

Aggiornamenti sulle attività dei Centri di Riferenza Nazionali in materia di latte ovino e caprino a supporto della filiera lattiero-casearia

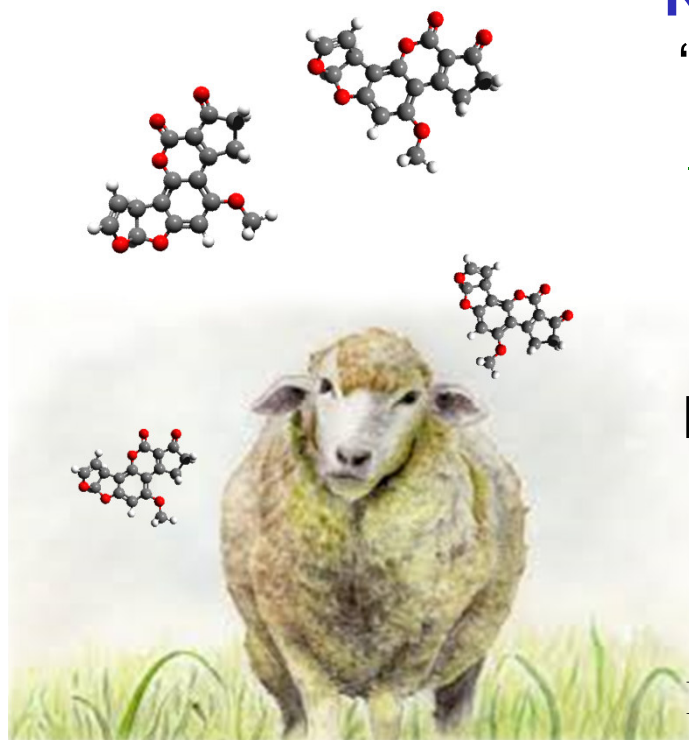
Ricerca Corrente IZSLT 01/21 “Strategica”

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

Presentazione dei risultati conclusivi sui Fattori di Concentrazione

Roma, 5 dicembre 2024

Dr. Carlo Boselli

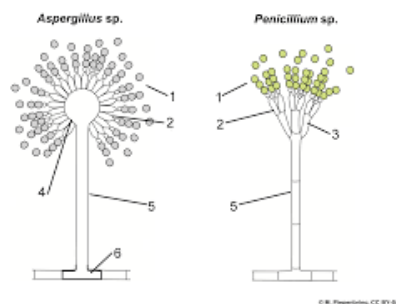


LE MICOTOSSINE

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

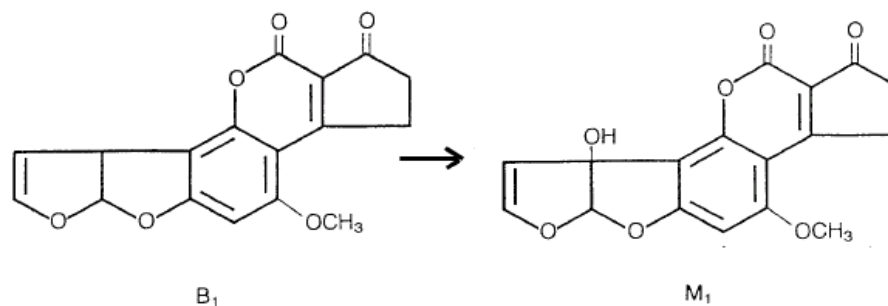
Tali metaboliti possono contaminare sia le piante in pieno campo sia le granaglie in fase di conservazione in magazzino o nei silos aziendali e se ingerite dagli animali possono causare manifestazioni di tossicità acuta e cronica.

Alcuni alimenti sono più suscettibili di altri alla crescita fungina.



LE AFLATOSSINE

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%.



