



Campionamento e analisi delle micotossine

Emma Tealdo, Veneto Agricoltura

5.1 Introduzione

Un corretto campionamento è il presupposto essenziale per un metodo analitico affidabile, tenendo presente che il risultato che si ottiene è sempre riferito al campione esaminato.

Tutte le operazioni di campionamento devono essere condotte in condizioni tali da garantire la sicurezza degli operatori e la protezione del campione da eventuali contaminazioni esterne.

La quantità di campione, per essere adeguata all'analisi delle micotossine, deve essere il più possibile rappresentativa della partita iniziale da campionare, considerando che la distribuzione delle micotossine è molto variabile in funzione del tipo di matrice da campionare.

Le matrici liquide sono considerate omogenee; un adeguato campionamento richiede in genere un'accurata agitazione del prodotto prima di effettuare i prelievi dei campioni destinati all'analisi delle micotossine. Nei prelievi di latte di massa effettuati in azienda, ad esempio, il campionamento può essere effettuato direttamente dalla vasca di refrigerazione dopo aver azionato il sistema di miscelazione.

Matrici quali le farine e i mangimi in polvere sono da ritenere abbastanza omogenei, ma deve essere valutata la rappresentatività del campione anche in relazione alle condizioni di stoccaggio.

Matrici quali le granelle, i semi, i fieni e gli insilati sono disomogenei e in genere la distribuzione delle micotossine è molto casuale. I cereali sono spesso stoccati in cumuli o silos generalmente di notevoli dimensioni: il prelievo di campioni rappresentativi da masse di questo tipo è molto difficoltoso e oneroso, inoltre la contaminazione da micotossine ha una distribuzione a macchia di leopardo che rende difficile ottenere campioni adeguati, nonostante l'applicazione di rigorosi protocolli di campionamento.

Per un buon campionamento si devono quindi considerare innanzitutto le caratteristiche della matrice; l'omogeneità del campione di partenza è un buon presupposto per un campionamento significativo:

- **granelle e semi** in genere sono matrici difficili da campionare per la distribuzione eterogenea delle micotossine e per le caratteristiche granulometriche delle matrici stesse;
- **farine e mangimi** sono omogenei ma in questo caso la significatività del



campionamento può essere influenzata dalle modalità e condizioni di stoccaggio. Le farine stoccate in silos verticali possono presentare differenze di umidità e temperatura fra esterno e interno della massa e quindi il prelievo deve essere effettuato in punti diversi;

- **unifeed** presenta una notevole disomogeneità in funzione della sua composizione, delle caratteristiche dei singoli componenti e della qualità della miscela;
- **insilati** possono essere disomogenei, il prelievo degli insilati in trincea orizzontale (silomais) dovrebbe essere rappresentativo di tutto il fronte di taglio, ad esclusione del cappello che comunque deve essere scartato;
- **fieni** costituiscono una matrice difficile da campionare: le micotossine eventualmente presenti possono essere diversamente distribuite nella/e balla e, in funzione delle condizioni di conservazione della /e stessa/e, della composizione e della qualità del prodotto di fienagione, il prelievo dovrebbe comprendere diverse balle e punti diversi (interno, esterno) delle stesse;
- **sacchi di farine e cumuli di alimenti** possono presentare problemi di attacchi fungini a causa di zone particolarmente umide a contatto con il terreno e/o per percolazione di acqua. Anche in questo caso il prelievo deve avvenire in punti diversi.

Sia che si tratti di matrici liquide che solide, si deve tener presente il tipo di partita, che può presentarsi come merce sfusa, imballaggio singolo o confezione al dettaglio. Al campionamento è associato circa l'80-90% dell'errore sul risultato analitico finale ed è dovuto essenzialmente alla:

- distribuzione eterogenea delle micotossine nel prodotto da campionare (in genere la contaminazione da micotossine è puntiforme con distribuzione a macchia di leopardo);
- grandezza del campione (basso numero di campioni elementari, scarsa rappresentatività dei punti campionati, inadeguata grandezza del campione globale, scarsa omogeneizzazione del campione globale prima del prelievo del campione finale).

