutori della filiera. In azienda il rischio di contaminazione degli alimenti da AFB₁ è legato principalmente ai prodotti derivanti dalla coltura del mais e ai prodotti di origine tropicale contenuti nei mangimi (cotone, soia, glutine, farine varie, ecc.).

L'attività svolta nell'ambito del progetto "Analisi delle problematiche legate alla presenza di aflatossine nella filiera lattiero-casearia: studio del trasferimento dell'aflatossina B₁ dal latte al formaggio e strategie aziendali per il contenimento del rischio di accumulo" ha perseguito i seguenti obiettivi: monitorare il livello di contaminazione da AFB₁ negli alimenti destinati a bovine in lattazione di alcune aziende da latte piemontesi; monitorare il livello di contaminazione da AFB₁ nelle granelle di mais; determinare la contaminazione da aflatossine totali negli insilati aziendali di mais in relazione al grado di deterioramento

aerobico; mettere a punto un metodo analitico per la determinazione del contenuto di AFB1 negli insilati; monitorare il livello di contaminazione da AFM1 nel latte prodotto in due filiere lattiero casearie e analizzare il comportamento dell'AFM1 durante il percorso di caseificazione.

■ Monitoraggio alimenti zootecnici in aziende piemontesi da latte

Per valutare la provenienza della contaminazione del latte con AFM1 si è provveduto a valutare l'incidenza di contaminazione da aflatossina B₁ nelle diverse tipologie di alimenti presenti nelle aziende studiate. L'aflatossina B₁ è stata determinata mediante saggio ELISA nelle farine, nei concentrati e nei foraggi secchi, mentre per gli insilati si è provveduto anche alla verifica dei dati ottenuti mediante ELISA attraverso la determinazione dell'aflatossina B₁ in HPLC.

Dai dati raccolti in oltre 70 aziende zootecniche nel periodo 2004-2007 è emerso che circa il 15% degli alimenti analizzati ha mostrato contaminazioni superiori al valore di 5 ppb (*Tabella 1*). Gli alimenti che maggiormente hanno contribuito alla contaminazione delle razioni sono stati il glutine di mais (fino a 21,7 ppb), il cotone (fino a 4,8 ppb) e alcuni mangimi che, sorprendentemente, hanno ampiamente superato i limiti di legge, che, per le vacche da latte, corrispondono a 5 ppb. Quando i mangimi complementari presentano contaminazioni sopra i 4 ppb (4 µg/kg s.s.) sono in grado di fornire un contributo di AFB1 alla razione cospicuo (considerando che nelle razioni in molte aziende zootecniche intensive da latte entrano con dosi tra 4,0 e 6,5 kg di s.s.). L'orzo, i fieni e le farine di mais prodotti in aziende irrigue hanno mostrato contaminazioni molto basse e talvolta sotto il livello di rilevabilità.

Alimenti zootecnici	Contaminazione AFB1 (ppb)		
	Media	Min	Max
Prodotti del mais Pastone	0,90	<0,5	1,4
Farina	1,3	<0,5	264
Glutine	5,2	<0,5	21,7
Farina di soia	0,8	<0,5	1,5
Orzo granella	0,7	<0,5	1,5
Fieno erba medica	0,3	<0,5	0,8
Fieno prato polifita	0,9	<0,5	2
Polpe barbabietola	1,3	<0,5	3,9
Nuclei e concentrati	2,5	<0,5	11,8
Cotone	2,6	<0,5	4,8



Figura 2

Il monitoraggio degli alimenti che compongono la razione è indispensabile per prevenire i rischi di livelli elevati di contaminazione del latte con aflatossine.

Tabella 1

Contaminazione da AFB1 in diverse tipologie di alimenti destinati a bovine in lattazione nelle aziende studiate durante il progetto (periodo 2004-2007).

Tabella 2

Contributo del mais in quattro tipologie di razioni di vacche da latte ad alta produzione in Piemonte.

L'elevato contributo del mais e dei suoi derivati nelle razioni delle vacche da latte ad alta produzione viene esemplificato in quattro razioni tipo studiate nelle aziende zootecniche della pianura piemontese riportate in *Tabella 2*. Dai dati si evidenzia un contributo di questa coltura nelle sue diverse forme (insilato, granella, glutine, prodotti e sottoprodotti di nuclei e concentrati) sempre superiore al 50% della sostanza secca ingerita. Ne deriva l'esigenza di conoscere con chiarezza i contenuti di AFB1 nei diversi prodotti del mais, nonché di disporre di un metodo preciso per la determinazione del contenuto dell'afatossina nel silomais, data la scarsa affidabilità del metodo ELISA per questo substrato (cf. Paragrafo successivo: *Messa a punto di un metodo analitico per la determinazione della contaminazione da aflatossine nell'insilato di mais*).

