

DETERMINAZIONE DELL'AFLATOSSINA M₁ NEL LATTE E NEI FORMAGGI OVINI

DETECTION OF AFLATOXIN M₁ IN BULK-TANK MILK AND SHEEP CHEESE

Cossu F., Scarano C., Moniello G., Spanu C., Pittau D., Viridis S., De Santis EPL
Dipartimento di Biologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Sassari.

SUMMARY

The Aflatoxin M₁ (AFM₁) content in 118 bulk-tank sheep milk samples was evaluated using an ELISA commercial kit. During a lactation, three bulk-tank milk samples were collected from each of 40 semi-extensive farms, selected on the basis of high level of concentrate supplementation as risk factor for exposure to Aflatoxin B₁ (AFB₁). The AFM₁ content was also determined in 38 sheep cheese samples collected from a dairy plant where the farms enrolled in the survey shipped the milk. In the three sampling the concentrate supplementation recorded in the farms ranged between (mean±sd) 492.2±257.7 and 397.7±214.3. AFM₁ was detected in 1 bulk-tank sheep milk sample (0.8%) at concentrations as little as 5.2 ng/L while in 117 it was not detectable (<5 ng/L). AFM₁ was also detected in 5 (13.2%) out of 38 samples of ripened sheep cheese at levels (mean±sd) of 58.1±7.8 ng/Kg. A very low AFM₁ content in bulk milk and cheese was observed, as the result of the implementation of good agricultural and good farming practices.

KEYWORDS

Aflatoxin M₁, sheep milk, cheese, ELISA, concentrate feedstuff.

INTRODUZIONE

La frequenza ed il livello di contaminazione da Aflatossina M₁ (AFM₁) nel latte di pecora e di capra è inferiore rispetto a quanto osservato in quello di vacca (1). I principali fattori che determinano tali differenze sono essenzialmente rappresentati dall'esposizione e dal carry-over, inferiori nei piccoli rispetto ai grossi ruminanti. L'esposizione della pecora e della capra all'Aflatossina B₁ (AFB₁) è limitata dal prevalente carattere estensivo o semi-estensivo degli allevamenti, nei quali il ricorso all'integrazione della razione con alimenti zootecnici conservati è contenuto. Nel latte di allevamenti intensivi di capre che ricevevano in corsia alimenti zootecnici conservati è stata osservata una più frequente contaminazione da AFM₁ (1). Gli allevamenti di piccoli ruminanti, negli ultimi decenni, hanno mostrato un progressivo incremento del numero dei capi allevati e del livello delle produzioni, una maggiore infrastrutturazione ed il frequente

ricorso alla somministrazione di alimenti conservati. I mangimi complementari di provenienza extra-aziendale utilizzati nelle aziende ovine in Sardegna per capo allevato, sono passati da valori medi di 13,4 Kg/anno negli anni '80, a 32,7 Kg/anno negli anni '90 e a 48 Kg/anno nel corso del periodo 2000-07 (2). Un fattore che contribuisce a ridurre la contaminazione da AFM₁ del latte di pecora è il carry-over inferiore rilevato in questa specie rispetto a quello osservato nel bovino. Nella vacca il carry-over è infatti compreso tra lo 0,35% ed il 3,0 %, fino a raggiungere il 6,2% nei capi con produzioni elevate (3;4). In pecore di razza Sarda, nel corso di prove sperimentali, il carry-over era compreso tra lo 0,26 e lo 0,33% (5). Nella capra i valori minimi sono confrontabili con quelli osservati per la pecora (0,18%), mentre i valori massimi (3,0%) risultano più elevati (6;7;8). Gli studi condotti in ambiti territoriali omogenei sul latte di differenti specie, mostrano prevalenza e concentrazione dell'AFM₁ inferiori nel latte