Negli alimenti:

- Aflatossina B1
- Aflatossina B2
- Aflatossina G1
- Aflatossina G2

Nel latte e derivati:

- Aflatossina M1
- Aflatossina M2
- Aflatossicolo



COc1cc2c(c1)oc3cc(OC)c(O)cc3c2C4C=CCOC4

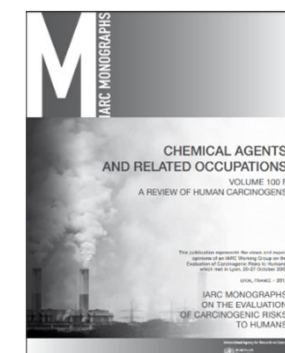
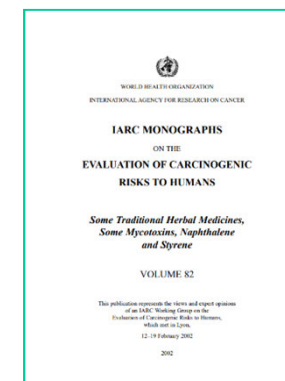
CLASSIFICAZIONE IARC (agg.to 11 ott. 2023)

Aflatoxins (B₁B₂G₁G₂**M₁**) **Group 1** - Vol. 82, 100F (2012)

Sterigmatocystin **Group 2B** - Suppl. 7, 72 (1987)

Group 1	Carcinogenic to humans
Group 2A	Probably carcinogenic to humans
Group 2B	Possibly carcinogenic to humans
Group 3	Not classifiable as to its carcinogenicity to humans

Cancerogeno per l'uomo
Probabilmente cancerogeno per l'uomo
Potenzialmente cancerogeno per l'uomo
Sostanze non ancora classificabili come cancerogene



UNO SGUARDO ALLA LEGISLAZIONE INTERNAZIONALE

Table 1
Regulation on aflatoxin M₁ in milk and milk products in different countries.

Country	Milk (µg/kg)	Dairy products (µg/kg)
USA	0.50	0.50
EU ^a	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 ^b	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	—

^a EU Regulation 466/2001.

^b Sarimehmetoglu, Kupulu, and Celik (2004).

Iqbal, S. Z., Jinap, S., Pirouz, A. A., & Ahmad Faizal, A. R. (2015). Aflatoxin M₁ 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



MICOTOSSINE: DALLA RAZIONE ALIMENTARE AL FORMAGGIO

Aflatossina B1: la biotrasformazione in AFM₁ ed il passaggio nel latte (Carry Over)

Il Carry Over (%) rappresenta in termini percentuali la quantità di AFM₁ (biotrasformata) eliminata con il latte (durante il periodo di plateau) rispetto alla quantità di AFB₁ ingerita con la razione.

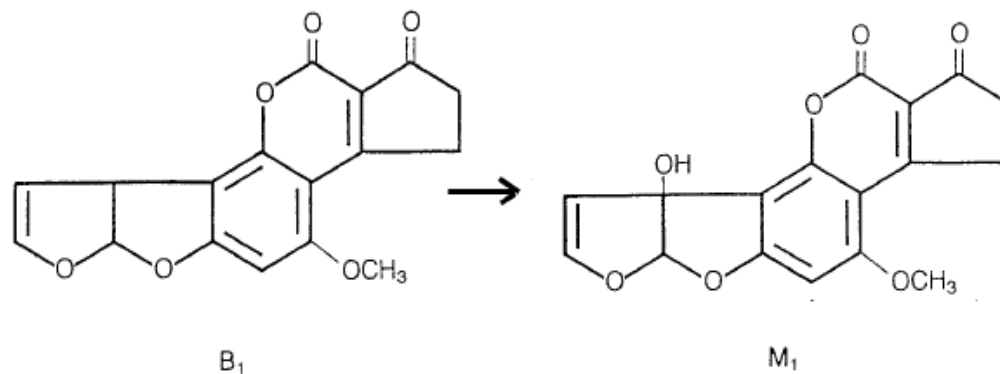
Varia nelle diverse specie animali allevate, ma soprattutto in relazione alla quantità di AFB₁ assunta con la razione. È generalmente superiore nella bovina da latte (2-3%) rispetto alle altre specie lattifere.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

