



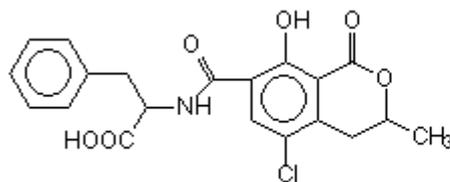
Presenza di Ocratossina in fegati di galline ovaiole in Umbria

Presence of Ochratoxin in livers of hens in Umbria Region (Italy)

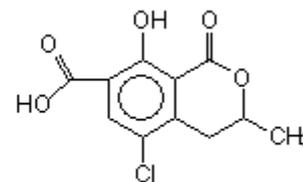
Pecorelli I., Bibi R., Pelli S., Lattanzio V., Solfrizzo M., Sonaglia L., Cenci T.

Abstract. This research studies micotoxins, secondary metabolites of microscopic fungi, known for their toxicity to humans and animals. this paper outlines the results of a sampling carried out in a stock farm of laying hens in Umbria (Italy) that were fed with poultry-feed contaminated by Ochratoxin A (OTA). The livers of four hens were analysed by HPLC with fluorescence detection. To confirm the results obtained, livers were extracted again, purified and analyzed by LC-MSMS with ESI operating in negative ions mode. The presence of OTA was confirmed in all four liver extracts. The presence of OTA in tissue and animal organ samples, used for human consumption may represent a risk to consumers. Furthermore, according to the report and recommendations of the European Food Safety Authority (EFSA) additional data on the presence of OTA in animal tissue in relation to human and animal health need to be acquired.

Riassunto. In questa ricerca sono studiate le micotossine, metaboliti secondari di funghi microscopici, note per la loro tossicità per l'uomo e gli animali. Questo lavoro descrive i risultati di un campionamento effettuato in un allevamento di galline ovaiole umbro nel quale erano stati somministrati mangimi contaminati con Ocratossina A (OTA). I fegati di quattro galline sono stati analizzati mediante HPLC con rivelatore a fluorescenza. Per la conferma dei risultati ottenuti, i fegati sono stati riestratti, purificati ed analizzati mediante HPLC-MS/MS con interfaccia ESI operante in ioni negativi. La presenza di OTA è stata confermata in tutti e quattro gli estratti di fegato. La presenza di OTA in campioni di tessuti e organi di animali destinati al consumo umano può rappresentare una fonte di assunzione da parte del consumatore. Anche in relazione a quanto stabilito dall'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) sarà necessario acquisire ulteriori dati sulla presenza di OTA nei tessuti animali sia in relazione alla salute degli stessi che all'esposizione umana.



Ocratossina A



Ocratossina α

Introduzione

Le micotossine sono metaboliti secondari di funghi microscopici note per la loro tossicità per l'uomo e gli animali. Tra le più conosciute ricordiamo l'ocratossina A (OTA) prodotta da varie specie di funghi quali *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus* e *A. carbonarius*. L'OTA è in grado di contaminare molte derrate alimentari quali cereali e derivati (birra), uve e derivati (mosto, vino), frutta secca e caffè. A causa delle sue riconosciute proprietà cancerogene, nefrotossiche, teratogene, immunotossiche e probabilmente neurotossiche i tenori massimi di questa micotossina nelle derrate alimentari sono fissati dal Regolamento (CE) 123/2005 che modifica il Regolamento (CE) 466/2001.

Al fine di tutelare la salute degli animali e, al contempo, garantire la salubrità degli alimenti attraverso tutta la filiera produttiva è stata recentemente emanata la Raccomandazione della Commissione del 17 agosto 2006 che indica agli stati membri i tenori massimi di OTA negli alimenti ad uso zootecnico. Precedentemente, anche in relazione ai recenti casi di importazione di ingenti quantità di cereali contaminate con la suddetta micotossina, il legislatore nazionale ha provveduto a normare i livelli di OTA nei mangimi mediante il Decreto del Ministero della Salute del 15 maggio 2006 che fissa in 50 µg/kg il tenore massimo di OTA nei mangimi per pollame e suini.

Nonostante sia noto dalla letteratura che l'OTA possa contaminare i tessuti di animali monogastrici, quali suini e pollame, alimentati con mangimi contenenti la micotossina, non esistono dati esaustivi sulla sua diffusione e sul suo metabolismo.