Alimenti zootecnici	Razione (% s.s.)			
	1	2	3	4
Silomais	43,7	39,5	44,7	29,5
Farina mais	17,5	17,9	17,9	3,3
Glutine mais			1,7	
Fieno prato	9,2			
Fieno medica	7,1			
Siloprato			6,1	
Siloloietto		11,9		12,7
Paglia	0,7	4,0		
Concentrato				53,6 (39,2*)
Nucleo	21,7	17,5 (7,7*)		
Soia		9,1	14,0	
Cotone			6,1	
Trebbie birra			6,6	
Integrazione minerale			2,8	0,9
Mais e suoi derivati	61,2	58,8	64,3	72,0

* percentuale di derivati di mais nei mangimi complementari.

Inoltre, poiché il mais costituisce una delle principali componenti dei mangimi complementari, diventa strategico a livello regionale poter conoscere la reale contaminazione delle partite di mais, anche nelle annate in cui il problema dell'AFB1 alla raccolta non è generalizzato, come invece avvenuto nel 2003. A questo proposito si è evidenziato che in alcune delle aziende problema studiate nel progetto gli alti livelli di AFM1 nel latte erano prevalentemente causati da contaminazioni dei mangimi complementari ai limiti di legge.

■ Messa a punto di un metodo analitico per la determinazione della contaminazione da aflatossine nell'insilato di mais

Uno dei punti critici per un corretto monitoraggio degli alimenti impiegati nell'alimentazione delle vacche da latte è la difficoltà di estrarre e misurare con precisione le aflatossine contenute negli insilati. La matrice "insilato" è particolarmente critica, a causa dell'abbondante presenza di prodotti delle fermentazioni e dell'acidità del mezzo. Allo scopo di mettere a punto una metodica affidabile per l'analisi delle aflatossine negli insilati, si è proceduto alla modifica di due recenti metodiche per l'estrazione e la determinazione delle aflatossine (B_1 , B_2 , G_1 , G_2) da varie materie prime e da alimenti zootecnici (Stroka *et al.*, 2000; Stroka *et al.*, 2003), ed alla validazione del metodo modificato. Il nuovo metodo è stato quindi utilizzato per confermare l'analisi effettuata su campioni di silomais prelevati presso alcune aziende zootecniche piemontesi e risultati positivi all'aflatossina B_1 mediante l'impiego di saggio immunoenzimatico ELISA, con contaminazioni rilevate fino a 20 ppb. Dal grafico della *Figura 4* emerge chiaramente la non affidabilità della metodologia ELISA, utilizzata per le granelle, nella valutazione dell'aflatossina B_1 negli insilati di mais. Infatti se i due metodi ELISA e HPLC fossero equivalenti i dati analitici ottenuti da uno stesso campione dovrebbero ricadere sulla retta tratteggiata, che rappresenta la bisettrice ($y = x$). Oltre ad avere una distorsione notevole della retta, con un'evidente sovrastima da parte del metodo ELISA, si osserva un'elevata dispersione dei dati attorno alla retta ($r^2 = 0,16$), che indica la bassa affidabilità di questa metodologia per l'analisi degli insilati, se non opportunamente modificata. Per contro la metodica ELISA ha confermato di essere valida per l'analisi dell'aflatossina B_1 nelle granelle di mais, con valori di coefficiente di determinazione (r^2) tra i due metodi pari a 0,993 (equazione ottenuta con i dati del progetto).

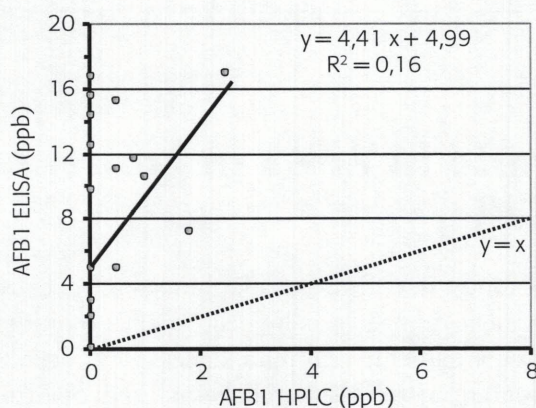


Figura 3

In azienda il rischio di contaminazione degli alimenti da AFB1 è legato principalmente ai prodotti derivanti dalla coltura del mais e ai prodotti di origine tropicale contenuti nei mangimi (cotone, soia, glutine, farine varie, ecc.).