ovino rispetto a quelle della vacca (9). Il latte di pecora in Italia è utilizzato per la trasformazione casearia. L'AFM₁ escreta con il latte si lega alle caseine e si concentra nella cagliata. Nei formaggi ovini e caprini, in seguito ai processi di caseificazione e di stagionatura, si realizza una concentrazione dell'AFM₁ pari a 4,3-5,6 volte quella inizialmente presente nel latte (10). Nell'UE non è stato definito un criterio per l'AFM₁ applicabile al formaggio, mentre nel Regolamento CE 1881/2006 (11) è stato definito in 50 ng/Kg il tenore massimo per il latte crudo o destinato alla trasformazione. In alcuni Paesi è stato definito un limite specifico per i formaggi, pari a 200 ng/Kg in Olanda e a 250 ng/Kg in Svizzera, Iran e Turchia. In Italia, il Ministero della Salute, in seguito all'emergenza aflatossina del 2003, aveva definito, per i formaggi a pasta dura tipo grana, un limite "provvisorio" di 450 ng/Kg (12). Tale limite era stato stabilito in relazione al coefficiente di trasformazione rilevato per questa tipologia di formaggio ed al conseguente fattore di concentrazione dell'AFM₁ inizialmente presente nel latte (13). Nel 2009 è stato realizzato un progetto di ricerca sulla contaminazione da AFM₁ nel latte di pecora, in allevamenti nei quali veniva effettuata la somministrazione di elevate quantità di alimenti zootecnici conservati. La ricerca dell'AFM₁ è stata, inoltre, effettuata in campioni di formaggio stagionato prodotti nello stesso stabilimento presso cui veniva conferito il latte degli allevamenti campione.

MATERIALI E METODI

La ricerca è stata condotta in 40 allevamenti di pecore di razza sarda. Le aziende sono state selezionate tra quelle conferenti il latte ad un caseificio cooperativo, situate in un'area ad elevata vocazione agro-zootecnica ed orientate verso modelli gestionali con elevata intensivizzazione. Sulla base dei dati disponibili presso il caseificio, si è proceduto a selezionare gli allevamenti nei quali risultava maggiore l'utilizzazione di alimenti conservati, con un conseguente maggiore rischio di esposizione all'AFB₁. Nel 2009, presso ciascuna azienda, sono stati effettuati tre sopralluoghi (1°, febbraio-marzo; 2°, maggio; 3°, giugno), nel corso dei quali sono stati prelevati i campioni di latte di tank (n=118). Venivano, inoltre, rilevati i dati relativi alla gestione aziendale, con particolare dettaglio per le tecniche di alimentazione e gli alimenti zootecnici utilizzati. In occasione di ciascun sopralluogo venivano prelevati dal tank 250 mL di latte refrigerato, mediante latte-prelevatore sterile. I

campioni venivano trasferiti presso il laboratorio in contenitori refrigerati a temperatura <+4°C. L'idoneità dei campioni (pH≥6,5) per l'analisi veniva accertata mediante misurazione del pH. I campioni venivano quindi suddivisi in due aliquote (10 mL e 100 mL) destinate, rispettivamente, alla determinazione dell'AFM₁ mediante metodica ELISA e all'analisi di conferma mediante HPLC, prevista esclusivamente nel caso di rilevazione di un contenuto di AFM₁ >30 ng/L. Ciascun campione veniva centrifugato a 4000 x g a +4°C per 15', allo scopo di separare il grasso, asportato mediante spatole sterili monouso. L'aliquota del campione utilizzata per l'eventuale analisi in HPLC, veniva conservata a -80°C. La ricerca dell'AFM₁ è stata effettuata anche su 38 campioni di formaggio prodotti nel caseificio in cui veniva conferito il latte delle aziende oggetto di campionamento. I campioni di formaggio analizzati comprendevano: Pecorino Romano (n.34 campioni), prodotto nel periodo febbraio-marzo (n.17), maggio (n.12) e giugno (n.5); Pecorino a pasta semicotta (n.3) e Pecorino a pasta cruda (n.1) prodotti in giugno.