CICLO DELLE AFLATOSSINE



Carry over nella bufala e nei piccoli ruminanti

(Ricerca Corrente IZSLT 12/05)

Bufala di razza MI (n=8)

Alimentate con dose giornaliera di **circa 200 µg/capo/die di AFB1**, per 6 giorni

Carry Over bufala = 0,190% (range: 0.123% - 0.280%)

Pecore di razza Comisana (n=5)

Capre di razza Maltese (n=5)

Alimentate con dose giornaliera di circa **58 µg/capo/die di AFB1**, per 6 giorni

Carry Over pecora = 0,72%

Carry Over capra = 0,68%

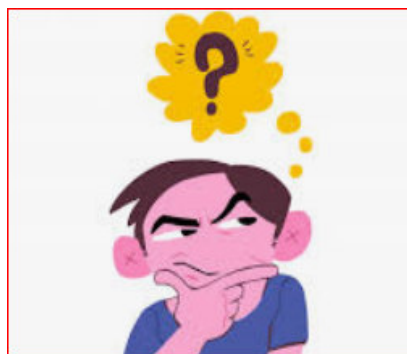


Riepilogando i valori medi di Carry Over (%) fra le diverse specie lattifere

Specie (razza)	Valore medio Carry Over %
Vacche da latte (HF)	2-3 %
Bufala Mediterranea Italiana	0,2 %
Pecore (Sarda e Comisana)	< 1 %
Capre (Saanen, Maltese)	< 1 %
Asine (Romagnola)	< 0,02 %



Trasferimento dell'aflatossina M₁ (AFM₁) dal latte al formaggio



Aflatossina M1 (AFM₁) dal latte al formaggio

Durante il processo di caseificazione, l'AFM1 si ripartisce tra cagliata e siero. Diverse sperimentazioni hanno evidenziato che la quantità di AFM1 nel formaggio costituisce una quota variabile ma compresa fra il **40-60%** di quella presente nel latte.

Nel formaggio AFM₁ ha una elevata affinità per la frazione caseinica.

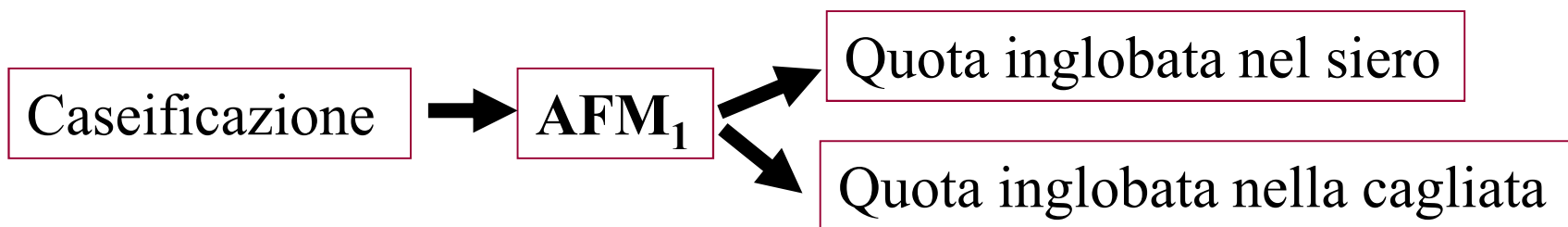
Valori bibliografici evidenziano che la concentrazione risulta mediamente più alta rispetto al latte di partenza di circa **2,5-5,5** volte anche in relazione al tipo di formaggio (fresco o stagionato).





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Fattore di concentrazione



Durante la caseificazione, sia essa presamica, acida o mista, l'AFM₁ si trova principalmente legata alla frazione proteica (caseine) concentrandosi principalmente nella cagliata.