Figura 4

Relazione tra AFB1 nel silomais determinata mediante HPLC e test ELISA. La retta tratteggiata rappresenta la bisettrice ($y = x$) su cui dovrebbero cadere i dati qualora i due metodi fossero equivalenti.



Figura 5

I risultati della ricerca evidenziano che l'insilato deteriorato, caratterizzato da pH elevati e muffe visibili, può presentare valori di aflatossine totali molto elevati e la presenza contemporanea di diverse aflatossine quali AFB1, AFB2 e AFG1.

■ Qualità di conservazione degli insilati di mais e contenuto di aflatossine

Su alcune trincee aziendali sono stati prelevati dei campioni al momento della trinciatura e durante la fase di consumo in zone deteriorate e non deteriorate per valutare le eventuali variazioni nel contenuto di aflatossine totali in relazione allo stato di conservazione dell'insilato (*Tabella 3*).

La disponibilità del metodo sopra descritto e la sperimentazione condotta in questo progetto di ricerca hanno consentito di confermare alcune osservazioni fatte in precedenti progetti di ricerca, in cui si era evidenziata una possibile correlazione tra sintesi di aflatossine e zone deteriorate del silo (Borreani *et al.*, 2003). I dati osservati in zone deteriorate del silo, caratterizzate da pH elevati, evidenziano che l'insilato deteriorato presenta valori di aflatossine totali molto elevati anche nel caso in cui si sia partiti da trinciati non contaminati. Tra le aflatossine evidenziate sono risultate presenti anche contemporaneamente AFB1, AFB2 e AFG1. Come già ricordato, i livelli massimi di aflatossina G₁ non sono soggetti a normativa per quanto riguarda gli alimenti zootecnici, mentre esiste un limite massimo definito per le aflatossine totali in materie prime destinate al consumo umano (4 ppb). È infatti provata la tossicità di tutte le quattro molecole su cellule di mammiferi, con livelli diversi di tossicità a seconda se l'azione sia espletata da ognuna di esse singolarmente o se si verifichi un'azione sinergica (Friedman *et al.*, 1997).

Azienda	Trinciato all'insilamento		Insilato			
			Centro		Zone deteriorate	
	Tenore di s.s.	Aflatossine (ppb)	Aflatossine (ppb)	pH	Aflatossine (ppb)	pH
1	38,2	ND	ND	3,79	15,97	5,19
2	37,6	ND	ND	3,82	3,51	4,03
3	34,1	0,13	0,11	3,60	4,38	5,50

Tabella 3

Contaminazione da aflatossine totali (B1 + B2 + G1 + G2) in campioni di trinciato alla raccolta e nei rispettivi insilati in tre aziende Piemontesi.

■ Contenuto in AFB1 in granelle di mais aziendali

Particolare attenzione è stata dedicata alla valutazione della contaminazione di AFB1 nelle granelle di mais raccolte nelle aziende monitorate, essendo la farina di mais un componente ricorrente delle razioni delle vacche da latte. Nella *Tabella 4* sono riportati i risultati delle analisi di quattro annate agrarie

(2004-2007), raggruppando i campioni in classi di contaminazione. Emerge che le annate 2004, 2005 e 2006 hanno presentato il 3,5, il 2,6 e l'1,8% dei campioni sopra al limite di legge (20 ppb), con punte di contaminazione di 90 ppb nel 2005 e 264 ppb nel 2006 (valori confermati in HPLC). Il 2007, dato l'andamento climatico più favorevole, non ha invece presentato grossi problemi di contaminazione, con solo il 2,6% dei campioni sopra i 5 ppb. Inoltre, mediamente, sui 4 anni studiati il 5% dei mais analizzati ha presentato valori superiori a 5 ppb, mentre nei diversi anni si sono osservate contaminazioni critiche (>20 ppb) per l'inserimento nelle razioni delle vacche da latte ad alta produzione, da un minimo del 9,1% nel 2007 a un massimo del 32,1% nel 2004.

Anno	Campioni (n)	Contenuto di aflatossina B ₁				
		valore max ppb	<2 (%)	2-5 (%)	5-20 (%)	>20 (%)
2004	112	34	67,9	17,9	10,7	3,6
2005	158	90	82,3	8,9	6,3	2,5
2006	171	264	87,7	7,0	3,5	1,8
2007	231	6	90,9	6,5	2,6	0,0
2004-2007	672	264	84,6	8,7	5,0	1,7

Tabella 4

Contaminazione da AFB₁ in granelle di mais piemontesi negli anni 2004-2007.

