

Micotossine, la previsione del rischio

Analisi di alcuni studi svolti per calcolare il loro sviluppo

di Gianni Di Falco

Coordinatore del GL 14 Sicurezza alimentare UNI e Rappresentante italiano ISO TC34/SC17 WG11
Prerequisite Programmes on Food Safety e WG19 Challenge test

38

Cosa sono le micotossine, come accrescono e possibile previsione della loro crescita mediante la tecnica della modellizzazione

I rischio legato alla presenza di micotossine nei prodotti alimentari è spesso sottovalutato per diverse ragioni, fra le quali, probabilmente, il fatto che gli effetti di queste sostanze non sempre si manifestano con episodi confrontabili con quelli tossinfettivi legati alla presenza di batteri patogeni e tossinogeni, ma piuttosto di accumulo, con conseguenze anche molto gravi, ma differite nel tempo e non sempre facilmente attribuibili alla causa.

Il problema legato alla valutazione delle contaminazioni per una corretta stima del rischio è stato affrontato a livello nazionale, dal Comitato nazionale per la Sicurezza alimentare (Cnsa) e dall'Istituto Superiore di Sanità (Iss), e internazionale, dall'Autorità europea per la Sicurezza alimentare (Efsa). Cercheremo di fornire una valutazione dell'evoluzione del rischio da micotossine e di analizzare gli strumenti di modellizzazione sui quali si sta lavorando.

Cosa sono le micotossine

Le micotossine sono sostanze tossiche prodotte da alcune muffe che possono svilupparsi nelle coltivazioni e durante lo stoccaggio e il trasporto degli alimenti. Sono state identificate per la prima volta negli anni '60 in Inghilterra in seguito alla morte di oltre 100.000 tacchini alimentati con farina di arachidi contaminata dal fungo *Apergillus flavus*. Tuttavia, le intossicazioni dovute al consumo di alimenti contaminati sono note già dal Medioevo. Ricordiamo le tremende epidemie di ergotismo¹ provocate dall'ingestione di farina di segale contaminata da *Claviceps purpurea*, fungo conosciuto anche con il nome francese di ergot (sperone), da cui la sua denominazione. La tossicità è dovuta ad alcuni alcaloidi presenti in questo fungo, che possono provocare vasocostrizione con gravi conseguenze di circolazione nonché interagire con il sistema nervoso centrale.

Le micotossine non costituiscono una classe chimica, ma sono caratterizzate da una grande diversità strutturale. Questo spiega l'eterogeneità degli effetti avversi. Alcune, come l'aflatoxina, sono delle epatotossine molto potenti, dotate di attività mutagena, teratogena e cancerogena. Analogamente, anche la patulina è responsabile di danni epatici, oltre ad avere un'a-

zione cancerogena. Altre, come l'acido penicilinico e l'ocratossina, esplicano la loro tossicità a livello renale.

La crescita delle muffe che producono micotossine è influenzata dalla temperatura e dall'umidità e i cambiamenti climatici in atto stanno aumentando la frequenza delle contaminazioni da queste sostanze anche nei Paesi temperati come l'Italia. L'intossicazione acuta è possibile, ma improbabile nel territorio italiano, mentre si potrebbero verificare delle intossicazioni croniche responsabili di diverse patologie, anche gravi, non facilmente riconducibili alla causa che le ha generate.

Sulla base di un parere emanato dal Cnsa, gli alimenti che hanno mostrato la maggiore contaminazione da miscele di micotossine sono i cereali e le micotossine più importanti per l'esposizione combinata sono prodotte dal genere *Aspergillus*: l'aflatossina B1 (AF) e l'ocratossina A (OTA).

Allo scopo di tutelare la salute dei consumatori e prevenire o minimizzare i cali produttivi, l'Unione europea, sulla base dei pareri scientifici dell'Efsa, ha stabilito le concentrazioni massime di micotossine negli alimenti (regolamento (CE) 1881/2006). La Commissione europea, inoltre, ha presentato la modifica delle raccomandazioni 2006/576/CE e 2013/165/UE relativamente ai valori di riferimento per deossinivalenolo, zearalenone, ocratossina A, tossine T2 e HT2 e fumonisine nei mangimi.