5.2 Campionamento

Presupposto importante perché il campione elementare sia rappresentativo del lotto iniziale è che il campionamento sia casuale.

Si distinguono due tipi di campionamento:

- statico: i prelievi vengono effettuati in punti diversi di una massa stoccata;
- dinamico: i prelievi vengono effettuati a tempi diversi di una massa in movimento.

Il *campionamento statico* richiede l'impiego di sonde, è di difficile attuazione, e l'errore aumenta con l'aumentare delle dimensioni e del tipo di massa stoccata.



Nei prodotti in cui la distribuzione delle micotossine è molto eterogenea



80-90% dell'errore è associato al campionamento



- CONFEZIONI
- SACCHI
- VAGONI
- SILOS



Il *campionamento dinamico* è più facile da realizzare, i campioni elementari si prelevano dai nastri trasportatori e si utilizzano campionatori automatici. La frequenza di prelievo dei campioni elementari dipende dalla velocità e dalle dimensioni del flusso e dalle dimensioni del campione totale.



Le modalità di campionamento sono oggetto di normative che indicano i passaggi, le quantità e modalità di campionamento per l'analisi delle micotossine nei cereali e prodotti derivati e nel latte destinati all'alimentazione umana e animale.

Il campionamento dei mangimi si basa sul Decreto Ministeriale 20/04/1978 – GU 165 del 15/6/1978 “Modalità di prelievo dei campioni per il controllo ufficiale del tenore di aflatossine degli alimenti per animali” che prescrive le condizioni operative descritte in Tabella 3. Il prelievo degli alimenti per il controllo di sostanze, come le aflatossine, che possono essere distribuite in modo non

Tab. 1 - Legislazione, campionamento ufficiale e metodi di analisi di riferimento

Micotossina	Limiti legislativi	Metodo di campionamento	Metodo di analisi di riferimento
Aflatossina B ₁ Alimentazione animale	Dir. 2002/32/CE	D.M. 20/04/1978	
Aflatossina B ₁ Aflatossine totali (B+G) Aflatossina M ₁ Alimentazione umana	Reg. CE 472/2002 Reg. CE 2174/2003 Reg. CE 683/2004	Reg. CE 401/2006 (*)	Reg. CE 401/2006 (*)
Fumonisine Deossivalenolo Zearalenone Tossina T ₂ e HT-2 Alimentazione umana	Reg. CE 856/2005	Reg. CE 401/2006 (*)	Reg. CE 401/2006 (*)
Ocratossina A Alimentazione umana	Reg. CE 472/2002 Reg. CE 683/2004	Reg. CE 401/2006 (*)	Reg. CE 401/2006 (*)

(*) Il Reg. CE 401/2006, che entrerà in vigore dal 1 luglio 2006, riunisce in un unico atto giuridico i metodi di campionamento e di analisi delle micotossine, abrogando le direttive 98/53/CE, 2002/26/CE, 2003/78/CE e 2005/38/CE.

Tab. 2 - Modalità di campionamento per i cereali e prodotti derivati (aflatossina B₁, aflatossine totali, ocratossina A, *fusarium*-tossine Reg. CE 401/2006)

Prodotto	Peso delle partite (t)	Peso o n. delle sottopartite	n. di campioni elementari	Campione globale (kg)
	> 1500	500 t	100	10
Cereali e prodotti derivati	300 - 1500	3 sottopartite	100	10
	50 - 300	100 t	100	10

(*) in funzione del peso della partita

uniforme richiede che la massa da campionare deve essere suddivisa in subunità da trattare separatamente e suddividere in campioni elementari in base alle dimensioni della partita. Per il prelievo dei foraggi, non previsto da queste norme, si può far riferimento alle indicazioni fornite dalle norme ISO (ISO 6497:2002) che oltre a dare indicazioni sulle modalità di prelievo delle granelle e farine prende in considerazione fieni, foraggi freschi e insilati (Tab. 4). Nel caso di insilati conservati in trincea, poiché è possibile prelevare solo sulla superficie di taglio, si può effettuare il prelievo dei campioni elementari lungo la diagonale del fronte, in modo che il campione globale rappresenti diversi livelli.