Determinazione del contenuto in AFM₁ nel latte mediante metodica ELISA - L'analisi quantitativa dell'AFM₁ è stata eseguita mediante kit commerciale ELISA (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germania). Gli standard, il bianco e i campioni di latte, analizzati in doppio, sono stati dispensati nei pozzetti della piastra microtiter rivestiti con anticorpi policlonali per l'AFM₁. La piastra veniva incubata in ambiente buio per 60' a +20-25°C. Dopo un primo lavaggio, 100 µL dell'AFM₁ coniugato-perossidasi sono stati dispensati nei pozzetti della piastra. Seguiva ulteriore incubazione in ambiente buio per 60', al termine della quale, l'AFM₁ coniugato-perossidasi non legata agli anticorpi, è stata rimossa con il secondo lavaggio. Nella fase successiva, si è proceduto a dispensare nei pozzetti 50 µL di substrato (urea perossido) e 50 µL di cromogeno (tetrametilbenzidina). Le piastre sono state poste ad incubare per ulteriori 30' al buio e, al termine, la reazione è stata bloccata aggiungendo 100 µL di H₂SO₄ 1M. La misurazione dell'assorbanza è stata effettuata a 450 nm mediante lettore di micropiastre spettrofotometrico Sunrise (TECAN, Grödig, Austria). I valori di concentrazione (ng/L) per gli standard e per i campioni, sono stati calcolati mediante procedura cubic spline del software RIDA SOFT WIN (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germania). Per ciascuno degli standard interni è stata valutata la resa, il coefficiente di variazione (CV) e la media delle

due ripetizioni.

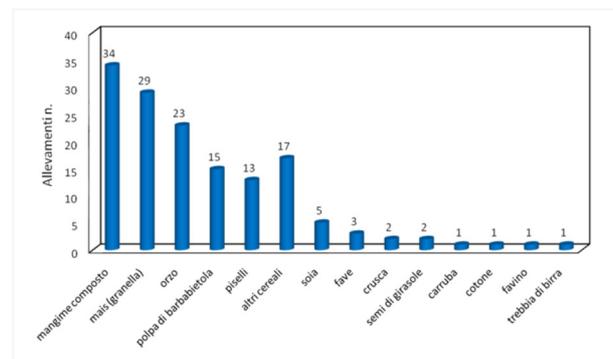
Determinazione del contenuto in AFM₁ nel formaggio mediante metodica ELISA - Da ciascuna forma, 100 g di formaggio venivano prelevati e grattugiati in Sterilmixer (International Pbi, Italia). Per ciascun campione, 2 g dell'omogenato venivano addizionati a 40 mL di diclorometano e tenuti in agitazione per 15' (250 rpm). 10 mL della sospensione filtrata (Millipore, 0,45 µm), venivano portati a secco (Rotavapor, Büchi, Svizzera) in debole corrente di N₂ a +60°C. Il residuo veniva disciolto in una soluzione composta da: 0,5 mL di metanolo, 0,5 mL di Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7,2) e 1 mL di n-eptano. Dopo centrifugazione a 2700 x g per 15' a +15°C, veniva rimosso il surnatante e utilizzata la fase acquosa-metanolica sottostante addizionata con PBS (diluizione 1:5). La determinazione analitica del contenuto di AFM₁, veniva effettuata in duplicato su 100 µL di quest'ultima soluzione, con le stesse modalità indicate per il latte. I valori di concentrazione ottenuti venivano moltiplicati per il fattore di diluizione 10. Il limite di rilevabilità del kit ELISA nel formaggio è di 50 ng/Kg. Anche in questo caso, per ciascuno degli standard interni utilizzati per definire la curva di calibrazione, sono stati valutati la resa, il coefficiente di variazione (CV) e la media delle due ripetizioni.

RISULTATI

La ricerca è stata condotta presso aziende ovine che presentavano una superficie di 80,3±48,0 ha (media±ds). In 30 aziende (75%) una parte della superficie (49,7± 48,7 ha) veniva utilizzata per erbai. La consistenza dei capi presenti in allevamento (media±ds) era di 678±325,7, dei quali 486,7±236,3 in produzione (73,6% del totale). L'alimentazione degli animali era costituita da pascolo su prato naturale o erbaio, con integrazione di concentrati e fieno, in parte di provenienza extra-aziendale (37/40 aziende). Nel grafico 1 sono riportate le tipologie degli alimenti zootecnici utilizzati e la frequenza rilevata negli allevamenti. La conservazione dei fieni e dei concentrati avveniva in maniera corretta. Questi ultimi erano stoccati all'interno di silos (n.32) o in aree coperte ed adeguatamente protette (n.8). La somministrazione degli alimenti zootecnici veniva effettuata in corsia in 10 allevamenti mediante carro miscelatore. In nessuna azienda veniva utilizzato insilato, come previsto nel contratto di fornitura del latte stipulato tra aziende e caseificio. La quantità di concentrati somministrata era rispettivamente di