La tecnica di caseificazione ne influenza il contenuto.

$$\text{Fattore di Concentrazione} = \text{AFM}_1 \text{ nel formaggio} / \text{AFM}_1 \text{ nel latte}$$



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



MINISTERO DELLA SALUTE

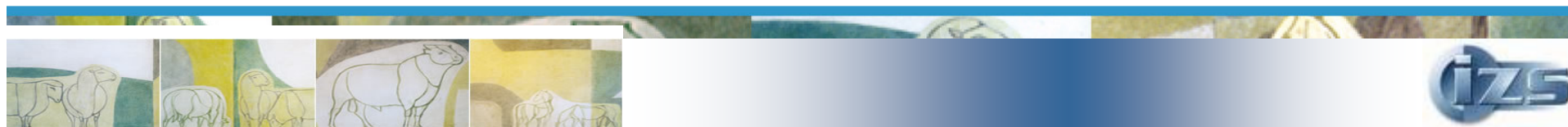
Sezione Sicurezza Alimentare

Comitato Nazionale per la Sicurezza Alimentare (CNSA)

Parere del 24 febbraio 2021 su “Micotossine non regolamentate:
metaboliti dell’aflatossina B1 (aflatossina M1 e aflatossicolo)
e sterigmatocistina in prodotti lattiero-caseari”

Raccomanda di:

effettuare studi specifici per i metaboliti dell’aflatossina B1 e per la sterigmatocistina sul latte e sui suoi derivati per una più accurata valutazione dell’esposizione attraverso il consumo di questi alimenti e dei potenziali rischi per la salute, anche ai fini di un eventuale valutazione di estensione delle misure di controllo

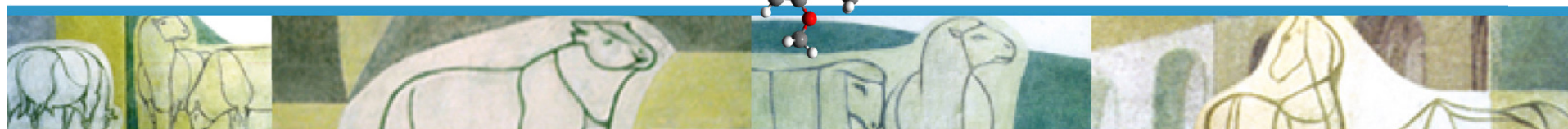
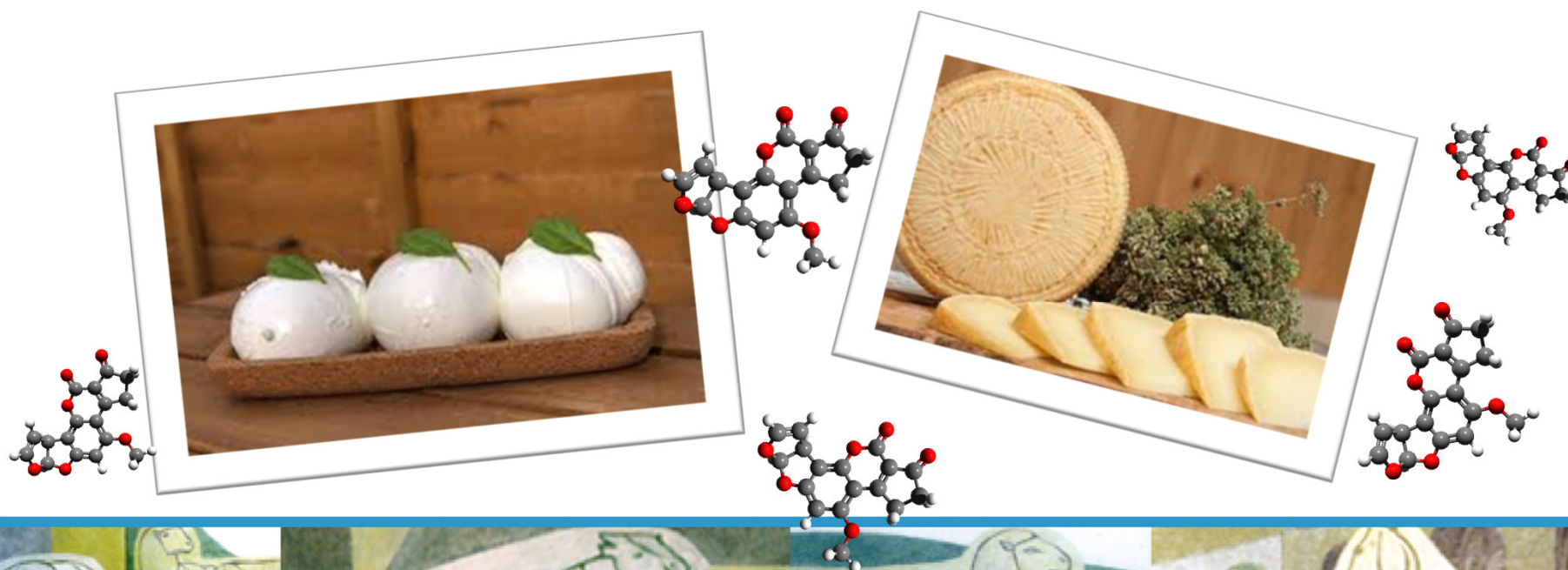




Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Ricerca Corrente IZSLT 01/21 “Strategica”

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



Uno degli obiettivi della ricerca prevedeva la determinazione del Fattore di Concentrazione di AFM1 e STC

- ❑ Caseificazioni sperimentali con **latte naturalmente contaminato da AFM1 e STC**
- ❑ Determinazione del fattore di concentrazione (FC) di AFM1 e Sterigmatocistina (STC) nei formaggi a diverso tempo di stagionatura

Bufalina

Ovina

Caprina



Protocollo Operativo

Gli OSA che avevano conferito campioni di latte di massa, delle 3 specie oggetto di studio, destinati alla determinazione di AFM1 in regime di autocontrollo (presso IZSLT) e che evidenziavano valori prossimi o superiori alla **soglia di attenzione (30 ng/kg)**, venivano contattati per dare la disponibilità a consegnare quantitativi variabili di latte di massa (>3 Litri), sui quali sono state eseguite caseificazioni sperimentali, previa verifica della concentrazione di AFM1.

- Caseificazioni di latte bufalino
- Caseificazioni di latte ovino
- Caseificazioni di latte caprino



Determinazione delle 3 tossine oggetto di studio sul latte e sui prodotti della caseificazione

UUOO IZS Sardegna: latte bufalino

UUOO IZS Umbria e Marche: latte ovino e caprino





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

RC IZSLT 01/21

Fattori di concentrazione Bufala



12 lotti di latte
di massa

11 caseificazioni
sperimentali IZSLT
1 Caseificio aziendale

Determinati nei formaggi:

- **FC_{STC}** (sterigmatocistina)
- **FC_{AFM1}**

Matrice	AFM1 ng/kg	STC ng/kg	FC _{AFM1}	FC _{STC}	MFFB %
Latte	34,93	0,65	1	1	Nd
Mozzarella	76,36	3,16	<u>2,20 (1,35-2,84)</u>	<u>6,10 (2,37-25,0)</u>	74,24
Ricotta	40,77	1,60	<u>1,11 (0,63-1,85)</u>	<u>2,75 (0,51-10,00)</u>	84,92
Acqua di Lavorazione	9,36	nd	<u>0,24 (0,15-0,43)</u>	<u>nd</u>	nd



Concentrazione di AFM1 e STC nelle diverse matrici esaminate (latte, mozzarella e ricotta)