In particolare, l'iniziativa legislativa prevederebbe che gli Stati membri debbano garantire che gli operatori del settore dei mangimi – nel valutare l'accettabilità delle materie prime per mangimi e mangimi composti per l'alimentazione animale – applichino nuovi valori vincolanti, notevolmente più bassi dei valori guida finora previsti (con picchi di riduzione superiori all'80%, come per le fumonisine nel mais).

La modellizzazione del rischio

L'applicazione dei modelli predittivi utilizzati per la previsione del comportamento dei miceti e la relativa produzione di micotossine non è ad oggi ancora possibile.

Degli approcci previsionali sono in via di svi-

luppo, ma non basati su criteri di ecologia microbica, quanto alla valutazione di andamenti climatici e tecniche agronomiche. L'obiettivo è la previsione del livello di rischio per la comparsa di micotossine nelle colture considerate.

Uno dei lavori è quello dell'agenzia Ersa del Friuli-Venezia Giulia, che ha svolto uno studio per calcolare il rischio di contaminazione da micotossine (in particolare, aflatossine e fumonisine) nel mais. Esso si inserisce all'interno del progetto AgriCS. Il metodo si basa sugli scenari agrometeorologici ovvero sistemi previsionali che consentono di illustrare alcuni aspetti agro-meteorologici di carattere territoriale, ad esempio l'andamento delle infezioni della ticiolatura del melo e la stima del bilancio idrico sul territorio regionale. In questo contesto, vengono introdotte le micotossine, che sono metaboliti secondari prodotti, in condizioni di stress, da funghi parassiti delle piante o da agenti di ammuffimento delle derrate alimentari.

La particolarità del modello di previsione è legata al diverso comportamento poiché le aflatossine sono maggiormente prodotte in presenza di stress idrico; per questo è necessaria la definizione dei limiti superiori e inferiori del bilancio idrico, che rispecchiano la sensibilità della pianta alla produzione di micotossine, a seconda della condizione idrica del terreno: il limite superiore esprime il livello al di sopra del quale la disponibilità idrica è buona (valore di rischio attribuito pari a 0), mentre il limite inferiore esprime il livello al di sotto del quale si inizia ad avvertire lo stress idrico (valore di rischio attribuito pari a 1).

Le fumonisine, invece, sono maggiormente prodotte in caso di eccesso idrico in campo: in questo caso, il limite superiore esprime il livello al di sopra del quale la pianta si trova in una condizione di eccesso idrico, con valore di rischio 1; il limite inferiore, invece, esprime il livello al di sotto del quale la condizione idrica è accettabile, con valore di rischio 0.

Una volta determinati i parametri precedentemente illustrati, viene calcolato l'indice complessivo di rischio compreso fra 0 e 1 per ciascuna classe di micotossine (aflatossine e fumonisine). Lo scopo dell'indice è quello di rappresentare su base territoriale l'andamento del rischio di contaminazione da aflatossine e fumonisine del



Figura 1 – Rappresentazione schematica di una porzione di suolo con i limiti superiori e inferiori di contenuto idrico che determinano la produzione di micotossine e il conseguente rischio agronomico

mais durante la stagione colturale (*Figura 1*). Un altro studio è stato svolto dall’Università Cattolica di Piacenza su sistemi di previsione basati sull’applicazione di sistemi di intelligenza artificiale, tenendo conto delle condizioni meteorologiche. In questo caso si è utilizzato il sistema del *Machine Learning*. Le tecniche di *Machine Learning* appartengono ad una famiglia di algoritmi che racchiudono insieme la statistica applicata e le scienze informatiche. A differenza dei metodi tradizionali di regressione, sono tecniche non parametriche, ovvero non vincolate da una forma funzionale e

libere da qualsiasi tipo di assunzione a priori di distribuzione statistica.