Questo lavoro descrive i risultati di un campionamento effettuato in un allevamento di galline ovaiole umbro nel quale erano stati somministrati mangimi contaminati con OTA.



Figura 1. aspetto dei campioni di fegato analizzati

Materiali e metodi

I fegati di quattro galline sono stati analizzati con un metodo analitico specifico (Monaci L., et al, 2005) che prevede l'estrazione con H₃PO₄ 1M ed etile acetato, la purificazione degli estratti su colonne di immunoaffinità e la determinazione dell'OTA mediante HPLC con rivelatore a fluorescenza (FLD) (λ_{ex} 334 nm; λ_{em} 460 nm) utilizzando una colonna RP C18 Phenomenex Luna (250 x 3,0 mm, 5 µm), Flusso 0,4 ml/min, Volume iniettato 20 µl. Eluizione isocratica (fase mobile ACN/AcOH 4% 50/50).

Per la conferma dei risultati ottenuti, i fegati sono stati riestratti, purificati ed analizzati mediante HPLC-MS/MS con interfaccia ESI operante in ioni negativi. Per le analisi HPLC-MS/MS è stata utilizzata una colonna RP C18 Phenomenex Synergi Hydro (150 x 2,0 mm, 4 µm), Flusso 0,2ml/min, Volume iniettato 20 µl. Eluizione in gradiente (fase mobile ACN/H₂O/0.1% AcOH).

OTA e OT α sono state determinate monitorando le transizioni indicate in Tabella 1

Tabella 1: Analisi LC-MSMS: Transizioni monitorate [Condizioni MS: Sorgente Electrospray (ESI); Rivelazione in Ioni Negativi; Multiple Reaction Monitoring]		
Micotossina	Ione Precursore (Q1, m/z)	Ione Figlio (Q3, m/z)
OTA	402.0	358.1
	402.0	210.5
	402.0	167.0
OT α	255.0	211.0
	255.0	167.1
	255.0	122.9

Risultati e discussione

La presenza di OTA è stata confermata in tutti e quattro gli estratti di fegato a livelli riportati in Tabella 2:

Tabella 2 [OTA] in $\mu\text{g/Kg}$			
Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4
0.685	0.124	0.074	0.171

Dall'indagine in HPLC/FLD e HPLC-MS/MS risulta, inoltre, la presenza, nei quattro campioni analizzati, di OT α un metabolita prodotto dall'idrolisi enzimatica dell'OTA.

Conclusioni

La presenza di OTA in campioni di tessuti e organi di animali destinati al consumo umano può rappresentare una fonte di assunzione da parte del consumatore. Attualmente solamente in due paesi il livello di OTA in tessuti animali è normato (FAO, 2003); (Danimarca - rene suino - 25 $\mu\text{g/Kg}$ ed Estonia - fegato suino - 10 $\mu\text{g/Kg}$) mentre in Italia esiste una circolare ministeriale (Ministero della Salute, 1999) che indica un livello massimo di OTA nella carne di suino pari a 1 $\mu\text{g/Kg}$. Inoltre alcuni paesi, tra i quali Svezia e Slovenia, includono nei loro piani di controllo la OTA tra le micotossine da ricercare negli alimenti di origine animale.

Anche in relazione a quanto stabilito dall'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) (EFSA Journal, 2004) è necessario acquisire ulteriori dati sulla presenza di OTA nei tessuti animali sia in relazione alla salute degli stessi che all'esposizione umana implementando studi sulla presenza di questa sostanza nei tessuti animali e nei loro sottoprodotti.