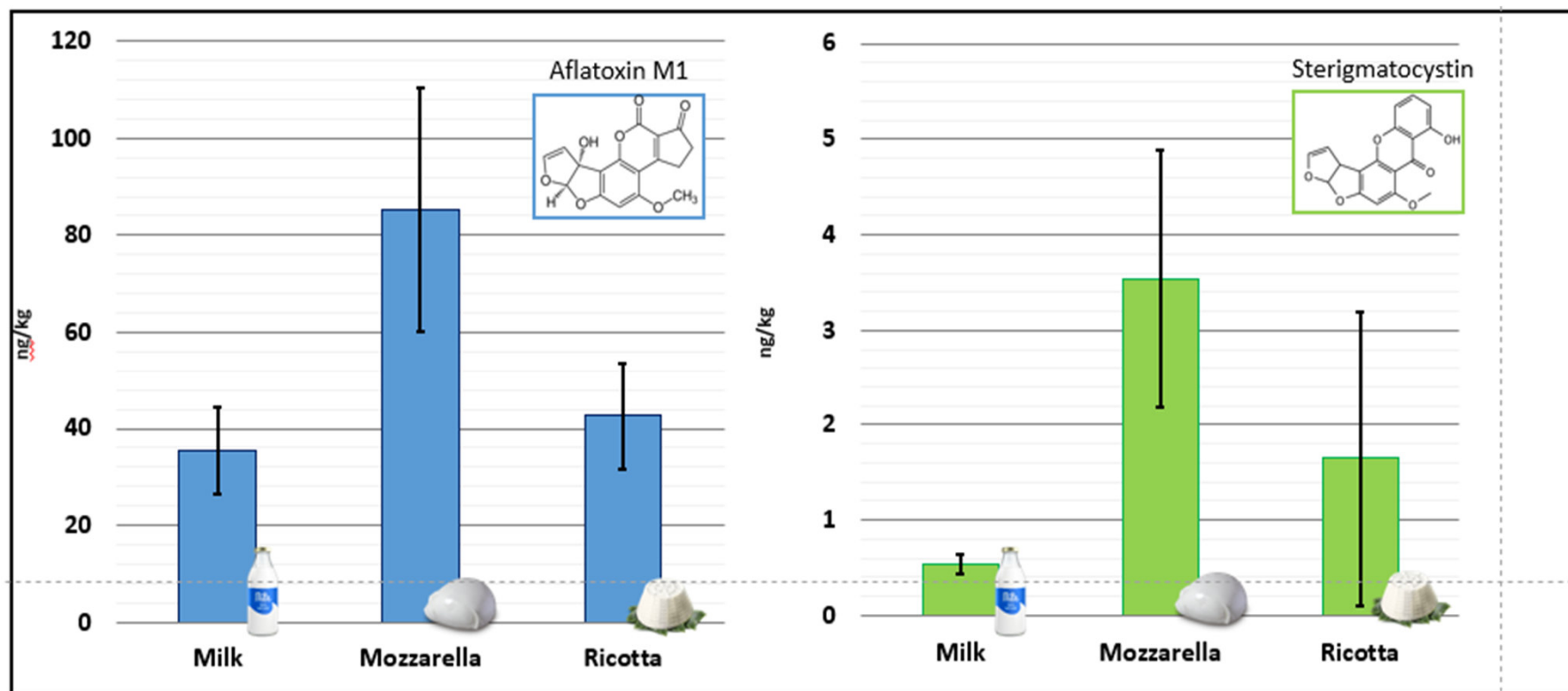


Figure 3. Aflatoxin M1 and sterigmatocystin levels in milk and soft cheeses



Fattore di concentrazione Ovina



6 lotti latte di
massa di
ovino
contaminati

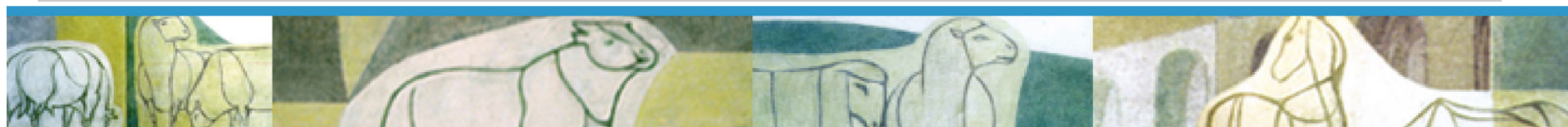


6 caseificazioni
sperimentali

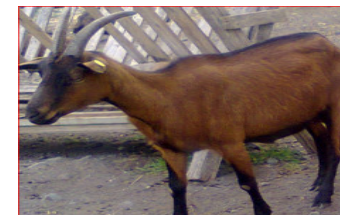


Determinato FC_{AFM1} nei
formaggi: **valori crescenti
all'aumentare del periodo
di stagionatura**

