

Indice:

INTRODUZIONE	1
LE MICOTOSSINE	2
Fattori che influenzano la produzione	4
Fattori estrinseci	5
Parametri ambientali	5
Fattori biologici	8
Fattori chimici	9
Fattori intrinseci	10
Micotossicosi	12
LE AFLATOSSINE	17
Tossicocinetica	17
Distribuzione	17
Reazioni di I fase	18
Reazioni di II fase	18
Tossicità e DL ₅₀	19
Meccanismo d'azione	21
Azione a carico del sistema immunitario	22
Aflatossicosi nel suino	22
OCRATOSSINE	25
Generalità	25
Destino biologico dell'ocratossina negli animali	26
Tossicità dell'ocratossina e DL ₅₀	28
L'ocratossicosi	30
LEGISLAZIONE	32
Legislazione aflatossina	32
Legislazione ocratossina	35
PARTE SPERIMENTALE	
Prova1: Effetto della intossicazione di diete per suini con micotossine e residui nelle carni.	38
Scopo della ricerca	38
Materiali e Metodi	38
Prova 2: Effetto della diversa integrazione di metionina in diete per galline ovaiole contaminate da micotossine	45
Scopo della ricerca	45
Materiali e Metodi	45
RISULTATI E DISCUSSIONE	50
Prova 1: Effetto della intossicazione di diete per suini con micotossine e residui nelle carni.	50
Valutazione della prova di allevamento	51

Analisi tossicologica nelle varie matrici	54
Quote residuali di micotossine nelle matrici esaminate	55
Prova 2: Effetto della diversa integrazione di metionina in diete per galline ovaiole contaminate da micotossine	64
Parametri zootecnici	64
Quote residuali di micotossine nelle matrici esaminate	70
CONCLUSIONI	73
BIBLIOGRAFIA	74

Introduzione

Le micotossine sono un eterogeneo gruppo composti chimici così denominati per due caratteristiche fondamentali: l'essere prodotte da funghi e possedere una attività tossica a carico degli organismi superiori.

Attualmente sono conosciuti almeno 300 metaboliti fungini potenzialmente tossici per l'uomo e per gli animali (Atroshi *et al.*, 2002). L'esposizione avviene prevalentemente per via alimentare (Avantaggiato e Visconti, 2003) ma sono state segnalate anche la via inalatoria ed il contatto diretto.

Secondo stime effettuate dalla FAO un quarto della produzione mondiale di derrate destinate al consumo alimentare animale ed umano sarebbe contaminato da micotossine. Per quanto riguarda l'alimentazione umana queste possono essere ritrovate sia nei prodotti vegetali che animali ove possono permanere come residui nei tessuti e nei prodotti edibili degli animali che hanno assunto alimenti contaminati (Devegowda *et al.*, 1998; Sciarrafia, 2002; Kabar, *et al.*, 2006).

Le micotossine che più frequentemente si ritrovano nei cereali sono aflatossine, ocratossine, tricoteceni, fumosine, zearalenoni ed ergotossine (Argentiere, 2002).

Da tempo risulta nota nell'uomo una correlazione positiva tra l'incidenza di carcinoma epatocellulare e l'assunzione di aflatossine contenute in alimenti di origine vegetale (Anadòn e Martinez-Larranagam, 1995), così come è riconosciuta tossica e potenzialmente cancerogena l'assunzione di aflatossina attraverso i prodotti di origine animale, tra i quali il latte sembra il più a rischio (Yiannikouris e Jouany, 2002; Creppy, 2002).

Nel caso di composti ad azione cancerogena, come le aflatossine secondo la classificazione dello IARC (International Agency for Research on Cancer) (IARC 2002), anche una quantità estremamente piccola può rappresentare un rischio di danni irreversibili (Madhyastha e Bhat, 1985).

L'ocratossina appare meno potente come cancerogeno (classificazione 2b, IARC, 2002) ma risulta essere correlata sia negli animali che nell'uomo a fenomeni di nefropatia, condizione patologica a cui sembra essere strettamente legata (Pompa 1994; Prelusky, 1994).

Gli alimenti di origine animale costituiscono l'attività terminale di un processo produttivo alla cui realizzazione concorrono diversi fattori strettamente connessi e in grado di incidere significativamente sulla materia prima finale (Biagi *et al.*, 2000). La presenza di micotossine nella filiera agro-alimentare comporta, oltre a problematiche inerenti la salute umana, perdite quali-quantitative delle produzioni e minori efficienze produttive degli animali in allevamento (Bonomi *et al.*, 1993; Yiannikouris e Jouany, 2002).

Il tutto si traduce in un calo della redditività del settore zootecnico e problematiche legate alle attività di monitoraggio.

Secondo quanto riportato dalla direttiva 2002/32/CEE del Parlamento Europeo del 7 maggio 2002, relativa alla presenza di sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali, risulta "impossibile escludere totalmente la presenza di sostanze indesiderabili ma è importante che la loro quantità nei prodotti destinati all'alimentazione degli animali sia ridotta, con dovuto riguardo alla tossicità acuta, bioaccumulabilità e degradabilità della sostanza, in modo da impedire che si producano effetti indesiderati e nocivi".

L'obiettivo attualmente perseguito al riguardo risulta perciò essere l'ottenimento di livelli minimi di micotossine negli alimenti ad uso zootecnico (Argentiere, 2002).

La riduzione del rischio di una contaminazione da micotossine può essere ottenuta mediante la prevenzione della contaminazione della materia prima, migliorando le tecniche di coltivazione, trasporto, immagazzinamento (Yiannikouris e Jouany, 2002), e prevedendo misure di decontaminazione e detossificazione delle derrate e dei relativi sottoprodotti mediante procedure fisico-chimiche (Minervini, 2000) e biologiche, ancora inibendo o riducendo l'assorbimento gastrointestinale delle stesse (Avantaggiato e Visconti, 2003; Kabak *et al.*, 2006).

Nelle ricerche in oggetto si è voluto studiare l'effetto della contaminazione con aflatossina e ocratossina in diete per suini nella fase di finissaggio e di galline ovaiole in ordine alle *performance* zootecniche e alla qualità delle produzioni, inoltre attraverso l'impiego di leganti o, integrazioni di aminoacidi essenziali, si è voluto valutare la possibilità di contrastare i gli effetti negativi legati indotti dalla presenza di micotossine

Le Micotossine

Le micotossine sono metaboliti secondari, prodotti naturalmente durante la crescita di funghi su substrati di origine vegetale (Anadòn e Martinez-Larranagam, 1995).

I prodotti del metabolismo secondario differiscono da quelli primari in quanto non è stato possibile attribuire loro un ruolo evidente per la crescita dell'organismo produttore. I funghi che possono dare origine a micotossine sono appartenenti a diversi generi che, frequentemente, sono parassiti delle piante (Ominski, *et al.*, 1994).

Le micotossine tuttavia non sono correlate direttamente alla crescita del fungo, ma risultano essere piuttosto una sua risposta a determinati stimoli ambientali (Steyen, 1998).

Diverse specie fungine appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Claviceps* sono responsabili della produzione di micotossine (Scott, 1994; Bennet e Keller, 1997; Yiannikouris e Jouany, 2002; Haouet e Altissimi, 2005) che sono caratterizzate da una notevole eterogeneità dal punto di vista della struttura chimica.

Le micotossine identificate sono circa 300, ma solo il 7% delle stesse sono contenute negli alimenti a livelli sufficientemente elevati da costituire un potenziale pericolo.

La crescita fungina avviene a carico delle piante coltivate in campo e dei loro prodotti dopo la raccolta; granella di cereali, semi oleosi e i loro sottoprodotti costituiscono il substrato di crescita dei funghi tossigeni. (Ominski, *et al.*, 1994)

Tabella 1. Funghi e micotossine ad essi associate (Yiannikouris e Jouany, 2002).

Funghi	Micotossine
<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>	Aflatossina B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂
<i>Penicillium verrucosum</i> , <i>P.</i> <i>viridicatum</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. carbonarius</i> .	Ocratossina
<i>Penicillium expansus</i> , <i>P. urticae</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> , <i>Byssochlamys</i> <i>nivea</i>	Patulina

<i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. roseum</i> , <i>F. trinctum</i> , <i>F. acuminatum</i>	Tricoteceni (deossinivalenolo)
<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. proliferatum</i>	Fumosine B ₁ , B ₂ , B ₃
<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i>	Zearalenone
<i>F. moniliforme</i> , <i>F. crookwellense</i> , <i>F. subglutinum</i> , <i>F. napiforme</i> , <i>F. heterosporum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. proliferatum</i>	Acido fusarico

La presenza di micotossine è strettamente legata alla possibilità di crescita del fungo che le produce (Aibino e Garella, 1999); tuttavia, vista l'elevata resistenza di questi metaboliti nell'ambiente ed ai trattamenti fisici utilizzati nelle produzioni e nelle trasformazioni a cui vengono sottoposti gli alimenti, esse possono persistere al loro interno anche per un lungo periodo di tempo dopo lo sviluppo e la morte del fungo. Molte tossine sono infatti termostabili fino a 150 °C e trattamenti quali l'essiccazione (Ceruti, *et al.*, 1993), la cernita, la molitura, la radiazione, l'estrazione, la raffinazione, la fermentazione, pur diminuendone notevolmente il contenuto, non sono in grado di distruggerle completamente (Argentiere, 2002).

L'assenza del fungo micotossigeno non è quindi sufficiente a comprovare l'assenza delle tossine così come un substrato ammuffito non indica necessariamente la presenza di micotossine. Inoltre, la massima produzione di tossine non sempre coincide con il massimo sviluppo del fungo ed avviene fisiologicamente con un ritardo di alcune ore o giorni (normalmente attorno al decimo giorno dello sviluppo del micelio) (Ceruti *et al.*, 1993; Zaghini e Lambertini, 1995).

Fattori che influenzano la produzione

I principali fattori coinvolti nella produzione delle micotossine possono essere suddivisi in estrinseci, costituiti dall'insieme delle condizioni che favoriscono lo sviluppo fungino (e di conseguenza l'eventuale produzione dei loro metaboliti), ed intrinseci, legati invece alla capacità del ceppo fungino a produrre micotossine (Pietri, 1998; Huwig *et al.*, 2001).

Fattori estrinseci

La formazione di micotossine viene influenzata da fattori di natura diversa, comunemente suddivisi in fisici, biologici e chimici.

Tabella 2. Fattori estrinseci che influenzano la presenza di micotossine sulle materie prime

(Pietri, 1998; D'Mello e Macdonald, 1997, op. mod.)

FATTORI FISICI

Tensione di O₂, temperatura, umidità e/o acqua libera, pH

Natura del substrato

Danni meccanici alle cariossidi

Condizioni atmosferiche

FATTORI BIOLOGICI

Presenza di altre specie fungine (azione competitiva)

Presenza di insetti (come infestanti o vettori di spore)

Stress della pianta

Resistenza del substrato

FATTORI CHIMICI

Utilizzo di fungicidi

Parametri ambientali

- Ossigeno

La maggior parte dei funghi è costituita da microrganismi aerobi, alcuni obbligati, la cui crescita risulta estremamente ridotta se la pressione parziale di O₂ è molto inferiore a quella dell'aria. Il loro sviluppo è inibito dalla carenza di ossigeno (tuttavia quasi tutti si sviluppano con una tensione di O₂ del 3%) e dalla presenza di CO₂ (concentrazioni di CO₂ uguali o superiori a 0,2% possono inibire completamente la crescita del micelio) (Ceruti *et al.*, 1993; Zaghini e Lambertini, 1995).