■ Conclusioni

Dai dati ottenuti in questo progetto emerge la necessità di approfondire la conoscenza sui fattori che determinano la contaminazione di aflatossina B₁ in campo, data l'assenza di informazione puntuale su questa micotossina che, da molti addetti ai lavori, è ancora oggi considerata solamente una tossina di magazzino e quindi legata alle cattive condizioni di conservazione delle granelle. Dati recenti di alcuni lavori americani confermano l'importanza della fase di campo nel determinare l'entità della contaminazione da questa micotossina, legata alle condizioni climatiche particolarmente critiche degli ultimi anni. Viene inoltre confermato che gli insilati deteriorati costituiscano un sito preferenziale di sintesi di micotossine e la necessità di effettuare sempre analisi di conferma in HPLC per la determinazione dell'aflatossina B₁ nel silomais.

Bibliografia

- Borreani G., Tabacco E., Cavallarin L., 2003. Contaminazione da micotossine negli insilati di mais. *L'Informatore Agrario*, 59, (31), 49-55.
- Borreani G., Tabacco E., 2004. Per un latte senza aflatossine meglio analizzare gli alimenti. *L'Informatore Agrario*, 60, (2), 53-56.
- Friedman L., Gaines D.W., Chi R.K., Smith M.C., Braunberg R.C., Thorpe C.W., 1997. Interaction of aflatoxins as measured by their biochemical action on rat liver slices and hepatocytes. *Toxic Substance Mechanisms*, 16:15-41.
- Munksgaard L., Larsen J., Werner H., Andersen P.E., Viuf B.T., 1987. Carry-over of aflatoxin from cows' feed to milk and milk products. *Milchwissenschaft*, 42: 165-167.
- Stroka J., Anklam E., Jorissen U., Gilbert J., 2000. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxin B-1 in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: a collaborative study. *Journal of AOAC International*, 83, 320-340.
- Stroka J., Von Holst C., Anklam E., Reutter M., 2003. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxin B-1 in cattle feed: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 86, 1179-1186.
- 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 Production*, 55, 163-168.

Monitoraggio e contaminazione del latte e trasferimento dell'AFM1 nei formaggi

Al fine di poter verificare l'oscillazione del contenuto in aflatossina M1 nel latte sono stati scelti tre centri di raccolta piemontesi (monitorati dal 2005 al 2007) e un quarto monitorato nel 2007, dislocati in diverse zone del Piemonte che lavorano complessivamente circa 145.000 t di latte all'anno raccolti da 284 aziende zootecniche conferenti. Attraverso il monitoraggio delle cisterne ci si è posto l'obiettivo di comprendere l'evoluzione della problematica della contaminazione del latte, di individuare i periodi più critici, nonché identificare alcune aziende "caso di studio" per approfondire le cause di presenza di AFM1 nel latte (Borreani *et al.*, 2008). I dati raccolti nell'ambito del progetto sono stati integrati con quelli disponibili dal 2001 al 2005 per poter comprendere meglio la dinamica del problema in alcune annate agrarie caratterizzate da diversi andamenti climatici. In *Tabella 1* sono riportate le frequenze delle classi di contaminazione di oltre 6000 campioni analizzati.

Anno	Campioni (n)	Classi di contaminazione AFM1			
		0-10 ppt	10-20 ppt	20-50 ppt	> 50 ppt
2001	304	82,2	11,8	5,6	0,3
2002	416	74,8	13,0	8,4	3,8
2003	1779	36,7	18,3	29,3	15,7
2004	1528	23,6	26,0	38,1	12,3
2005	517	61,5	25,0	10,4	3,1
2006	689	72,6	19,3	6,5	1,6
2007	811	74,2	17,0	4,8	3,9
MEDIA	-	60.8	18.6	14.7	5.8

Anche la variazione stagionale del contenuto in AFM1 nel latte è stata studiata sui centri di raccolta individuati. In *Figura 1* è riportata, a titolo di

Giorgio Borreani
Ernesto Tabacco
*Dipartimento di Agronomia,
Selvicoltura e Gestione del Territorio -
Università degli Studi di Torino*