492,2±227,6 (febbraio-marzo), 405,2±211,2 (maggio) e 397,7±214,2 (giugno) g/die/capo, progressivamente decrescente nel corso della lattazione. Complessivamente sono stati analizzati 118 campioni di latte. In una delle aziende è stato possibile effettuare solo il primo campionamento. Per gli standard interni (SI), utilizzati per definire la curva di calibrazione del test ELISA, la resa ed il CV sono risultati (media di quattro letture, effettuate in duplicato) rispettivamente: 100%, 3,1 (SI 5 ng/L); 99,7%, 0,9 (SI 10 ng/L); 100,2%, 0,9 (SI 20 ng/L); 99,9%, 2,8 (SI 40 ng/L); 100,2%, 3,4 (SI 80 ng/L). In 117 dei 118 campioni di latte analizzati, la concentrazione dell' AFM₁ è risultata inferiore alla sensibilità del metodo (5 ng/L).

Grafico 1. Frequenza dei differenti alimenti zootecnici presenti nella razione alimentare



In un solo campione (0,8%) prelevato in primavera, l'AFM₁ è stata rilevata in concentrazione (5,2 ng/L) prossima al limite di sensibilità del metodo. In relazione ai dati ottenuti, in nessun campione è stata eseguita la conferma mediante HPLC. L'AFM₁ è stata rilevata in 5 dei 38 campioni di formaggio analizzati, in concentrazione di 58,1±7,8 ng/Kg (range 51,9-71,2 ng/Kg) e rispettivamente: a) Pecorino Romano (prodotto a febbraio), n.3 campioni, AFM₁ 53,6±2,3 ng/Kg, (51,9-56,2 ng/Kg); b) pecorino a pasta semicotta, n.1 (giugno), 71,2 ng/Kg; c) pecorino a pasta cruda, n.1 (maggio), 58,4 ng/kg.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Gli allevamenti inclusi nella ricerca sono stati selezionati in un'area territoriale a forte vocazione zootecnica, ove si è già verificata una significativa evoluzione delle aziende ovine verso modelli gestionali atti a incrementare l'efficienza produttiva. La consistenza media dei capi è risultata, infatti, sensibilmente maggiore rispetto a quella regionale, pari a 226 capi per