- Temperatura

In riferimento alle esigenze di temperatura, i funghi, per la crescita, sono definiti psicrofili, mesofili, termofili, a seconda delle specie esistono intervalli ottimali per la crescita che

comunque non coincidono necessariamente con la produzione di tossine (Ominski, *et al.*, 1994)

- Umidità

Un altro fattore di fondamentale importanza è l'umidità del substrato, espressa come "attività dell'acqua" (a_w), che indica la disponibilità dell'acqua per le reazioni chimiche e per la crescita del microrganismo. Sebbene, tra i funghi, esistano specie in grado di moltiplicarsi a valori di umidità estremamente bassi o molto elevati, la maggior parte delle specie si moltiplica da valori di a_w da 0,80 ad 1,0 (Ominski, *et al.*, 1994) Molto importanti risultano anche essere gli sbalzi termici, con formazione di condensa anche all'interno della massa stessa di granaglie, con trasferimento di vapore acqueo dalle aree calde a quelle più fredde. In tal modo si ha aumento del contenuto di acqua derivante dall'aria umida e la variazione del suo contenuto non risulta più essere costante all'interno della massa (Lacey, 1989).

- pH

Per quanto riguarda il pH, i funghi preferiscono valori vicino alla neutralità o leggermente acidi, ma sopportano anche valori differenti. Il *range* ottimale è compreso fra 5,0 e 7,0 e la produzione di micotossina sembra maggiore con pH acidi (O'Callaghan, *et al.*, 2006)

E' importante ricordare che la sopravvivenza del microrganismo può verificarsi anche in condizioni che non ne consentono la crescita. Inoltre la tolleranza nei confronti di un determinato parametro aumenta se le restanti condizioni di crescita rientrano nell'intervallo ottimale per quella determinata specie, mentre una combinazione di fattori sub-ottimali può prevenire la crescita fungina (Deacon, 1997; Tiecco, 1992).

Natura del substrato

Il tipo di substrato può influenzare considerevolmente la produzione di micotossine (Pietri, 1998). Ad esempio, la produzione di aflatossine è elevata se il fungo si sviluppa in presenza di glucosio, mannosio, fruttosio ed azoto in forma ammoniacale (Gerola *et al.*, 1986). La quantità di aflatossine prodotte da *Aspergillus flavus* è decisamente superiore nelle arachidi rispetto ai cereali ed è nulla nel riso, tanto che dalla fermentazione di quest'ultimo, mediante l'aggiunta di *A. flavus*, si ottiene il *sakè* (Tiecco, 1999). Il tipo di substrato è correlabile alla presenza di specifiche tossine che evidenziano un "legame" tra il fugo produttore e la matrice di accrescimento dello stesso. (Ominski, *et al.*, 1994; Huwig *et al.*, 2001).

Danni meccanici alle granaglie e condizioni atmosferiche

Per quanto riguarda i danni alla cariosside Bartolini (2002) riporta che ogni lesione presente sulla granella di mais costituisce una via d'ingresso preferenziale per i funghi responsabili della produzione di micotossine.

Fra le cause che possono determinare questa situazione va ricordata la trebbiatura di granella troppo secca (valore ideale al momento della raccolta: 20-25% di umidità) ed una non corretta regolazione della mietitrebbia. D'altra parte una granella eccessivamente umida (28%) favorisce l'insorgenza di muffe e un aumento di costi d'essiccazione.

Anche l'azione di grandine, insetti, uccelli e roditori può determinare danneggiamento e rottura dei semi (Aibino e Garelli, 1999; Yiannikouris e Jouany, 2002).

La contaminazione può essere facilitata da condizioni atmosferiche avverse l'esistenza di zone considerate ad alto rischio per le micotossine può, ad esempio, essere dovuta alla presenza di particolari condizioni locali, quali improvvise gelate o siccità (Hoogenboom *et al.*, 2001; Avantaggiato e Visconti; 2003).

Con condizioni atmosferiche umide e piovose in prossimità della raccolta prevale la contaminazione da zearalenone e tricoteceni, a causa del prevalente sviluppo di funghi del genere *Fusarium*, mentre in presenza di un clima più caldo e secco prevalgono i funghi produttori di fumosine, accompagnati da una diffusa contaminazione di aflatossine (Bartolini, 2002; Avantaggiato e Visconti; 2003).

In Italia il livello di contaminazione da aflatossine risulta essere generalmente contenuto per ragioni climatiche e per le tecniche agronomiche avanzate (Pietri, 1998); tuttavia ciò non esclude una contaminazione in momenti successivi, ad esempio durante la conservazione. L'importazione di derrate provenienti da regioni sub-tropicali, caratterizzate da climi caldo-umidi e dove i mangimi sono particolarmente esposti ad infestazioni fungine ed alla conseguente contaminazione da micotossine, desta qualche preoccupazione in ordine all'entità della contaminazione (Mari, 1997).

Indicazioni di carattere pratico attuabili come linee guida con l'obiettivo di riduzione della contaminazione del mais nelle fasi di raccolta e prime fasi di stoccaggio prevedono l'ottimale regolazione della macchina trebbiatrice per ridurre al minimo le rotture di cariossidi, valutazioni dell'umidità di raccolta per l'ottenimento del medesimo obiettivo. Attraverso la valutazione del numero di cariossidi fluorescenti, anche se non costituisce parametro analitico accreditato, si vuole sommariamente valutare il grado di contaminazione fungina di un lotto di raccolta al fine di indicare un possibile diverso stoccaggio e trattamento delle partite di mais più contaminate rispetto alle altre (AA. VV., 2006).

Fattori biologici:

-Presenza di altre specie fungine

Le alterazioni determinate dall'infestazione di molteplici specie di funghi possono comportare modificazioni fisico-chimiche del substrato. Ciò può condizionare in senso favorevole o meno lo sviluppo di altre specie.

Nel primo caso si può verificare la presenza di più infestanti con possibile effetto sinergico, ad esempio la presenza di acido fusarico aumenta la tossicità delle fumosine nel pollo (D'Mello e Macdonald, 1997) e quella dei tricoteceni DAS (diacetossiscirpenolo) e DON (deossinivalenolo o vomitossina) nel maiale (Porter *et al.*, 1996).

Nel secondo si può avere una inibizione competitiva della crescita di alcune specie. Ad esempio la presenza di *Aspergillus glaucus* inibisce la crescita di *A. ocraceus* (Zaghini e Lambertini, 1995), mentre i batteri lattici (*Lactobacillus delbruekii*) quella di *A. flavus* (Minervini, 2000).

Frequentemente le specie responsabili della formazione di micotossine sono anche quelle maggiormente patogene per le piante (D'Mello e Macdonald, 1997). Ne è un esempio la cosiddetta "putrefazione della spiga" o "ear rot" dovuta alla infestazione da *Fusarium graminearum* ed a volte da *Fusarium culmorum* che, oltre a comportare la presenza di zearalenone e tricoteceni, determina una colorazione da porpora a rosa sui chicchi di mais, con una muffa rosata visibile che cresce sulle aree infette della spiga. Nel frumento, invece, le spighe appaiono prematuramente giunte a maturazione ed i chicchi sbiancati possono avere macchie rosate per la presenza del fungo (Aibino e Garella, 1999).

Dal punto di vista quantitativo è stata dimostrata una correlazione positiva tra infestazione da parte delle piante e produzione di micotossine: quanto più estesa è la contaminazione fungina, tanto aumenta la probabilità di ottenere da tali colture derrate inquinate. Ad esempio, nella granella di mais, esiste un rapporto diretto tra la contaminazione da *A. flavus* e contenuto di AFB₁ (Brown *et al.*, 1995).

-Presenza di insetti

La presenza di insetti sia in campo che nelle masse stoccate da origine ad un danno meccanico alle cariossidi che favorisce la penetrazione di specie tossigene (Aibino e Garella, 1999), gli insetti possono fungere anche da vettori animati per le spore fungine a cui creano attraverso la loro attività trofica le condizioni per un attecchimento creando sulla massa delle derrate stoccate un effetto favorente la moltiplicazione dei funghi. L'incidenza di infezione da parte di alcune specie micotossigene (*Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *Fusarium verticillioides*) è

significativamente più elevata nelle cariossidi danneggiate rispetto a quelle sane (Avantaggiato e Visconti 2003). Gli insetti inoltre, come anche i venti, possono contribuire, in campo, a disseminare le spore prodotte dal micelio su territori molto ampi.

-Resistenza del substrato

Per resistenza del substrato si intende sia la resistenza genetica, sia l'integrità della cariossida (Pietri, 1998).

Sono state condotte numerose ricerche con l'obiettivo di selezionare e sviluppare genotipi di cereali resistenti agli attacchi dei funghi tossigeni (D'Mello e Macdonald, 1997; Yiannikouris e Jouany, 2002). Alcuni risultati positivi sono stati ottenuti con la identificazione di ceppi di mais resistenti alla "ear rot" causata da *Aspergillus*; in tali ceppi il livello di aflatossine è risultato essere generalmente basso. E' stato osservato inoltre che due ceppi di lieviti (di cui uno di *Exophiala spinifera*), isolati sempre dal mais, sono in grado di accrescersi utilizzando come fonte di carbonio la fumosina B₁ (Blackwell *et al.*, 1999), degradandola completamente fino alla formazione di CO₂. Sono infine state ottenute varietà transgeniche di mais in grado di codificare proteine tossiche per alcuni insetti, mediante l'inserimento di geni isolati di *Bacillus thuringensis* (Avantaggiato e Visconti 2003).

In questo caso la resistenza (mais BT) è ottenuta in modo indiretto ovvero rendendo la pianta resistente agli attacchi degli insetti (piralide) si contribuisce a ottenere una situazione più sfavorevole all'attacco fungino.

-Stress della pianta

E' stata rilevata una stretta relazione fra presenza di micotossine e *stress* che la pianta può subire nel corso della vita vegetativa.

Ad esempio, per quanto riguarda il mais, si hanno contaminazioni in presenza di elevate dosi di azoto organico e di carenza di potassio (una dose di 220 kg per ettaro è indispensabile per il mantenimento di una pianta sana e meno attaccabile da agenti patogeni). Anche la disponibilità di acqua è un fattore fondamentale: la sua carenza in una qualsiasi fase vegetativa influisce sulla produzione e resistenza della pianta (Bartolini, 2002).

Fattori chimici:

- Uso di fungicidi

Nel grano l'uso di fungicidi nel controllo delle infestazioni da miceti ha diminuito il rischio di contaminazione da micotossine (D'Mello e Macdonald, 1997). Tuttavia alcuni Autori

riportano che la produzione di micotossine può subire un incremento con l'utilizzo di concentrazioni sub-letali. L'acido propionico inibisce la crescita delle muffe mediante un abbassamento del pH e riducendo la formazione di ATP. Il sodio cloruro agisce diminuendo la quantità di acqua libera del foraggio non sufficientemente essiccato. L'ammoniazione è risultata efficace, ma conferisce un aroma che provoca rifiuto del mangime da parte degli animali se questo non preventivamente aerato (Minervini, 2000).