Nella realtà aziendale, tali modalità, sicuramente molto corrette, non sono di facile esecuzione per le difficoltà di attuazione, mancanza dei mezzi tecnici idonei e anche del tempo che tali metodi richiedono. Tuttavia, si deve tenere presente che una corretta procedura prevede:

- un campionamento rappresentativo (per numero di sottocampioni, punti di prelievo, grandezza del campione globale);
- un'accurata omogeneizzazione del campione globale;
- una quantità di campione adeguata all'analisi: campioni insufficienti (< 100 g) non sono rappresentativi, soprattutto nel caso di matrici non omogenee; quantitativi elevati creano difficoltà al momento della miscelazione, prima del prelievo per l'analisi, rischiando di compromettere le precedenti fasi di campionamento,
- conservazione del campione prima dell'analisi in luogo fresco e asciutto se l'analisi è effettuata entro le 24 – 48 ore; congelare per tempi più lunghi.

I principali errori del campionamento:

- basso numero di campioni elementari (quantitativo di campione prelevato in un solo punto della partita o sottopartita)
 - scarsa rappresentatività dei punti di campionamento
 - insufficiente e inadeguata grandezza del campione globale (campione che deriva dall'aggregazione di tutti i campioni elementari prelevati dalla partita o sottopartita)
 - inadeguata conservazione del campione dopo il prelievo (se al prelievo non segue immediatamente l'analisi, i campioni devono essere conservati stabilizzandone l'umidità o precedendo con il congelamento del campione).
-

Alcuni suggerimenti

Alimenti secchi e umidi devono essere campionati in modo diverso:

- **Campionamento di alimenti secchi** con umidità inferiore al 15% come semi secchi, fieno e concentrati:
 - prendere 8 – 12 campioni ogni 3-5 partite di merce rimossa dallo stoccaggio,
 - mescolare bene i sottocampioni e raccogliere un campione di 500 g,
 - unire 3 – 5 campioni, mescolare e prendere 500 g per il campione finale da inviare al laboratorio,
 - conservare i campioni in sacchetti di carta a doppio strato, in un luogo asciutto, fino alla consegna al laboratorio.oppure
 - prendere 12 – 20 campioni sul flusso di materiale di scarico, oppure con una sonda da un contenitore. Prelevare i campioni a diverse profondità e ai lati. I campioni vanno formati mediante prelievi casuali, tenendo conto che le muffe tendono a formarsi nelle parti laterali dei contenitori e sulla sommità,
 - mescolare i sottocampioni e prelevare il campione finale di 500 g da inviare al laboratorio.
- **Campionamento di alimenti umidi** con un'umidità superiore al 15% come semi umidi, silomais:

- prendere 8 – 12 campioni ogni 3-5 partite di alimenti rimossi dallo stoccaggio,
- mescolare bene i sottocampioni e raccogliere un campione di 1 kg,
- unire 3 – 5 campioni, mescolare e prendere 1 kg per il campione finale da inviare al laboratorio,
- mettere i campioni in sacchetti di plastica, avendo cura di far uscire l'aria, e conservare in congelatore fino alla consegna al laboratorio.

Tab. 3 - Modalità di prelievo degli alimenti per il controllo di sostanze, come le aflatossine, che possono essere distribuite in modo non uniforme (D.M. 20/04/1978)

Tipo di alimento	Numero di campioni elementari	Campione globale <i>Quantità minima</i>	Campione finale <i>(*)</i>
<i>Alimenti alla rinfusa</i>			
< 1 t			
1-10 t	Minimo 7 - Massimo 40	4 Kg	500g
> 40 t			
<i>Alimenti confezionati</i>	<i>n. confezioni</i>		
Partita 1-16 confezioni	4	4 Kg	500 g
Partita > 16 confezioni	Minimo 4 - Massimo 40		

(*) ad ogni campione globale corrisponde un campione finale

Tab. 4 - Campionamento dei foraggi (ISO 6497:2002)