Le condizioni meteorologiche sono le principali variabili che determinano i funghi produttori di micotossine e la conseguente contaminazione nei chicchi di mais, ma il sistema di coltivazione utilizzato può mitigare considerevolmente questo impatto meteorologico. La presenza di AFB1 (aflatossine) e FB (fumonisine) nei campi di mais è stata registrata e sono stati raccolti i dati del sistema colturale corrispondente nel periodo 2005-2018 nell’Italia settentrionale. Due modelli di reti neurali

¹ Vedi www.sitox.org/blog-sitox/medioevo-quando-si-mangiava-naturale-e-la-vita-media-arrivava-a-45-anni-2020-07-20

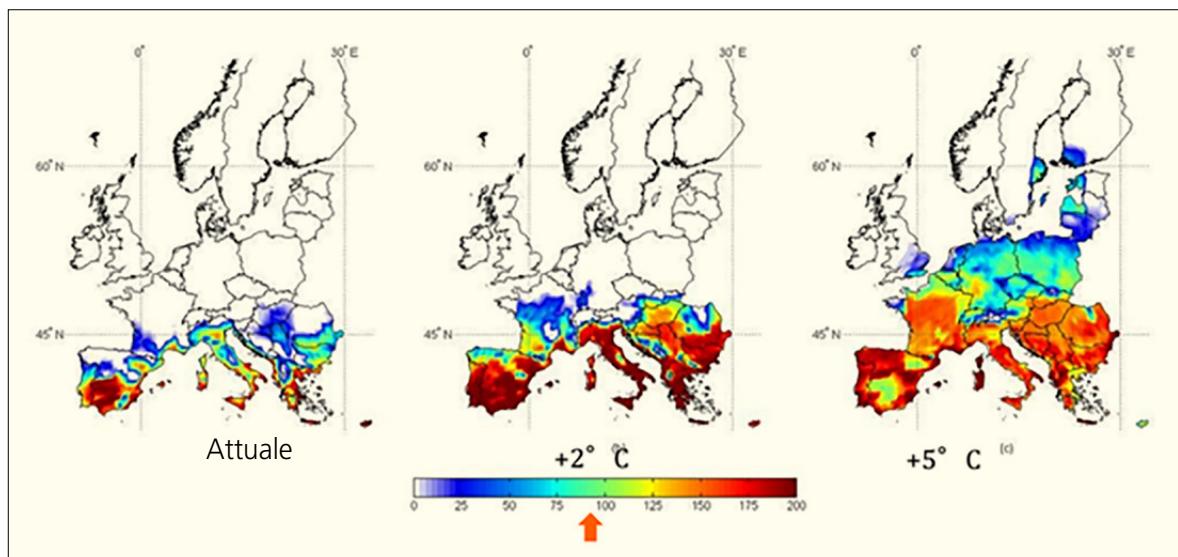


Figura 2 – Mappe di rischio conseguenti ad un aumento delle temperature

profonde (DNN) sono stati addestrati per prevedere, al momento del raccolto, quali campi di mais sono stati contaminati oltre il limite legale con AFB1 e FB. Entrambi i modelli hanno raggiunto un'accuratezza >75%, dimostrando il valore aggiunto dell'approccio *Machine Learning* rispetto a quelli statistici classici (ad esempio, modelli di regressione lineare semplice o multipla).

Dallo studio sono emerse interessanti indicazioni sull'andamento climatico e sulle conseguenti mappe del rischio (vedi Figura 2). È stata quindi fatta la valutazione del ruolo dell'attività dell'acqua sulla crescita di *Fusarium verticilloides* e *Aspergillus flavus* e sulla produzione di micotossine

(Figura 3, pubblicata alle pagine 42-43). L'uso di *Machine Learning* abbinato a modelli predittivi meccanicistici ha permesso un significativo miglioramento delle prestazioni predittive.