Fattori intrinseci

I fattori tossinogenetici legati al ceppo fungino sono:

- il potenziale tossigeno, che tra i ceppi può variare da 1 a 10^3 o 10^4
- la specie fungina, che determina la classe di micotossine prodotte
- il livello iniziale di contaminazione, che influenza la quantità finale di micotossine prodotte (Pietri, 1998)

-Potenziale tossigeno

La presenza nelle derrate alimentari di funghi annoverati fra le specie potenzialmente tossigene non è un indice assoluto della presenza di tossine, la cui produzione, come riportato in precedenza, è associata a determinate condizioni ambientali, competizione con altri funghi, capacità dello stesso di produrre tossina. All'interno di un substrato possono essere presenti ceppi di funghi produttori di elevate quantità di tossine che non sono differenziabili morfologicamente da quanti ne sono scarsi produttori o non ne producono affatto. Bottalico (1987) riporta che, su 3460 ceppi di *A. flavus* isolati da alimenti contaminati, solo il 74,4% di essi era in grado di produrre tossine (aflatossine), percentuale che scendeva a 61,4% per l'*A. viridicatum* (ocratossina) e al 16,9% per *A. ocraceus* (ocratossina) (Ominski, *et al.*, 1994).

Ciascuna specie fungina è legata a condizioni ambientali ben definite ed ha specifiche esigenze nutritive. Le condizioni che permettono lo sviluppo del micelio spesso differiscono notevolmente da quelle che possono comportare la produzione di micotossine. La produzione di micotossine è spesso legata a condizioni di stress del fungo e a presenza di particolari substrati come grassi irranciditi, Fanelli e Fabbri (1989) in uno studio condotto per definire il possibile effetto di grassi insaturi e loro derivati ossidati sulla produzione di aflatossine evidenziano gli effetti dell'irrancidimento come possibile meccanismo d'induzione alla sintesi di aflatossine da parte di aspergilli; questo appare in relazione anche ai substrati contaminati

da tale tossina come oleaginose e mais, substrati che contengono un buon o abbondante tenore di oli e che inevitabilmente durante lo stoccaggio subiscono fenomeni di irrancidimento.

-Specie fungina

La produzione di micotossine è strettamente connessa alla presenza di specie tossigene, ma non solo, all'interno della medesima specie sono stati riconosciuti ceppi tossigeni e non; i metaboliti primari contribuiscono alla sintesi ed al catabolismo di proteine, lipidi e carboidrati e sono comuni a tutti i funghi, quelli secondari non sono correlabili alla crescita e dipendono dalla specie e dal ceppo fungino (Pietri, 1998; Yiannikouris e Jouany, 2002). Va ricordato che nonostante l'eterogeneità chimica delle micotossine la stessa molecola può essere prodotta da funghi di specie e genere diversi e che le stesse possono vivere su substrati e in ambienti differenti un esempio ne è l'ocratossina prodotta sia da aspergilli che da penicilli funghi che presentano anche esigenze ambientali e di substrato diverse tra loro (Larsen, *et al.*, 2001; Biagi *et al.*, 2002)

-Livello iniziale di contaminazione fungina

Le micotossine possono essere presenti già in campo ed operazioni di raccolta condotte in maniera scorretta o condizioni di conservazione inadatte possono favorire lo sviluppo di funghi e di conseguenza di micotossine (Mari, 1997). Nel caso del mais, diverse tipologie di pulizia e di separazione nell'operazione di mietitura e trebbiatura comportano notevoli variazioni nella percentuale di granella spezzata (dal 7-8% al 28%), condizione favorente lo sviluppo di muffe. Inoltre in sole 24 ore si sviluppano muffe tossigene nel mais accumulato nei piazzali aziendali; per cui questa pratica andrebbe quindi, per quanto possibile, evitata (Bartolini, 2002).

La crescita di muffe e lo sviluppo di micotossine sono favoriti dall'uso di sili sporchi per la consegna del mangime, come pure di strutture di stoccaggio non adeguatamente pulite. Altro fattore predisponente potrebbe essere l'impiego di impianti per la produzione di mangimi non funzionanti in modo corretto. Un aumento di temperatura della farina durante il processo di macinazione dei cereali dovuti ad attriti e frizioni che determinano produzione di calore o non corretta gestione delle operazioni di pellettatura si potrà avere una migrazione di umidità, creando zone a rischio per un possibile attecchimento delle muffe (Aibino e Garella, 1999).

Le pratiche agronomiche adottate costituiscono una possibile fase critica di controllo delle infezioni fungine o una possibilità di diffusione. Alcune pratiche agronomiche favoriscono potenzialmente la diffusione delle specie fungine in campo: ad esempio diminuzione delle

lavorazioni profonde del terreno con conseguente permanenza dei residui colturali dell'anno precedente può determinare focolai di infestazione.

La portata del rischio di micotossine contenute in caso di colture infette e, quindi, già presenti in fase di pre-raccolta risulta superiore a quella che si può verificare nei prodotti durante le fasi successive (manipolazioni, stoccaggio, trasporto, trasformazioni tecnologiche) (Avantaggiato e Visconti, 2003).

La presenza di micotossine può determinare alterazioni quali-quantitative nelle derrate agricole. Bartolini (2002) riporta una perdita del 7% nel tenore delle proteine e del 63% nel tenore di grassi, oltre ad una diminuzione dell'appetibilità del mangime. Il deossinivalenolo (vomitossina), prodotto da diverse specie appartenenti al genere *Fusarium*, determina ad esempio un rifiuto da parte del suino, mentre la presenza di *Penicillium cyclopium* conferisce all'alimento un gusto di terra (Pietri, 1998). Tuttavia non sempre la presenza di funghi potenzialmente tossigeni si manifesta in modo così evidente.

Micotossicosi

Sono intossicazioni acute o croniche date da micotossine, di norma avvengono attraverso per via alimentare e la loro diagnosi clinica è spesso difficile con emissione di referto di sospetto di micotossicosi.

Negli animali allevati così come nell'uomo è possibile e più frequentemente riscontrabile una sintomatologia cronica, raramente è possibile osservare sintomatologie acute. Spesso la diagnosi di sospetto è legata negli animali a fenomeni di scarso rendimento zootecnico o legata a sintomi aspecifici, mentre la diagnosi clinica è confermata frequentemente solo da evidenze di laboratorio sugli alimenti o da prelievi a carico degli animali. (Pompa 1994; Prelusky *et al.*,1994)

Come limitare le micotossine

In condizioni favorevoli al loro sviluppo le muffe tossigene possono determinare la formazione di micotossine in qualunque fase della filiera cerealicola (Argentiere, 2002).

Il controllo del problema micotossine passa attraverso l'unica strada della riduzione del rischio. La riduzione della contaminazione da micotossine necessita quindi dell'applicazione sia di misure di controllo della contaminazione iniziale, sia di misure di detossificazione applicate ai prodotti cerealicoli.

L'ottenimento di un prodotto finale con livelli accettabili di micotossine risulta attuabile agendo soprattutto durante la pre-raccolta, nonostante le difficoltà che tale approccio comporta, per l'azione di fattori biotici e abiotici; questi ultimi, soprattutto legati a condizioni ambientali, risultano difficilmente controllabili (Avantaggiato e Visconti, 2003). Schematicamente in tabella 3,4, 5 sono riportati alcuni metodi attuabili per il controllo delle micotossine, nelle tabelle 6e 7 sono indicati alcuni metodi di decontaminazione e detossificazione nelle derrate.

Tabella 3. Controllo delle micotossine in fase di pre-raccolta

OBIETTIVI	METODI	EFFETTI
Selezione e sviluppo di varietà resistenti	Tecniche di selezione ed ingegneria genetica	Diminuzione dell'attecchimento delle muffe tossigene, diminuzione della contaminazione iniziale
Controllo delle infestazioni da insetti	Utilizzo di varietà transgeniche e di pesticidi	Diminuzione dei danni meccanici alla pianta e della diffusione delle spore
Controllo dei residui di campo e rotazioni colturali	Lavorazioni profonde del terreno, attuazione dell'avvicendamento colturale	Abbattimento della carica fungina
Controllo dei trattamenti irrigui e fertilità del terreno	Concimazione ed irrigazione equilibrate, evitare stress idrici	Diminuzione dei fattori stressanti per la pianta, controllo dei fattori ambientali favorevoli allo sviluppo di micotossine

Tabella 4. Controllo della contaminazione durante e dopo la raccolta

OBIETTIVI OPERAZIONI AZIONI	METODI	EFFETTI
Tempestività della raccolta	Semina a cicli differenziati, programmazione dei tempi di raccolta	Ottenimento di un prodotto avente la giusta percentuale di umidità
Pulitura delle granaglie	Tecniche meccaniche, elettroniche	Allontanamento di spore fungine o di miceli legate a "particelle polverose"
Essiccamento delle derrate	Essiccamento naturale all'aria o con impianti dedicati	Diminuzione dell'umidità delle derrate (max 14%)
Immagazzinamento (durata, rapidità, modalità)	Locali adeguati (eventualmente con ventilazione artificiale, atmosfera modificata e fumiganti se le derrate sono troppo umide)	Mantenimento di temperatura ed umidità a livelli bassi

Tabella 5. Principali metodi di decontaminazione delle derrate

OBBIETTIVI OPERAZIONI AZIONI	METODI	EFFETTI
Pulitura e separazione meccanica	Decontaminazione manuale (selezione manuale, ispezioni sanitarie), meccanica (vagliatura, molitura, flottazione, ventilazione), elettronica (irraggiamento e scarto elettrico)	Rilevamento e rimozione della massa contaminata
	A secco	Accumulo di fumosine nella crusca e di aflatossine in germe e pula
	Ad umido	Accumulo di aflatossine nelle acque di molitura
Macinazione		Distribuzione delle micotossine in una determinata frazione di molitura e allontanamento

Tabella 6. Principali metodi di detossificazione delle derrate

METODI		EFFETTI
<u>Metodi fisici</u>		
Inattivazione termica	Trattamento idoneo a ciascuna tossina e substrato (es. riscaldamento a 200-250 °C per 40-60 min per farina di frumento contaminata da ocratossina A)	Abbattimento del contenuto di tossine
Irraggiamento	Trattamento con raggi gamma (> 4 kgy)	Abbattimento del contenuto di tossine
Aggiunta di adsorbenti	Minerali: alluminosilicati (bentoniti, zeoliti, sepioliti); organici: carboni attivi; biologici: <i>S. cerevisiae</i> , mannoligosaccaridi ¹	Riduzione dell'assorbimento gastrointestinale mediante legame stabile con le micotossine
<u>Metodi chimici</u>		
Acidi	Acido propionico	Degradazione delle micotossine
Basi	Ammoniaca, idrossido di sodio	
Agenti ossidanti	Perossido di idrogeno, ozono	
Agenti riducenti	Bisolfito	
Agenti cloruranti	Cloro	
<u>Metodi biologici</u>		
Detossificazione biologica	Aggiunta ai mangimi di specifici agenti biotici (es. <i>F. aurantiacum</i> , <i>Trichoderma viridae</i> , <i>A. niger</i> (vs aflatossine), <i>Gliocladium roseum</i> (vs zearalenone)	Degradazione o trasformazione enzimatica delle tossine

Le aflatossine

Le aflatossine sono metaboliti secondari prodotti da diverse specie di *Aspergilli*. L'*A. flavus* micete produttore di aflatossine rappresenta la forma conidiofora (imperfetta) di un ascomicete la cui forma perfetta caratterizzata dalla produzione di un asco, nella forma imperfetta si ha invece la formazione di spore agame, dette conidi.