Tipo di alimento	Campioni elementari <i>(min 10 - max 40)</i>	Campione globale <i>(massimo)</i>	Campione finale <i>(minimo)</i>
Foraggi freschi ed insilati	0,2 kg	20 kg	1 kg
Foraggi affienati ed essiccati	0,1 kg	10 kg	1 kg

Definizioni

- **Partita:** Quantità identificabile di prodotto alimentare consegnata in una sola volta e avente caratteristiche comuni (origine, varietà, tipo di imballaggio) ufficialmente riconosciute
- **Sottopartita:** Porzione di una grande partita fisicamente separata ed identificabile
- **Campione elementare:** Quantitativo di materiale prelevato in un solo punto della partita o sottopartita
- **Campione globale:** Campione ottenuto dall'aggregazione di tutti i campioni elementari prelevati dalla partita o dalla sottopartita
- **Campione di laboratorio:** Campione destinato al laboratorio di analisi

5.3 Analisi delle micotossine nel mais

La determinazione del contenuto in micotossine dipende, oltre che dalla correttezza dell'analisi eseguita in laboratorio, dal campionamento del materiale da esaminare. Errate procedure di campionamento rappresentano la principale fonte di errore nella determinazione delle micotossine. Tuttavia non sono

trascurabili le fasi di conservazione e preparazione del campione da sottoporre all'analisi. I campionamenti devono essere preparati (soprattutto omogeneizzati) con cura, evitando il più possibile l'esposizione alla luce, dato che le aflatoossine si decompongono alla luce ultravioletta.

Le micotossine sono contaminanti presenti in concentrazione molto basse, espresse con le seguenti unità di misura:

ppm (parti per milione)	➤	mg/kg = $\mu\text{g/g}$	1 ppm = 1000 ppb
ppb (parti per bilione)	➤	$\mu\text{g/kg}$ = ng/g	1 ppb = 1000 ppt
ppt (parti per trilione)	➤	ng/kg	

Per misurare analiti a così bassi livelli di concentrazione è necessario disporre di metodiche analitiche molto accurate, sensibili e specifiche.

Negli ultimi anni sono state sviluppate numerose tecniche idonee a queste determinazioni che richiedono l'applicazione di una serie di fasi sequenziali:

- 1) estrazione della micotossina dalla matrice utilizzando soluzioni estraenti, metodi e tempi di miscelazione adeguati alle proprietà chimico-fisiche della micotossina da estrarre e della matrice che la contiene;



Cromatografo liquido ad alta pressione (HPLC)

Tipi di errori connessi con la filiera analitica



partita

Errore di campionamento



campione

Errore di sottocampionamento



sotto campione

Errore di analisi



analisi

- 2) purificazione dell'estratto al fine di ridurre o eliminare le sostanze interferenti utilizzando colonnine per estrazione in fase solida (SPE) o di immunoaffinità (IAC);
- 3) separazione e quantificazione delle micotossine mediante tecniche cromatografiche. La cromatografia liquida (HPLC) è la tecnica attualmente più utilizzata e di riferimento per l'elevata sensibilità e specificità.

Benché i metodi cromatografici garantiscano un'elevata sensibilità e specificità, la necessità di eseguire monitoraggi su un gran numero di campioni in tempi brevi, e a costi più contenuti, ha portato alla messa a punto di diversi metodi rapidi e di più facile esecuzione.

Tra questi vi sono i test immunoenzimatici, come il test ELISA, attualmente disponibili per la determinazione di diverse micotossine.

Oltre ai kit quantitativi, sono disponibili test di screening qualitativi per la verifica della presenza o assenza della micotossina che possono anche fornire indicazioni semi-quantitative del livello di concentrazione. Anche questi si basano su procedimenti immunoenzimatici: gli anticorpi sono fissati su un supporto solido, il legame con le micotossine si evidenzia attraverso una variazione di colore che si verifica a valori di concentrazione prefissati.