Laura Cavallarin
Sara Antoniazzi
ISPA-CNR, sezione di Torino

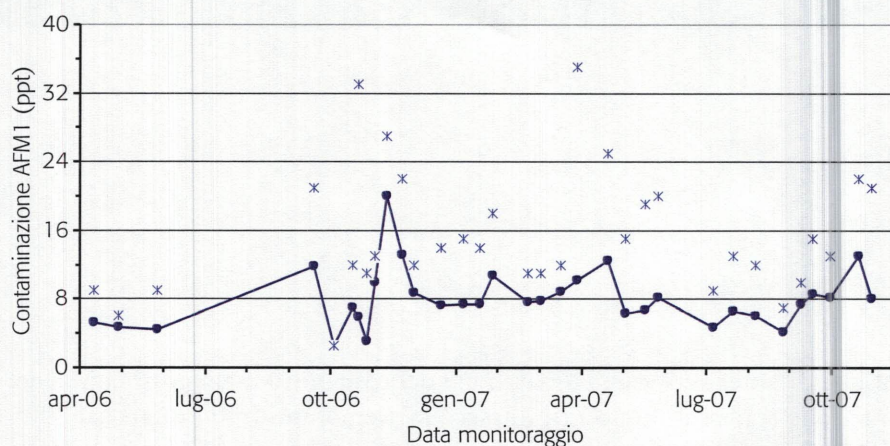
Daniele Giaccone
*Associazione Regionale Allevatori
del Piemonte - Torino*

Tabella 1

Campioni di latte piemontesi, prelevati dal 2001 al 2007, e suddivisi in classi di contaminazione da AFM1 (%).

Figura 1

Evoluzione della contaminazione da AFM1 del latte di massa di uno dei centri di raccolta monitorato nelle campagne 2006 e 2007. L'asterisco indica il valore della cisterna più contaminata.



■ Trasferimento dell'AFM1 dal latte ai formaggi

La presenza di AFM1 nel latte e nei prodotti caseari può rappresentare una potenziale minaccia per la salute del consumatore, ma nonostante l'adozione di misure volte a regolamentare la contaminazione da AFM1 nel latte in più di 60 paesi, spesso non è possibile ottenere produzioni di latte privo di AFM1. Inoltre il limite di contaminazione di AFM1 fissato per il latte a 50 ng/kg (ppt) (Tabella 2), non sempre è garanzia di salubrità dei prodotti caseari derivati.

Tabella 2

Limiti di legge per la contaminazione da AFM1 nel latte, formaggi e burro in diversi paesi.

Anno	Limiti massimi (ppt o ng/kg)		
	Latte	Formaggi	Burro
Italia	50	450*	50
Austria	50	250	20
Svizzera	50	250	20
Olanda	50	200	20
USA	500	-	-

* formaggi a pasta dura e filata.

A causa dell'affinità della AFM1 con la componente caseinica del latte, durante i processi di caseificazione con latte contaminato, la AFM1 si ripartisce tra

cagliata e siero, ma l'associazione con la caseina causa una più elevata concentrazione nel formaggio rispetto al latte di partenza. I fattori di arricchimento calcolati vanno da 2,5-3,3 per i formaggi teneri a 3,9-5,8 per i formaggi duri (Pietri *et al.*, 2004). Per quanto riguarda la produzioni casearie italiane, le informazioni disponibili a questo proposito sono relative soprattutto al processo di produzione del Grana Padano (Piro *et al.*, 2004), ma non esistono attualmente dati in proposito sulle principali produzioni casearie piemontesi (DOP e tipiche). Il progetto si è proposto di verificare in che misura avvenga la concentrazione di AFM1 in due tipologie di formaggi di caseificazione.

■ Prove sperimentali di caseificazione

Per definire un "indice di concentrazione" dell'AFM1 in alcuni formaggi freschi piemontesi a coagulazione presamica (tipo Primosale) e a coagulazione acida (tipo Robiola), si è provveduto alla realizzazione di prove sperimentali di caseificazione con latte contaminato sia naturalmente sia artificialmente con AFM1 a concentrazione nota. I livelli di contaminazione da AFM1 considerati sono stati il livello di contaminazione naturale (intorno a 5 ppt) e 50 ppt. Entrambi questi livelli sono compatibili con contaminazioni "realistiche" della realtà lattiero casearia piemontese. La prima rappresenta una contaminazione media del latte piemontese; la seconda è stata scelta in quanto costituisce il limite di contaminazione fissato per il latte a livello europeo e risulta quindi di particolare interesse verificare quale livello di contaminazione da AFM1 si possa raggiungere in queste produzioni casearie, lavorando latte con contaminazioni al limite di legge.

	Latte caseificato a:	
	Robiola	Primosale
Grasso (%)	3,82	3,62
Proteine (%)	3,41	3,43
Lattosio (%)	4,82	4,81
Cellule somatiche (/ml)	245.500	318.000
Urea (mg/dl)	28,64	32,84
Caseina (%)	2,67	2,73
Inibenti	Assenti	Assenti
Carica batterica (UCF/ml)	9.940	12.595
Aflatossina M ₁ (ppt)	6,5	6,5

Il latte utilizzato per le lavorazioni sopra descritte è stato reperito in un'azienda della provincia di Torino, che alleva vacche di razza Frisona della provin-



Figura 2

Il monitoraggio delle cisterne ha avuto come obiettivo lo studio dell'evoluzione della problematica della contaminazione del latte, l'individuazione dei periodi più critici, nonché l'identificazione di alcune aziende caso di studio per approfondire le cause di presenza di AFM1 nel latte.