Un altro studio presso l'Università Cattolica di Piacenza è stato svolto sull'influenza della temperatura (T) sulla crescita di *Penicillium* e *Aspergillus* spp. e sulla produzione di micotossine sulle croste dei formaggi con lo scopo di definire l'ecologia fungina del formaggio in termini di fabbisogno di temperatura, concentrandosi sulla ripartizione delle micotossine tra la crosta e il micelio e validare modelli predittivi precedentemente sviluppati da studi in vitro. In base a questo studio, sono state

Tabella 1

Previsione di produzione di Sterigmatocisina nel formaggio, in rapporto all'aumento della temperatura

Temperatura (°C)	Potenziale di crescita del micelio (cm/gg)	Produzione della tossina nel micelio	Produzione della tossina nel formaggio (ng)
0	0	0	0
10	0	0	400
15	0,19	200	200
20	0,38	80	20
25	0,66	5	20
30	0,28	20	150

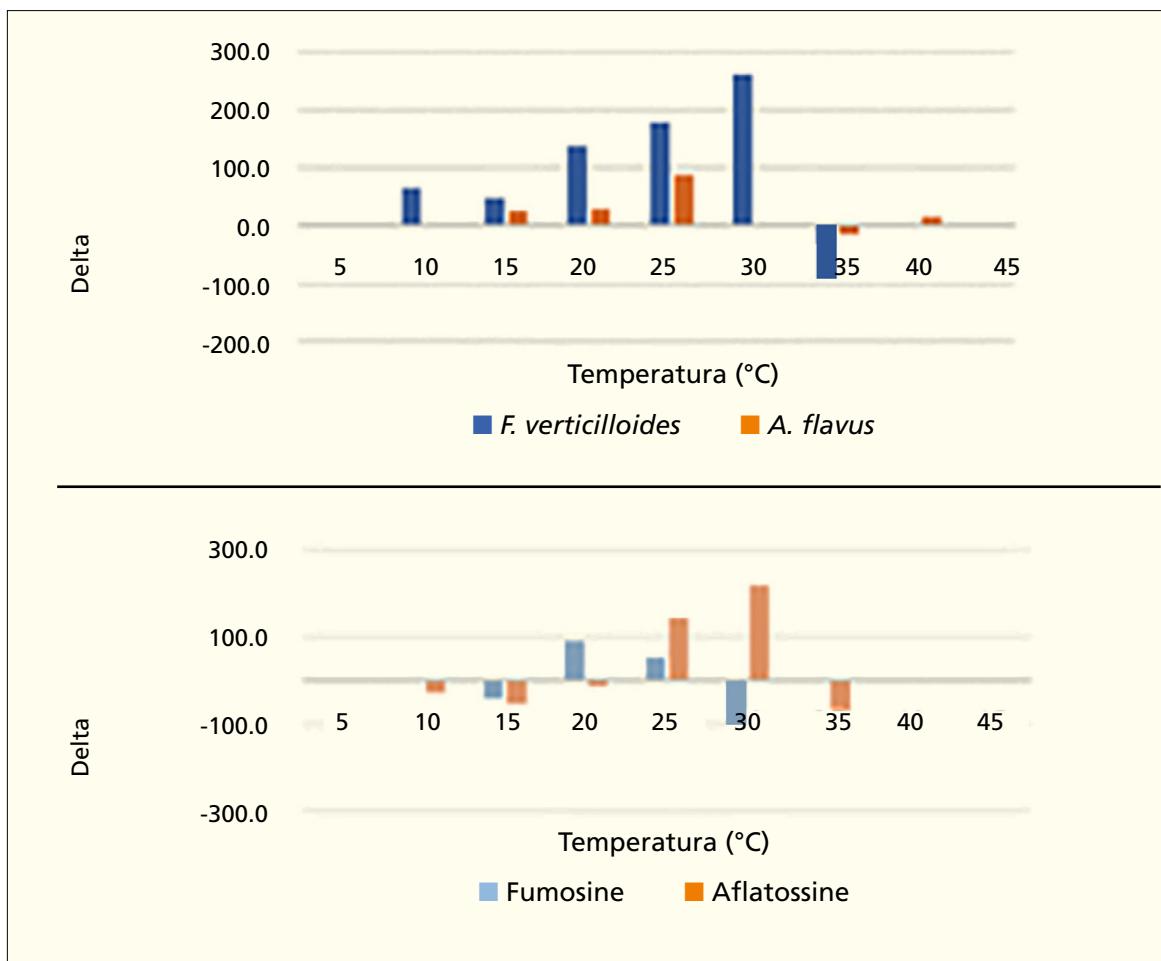


Figura 3 – Elaborazione dell'interazione fungina in funzione della temperatura e dell'attività dell'acqua

rilevate le crescite reali sperimentali del micelio mediante la misurazione in cm dopo 21 giorni di incubazione alle diverse temperature.

Pur considerando il diverso metabolismo dei miceti rispetto ai batteri, è possibile costruire un modello di crescita per prevedere la produzione di micotossine, assumendo come parametri la crescita del micelio e la