Alcune specie sono patogene per l'uomo e gli animali, altre, capaci di fermentare lo zucchero, vengono utilizzate per produrre il sakè o vino di riso (*Aspergillus oryzae*) e la salsa di soia (*A. wenti*) (Tiecco, 1999). Dalla coltura di alcune specie (*A. flavus*, *A. fumigatus*) si ricavano antibiotici (flavacidina, flavicina, fumagatina).

Le aflatossine vengono prodotte principalmente da *Aspergillus flavus* e *parasiticus*. Altre specie fungine, quali l'*Aspergillus niger*, *ruber*, *wenti*, *citrinum* e *frequens* sono considerate potenziali produttori (Pompa, 1994; Scott, 1994). E' stata accertata la produzione di varie tossine differenti. L'aflatossina B₁ (così detta per la fluorescenza blu-viola evidenziabile con la lampada di Wood) dal punto di vista chimico è un metossi-difuro-cumarone, mentre l'aflatossina G₁, che presenta una fluorescenza verde è metossidifuro-cumaro-lattone. Sono stati identificati anche diidroderivati della B₁ e della G₁ (rispettivamente B₂ e G₂) (Pompa, 1994). *Aspergillus flavus* produce solo l'aflatossina B, mentre *A. parasiticus* e il raro *A. nomiu* anche l'aflatossina G₁ (Creppy, 2002).

- Tossicocinetica

L'aflatossina B₁ dopo l'assunzione da parte di un vertebrato superiore può essere metabolizzata ad altri composti, alcuni dei quali sono caratterizzati da una maggiore o minore tossicità. Queste trasformazioni comprendono reazioni di prima fase (riduzione, ossidazione e idrolisi) e di seconda fase che consentono la combinazione con un composto naturale prodotto dall'organismo (Williams, 1971).

- Assorbimento

Le aflatossine sono composti caratterizzati da una elevata lipofilia; quando assunte per via orale vengono assorbite prevalentemente a livello intestinale e passano al torrente circolatorio dove si legano alle albumine (Leeson *et al.*, 1995; Pompa, 1984).

L'assorbimento attraverso il sistema respiratorio è stato accertato nell'uomo in addetti alla macinazione dei mangimi ma l'importanza di questa modalità di intossicazione non è stata attualmente quantificata.

- Distribuzione

Le aflatossine tendono a distribuirsi nel grasso e nei tessuti molli, tuttavia le concentrazioni più elevate di residui si riscontrano negli organi coinvolti nei processi di detossificazione: il rene e soprattutto il fegato (Leeson *et al.*, 1995; Derache, 1986). Esiste una correlazione fra la quantità di tossina ingerita e la presenza di residui in questa ultima sede. Tale rapporto è 800:1 nel suino, 14000:1 nel bovino, 1200:1 nel pollo (Piva e Pietri, 1988).

- Reazioni di prima fase

La reazione più importante nel metabolismo di prima fase dell'aflatossina B₁ è l'ossidazione da parte di enzimi microsomiali che avviene prevalentemente a livello epatico. Il fegato rappresenta la sede metabolica dove, ad opera delle ossidasi a funzione mista citocromo P-450 dipendenti, presenti nella frazione microsomiale, si giunge alla formazione di diversi metaboliti (aflatossina Q₁, P₁, B_{2a}, M₁, M₂, aflatossicolo, ecc.) e degli intermedi epossidi (Pompa 1994).

Mediante l'azione di enzimi a funzione mista citocromo P-450 dipendenti viene prodotto l'AFB₁ 8,9 epossido, una delle sostanze a più alto potere cancerogeno attualmente conosciute (Ceruti, 1993; Yiannikouris e Jouany, 2002).

Mediante idrossilazione si può avere la formazione di aflatossina M₁ (così chiamata in quanto viene isolata soprattutto nel latte), e Q₁; attraverso una reazione di O-demetilazione si ottiene la aflatossina P₁. Questi ultimi due composti sono caratterizzati da una tossicità molto inferiore rispetto alla B₁. (Pompa, 1994; Leeson *et al.*, 1995).

L'aflatossicolo, prodotto dalla riduzione della B₁, in natura viene velocemente riconvertito a B₁ e ne costituisce quindi una riserva (Pompa, 1994; Yiannikouris e Jouany, 2002).

- Reazioni di seconda fase

Il processo di detossificazione dell'organismo nei confronti delle aflatossine avviene principalmente attraverso due reazioni: il B₁-8,9-epossido viene legato al glutadione o GSH (reazione catalizzata dalla GSH-transferasi) ed in minor misura trasformato in aflatossicolo (Pompa, 1984); altri metaboliti (AFM₁; AFP₁; AFQ₁) vengono coniugati con l'acido glicuronico (Yiannikouris e Jouany, 2002). Le reazioni di seconda fase diminuiscono la tossicità ed aumentano la idrosolubilità e la polarità dei composti favorendone l'escrezione attraverso bile e in minor misura urine e latte (Yiannikouris e Jouany, 2002; Williams, 1971). In tabella 1 sono schematizzate le reazioni coinvolte nel metabolismo dell'aflatossina.

Tabella 1. Maggiori vie di bioconversione delle micotossine nei sistemi biologici (Yiannikouris e Jouany, 2002).

Tossina	Ossidazione	Riduzione	Coniugazione	
	P450		glucuronide	GSH
AFB ₁	eossido AFM ₁ AFP ₁ AFQ ₁	aflatossicolo	AFM ₁ AFP ₁ AFQ ₁	eossido

- Tossicità e DL₅₀

L'aflatossina (AFB₁) è stata classificata come composto molto tossico (DL₅₀ 1-50 mg/kg) per molte specie animali ed estremamente tossico (DL₅₀ < 1mg/kg) per alcune particolarmente sensibili come trota, gatto e anatroccolo (Leeson *et al.*, 1995). Quest'ultimo, per l'elevata sensibilità (la DL₅₀ è 0,35 per AFB₁ e 0,78 per AFG₁ in animali di un giorno), in passato veniva utilizzato per la prova biologica atta a stabilire l'eventuale contaminazione delle derrate alimentari (Pompa, 1994).

In tabella 2 sono riportati i valori di DL₅₀ per alcune specie animali.

Gli effetti tossici conseguenti dovuti all'esposizione all'AFB₁ sono correlati alla dose ed al tempo di esposizione: vengono distinte due diverse forme di intossicazione, acuta e cronica (Leeson *et al.*, 1995). L'organo bersaglio è il fegato, ma vengono interessati anche altri organi e tessuti.

La forma acuta è caratterizzata da depressione ed anoressia seguite da anemia, ascite, ittero e diarrea. Frequenti, a causa delle lesioni epatiche, le coagulopatie che si manifestano con emorragie petecchiali sulle mucose apparenti, gastroenterite emorragica, melena, ematuria. Dal punto di vista anatomico-patologico si osserva congestione ed emorragia epatica (Yiannikouris e Jouany, 2002), necrosi periportale, proliferazione dei dotti biliari e iperplasia delle cellule ovali (Pompa, 1994; Leeson *et al.*, 1995). A livello renale e cardiaco è stato rilevato accumulo di acidi grassi. La morte si verifica di norma entro poche ore o giorni ed è dovuta alla gravità delle lesioni epatiche (Yiannikouris e Jouany, 2002).

Tabella 2. DL50 in diverse specie (Pompa, 1994)

Specie	DL ₅₀ espresso in mg/kg <i>per os</i> per una singola somministrazione
coniglio	0,3
trota	0,3
anatroccolo	0,35
gatto	0,55
tacchinotto	0,4-0,6
cane	0,5-1
suini appena svezzati	0,62
pulcino	1-1,5
gallina ovaiaola	0,2-1
ratto	5-18

La forma cronica si verifica in natura più frequentemente rispetto a quella acuta.

Spesso, pur assistendo ad un peggioramento delle prestazioni produttive non si manifesta una sintomatologia conclamata.

Nei ruminanti adulti l'esposizione a bassi livelli di aflatossine per lungo tempo determina diminuzione dell'efficienza alimentare, dell'immunocompetenza e della produzione di latte ed alterazioni della motilità ruminale (Smith e Ross, 1991; Edrington *et al.*, 1994). Studi compiuti *in vitro* evidenziano gli effetti sulla microflora ruminale: diminuita degradazione della cellulosa, minore produzione di acidi grassi volatili ed ammoniaca e attività proteolitica inferiore (Bodine e Mertens, 1983).

Gli ovini sono relativamente resistenti all'azione tossica delle aflatossine: tuttavia alcuni Autori hanno riscontrato una diminuzione dell'assunzione di alimento ed una formazione di lesioni epatiche accompagnate da compromissione delle performance produttive con 2,5 mg/kg di AFB₁ nella dieta (Edrington *et al.*, 1994).

Nelle galline ovaiole con dosi comprese fra 0,2 ed 1 ppm determinano diminuzione della produzione e della schiudibilità delle uova, mentre nel pollo, oltre ad una diminuzione dell'accrescimento e dell'efficienza alimentare (Leeson *et al.*, 1995), si osserva decalcificazione ossea per diminuzione dell'assorbimento intestinale di calcio (Pompa, 1994).

Il peggioramento delle performance zootecniche, spesso accompagnato da sintomi generici quali anoressia, turbe della digestione e dimagrimento è legato alla diminuzione della funzionalità epatica (Edrington *et al.*, 1994). Le lesioni croniche più frequenti sono l'induzione del carcinoma epatico, iperplasia dei dotti biliari, steatosi epatica (Leeson *et al.*, 1995).

La trota é la specie più sensibile all'azione cancerogena, infatti la somministrazione di 0,004 ppm di tossina provoca lesioni cancerose a livello epatico in cinque giorni. I ruminanti possiedono elevata resistenza dovuta probabilmente ad una maggiore efficacia dei sistemi di detossificazione GSH-dipendenti ed alla parziale demolizione da parte della flora ruminale (Pompa, 1994).

Fattori non legati alla specie che possono influenzare la tossicità sono l'età dell'animale (gli animali giovani risultano più sensibili (Pompa, 1994) e il sesso, si è infatti osservato che l'effetto cancerogeno nel ratto femmina è meno intenso che nel maschio, così pure la tossicità espressa da forti dosi è meno acuta nella femmina che nel maschio. L'effetto tossico, soprattutto quello cancerogeno, è anche in funzione della durata dell'esposizione (dosi prolungate nel tempo hanno più probabilità di indurre tumore rispetto a singole dosi quantitativamente consistenti assunte in una sola o poche volte).