Tabella 3

Caratteristiche qualitative e livello di contaminazione con AFM1 del latte tal quale utilizzato per le due caseificazioni.



Figura 3

Per definire un indice di concentrazione dell'AFM1 in alcuni formaggi freschi piemontesi a coagulazione presamica (tipo Primosale) e a coagulazione acida (tipo Robiola), si è provveduto alla realizzazione di prove sperimentali di caseificazione.

cia di Torino, la cui analisi media è riportata in *Tabella 3*. Sul latte è stata valutata con metodo rapido la contaminazione naturale di AFM1. Il latte ha mostrato contaminazioni da AFM1 basse (tra 5 e 7 ppt) in tutte le partite di latte utilizzate per la prova. Per ogni esperimento di caseificazione si è provveduto alla contaminazione artificiale del latte con una soluzione di standard di AFM1 al livello di 50 ppt. La somma delle contaminazioni naturale (circa 5 ppt) e artificiale (40 ppt) ha dato luogo a latte contaminato a circa 50 ppt.

Descrizione delle prove di caseificazione

Le tipologie di caseificazione scelte per le prove di carry-over dal latte al formaggio vengono brevemente descritte qui di seguito.

Lavorazione lattica fresca a latte crudo (tipo Robiola)

Il latte è stato riscaldato a 25°C ed è stato aliquotato in due contenitori (12 l/contenitore), per realizzare le due tesi sperimentali: latte non trattato (TQ), latte con aggiunta di 40 ppt AFM1 (T50). Le due tesi sono poi state lavorate come di seguito dettagliato ed il procedimento è stato ripetuto per tre volte per ogni tesi. Al latte è stato aggiunto un fermento mesofilo eterofermentante (1 unità per 100 litri di latte) ed è seguita una sosta di 4 ore a temperatura ambiente per permetterne l'attivazione e l'inizio dell'acidificazione del latte. Successivamente si è proceduto all'aggiunta del caglio (caglio animale liquido (80:20) 1:10000, alla dose di 15 ml/100 litri) ed alla fase di coagulazione, a 25°C, per 24 ore. Nella fase successiva di estrazione si è proceduto al taglio della cagliata a dimensioni di circa 2 cm x 2 cm e all'estrazione con mestolo. La cagliata così estratta è stata quindi formata in fascelle, sottoposta a 4 rivoltamenti, salata e stoccata a 4°C. Dopo 12 ore si è provveduto ad un'ulteriore salatura e infine al campionamento delle forme ottenute. Per ogni tesi sono state ottenute 8 forme, che sono state campionate, sigillate in contenitori sottovuoto e poste in congelatore fino al momento delle analisi.

Lavorazione per formaggio fresco a coagulazione presamica (tipo Primosale)

Il latte è stato riscaldato a 40°C ed è stato aliquotato in due contenitori (10 l/contenitore), per realizzare le due tesi sperimentali: latte non trattato (TQ), latte con aggiunta di 40 ppt AFM1 (T50). Le due tesi sono poi state lavorate come di seguito dettagliato ed il procedimento è stato ripetuto per due volte per ogni tesi. Al latte è stato aggiunto un fermento termofilo omofermentante, lasciato attivare per 50 minuti. Successivamente è stato aggiunto il cloruro di sodio al latte alla dose di 0,7% sul tal quale. Si è quindi proceduto all'aggiunta del caglio (caglio liquido 1:10000, alla dose di

40-50 ml/100 litri) ed alla coagulazione per 35-40 minuti. La cagliata è stata estratta e formata negli stampi, e successivamente sottoposta a rivoltamenti veloci (3 rivoltamenti in 15 minuti). Le forme sono state lasciate a maturare per 2 ore e quindi poste a 4°C. Le forme così ottenute (8 per tesi) sono state poi campionate, sigillate in contenitori sottovuoto e poste in congelatore fino al momento delle analisi.