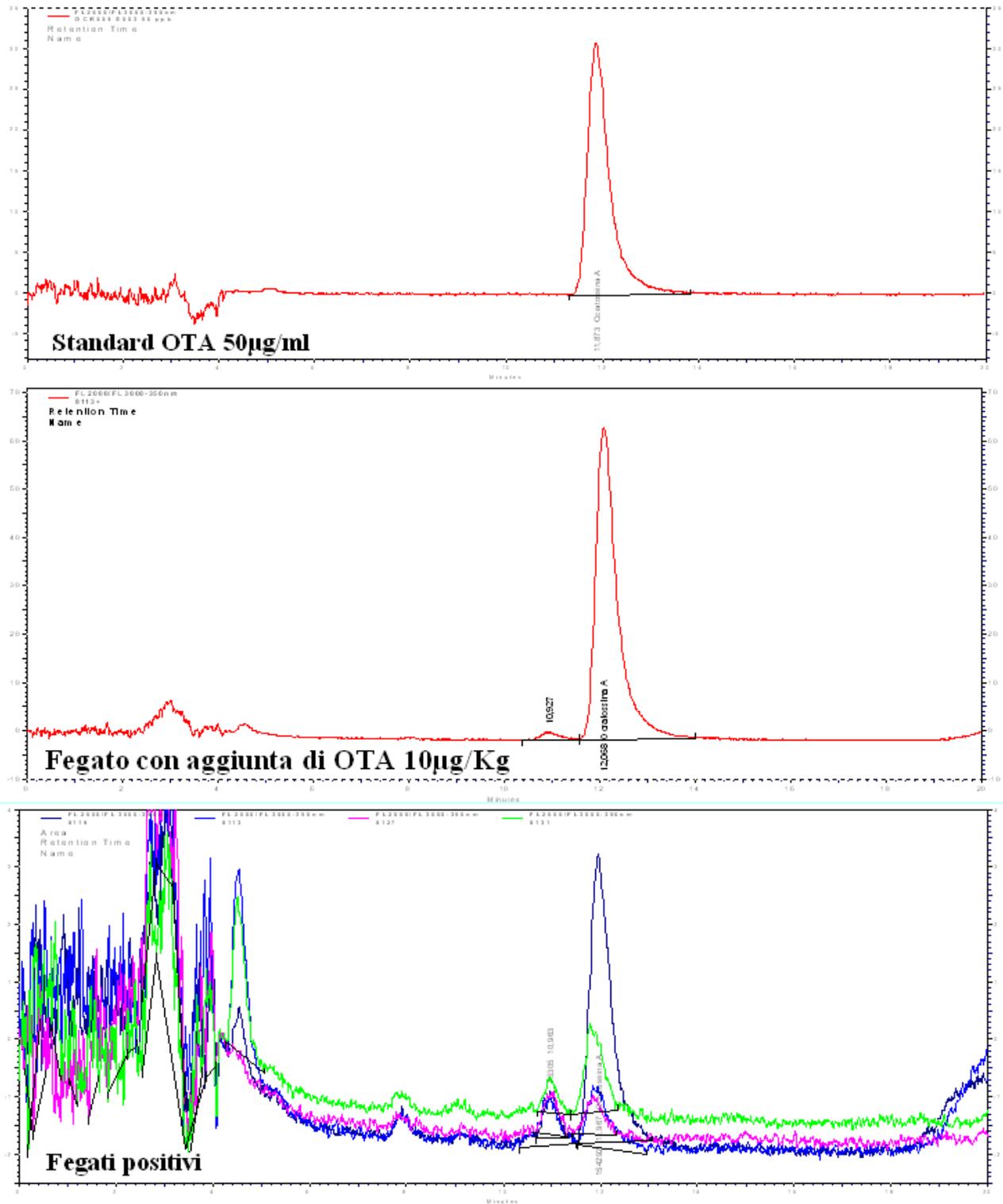


Figura 2: analisi OTA mediante HPLC-FLD

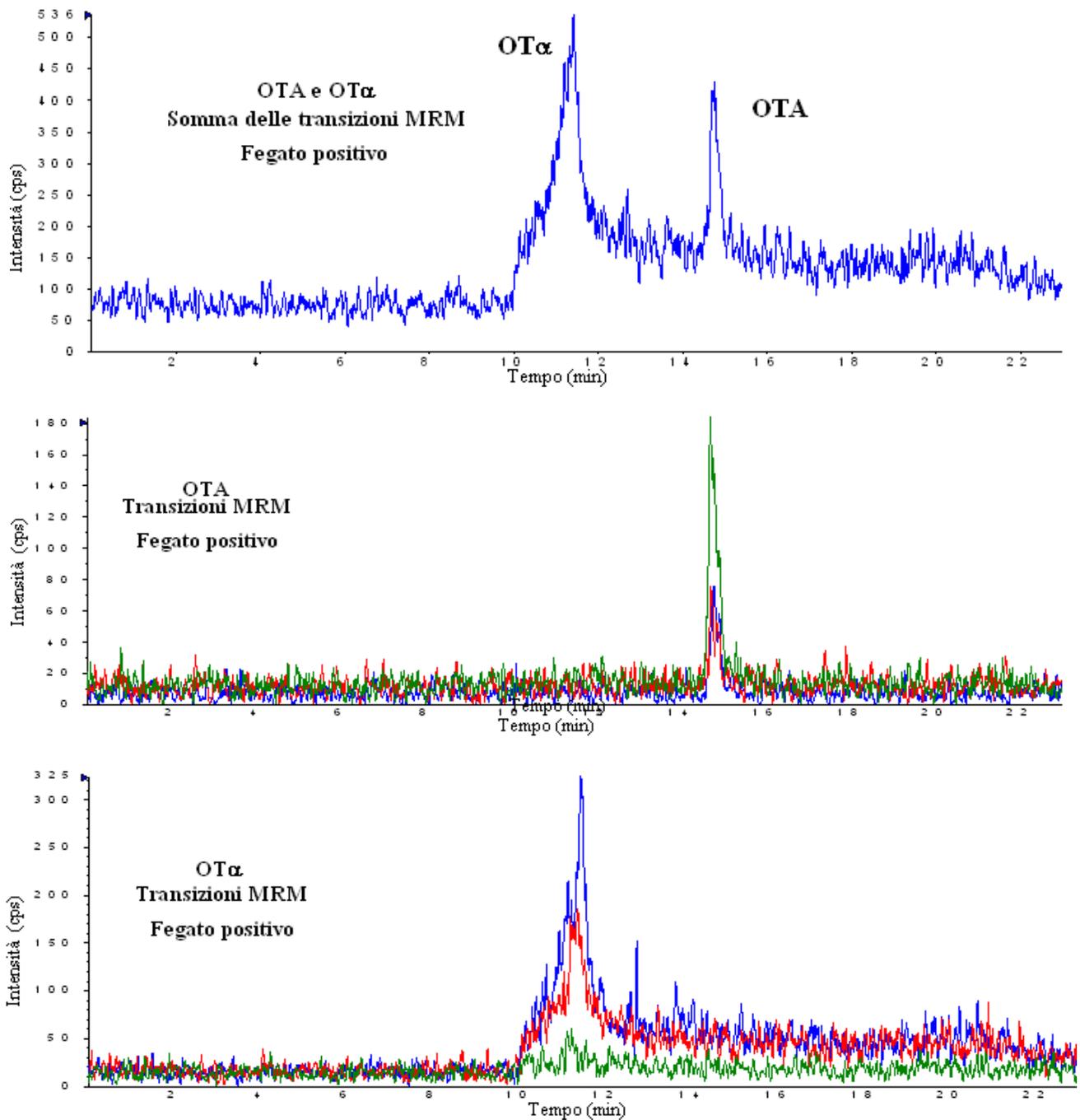


Figura 3: analisi OTA e OT α mediante HPLC-MS/MS

Bibliografia

FAO Food and nutrition papers - 81: Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003.

Monaci L., Palmisano F., Matrella R., Tantillo G., 2005. Journal of Chromatography A, 1090, 184-187.

Ministero della Sanità - CIRCOLARE 9 Giugno 1999, n. 10. Gazzetta Ufficiale n. 135 del 1 Giugno 1999. L.

Opinion of the scientific Panel on contamination in Food Chain on a request from the Commission

related to Ochratoxin A (OTA) a undesirable substance in animal feed. The EFSA Journal (2004) 101, 1-36.

Affiliazioni:

Pecorelli I (a), Bibi R (a), Pelli S (a), Lattanzio V (b), Solfrizzo M (b), Sonaglia L (c), Cenci T (a)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale Dell'Umbria e delle Marche

(b) CNR, Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari

(c) ASL3 Umbria, Servizio Veterinario)



Presenza di Ocratossina in fegati di galline ovaiole in Umbria by Pecorelli I., et al. is licensed under a [Creative Commons Attribution 2.5 Italia License](http://creativecommons.org/licenses/by/2.5/it/).

Permissions beyond the scope of this license may be available at <http://indice.spvet.it/adv.html>.

	Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Via G. Salvemini 1. 06126, Perugia - Italy / http://www.izsum.it
Centralino Istituto	Tel. +39 075 3431 - Fax. +39 075 35047
Biblioteca	Tel. / Fax +39 075 343217 e-mail: bie@izsum.it
Rivista SPVet.it ISSN 1592-1581	Tel. +39 075 343207 e-mail: editoria@izsum.it http://spvet.it / http://indice.spvet.it
U. R. P.	Tel. +39 075 343223; Fax: +39 075 343289 e-mail: URP@izsum.it