allevamento nel 2007 (2). In queste aziende, l'elevata utilizzazione degli alimenti conservati comporta un possibile incremento del rischio di esposizione all'AFB₁. Tuttavia i dati rilevati indicano che i mangimi prevalentemente utilizzati appartengono, ad eccezione del mais in granello, soprattutto alle tipologie considerate a rischio basso o trascurabile (14). L'alimentazione in corsia è praticata in parte delle aziende (25%) nel periodo di minore disponibilità di pascolo (inverno). Anche in questi allevamenti, tuttavia, il pascolo copre parte non trascurabile delle esigenze alimentari, con una riduzione del rischio di esposizione all'AFB₁. Nelle indagini condotte in Sardegna ed in altre aree geografiche (9;10;15;16;17;18), nel latte ovino è stata osservata una bassa prevalenza di campioni contaminati da AFM₁ e le concentrazioni rilevate erano sempre inferiori al limite massimo ammissibile nell'UE (11). Soltanto in 5 dei 38 formaggi analizzati è stata rilevata una contaminazione da AFM₁ in concentrazione contenuta, come rilevato in precedenti indagini condotte su altre tipologie di prodotti ottenuti da latte di pecora (10). I risultati ottenuti mostrano che nelle aziende ove è maggiore l'intensivizzazione dei fattori di produzione e nelle quali è più ampio il ricorso agli alimenti zootecnici conservati, il rischio di contaminazione da AFM₁ è mitigato e controllato dalle migliori capacità gestionali. I mezzi e le competenze tecniche disponibili presso tali aziende, hanno favorito la progressiva adozione di procedure (GAP, GMP) efficaci nell'evitare l'introduzione di alimenti zootecnici contaminati dall'esterno dell'azienda, ridurre la contaminazione ed il successivo sviluppo di miceti tossigeni negli alimenti nelle varie fasi della produzione, lavorazione e stoccaggio, fino all'utilizzazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Viridis, S., Corgioli, G., Scarano, C., Pilo, A.L., De Santis E.P.L. (2008). Occurrence of Aflatoxin M₁ in tank bulk goat milk and ripened goat cheese. *Food Control*, 19, 44–49.
2. Idda, L., Furesi, R., Pulina, P. (2010) Economia dell'allevamento ovino da latte. Produzione, trasformazione, mercato. Franco Angeli, Milano. 81.
3. Frobish, R.A., Bradley, D.D., Wagner, D.D., Long-Bradley, P.E., Hairston, H. (1986). Aflatoxin residues in the milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain. *J. Food Prot.*, 49, 781-785.
4. Veldman, A., Meijst, J.A.C., Borgrevve, G.J., Heeres Van Der Tol, J.J. (1992). Carry over of aflatoxin from cows' food to milk. *Anim. Prod.*, 55, 163-168.
5. Battacone, G., Nudda, A., Palomba, M., Pascale, M., Nicolussi, P., Pulina, G. (2005). Transfer of aflatoxin B₁ from feed to milk and from milk to curd and whey in dairy sheep fed artificially contaminated concentrates. *J. Dairy Sci.*, 88, 3063-3069.
6. Goto, T., Hsieh, D.P. (1985). Fractionation of radioactivity in the milk of goats administered ¹⁴C-Aflatoxin B₁. *Journal of AOAC*, 68, 456–458.
7. Nageswara Rao, S.B., Chopra, R.C. (2001). Influence of sodium bentonite and activated charcoal on aflatoxin M₁ excretion in milk of goats. *Small Rum. Res.*, 41, 203-213.
8. Stoloff, L. (1980). Aflatoxin in perspective. *Journal of Food protection*, 43, 226–230.
9. Hussain, I., Anwar, J., Rafiq Asi, M., Ali Munawar, M., Kashif, M. (2010). Aflatoxin M₁ contamination in milk from five dairy species in Pakistan. *Food Control*, 21, 122–124.
10. Kaniou-Grigoriadou, I., Eleftheriadou, A., Mouratidou, T., Katikou, P. (2005). Determination of Aflatoxin M₁ in ewe's milk samples and the produced curd and Feta cheese. *Food Control*, 16, 257–261.
11. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea (G.U.C.E.) 2006. Regolamento (CE) N. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. L 364/5 del 20 dicembre 2006, 5–24.
12. Ministero della Salute, 2004. Nota D.G.V.A/IX/25664/f.5.b.b.2/P "Metodi di campionamento e di Analisi per la ricerca di aflatossine nei formaggi".
13. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana (GURI) 2003. Decreto MIPAF 21 gennaio 2003, Modalità di applicazione del Regolamento CE n.1392/2001 in materia di quote latte. Serie generale, n.57 del 10 marzo 2003.
14. Anonimo (2005) Latte bovino: come difendersi dalle aflatossine. *Agricoltura*, 91-99.
15. De Santis, E.P.L., Mazzette, R., Viridis, S., Caria, A., Nieddu, M. P. (2000). Improvement factors of hygienic milk quality. *Proceedings of international congress food production and quality of life*, 2, 579–585.
16. Minervini, F., Visconti, A., Montagna, M.T., Botalico A. (2001). Presenza di aflatossina

- M₁ in formaggi dell'Italia Meridionale. *In-Industrie Alimentari*, 40, 513-516.
17. Palomba, M., Battacone, G., Brundu, F., Pulina, G. (2003). A new LC-MS method for the determination of aflatoxin M₁ concentration in ovine milk, cheese and ricotta. *XXXVIII Simp. Int. Zootechnia "Milk & Research"*. Lodi, 30 Maggio, 233-237.
18. Roussi, V., Govaris, A., Varagouli, A., Botsoglou, N.A. (2002). Occurrence of aflatoxin M₁ in raw and market milk commercialized in Greece. *Food Addit. Contam.*, 19, 863-868

Ricerca eseguita con finanziamento della Regione Autonoma della Sardegna, Ricerca Sanitaria Finalizzata 2007