Matrice	AFM1 ng/kg	FC_{AFM1}	MFFB %
Latte	53,57	1	Nd
Formaggio Fresco	136,70	<u>2,94 (2,17-4,19)</u>	70,07
Formaggio 30 gg	138,40	<u>4,35 (3,14-6,75)</u>	47,53
Formaggio 90 gg	157,00	<u>4,41 (2,24-6,58)</u>	45,10
Ricotta	58,57	<u>1,27 (0,53-2,40)</u>	81,55



Fattore di concentrazione Caprina



Matrice	AFM1 ng/kg	FC_{AFM1}	MFFB %
Latte	24,0	1	Nd
Formaggio Fresco	73,0	3,19±0,69	73,51
Formaggio 30 gg	133,5	4,54	51,27
Ricotta	29,5	1,02	78,67



TRASFERIMENTO DI AFM₁ NEL FORMAGGIO

Coefficienti di concentrazione per specie lattifera

Latte → Formaggio ovino:

- da 1.8 a 2.9 (cagliata) (Battacone et al., 2005)
- da 4.3 a **5.6** (Feta) (I. Kaniou-Grigoriadou et al., 2005)
- da 2.0 a 2.7 (cagliata) - 2.7 a 2.9 (formaggio Manchego) (Rubio R. et al., 2011)

Latte → Mozzarella di bufala:

- 1.69 (Mozzarella) (Giangolini et al., 2015)
- 1.05 (Mozzarella) (Pietri et al., 2003)

Latte → Formaggio bovino:

- da 1.4 a 2.2 (Primo sale, Robiola) (Cavallarín et al., 2014)
- **6.7** (Maccagno, pasta dura) (Cavallarín et al., 2014)
- 4.5 (Grana Padano) (Manetta A. C. et al., 2009)



Regolamento UE 1881/2006 della Commissione

del 19 dicembre 2006

che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari

Limite di legge latte 0,05 $\mu\text{g/Kg}$ (50 ng/Kg)

Art. 2: introduce il concetto di **fattori specifici di concentrazione/diluizione** per alimenti sottoposti a trattamento tecnologico.



L'Autorità Competente (AC) come valuta la conformità di un formaggio o di un derivato del siero?

In sede di controllo si possono verificare 2 casi

1) L'OSA fornisce evidenza del **proprio FC** in base a dati analitici eseguiti sui suoi prodotti (latte, formaggio)

L'**AC** esegue il calcolo del limite massimo di AFM1 nel formaggio applicando la formula:

AFM1 lim Max = Limite di legge di AFM1 del latte x FC fornito dall'OSA

L'AC confronta il valore di AFM1 ottenuto dal laboratorio e lo confronta con il valore limite di riferimento calcolato.





2) L'OSA non fornisce il **proprio FC** per i suoi prodotti (latte, formaggio)

L'AC determina prioritariamente il valore di MFFB % (tasso di umidità della materia sgrassata)

$$\text{MFFB} = \frac{\text{Peso acqua formaggio}}{\text{Peso totale - grasso}} \times 100$$

Ricerca la categoria di durezza cui il formaggio campionato appartiene, individuando il FC corrispondente al tipo di specie lattifera (bovina vs non bovina) (nota ministeriale 0070600-23/12/2019 DGSAN)

Per la valutazione dei tenori di aflatossina M1 nei formaggi a base di latte vaccino, il Ministero della salute, con Circolare n.70600 del 23/12/2019, ha adottato i seguenti Fattori di concentrazione (FC), individuati da un gruppo di lavoro *ad hoc* coordinato dal LNR per le Micotossine:

Categoria di formaggi	FC
Formaggi a pasta molle (MFFB $\geq 68\%$)	3
Formaggi a pasta semi-molle ($62 \leq \text{MFFB} < 68\%$)	4
Formaggi a pasta semi-dura ($55 \leq \text{MFFB} < 62\%$) e a pasta dura ($47 \leq \text{MFFB} < 55\%$)	5
Formaggi a pasta extra-dura (MFFB < 47)	6

Per l'aflatossina M1 in formaggi ottenuti da latte non bovino e per i prodotti derivati dal siero si continuano ad applicare i fattori di concentrazione adottati con Circolare del Ministero della salute n.28454 del 3/7/2013, stabiliti con Parere CNSA n. 13 del 10 giugno 2013 (3,0 per i formaggi a pasta tenera e prodotti derivati dal siero; 5,5 per i formaggi a pasta dura).