Meccanismo d'azione

- Azione sugli acidi nucleici

Studi compiuti *in vitro* dimostrano che AFB1 è in grado di inibire la sintesi di RNA e DNA. Sono attualmente noti due tipi di interazioni con il DNA da parte dell'aflatossina. Il primo consiste in un legame reversibile non covalente con i siti attivi della macromolecola, il secondo in un legame molto stabile di tipo covalente che porta alla formazione degli addotti del DNA. In questo secondo caso ciò che si lega al DNA non è la micotossina ma un suo metabolita, il derivato epossidico che deriva dal coinvolgimento del citocromo P450 epatico, un prodotto derivante dalla azione detossificante epatica. Questo metabolita riveste particolare importanza per l'elevato potenziale cancerogenetico a sua volta determinato dalle reazioni con gli acidi nucleici. L'alterazione nell'espressione di particolari geni, detti proto-oncogeni, presenti in forma inattiva in tutte le cellule e attivabili anche da una singola mutazione, può portare ad alterazioni nella regolazione dello sviluppo, della proliferazione e dell'iperplasia cellulare; queste alterazioni possono eventualmente progredire verso una evoluzione maligna (Weinberg, 1989). Ad esempio, in tumori di ratti indotti da esposizione cronica ad AFB1 sono stati isolati proto-oncogeni (appartenenti alla famiglia c-Ki-ras) attivati (Leeson *et al.*, 1995).

- Azione sulla sintesi proteica, del metabolismo dei lipidi e carboidrati

Le aflatossine determinano una diminuzione della sintesi proteica attraverso due meccanismi, il primo è determinato da una azione disaggregante sui poliribosomi e sul RER epatici. Il secondo si è legato al blocco della trascrizione da parte della RNA-polimerasi DNA-dipendente con conseguente diminuzione della sintesi proteica cellulare. Un effetto è l'inibizione a livello epatico della sintesi dei fattori della coagulazione ed anche fenomeni di

steatosi collegati alla minore capacità di metabolismo/mobilizzazione lipidica epatica (Pompa, 1984).

La diminuita sintesi di proteine “addette” al trasporto dei lipidi generato dal danno epatico della tossina causano alterazione della mobilizzazione e del trasporto dei lipidi che sfocia come reperto clinico-anatomopatologico nella degenerazione grassa del fegato. Le aflatossine determinano anche una alterazione del metabolismo dei carboidrati con diminuzione delle riserve di glicogeno epatico.

Azione a carico del sistema immunitario

Le aflatossine sono in grado di provocare alterazioni della risposta umorale e cellulo-mediata. Ciò è probabilmente legato all’azione diretta esercitata sulle membrane cellulari e sugli organuli che a sua volta ha una ricaduta sulla funzionalità delle cellule deputate alla produzione anticorpale e alla citolisi cellulo-mediata (Sayan *et al.*, 1995).

In particolare è stata rilevata una correlazione tra somministrazione ripetuta di AFB1 e la comparsa di una alterata ripartizione tra due sottopopolazioni di linfociti T (linfociti T-helper e T citotossici) in scrofe intossicate durante la gestazione e la lattazione con pool di aflatossine B₁, B₂, G₁, G₂ somministrate giornalmente all’interno della razione in dose di 300 ppb. Secondo gli Autori disordini quali-quantitativi all’interno della formula leucocitaria potrebbero avere effetto sull’efficienza della risposta immunitaria.

Altre ricerche confermano una relazione positiva tra l’elevata frequenza di infezioni opportuniste e il consumo di alimenti contaminati da aflatossina.

Aflatossicosi nel suino

- Sintomi acuti e cronici

La sintomatologia acuta non è frequente e la sua gravità è legata alla durata di esposizione e all’età dell’animale (in questo caso gli animali giovani risultano più sensibili, in tabella 3 sono evidenziati i sintomi clinici in funzione del grado d’intossicazione).

Tabella 3. Sintomi clinici da aflatossicosi nel suino (Osweiler, 1999).

Categoria di suini	Livello di tossina nella razione (ppb)	Sintomi clinici
Accrescimento e finissaggio	<100ppb	Nessun sintomo clinico; residui nel fegato
	200-400ppb	Diminuzione dell'accrescimento e dell'efficienza alimentare; a volte immunosoppressione
	400-800ppb	Lesioni epatiche microscopiche, colangioepatite; aumento del livello sierico di enzimi epatici, immunosoppressione
	800-1200ppb	Diminuzione dell'accrescimento e diminuzione del consumo di cibo; arruffamento del pelo; ittero; ipoproteinemia
	1200-2000 ppb	Ittero; coagulopatie; depressione; anoressia; alcuni decessi
	>2000 ppb	Epatosi acuta; coagulopatia; morte in 3-10 giorni
Scrofe in gestazione e scrofette	500-750 ppb	Nessuna conseguenza sul concepimento; nascita di suinetti normali, rallentata crescita per assunzione di aflatossina con il latte

Anche nel suino, come per altre specie, i sintomi più comuni di intossicazione acuta o sub-acuta sono costituiti da anoressia e depressione, accompagnati da ittero ed alterazioni della coagulabilità del sangue.

Dal punto di vista macroscopico il fegato si presenta marrone chiaro o color argilla, con emorragie centrolobulari e lesioni emorragiche (petecchie ed ecchimosi) nella sottosierosa, si osservano anche emorragie intestinali e a livello di colon. Con il progredire dell'intossicazione, il fegato diviene giallo e si sviluppa una fibrosi che rende l'organo duro, secco e con lobulatura accentuata (Harvey *et al.*, 1989).

Le alterazioni microscopiche comprendono vacuolizzazione degli epatociti, necrosi e degenerazione grassa, che si concentra attorno alle vene centrolobulari. Se si verifica l'evoluzione verso la forma cronica si ha la comparsa di epatomegalociti, caratterizzati dalla presenza di più nuclei (Harvey *et al.*, 1988).

Le alterazioni sieriche più importanti riguardano l'aumento dei livelli di enzimi associati al danneggiamento degli epatociti (aspartato amino-transferasi, alanino amino-transferasi, fosfatasi alcalina, gamma glutamil-transferasi) e la diminuzione di altri parametri, quali la capacità di legare il ferro, la quantità delle proteine totali, l'albuminemia, i livelli di colesterolo e di glucosio (Harvey *et al.*, 1988, 1989). Risultano elevati anche il tempo di

protrombina, il tempo parziale di tromboplastina e il livello di bilirubina, segni di sofferenza epatica (Panagala *et al.*, 1986).

Nella maggioranza dei casi, l'intossicazione da aflatossine nel suino è dovuta ad una esposizione prolungata a piccole dosi e coinvolge contemporaneamente più soggetti di un allevamento. L'eventualità di una intossicazione può essere presa in considerazione qualora si manifestino ittero, emorragie e coagulopatie non attribuibili ad altre cause ed accompagnate da peggioramento delle prestazioni zootecniche e da sintomi aspecifici quali malessere, dimagrimento, anoressia che, come visto in precedenza, risultano essere i segni clinici più comuni in caso di intossicazione cronica. Tale sospetto può essere confermato dalla presenza di lesioni epatiche caratteristiche rilevate al momento della macellazione. Infatti, frequentemente, la cirrosi epatica del suino viene correlata all'aflatossicosi cronica e rappresenta l'evoluzione maligna di una fibrosi dovuta alla continua azione di agenti fibrinogeni, quali appunto le micotossine che determinano danni irreversibili. Il fegato presenta una disarchitettura generale del parenchima, fibrosi irreversibile associata a fenomeni rigenerativi che conferiscono all'organo un aspetto bernoccolato, con noduli disposti irregolarmente ed aree di colore diverso (Marcato, 1998).

Per quanto riguarda le conseguenze sull'efficienza riproduttiva, studi recenti (Bonomi, 1999) hanno dimostrato che, a 60 giorni dal parto, l'aggiunta al mangime per scrofe di aflatossine B₁ e G₁ in associazione e per dosaggi complessivi di 650 e 800 ppb non ha determinato la comparsa di alterazioni cliniche evidenti, ma ha influenzato negativamente le prestazioni produttive degli animali, diminuendo l'incremento ponderale, il consumo di alimento, il numero di suinetti nati vivi rispetto a quelli nati morti ed il loro peso alla nascita. I suinetti nati da scrofe trattate manifestano alterazioni a livello epatico, renale e gastroenterico, con aumento del tasso di mortalità rispetto ai soggetti di controllo.

L'assunzione di razioni sperimentalmente contaminate determina la presenza di residui di aflatossine nel latte delle scrofe in quantità circa mille volte inferiore a quella contenuta nell'alimento (Silvotti *et al.*, 1997).

Le ocratossine

L' Ocratossina A

Generalità

Le ocratossine furono isolate per la prima volta dopo la somministrazione di cereali contaminati da funghi ad anatroccoli, ratti e topi (Theron *et al.*, 1966). In seguito si scoprì che l' ocratossina A è il più importante principio tossico prodotto da *Aspergillus ochraceus* (Dounnik e Peckham, 1970; Peckham *et al.*, 1971).

Indagini successive hanno dimostrato che numerose specie appartenenti ai generi *Aspergillus* e *Penicillium* sono in grado di produrre l' ocratossina A, il suo analogo dechlorurato, l' ocratossina B, e i rispettivi esteri metilici ed etilici, componenti minori della coltura fungina. Per quanto riguarda il genere *Aspergillus* la specie produttrice di ocratossina A più conosciuta è *A. alutaceus* (precedentemente conosciuto come *A. ochraceus*), ma ne esistono altre, tra cui *A. sulphureus*, *A. sclerotium* e *A. melleus*, che però solo raramente sono state identificate in alimenti o mangimi (Madhyastha *et al.*, 1990; Moss, 1996), mentre la specie appartenente al genere *Penicillium* maggiormente implicata è il *P. verrucosum*.

L'ocratossina prodotta da *P. verrucosum* e *viridicatum* sono presenti in quasi tutti i cereali di interesse zootecnico (mais, orzo, avena, riso e grano) ed anche nei semi e nei prodotti di oleaginose soprattutto se stoccate a livelli di umidità troppo elevati. L'ocratossina su questi substrati è una contaminazione tipicamente legata alla fase di stoccaggio, la sua sintesi è infatti successiva alla raccolta. (Yannikouris e Jouany, 2002).

Le temperature elevate favoriscono l' attività di *A. ochraceus alutaceus*, che è anche diffuso nelle regioni tropicali, mentre le temperature più basse sono favorevoli al *P. verrucosum*, che è più diffuso nelle regioni fredde e temperate, quali i Paesi del nord Europa e Canada.

Le ocratossine sono derivati dell' isocumarina legati a L-beta-fenilalanina e sono classificate come pentacetidi. Le ocratossine esistono in diverse forme, con tossicità variabile dovuta alla dissociazione del gruppo fenolico idrossile. Esistono altre forme che posseggono un minor grado di tossicità. Sebbene un elevato numero di derivati dell'ocratossina siano stati isolati in laboratorio da colture di funghi produttori, solo l'ocratossina A e molto più raramente l'ocratossina B possono essere rinvenute naturalmente nelle piante (Marquardt e Frohlich, 1992; EFSA 2006).

Il *Penicillium verrucosum* si sviluppa soprattutto su cereali ricchi di carboidrati quali l'orzo, mentre l'*Aspergillus alutaceus* su moltissimi tipi di derrate alimentari, soprattutto se ad elevato tenore lipidico e proteico (Biagi *et al.*, 2002); l'*A. alutaceus* è infatti molto comune nei semi di caffè verde e nelle spezie, ed è anche frequentemente isolato dai semi di cacao, di soia, arachidi, riso e grano (Kuiper-Goodman e Scott, 1989). In ogni caso la maggiore

incidenza e i maggiori livelli di contaminazione da ocratossina A sono stati rilevati nei cereali: attualmente si è stimato che in Europa circa, se non più del 50% dell'assunzione di tale tossina con la dieta proviene dai cereali e dai prodotti derivati dai cereali (EFSA 2006).