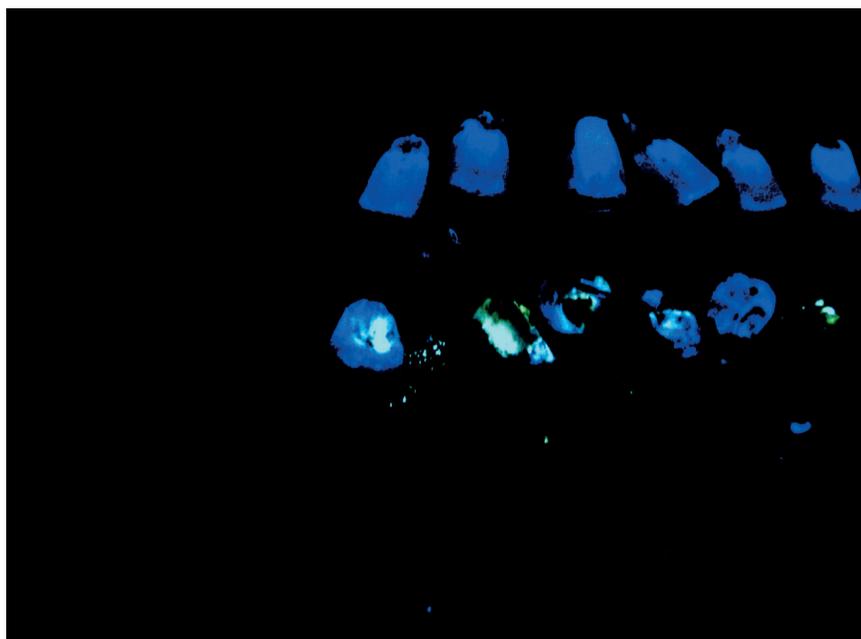


Test ELISA

La fluorimetria è una tecnica per la determinazione delle aflatossine nel mais che accoppia la preparazione del campione tramite passaggio in colonne di immunoaffinità con la lettura in un fluorimetro. Il metodo è abbastanza semplice e di veloce esecuzione.

Un metodo molto rapido utilizzato per rilevare l'ammuffimento del mais, consiste nell'esaminare i campioni con luce UV (365 nm) in camera oscura. I campioni possono emettere una luce fluorescente, tuttavia la fluorescenza non è data dalle aflatossine ma da un metabolita prodotto da *Aspergillus flavus* (lo stesso fungo che può produrre le aflatossine), denominato acido Kojico, in presenza di un enzima (perossidasi) localizzato a livello dei tessuti freschi della granella e della pianta. Poiché il fungo può produrre l'acido Kojico, ma non le aflatossine, i campioni che presentano fluorescenza si devono analizzare per confermare l'eventuale presenza della micotossina.

I metodi rapidi sono di utile applicazione nelle fasi di screening dei campioni poiché consentono di velocizzare i processi di controllo, tuttavia i risultati



Fluorescenza di granella di mais attaccata da *Aspergillus* (foto R. Causin)

ottenuti con tali test, soprattutto per valori vicini al limite di legge, devono essere confermati successivamente con tecniche cromatografiche (HPLC). La necessità di disporre di metodi in grado di rilevare concentrazioni molto basse e di risolvere le problematiche legate alla preparazione di matrici piuttosto complesse rende indispensabile un continuo miglioramento delle tecniche analitiche, ma queste da sole non saranno sufficienti a garantire una corretta valutazione di una partita di alimenti se a monte non sarà effettuato un corretto campionamento. Errate procedure di campionamento rappresentano la fonte principale di errore per analiti distribuiti in modo eterogeneo all'interno di un lotto. L'ampiezza dell'errore dovuto al campionamento è molto più grande di quella derivante dall'analisi.

Riassumendo... Il campionamento

Un corretto piano di campionamento è fondamentale per la determinazione dell'eventuale contenuto in micotossine nel materiale da esaminare. Errori di campionamento rappresentano infatti la principale fonte di errore nei test analitici.

I campionamenti eseguiti su cumuli di granella stoccate in sili o magazzini sono facilmente soggetti a errori, in quanto la distribuzione delle micotossine è molto casuale, per cui occorrerà eseguire:

- un adeguato numero di sottocampioni, in diversi punti di prelievo
- un'accurata omogeneizzazione del campione globale e successivo prelievo del campione finale
- una corretta conservazione del campione, stabilizzandone l'umidità