produzione di tossine. Considerando gli andamenti emersi dallo studio, assumeremo come riferimento *Aspergillus versicolor* e la produzione di Sterigmatocisina (Tabella 1, pubblicata a pagina 41). Sono stati calcolati i potenziali di crescita, come fatto per le popolazioni batteriche, considerando che per i miceti non c'è una curva confrontabile e basandosi, quindi, sulla misurazione dello sviluppo del micelio nelle piastre in cm. Questo ha un valore puramente indica-

tivo, non potendo far riferimento a parametri di crescita noti.

Pur con l'approssimazione determinata dalla metodologia di misura, si può rilevare che la crescita di *Aspergillus* aumenta significativamente fra i 10 e i 25 °C, ma la produzione di tossina nel formaggio non segue in modo parallelo la tendenza, concentrandosi nelle condizioni meno favorevoli alla crescita (10 °C e 30 °C) e confermando che la produzione è maggiore in condizioni di stress.

Per gli altri miceti la crescita è rilevante, ma la produzione di OTA nel formaggio è significativa solo per *Penicillium nordicum* a 25 °C e 30 °C e per *Penicillium verrucosum* a 15 °C e 20 °C.

In base a questi dati, si conferma la difficoltà a modellizzare la produzione di tossina in base al calcolo dei potenziali di sviluppo dei miceti e che il range di temperature più critico è compreso fra i 10 °C e i 30 °C.