L'ocratossina A è una molecola relativamente stabile, può attraversare immodificata la catena alimentare e quindi la contaminazione si può estendere in alimenti di origine animale quali carne, latte, alimenti fermentati. In alcune zone dell' Europa (del Nord in particolare) circa il 20% dell' esposizione è determinato dal consumo di alimenti di origine animale , quali carne e sangue di suino (Visconti, 1997).

Destino biologico dell' ocratossina negli animali:

Assorbimento

L'assorbimento avviene a livello gastrointestinale ed è il primo passaggio che regola l' ingresso della tossina all'interno del sangue e successivamente ai tessuti componenti l'organismo.

Per quanto riguarda le caratteristiche dell'ocratossina A, sia il gruppo fenolico che quello carbossilico sono responsabili della lieve acidità e della debole proprietà idrofila di questa molecola. Per questo la diffusione della forma non ionizzata attraverso la membrana lipidica è considerata il meccanismo principale dell'assorbimento gastrointestinale. Sulla base del rapido declino del livello gastrico in ratti a cui era stata somministrata ocratossina A per via orale, si è ipotizzato che l'assorbimento avvenga già nella prima parte del tratto gastroenterico (Galtier, 1974; Suzuki *et al.*,1977). Successivamente è stato dimostrato che l'assorbimento dell'ocratossina A avviene in massima parte nel digiuno prossimale (Kumagai, 1988; Kumagai e Aibara, 1982). Nei ruminanti la microflora ruminale idrolizza l'ocratossina A prima che avvenga l'assorbimento in ocratossina α , un metabolita meno tossico (Yiannikouris e Jouany, 2002).

Dopo che è avvenuto l' assorbimento gastrointestinale, le tossine sono trasportate in tutto l' organismo attraverso il sangue, dove esse possono interagire con le cellule ematiche o con le proteine plasmatiche.

Per l'ocratossina A è stato dimostrato che il fenilbutazone, l'etilbiscumacetato e la sulfametossipiridazina inibiscono competitivamente il legame della tossina all'albumina nel suino (Galtier *et al.*,1980). Questo indicherebbe che queste sostanze e la tossina probabilmente si legano allo stesso sito nella proteina e che si possano pertanto verificare importanti interazioni tra la tossina e queste molecole di comune utilizzo nella terapia umana e veterinaria.

Da un punto di vista farmacocinetico l'ocratossina A, avendo un lunga emivita ematica, è una cosiddetta "tossina rimanente", anche se sono state osservate differenze interspecifiche

riguardanti la stessa micotossina. L'emivita stimata è pari a 55-120 ore nel ratto, 72-120 ore nel suino, 510 ore nei macachi (Creppy, 2002).

Nell'uomo la tossicocinetica dell'ocratossina A è particolare ed è caratterizzata da una emivita nel sangue pari a 840 ore dopo l'ingestione per via orale; questa è la più lunga emivita tra tutte le specie esaminate (Schlatter *et al.*, 1996), ed è dovuta al riassorbimento da parte del circolo entero-epatico, dal riassorbimento dalle urine dopo la secrezione tubulare e anche dal forte legame alle proteine plasmatiche.

Distribuzione tissutale:

Il destino dell'ocratossina A nel suino e nel pollame è ben documentato a causa del rilevamento dei residui della tossina nei tessuti di queste specie. Nei suini esposti ad ocratossina A per un periodo di tempo che va dalle due alle otto settimane i livelli residuali alti sono stati rilevati nei reni e poi, in ordine decrescente, nel muscolo, fegato e grasso (Madsen *et al.*, 1982). Quando il mangime contenente l'ocratossina A era sostituito da una dieta non contaminata prima della macellazione, i livelli di residui decrescevano rapidamente.

Metabolismo:

La biotrasformazione delle micotossine è un evento importante per il loro destino nel corpo animale.

Per quanto riguarda l'ocratossina A, le sue proprietà tossiche sono dovute sia ad un processo metabolismo-dipendente che ad uno non metabolismo-dipendente.

Infatti una parte del suo effetto nefrotossico è dovuto alla sua struttura chimica, omologa a quella della fenilalanina, che porta ad una inibizione della sintesi proteica a causa della competizione per lo specifico t-RNA (Neal, 1998). La reazione metabolica che avviene nella detossificazione dell'ocratossina A e B nei ruminanti è data da un'idrolisi catalizzata dalla carbossipeptidasi A e dalla chimotripsina. Questo processo rompe il legame ammidico (Doster *et al.*, 1972) con la formazione dell'aminoacido fenilalanina e dell'ocratossina α (Patterson, 1977), molto meno tossica della molecola originaria, essa può essere inoltre esterificata con produzione di ocratossina C avente tossicità simile alla α (Hult *et al.*, 1976; Yiannikouris e Jouany, 2002).

Probabilmente su questa capacità di detossificazione si basa la resistenza dei ruminanti nei confronti dell'ocratossina A, e questo è provato dall'osservazione che invece i giovani ruminanti che, per l'incompleto sviluppo dei prestomaci, si comportano ancora come monogastrici sono sensibili a tale tossina (Krogh, 1992). La frazione dell'ecosistema microbico del rumine rappresentata dai protozoi sembra essere più efficace nel metabolismo delle micotossine rispetto alla frazione costituita dai batteri, ma i protozoi sono anche più sensibili a queste tossine (Westlake *et al.*, 1989).

Il meccanismo biochimico alla base della tossicità renale dell'ocratossina, effetto più noto e studiato, sembra essere legato all'interazione di alcuni suoi effetti tossici caratteristici.

L'ocratossina possiede la capacità di inibire il trasporto di fosfati e la respirazione a livello mitocondriale attraverso l'azione di inibizione competitiva di un carrier proteico sito internamente alla membrana mitocondriale, questo sembra essere la causa di degenerazione mitocondriale osservata in caso di intossicazione. Una minore integrità di membrana degli organelli cellulari sembra strettamente collegata all'azione di inibizione della sintesi proteica indotta dall'ocratossina; la minore integrità membranaria è associata ad un aumento di enzimi lisosomiali nel liquido intracellulare con una conseguente degenerazione epiteliale, i cambiamenti a carico dei mitocondri e degli organuli cellulari che, in definitiva, si ripercuotono sull'integrità dell'epitelio sembrano essere la causa della tossicità renale dell'ocratossina, tossicità che si manifesta primariamente a carico dei tubuli contorti prossimali (Stoev *et al.*, 2001).

Eliminazione:

L'eliminazione delle micotossine avviene attraverso le feci oppure attraverso le urine a seconda dell'efficacia dell'assorbimento gastrointestinale e della possibilità di metabolizzazione epatica ed è caratteristica per ogni molecola.

Dopo la somministrazione per via orale, l'escrezione urinaria è più efficace nel caso delle tossine altamente assorbite e metabolizzate, ed a queste appartiene l'ocratossina A. Alla nefrotossicità di questa tossina partecipano specifici processi fisiologici che governano il destino delle sostanze anioniche all'interno dei reni (riassorbimento attivo) (Stein *et al.*, 1985).

L'eliminazione con le feci può essere conseguente ad uno scarso assorbimento all'interno del tratto gastrointestinale o ad un'efficiente escrezione biliare della tossina o dei suoi metaboliti. L'ocratossina A viene eliminata in maniera significativa con la bile sotto forma di metaboliti coniugati (Galtier, 1998). Inoltre è stato dimostrato in ratti e suini l'attività del circolo enteroepatico che partecipa all'accumulo di queste tossine nell'organismo attraverso il riassorbimento delle stesse (Roth *et al.*, 1988).

Vacche in lattazione alimentate con diete contaminate eliminano l'ocratossina A, sia nella forma della tossina originaria che in quella di metaboliti tossici attraverso la mammella (Yiannikouris e Jouany, 2002).

Tale tossina è stata riportata come un naturale contaminante del latte di vacca poiché la diffusione delle forme non ionizzate di questa molecola sarebbero capaci di attraversare *in vivo* la barriera sangue-latte (Galtier, 1998). E' evidente che l'eliminazione attraverso questa via rappresenta un alto rischio in termini di sicurezza alimentare.

Tossicità dell' ocratossina e DL 50:

La tossicità dell'ocratossina A si manifesta attraverso tre meccanismi d'azione principali. I meccanismi più rilevanti sono:

- 1) induzione della alterazione del metabolismo del calcio;
- 2) inibizione della fenilalanina-tRNA sintetasi che ha, come conseguenza, l'inibizione della sintesi proteica;
- 3) la formazione dei metaboliti dell'ocratossina A che si legano al DNA, causando la rottura del DNA ed altri effetti.

L'ocratossina A esercita un'azione anti-vitamina K, cui può conseguire una sindrome emorragica.

La tossicità dell'ocratossina è sia acuta che cronica, gli effetti evidenziati a carico di diverse specie animali della tossicità cronica seppur riconducibili ai meccanismi d'azione tossica della molecola si evidenziano con calo dell'attività immunitaria con attività di inibizione dei linfociti B e T; ancora si nota un calo dei linfociti deputati al controllo delle cellule tumorali e questo sembra essere collegato con la proprietà cancerogena della tossina. Ancora tra gli effetti predominanti della tossina vi è l'attività tossica a carico di rene e fegato (Yiannikouris e Jouany, 2002).

Tra gli effetti tossici riscontrabili in uno studio condotto da Biró *et al.* (2003) si è dimostrato un possibile avverso effetto dell'esposizione all'ocratossina di verri in ordine alla qualità del seme prodotto.

In questa ricerca si è infatti evidenziato un peggioramento del volume eiaculato, della motilità degli spermatozoi e della loro vitalità, questo effetto è stato collegato dagli Autori alla riduzione nella sintesi proteica che influenzerebbe negativamente la sintesi proteica nella spermatogenesi con calo della stabilità di membrana degli spermatozoi.

Per quanto riguarda l'effetto genotossico dell'ocratossina A, è stato dimostrato che essa causa rottura del DNA nelle cellule della milza di topo *in vitro*. Questi punti di rottura sono stati evidenziati anche in vivo nel rene, fegato e milza di topi che avevano ricevuto una sola dose per via intraperitoneale di ocratossina A e nel rene e fegato di ratto dopo trattamento per 12 settimane ad un livello equivalente a basse concentrazioni nella dieta (2 mg/kg nel cibo) (Creppy *et al.*, 1985).

La DL₅₀ dell'ocratossina A è stata calcolata nel ratto, dopo somministrazione per via orale, ed è risultata pari a 22 mg/kg di peso vivo; nel pollo, dopo somministrazione per via orale, la DL₅₀ è risultata pari a 3-4 mg/kg, nel tacchino la DL₅₀ è superiore al pollo ed è all'incirca di 5.9 mg/kg. L'ocratossina B si è dimostrata meno tossica della A, pur avendo i due composti una struttura chimica molto simile (Pompa, 1994).