Analisi del latte e dei formaggi per la determinazione dell'AFM1

La AFM1 è stata determinata nel latte utilizzato per la caseificazione, prima e dopo la contaminazione artificiale, e nei corrispondenti formaggi ottenuti. La determinazione della AFM1 nel latte è stata effettuata presso i laboratori dell'ISPA-CNR, che prevede la purificazione e concentrazione della AFM1 su colonnina ad immunoaffinità ed analisi in HPLC accoppiato a rivelatore a fluorescenza. La determinazione della AFM1 nei formaggi è stata effettuata dal laboratorio dell'ERSAF di Mantova, seguendo il protocollo di Pietri *et al.* (2004), che prevede l'impiego di un metodo enzimatico di estrazione della AFM1, purificazione su colonnina ad immunoaffinità ed analisi in HPLC accoppiato a rivelatore a fluorescenza. La *Tabella 4* illustra i risultati delle prove di caseificazione con latte contaminato con AFM1, utilizzando le due diverse tecnologie di caseificazione a coagulazione presamica e acida.

	Tipo di contaminazione	AFM1 nel latte (ppt)	AFM1 nel formaggio (ppt)	Indice di concentrazione
Primosale	TQ	5,2	12,5	2,4
	T50	45,8	63,5	1,4
Robiola	TQ	5,0	22,8	4,1
	T50	47,4	77,5	1,6

Tabella 4

Contaminazioni medie del latte e dei formaggi e relativi indici di concentrazione della AFM1 nelle due lavorazioni, utilizzando latte contaminato naturalmente (TQ) e latte contaminato artificialmente a 50 ppt di AFM1 (T50).

I contenuti di AFM1 nel primosale caseificato naturalmente e contaminato artificialmente a 50 ppt sono stati rispettivamente 12,5 ppt e 63,5 ppt. Questo indica che si è verificata una concentrazione della AFM1 nei formaggi rispetto al latte con cui sono stati prodotti, pari a 2,4 volte nel caso del latte contaminato naturalmente a 5,2 ppt e pari a 1,4 volte per il latte contaminato artificialmente a 45,8 ppt. Il contenuto di AFM1 rilevato nella robiola caseificata con latte naturalmente contaminato a 5,0 ppt è stato di 22,8 ppt, con una concentrazione pari quindi a 4,1 volte, mentre nella robiola prodotta con latte contaminato artificialmente a 47,4 ppt è stata di 77,5 ppt, con una concentrazione di 1,6 volte.

In conclusione, i dati ottenuti confermano quanto descritto in letteratura per altre tipologie di caseificazione per quanto riguarda la concentrazione della