L'**AC** esegue il calcolo del limite massimo di AFM1 nel formaggio applicando la formula:

AFM1 lim Max = Limite di legge di AFM1 del latte x FC **normato (per specie lattifera e valore di MFFB %)**

L'**AC** determina il valore di «**AFM1 lim Max**» e lo confronta con il valore limite di riferimento.

Categoria di formaggi NON BOVINO	FC	Max AFM₁
Formaggi a pasta tenera (molle e semimolle) e prodotti derivati dal siero	3	0,150 µg/kg
Formaggi a pasta dura (semidura, dura, extradura)	5,5	0,275 µg/kg



CONSIDERAZIONI FINALI

- L'analisi dei risultati, ottenuti dalle caseificazioni sperimentali, ha evidenziato la presenza di AFM1 nel latte e nei prodotti della caseificazione sulle specie animali oggetto di studio.
- La STC è stata determinata sul latte e sui prodotti della caseificazione solo per la specie bufalina, peraltro in soli 8 lotti di produzione su 12 complessivamente analizzati.
- AFX non è stato mai rilevato.
- I Fattori di concentrazione ottenuti dalle caseificazioni sperimentali, con latte naturalmente contaminato da AFM1, sono risultati sovrapponibili a quelli contenuti nella nota ministeriale, pari a 3 e 5,5, validi per le specie lattifere diverse dal bovino.



CONSIDERAZIONI FINALI

- Solo per la specie caprina il FC per i formaggi classificati a «Pasta Tenera» con MFFB > 62%, è risultato pari a 3,19, leggermente superiore al limite di 3, sebbene il numero di caseificazioni era limitato (n. 3) con una incertezza di misura di $\pm 0,69$.
- I Fattori di concentrazione ottenuti dalle caseificazioni sperimentali con latte artificialmente contaminato da AFM1 (con aggiunte di 15, 30, 40, 50, 65 ng/kg), sono risultati compresi da $2,71 \pm 1,20$ (MFFB 66,71%) a $3,47 \pm 1,03$ (MFFB 37,2%) per i formaggi freschi e stagionati a 60 giorni rispettivamente.



CONSIDERAZIONI FINALI

E sugli oltre 440 campioni di formaggi e derivati del siero, previsti dalla ricerca, reperiti sul mercato (GDO, media e piccola distribuzione, caseifici aziendali) quale è ad oggi la situazione circa le tre micotossine studiate?

Characteristic	Bufala, N = 105	Capra, N = 149	Pecora, N = 186
AFLATOXIN M1 (ng/kg)			
Mean	4.97	9.00	7.88
(5%, 95%)	(0.00, 25.00)	(0.00, 41.30)	(0.00, 30.90)
Minimum , Maximum	0.00 , 39.00	0.00 , 111.00	0.00 , 140.00
AFLATOXICOL (ng/kg)			
Mean	0.00	0.00	0.00
(5%, 95%)	(0.00, 0.00)	(0.00, 0.00)	(0.00, 0.00)
Minimum , Maximum	0.00 , 0.00	0.00 , 0.00	0.00 , 0.00
STERIGMOCYSTIN (ng/kg)			
Mean	1.23	3.67	10.00
(5%, 95%)	(0.00, 3.88)	(0.00, 20.20)	(0.00, 10.90)
Minimum , Maximum	0.00 , 12.00	0.00 , 50.00	0.00 , 639.00





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



CRELDOC

**Grazie alle UUOO degli IZZSS che hanno partecipato
alla Ricerca e al pubblico per l'attenzione**