La DL₅₀ dell'ocratossina A nel suino è stata valutata pari a 1 mg/kg di peso vivo per sei giorni, dopo somministrazione per via orale, 1-2 mg/kg PV nei suinetti, sempre dopo somministrazione *per os*.

L' ocratossicosi:

L' ocratossicosi acuta nei mammiferi si manifesta con anoressia, sete intensa, poliuria, distensione della parete addominale, dolori addominali, diarrea ed edemi sottocutanei.

I reperti anatomo-patologici più salienti sono rappresentati da una grave gastroenterite con focolai di necrosi a livello intestinale, da un edema con focolai necrotici a carico del tessuto linfatico, da notevoli alterazione degli epatociti (accumulo di glicogeno, steatosi, estesi focolai di necrosi), da fenomeni necrotici a carico dei tubuli renali, fibrosi periglomerulare ed interstiziale che evolve in atrofia glomerulare.

Tra i mammiferi il suino è l'animale più sensibile agli effetti tossici dell'ocratossina A. Negli animali adulti l'intossicazione spontanea decorre in forma prevalentemente subacuta o cronica con riduzione dell'appetito, perdita di peso e limitati fenomeni di polidipsia e poliuria, mentre solo raramente la funzionalità renale è compromessa a tal punto da comportare l'insorgenza di una sindrome uremica. Si può avere proteinuria, glicosuria ed aumento della concentrazione sierica di creatinina (Tapia e Seawright, 1984); l'alterazione della funzionalità del tubulo prossimale porta ad una riduzione della capacità di concentrare le urine e ad una maggiore escrezione urinaria di glucosio.

Le lesioni riscontrabili a carico dei reni sono rappresentate da aumento di volume, di peso e di consistenza (fibrosi corticale diffusa) oltre che dalla comparsa di rugosità e di irregolarità della superficie degli organi, che si presentano di colore pallido (Rutqvist *et al.*, 1978).

All'esame istologico queste lesioni manifestano chiaramente i fenomeni degenerativi dell'epitelio tubulare, la fibroplasia connettivale dell' interstizio e la ialinosi glomerulare (Buck *et al.*, 1966).

I livelli di ocratossina A nei reni degli animali intossicati oscillano in genere tra i 2 e i 100 ppb.

Questa nefropatia del suino, molto diffusa nelle regioni del nord dell'Europa (Danimarca, Svezia) è stata denominata "nefropatia micotossica", e può essere riprodotta anche sperimentalmente sia con la somministrazione protratta di ocratossina A (1 mg/kg o 200ppb nel mangime per alcuni mesi) (Krogh *et al.*, 1976), sia con la somministrazione di citrinina (200ppb nel mangime), che è un' altra tossina prodotta da *Penicillium viridicatum* e dotata di spiccata nefrotossicità. Poiché il *P. viridicatum* è anche produttore di ocratossina A è probabile che nella sua forma spontanea di "nefropatia micotossica" sia provocata dalla concomitante presenza di queste due micotossine nei mangimi contaminati da muffe; l'ocratossina e la citrinina sono spesso coesistenti nel medesimo substrato ed è ipotizzabile un effetto contemporaneo a carico del rene (Booth e McDonald, 1982; Prelusky *et al.*, 1994)

Tra i volatili la specie più sensibile all'ocratossina A è l'anatroccolo (DL₅₀ di 0.5 mg/kg) mentre meno sensibili risultano il pollo (3-4 mg/kg), il tacchino (5.9 mg/kg), e la quaglia (16.5 mg/kg) (Prior *et al.*, 1976).

La sintomatologia dell'ocratossicosi in queste specie animali è caratterizzata da depressione, diarrea, disidratazione, arresto della crescita, anemia, e, a dosi sub-letali, inibizione della emopoiesi e deplezione degli elementi linfoidei della milza e della borsa di Fabrizio (Pekham *et al.*, 1971).

Diete contenenti rispettivamente 1, 2, 4 ppm di ocratossina A somministrate a polli di 14 settimane e fino ad un anno di età determinano minor incremento ponderale, sfavorevole indice di conversione degli alimenti, ritardo della maturità sessuale e riduzione della deposizione, del peso e della schiudibilità delle uova. Dosi inferiori di tossina (0.5 ppm) in animali di tre settimane di età provocano solamente un brusco e significativo arresto della crescita (Tucker e Hamilton, 1971; Huff *et al.*, 1974). Inoltre è stato dimostrato che l'ocratossina causa nei giovani broiler una riduzione della resistenza delle ossa, che appaiono gommose a causa della minore mineralizzazione del tessuto osseo, e presentano un aumento dei diametri della tibia (Huff *et al.*, 1977).

Gli effetti clinico-patologici causati da tale tossina includono un incremento dell'attività degli enzimi aspartato-aminotransferasi e lattato deidrogenasi nelle urine (Kitchen *et al.*, 1977), inoltre riduzione del peso specifico delle urine, proteinuria e glicosuria.

Le lesioni anatomico-patologiche riportate sono date da formazione di figure mieliniche e disordine citoplasmatico nelle cellule epiteliali dei tubuli renali (EFSA 2006; Szczech *et al.*, 1974) e moderata necrosi epatica centrolobulare ed alterazioni del grasso epatico (Szczech *et al.*, 1973).

Gli effetti teratogeni sono stati identificati nel ratto e nel topo ed interessano il sistema nervoso centrale, l'occhio e la colonna vertebrale, portando ad encefalopatie, microftalmia, collo e arti più corti del normale e ricurvi, riduzione delle dimensioni dell'intero corpo dell'animale, paratopie di organi che risultano invertiti nella loro posizione. Questi effetti non sono stati riscontrati nelle scrofe dopo somministrazione per via orale della dose di 0.38 mg/kg: i suinetti nati da queste risultarono normali (Galtier, 1991).

Studi effettuati su topi e ratti di laboratorio sulla cancerogenesi hanno dimostrato un'alta incidenza di adenomi renali, carcinomi renali e fibroadenomi mammari. Nel rene del ratto, l'induzione dei tumori è stata evidenziata ad una dose molto bassa (70 µg/kg di peso vivo) (Kuiper-Goodman e Scott, 1989).

In base al rischio cancerogeno per l'uomo l'ocratossina A è stata classificata come appartenente al gruppo 2b (della classificazione prodotta dallo IARC), al quale appartengono gli accertati cancerogeni per gli animali e possibili cancerogeni per l'uomo (IARC, 2002).

Legislazione

Legislazione e aflatossine

Attualmente la sensibilità delle istituzioni e del consumatore sulla sicurezza degli alimenti ha portato, per gli operatori del settore agroalimentare, i temi della sicurezza alimentare ad una centralità pressoché assoluta tanto da ritenere la salubrità degli alimenti un prerequisito anziché un elemento di “valore aggiunto”.

In questo piano di controllo e tutela del consumatore da parte delle istituzioni, pur senza ledere le autorità nazionali, si pone come organo tecnico scientifico depositario della responsabilità di emanare pareri tecnici sulla sicurezza alimentare l'EFSA (European Food Safety Agency).

Le micotossine costituiscono notoriamente una fonte di rischi per il consumatore. Secondo la classificazione prodotta dallo IARC (2002) le aflatossine rientrano tra i cancerogeni per l'uomo e molte altre micotossine, come l'ocratossina, sono comprese all'interno di queste categorie; l'ocratossina è classificata come possibile cancerogeno per l'uomo.

L'aflatossina è tossica oltre che per l'uomo anche per gli animali e la sua tossicità è ampiamente documentata in letteratura. L'organo bersaglio di questa tossina è il fegato (EFSA, 2004a; IARC 2002).

La sua tossicità si esplica prevalentemente in modo cronico ed è caratterizzata da fenomeni di intossicazione e riduzione della crescita degli animali. Studi sperimentali in campo indicano che esposizioni prolungate nel tempo anche se a bassi dosaggi inducono tumore a carico del fegato (EFSA 2004a).

La normativa sui tenori massimi di contaminanti alimentari indesiderati negli alimenti per l'uomo è stata recentemente aggiornata con l'emanazione del Regolamento CE N. 1881/2006 del 19 Dicembre 2006.

Questo regolamento abroga il precedente regolamento CE n. 466/2001. Il nuovo regolamento fissa in un testo organico i limiti per diverse micotossine oltre all'aflatossina, infatti indica limiti per ocratossina A, patulina, deossinivalenolo, zearalenone, fumonisine, tossine T2 e HT-2.

In tutti i prodotti, in cui è indicato un limite massimo ammissibile, solo per l'aflatossina M₁ esiste un limite per un prodotto di origine animale, il latte.

Oltre all'Europa esistono nel mondo diverse e dettagliate regolamentazioni sul contenuto di aflatossina in svariati prodotti. Secondo recenti stime infatti (FAO 2004) in circa 60 paesi

esiste uno specifico limite per l'aflatossina M₁ che però costituisce un elemento di disaccordo a livello internazionale poiché vi sono limiti massimi consentiti molto diversi tra loro. In Europa, ove centrale è la tutela del consumatore, il limite fissato è di 0.05 ppb di AFM₁; negli Stati Uniti, in diversi paesi asiatici ed in alcuni europei il limite è fissato a 0.5 ppb di AFM₁. In considerazione della elevata pericolosità della molecola, il limite europeo è basato, sul principio "ALARA" riconosciuto e definito come "As Low As Reasonably Achievable".

E' interessante notare come la legislazione e il legislatore in funzione del "carry over" dell'aflatossina nel latte ponga grande attenzione al contenuto di AFB₁ negli alimenti destinati alle bovine da latte. I limiti per l'aflatossina B₁ (unica molecola indicata) sono dieci volte superiori nella bovina rispetto ad un mangime non destinato ad animali da latte.

La tabella A riporta i valori massimi consentiti per i vari prodotti destinati all'alimentazione animale.

Tabella A. Limiti indicati dalla Direttiva 2002/32/CE

Sostanze indesiderabili	Prodotti destinati all'alimentazione degli animali	Contenuto massimo in mg/kg (ppm) di mangime al tasso di umidità del 12%
Aflatossina B ₁	Materie prime per mangimi ad eccezione di:	0,05
	arachidi, copra, palmisti, semi di cotone, babassu, granturco e loro derivati	0,02
	Mangimi completi per bovini, ovino, caprino, ad eccezione di:	0,05
	animali da latte	0,005
	vitelli, agnelli, capretti	0,01
	Mangimi completi per suini e pollame (salvo animali giovani)	0,03
	Altri mangimi complementari	0,005

L'elevata diffusione delle aflatossine che le rende praticamente presenti in un gran numero di prodotti destinati all'alimentazione animale rende difficoltosa la scelta di materie prime che possano garantirne l'assenza e quindi l'interruzione del trasferimento delle stesse nella catena alimentare. In base al Regolamento Cee 1525/98 è vietato l'utilizzo di trattamenti chimici per i cereali destinati all'uomo tal quali o come ingredienti di alimenti con

concentrazioni superiori a 2 ng/kg, mentre sono ammessi metodi di cernita o altri trattamenti fisici che permettano di ridurre il grado di contaminazione (Minervini, 2000).

Sono state compiute diverse ricerche per valutare la quota residuale di aflatossine che permane negli alimenti di origine animale .