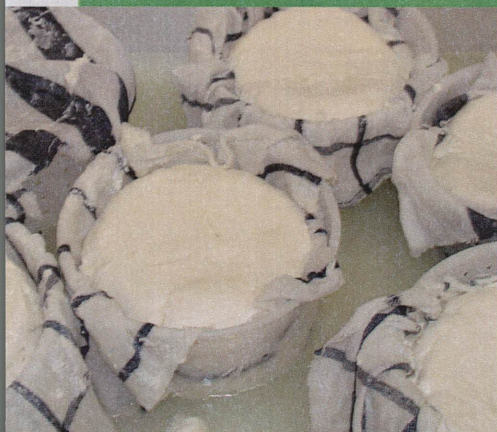


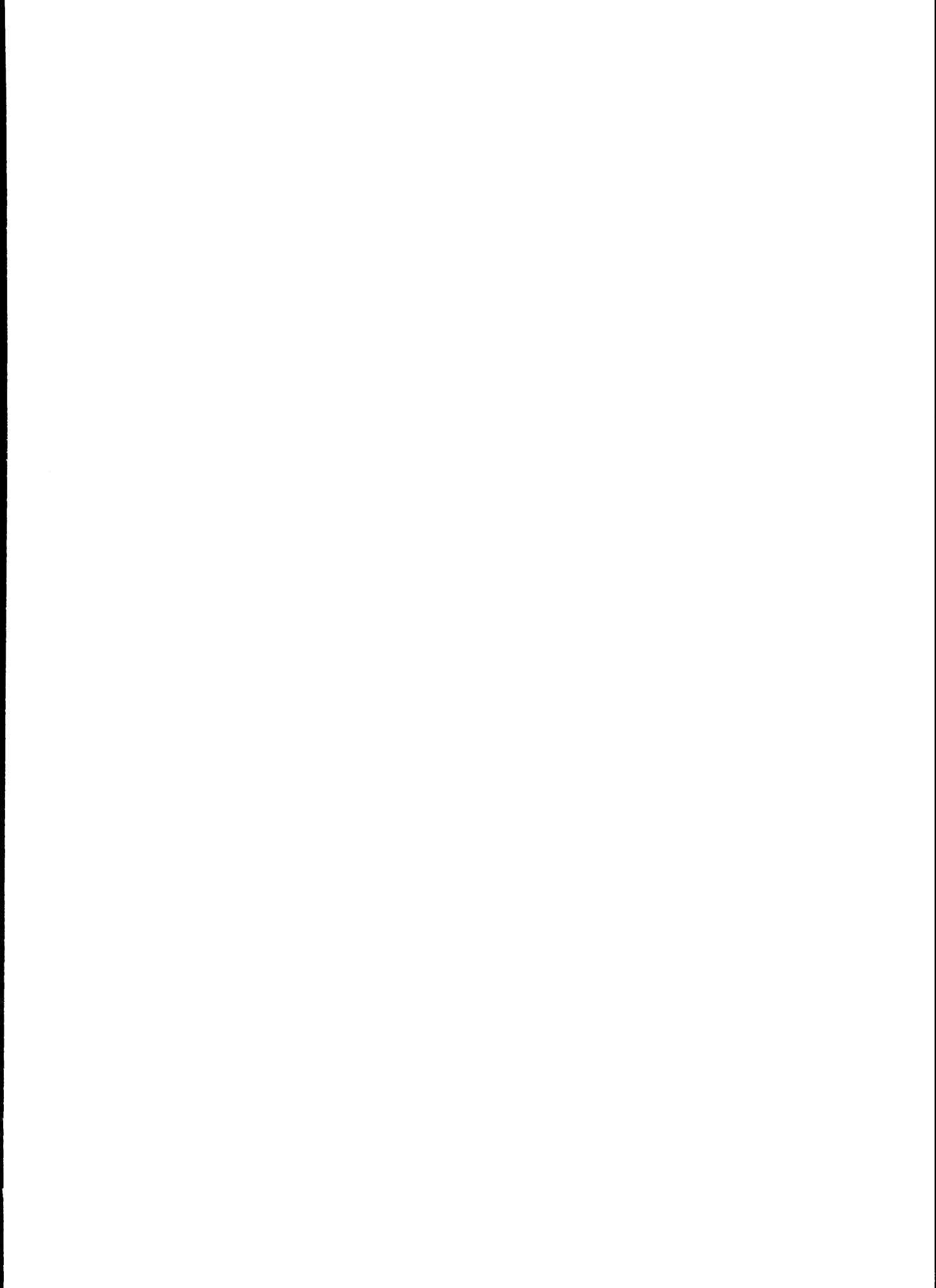
Figura 4

Il contenuto di AFM1 rilevato nella robiola caseificata con latte naturalmente contaminato a 5,0 ppt è stato di 22,8 ppt, con una concentrazione pari a 4,1 volte, mentre nella robiola prodotta con latte contaminato artificialmente a 47,4 ppt è stata di 77,5 ppt, con una concentrazione di 1,6 volte.

AFM1 durante i processi di caseificazione. Inoltre questi risultati costituiscono i primi dati disponibili circa gli indici di concentrazione in caseificazioni tipiche piemontesi e i livelli di concentrazione di AFM1 nei relativi formaggi. La sperimentazione ha indicato che latte contaminato al limite di norma di legge (50 ppt) da origine, per le due tipologie di caseificazione considerate, a formaggi contaminati al di sotto dei limiti di legge previsti per i formaggi (450 ppt).

Bibliografia

- Borreani G., Tabacco E., Cavallarin L., Antoniazzi S., Manassero D., Zanoni C., Giaccone D., 2008. *Dal latte al formaggio aflatossine sotto controllo*. *L'Informatore Agrario*, 64, (46 - Suppl. Stalle da Latte), 45-48.
- Pietri A., Bertuzzi T., Fortunati P., Piva G. (2004). *Determinazione dell'aflatossina M1 nei formaggi: nuovo metodo enzimatico di estrazione*. Atti del convegno: "Le micotossine nella filiera agroalimentare", Istituto Superiore di Sanità, Roma, 29-30 novembre, p. 94.
- Piro R., Daminelli P., Biancardi A., Finazzi G., Boni P., 2004. *Coefficiente di trasferimento dell'aflatossina M1 nel formaggio grana*. Atti del convegno: "Le micotossine nella filiera agroalimentare", Istituto Superiore di Sanità, Roma, 29-30 novembre, p. 28.



Della collana *Innovazione e sperimentazione in agricoltura* fanno parte:



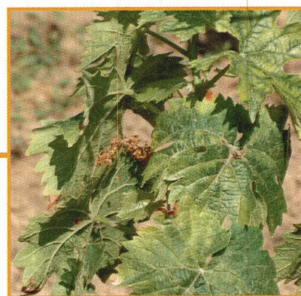
■ Reflui zootecnici
e fertilizzazione organica



■ Coltivazioni e allevamento
estensivi e biologici



■ Qualità del latte
e dei formaggi



■ Difesa fitosanitaria