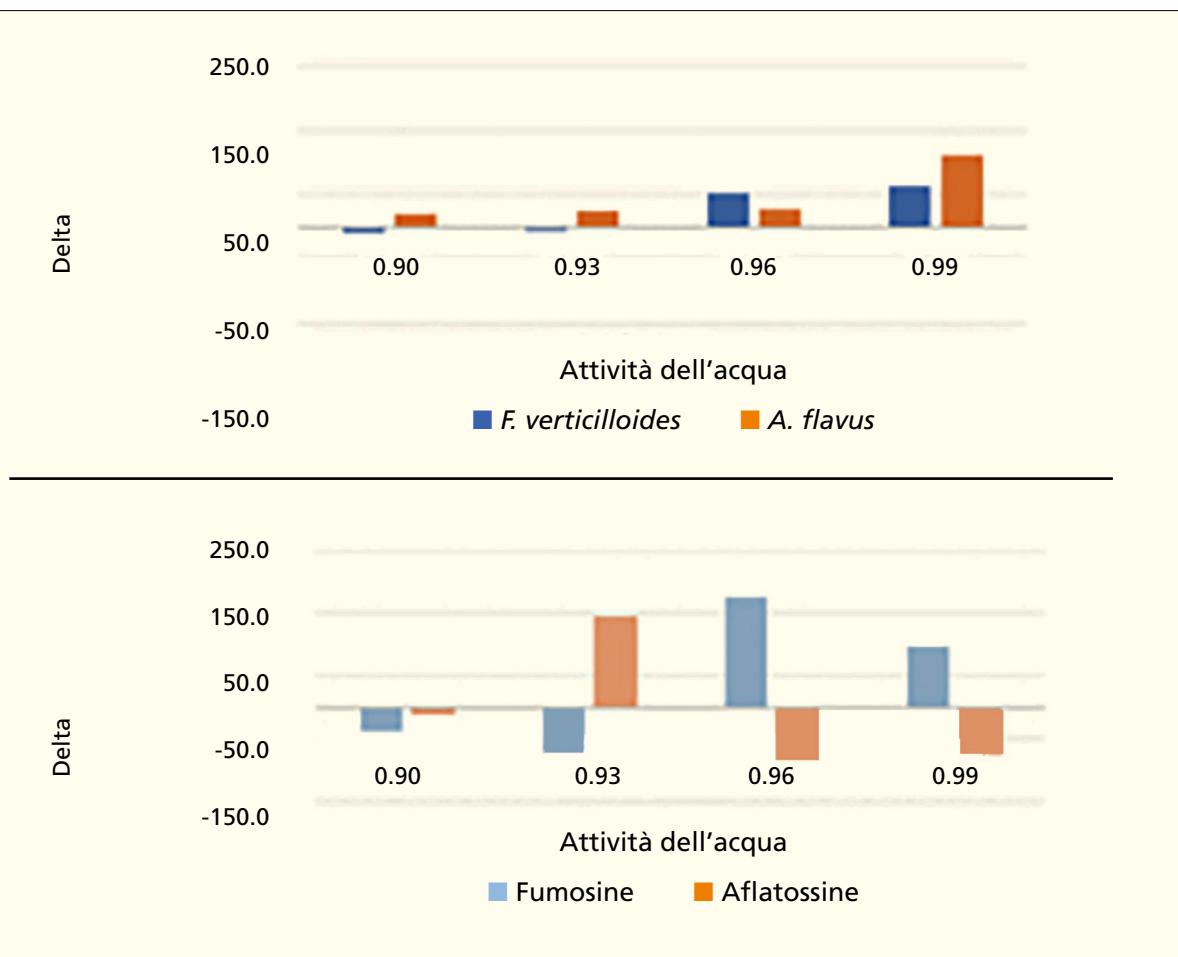


Figura 3 – Elaborazione dell'interazione fungina in funzione della temperatura e dell'attività dell'acqua

Evoluzione dei rilevamenti Rasff

In linea con gli anni precedenti, le micotossine sono state il terzo pericolo più notificato al Sistema comunitario di allerta rapido per alimenti e mangimi (Rasff) con 401 notifiche, con un calo del 17% rispetto al 2022. Le notifiche hanno riguardato principalmente l'individuazione di aflatossine (331).

La categoria di prodotti più comune è stata la frutta a guscio, i prodotti a base di frutta a guscio e i semi (226). L'origine più riportata per questi casi sono stati gli Stati Uniti (85).

I dati, che sono sempre da considerare sottostimati poiché si riferiscono alle segnalazioni effettuate e registrate, confermano come le micotossine rappresentino un rischio grave.

Le micotossine rappresentano un rischio alimentare molto grave e sono il risultato di una combinazione di fattori climatici, ecologici e tecnologici, che determinano situazioni di rischio non sempre facili da prevedere.

La disponibilità di dati climatici, abbinati a tecniche agronomiche, può ridurre il rischio.

Nuovi metodi di previsione e modellizzazione possono contribuire a un'efficace gestione del rischio, ma necessitano ancora di studi ecologici e tossicologici per poter disporre di previsioni attendibili.

Si conferma che la refrigerazione sotto i 10 °C rappresenta un efficace misura di controllo, anche se viene confermata la maggior produzione di tossine nell'alimento in condizioni di stress non ottimali alla crescita (10 °C e 30 °C).