Generalmente tali livelli sono bassi (Piva *et al.*, 1996) con l'eccezione della AFM₁ nel latte. Gli animali che ingeriscono alimenti contaminati da AFB₁, la tossina viene metabolizzata ed eliminata in gran parte sotto forma di metaboliti; nella bovina da latte la quota di M₁ rilevata corrisponde al 1-3% della quota di B₁ ingerita (Pietri, 1998). Studi compiuti somministrando un'unica dose elevata di AFB₁ hanno dimostrato che il 90% dell' aflatossina viene eliminato entro quarantotto ore con il latte e le urine. Il livello più elevato di tossine e loro metaboliti è, ovviamente, stato rinvenuto nel fegato che costituisce anche un organo ove i residui permangono per tempi abbastanza lunghi (1987 Anadòn e Martinez-Larranagam 1995).

Studi compiuti somministrando a suini all'ingrasso diete contenenti aflatossine B₁ ed G₁ in associazione in parti uguali per dosaggi complessivi di 500, 650 e 800 ppb, hanno dimostrato che solo la B₁ è risultata capace di residuare nel fegato (da 1,10 a 1,80 ppb), nel rene (da 0,25 a 0,65 ppb) e nel muscolo bicipite femorale e semitendinoso in prosciutti stagionati (da 0,15 a 0,25ppb) in quantità analoga a quella presente nella carne fresca e proporzionale alla dose somministrata (Bonomi *et al.*, 1996).

L'aflatossina ad oggi non sembra essere un problema nelle carni dei vari animali proprio in considerazione della sua scarsa capacità di accumulo, pertanto questi prodotti non rappresentano un rischio per il consumatore se paragonati ad altri alimenti ben più a rischio di contaminazione.

Legislazione e ocratossine

L'ocratossina è stata rilevata sia nei climi temperati del nord Europa che nelle regioni tropicali o sub tropicali. In questi due siti è prevalentemente prodotta da funghi di genere diverso (*Penicillium* e *Aspergillus*). Secondo stime FAO (FAO 2004) quaranta stati nel mondo possiedono una normativa sui limiti di contaminazione dell'ocratossina negli alimenti per uomo e animali, solo nel 1996 il numero degli stati che aveva emanato normative su questa tossina erano circa una decina (FAO, 1997), è evidente che vi è un recente forte interesse in ordine ai rischi sulla salute pubblica provocati dall'OTA.

L'ocratossina è presente in molti cereali utilizzati comunemente nell'alimentazione degli animali, analisi effettuate su 1500 campioni di diversi tipi di cereale ha evidenziato per un 4% dei campioni contenuti superiori a 1 ppb (EFSA, 2004b).

Dati sulle analisi condotte nel Regno Unito hanno evidenziato una prevalenza di positività, in cereali stoccati per l'alimentazione animale, pari al 15% di campioni aventi tenori di ocratossina uguali o superiori ad 1 ppb. Nella stessa ricerca il contenuto maggiore di micotossina è stato rinvenuto in campioni di orzo a livelli di 17.8 ppb (EFSA 2006).

Un'altra ricerca condotta in Romania da Curtui *et al.* (2001) all'analisi sul sangue prelevato da suini al macello si è potuta rilevare una positività dei campioni pari al 98%. Questo indica un'elevata incidenza della contaminazione da ocratossina nei mangimi per gli animali.

A livello Europeo le varie direttive emanate per il controllo delle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali con particolare riferimento alla Direttiva 2002/32/CE, non stabilisce alcun limite nei mangimi e nelle materie prime per quanto concerne l'ocratossina.

L'ocratossina è considerata un tossico insidioso negli alimenti per animali (EFSA 2004b) e in assenza di una normativa europea diverse nazioni si sono adoperate nell'emanazione di normative statali che fissano un limite massimo ammissibile per gli alimenti ad uso animale (EFSA 2004b).

L'Italia in un recente decreto del Ministero della Salute (15 Maggio 2006) stabilisce i limiti massimi ammissibili di ocratossina A negli alimenti per animali. Tale decreto stabilisce che la presenza di OTA nei mangimi e nelle materie prime utilizzate per la loro produzione non deve superare i valori riportati in tabella B.

Tabella B. valori massimi di ocratossina A nei mangimi in Italia

Substrato	Valore massimo ammesso (ppm)
Materie prime per mangimi	
cereali e prodotti derivati da cereali	0.25
Mangimi completi e complementari e razione giornaliera	
Per suini	0.05
Per pollame	0.1

Come si può osservare non si fissano limiti specifici per i ruminanti.

A livello europeo in assenza di una legge che imponga dei limiti di contaminazione per l'OTA nei mangimi e materie prime è comunque stata emanata una raccomandazione (Raccomandazione della commissione del 17 Agosto 2006). Tale raccomandazione fissa limiti per diverse micotossine quali deossinivalenolo, zearalenone, ocratossina A, tossine T2 e HT2, e fumonisine. Il limite di OTA fissato in tale regolamento e i mangimi o materie prime sottoposte a limiti coincidono con quanto riportato dal decreto del Ministero della Salute italiano.

Per quanto riguarda gli alimenti per l'uomo il precedente Regolamento CE n. 466/2001 e sue modifiche è stato abrogato dal Regolamento CE n.1881/2006. In esso sono indicati i limiti dell'ocratossina in diversi prodotti alimentari ma nessuno di questi è di origine animale.

Le maggiori informazioni che riguardano l' ocratossina nel suino vengono soprattutto dalla Danimarca, dove esiste una legislazione che regola i massimi livelli di residui nei tessuti. Secondo questa legislazione un livello di ocratossina A compresi tra i 10 ppb nel rene di suino implica una confisca di questi organi, mentre un livello superiore a 25 ppb comporta la distruzione dell'intera carcassa (Jorgensen e Petersen 2002). Questo in base alla stima effettuata in cui il contenuto in ocratossina del muscolo è circa il 40% del contenuto renale.

La legislazione italiana non contiene una norma che fissa i limiti di ocratossina nei prodotti di origine animale ma contiene l'indicazione di linee guida proposte dall'Istituto Superiore di Sanità e pubblicate sulla G.U. Italiana con indicazione del contenuto massimo coincidente con 1 ppb. (G.U. 135 dell'11 Giugno 1999)

L'EFSA ha pubblicato recentemente un proprio parere sull'ocratossina (EFSA 2006) OTA ove all'analisi della bibliografia effettuata dagli autori risulta essere una molecola con effetti nefrotossici in molti animali oggetto di test e sembra esserlo anche a carico dell'uomo, essa possiede inoltre effetti immunotossici, neurotossici, e teratogeni; è stato evidenziato un effetto dose e tempo dipendente.

Il gruppo di ricercatori che ha realizzato le indicazioni emerse dalla pubblicazione EFSA ha elaborato per l'ocratossina una dose settimanale tollerabile di 120 ppt (ng/kg) per chilo di peso corporeo. Gli attuali livelli di assunzione dell'ocratossina stimati dagli esperti sono compresi in un range che va da un minimo di 15 ed un massimo di 60 ppt per chilo di peso. Da questo dato emerge un risultato apparentemente confortante in quanto si colloca mediamente a meno della metà della dose massima tollerabile.

L'ocratossina costituisce un problema di sicurezza alimentare, la quota contenuta nella carne, e negli altri prodotti di origine animale, derivante dall'assunzione da parte degli animali produttori di derrate per l'uomo di mangimi contaminati sarebbe secondo le indicazioni del gruppo di esperti una fonte trascurabile per l'esposizione umana (EFSA 2006). Comunicato stampa 2006.

Prova 1: Effetto della intossicazione di diete per suini con micotossine e residui nelle carni.

Scopo della ricerca

Nell'ambito del progetto "Sicurezza e qualità nella filiera dei salumi tipici" si è voluto indagare, in suini allevati in fase di finissaggio, l'effetto di diete contaminate da micotossine (aflatossina e ocratossina) in ordine al grado di contaminazione delle carni e di alcuni organi "bersaglio" ed anche la possibilità d'impiego di un adsorbente per prevenirne l'assorbimento. Contemporaneamente si sono volute valutare alcune *performances* zootecniche e alcuni parametri la qualità delle produzioni ottenute dagli animali.

Materiali e metodi

La prova effettuata su 80 suini di peso vivo medio di circa 120-130 kg all'arrivo presso la struttura di allevamento (Stabulari della Sezione di Zootecnia, Nutrizione e Alimenti del DIMORFIPA). La sperimentazione prevedeva la costituzione di 8 gruppi omogenei per peso e consistenti in 5 maschi e 5 femmine per gruppo. Lo schema sperimentale è di seguito riportato:

Gruppo 1: (5 masc. e 5 femm.) Dieta base (controllo)

Gruppo 2: (5 masc. e 5 femm.) Dieta base + *Saccharomyces cerevisiae* autoclavato (Sca)

Gruppo 3: (5 masc. e 5 femm.) Dieta base + Ocratossina A

Gruppo 4: (5 masc. e 5 femm.) Dieta base + Ocratossina A + Sca

Gruppo 5: (5 masc. e 5 femm.) Dieta base + Aflatossina B1

Gruppo 6: (5 masc. e 5 femm.) Dieta base + Aflatossina B1 + Sca

Gruppo 7: (5 masc. e 5 femm.) Dieta base + Ocratossina A + Aflatossina B1

Gruppo 8: (5 masc. e 5 femm.) Dieta base + Ocratossina A + Aflatossina B1 + Sca

La durata della prova è stata di circa 5 settimane, l'inizio della stessa è stato scaglionato per poter effettuare una macellazione frazionata in più giorni; questo per permettere il prelievo di tutti i campioni previsti e l'effettuazione di tutte le rilevazioni in sede di macellazione.

La stabulazione degli animali è stata effettuata in box collettivi di 5 animali del medesimo sesso, i box utilizzati erano a pavimento fessurato. Le condizioni di allevamento in ambiente controllato prevedevano temperature all'incirca di 21°C e umidità relativa al 66-67%.

La sperimentazione è stata autorizzata dal Ministero della Salute sulle basi del giudizio del Comitato Etico per la ricerca dell'*Alma Mater Studiorum* Università di Bologna, in accordo con la Direttiva 86/609/CE.

All'inizio della prova sperimentale si è proceduto ad un'analisi preliminare delle materie prime utilizzate nella dieta per valutare l'eventuale grado di contaminazione preesistente sulle stesse ed anche analisi sul siero ottenuto dagli animali per valutare un precedente episodio di intossicazione.

La razione utilizzata per l'alimentazione dei suini è riportata nella tabella 7.

Tabella 7. Composizione centesimale del mangime

<u>Ingrediente</u>	<u>%</u>
Mais	38.5
Orzo	18.0
Soia	17.0
Farinaccio di grano duro	11.5
Semola glutinata di mais	7.5
Crusca di frumento	4.0
Carbonato di calcio	1.2
Fosfato bicalcico	1.0
Olio di Soia	0.5
Premiscela	0.4
Cloruro di sodio	0.4

La composizione chimica del mangime utilizzato è riportata nella tabella 8.

Tabella 8. Composizione chimica del mangime (% tq)

<u>Composizione chimica</u>	<u>%</u>
Sostanza secca	88,92
Proteina greggia	15,76
Grasso greggio	3,52
Fibra greggia	4,38
Ceneri	5,32
Calcio (da tesi)	0.77
Fosforo (da tesi)	0.69

Energia Lorda (kcal/kg SS)

4224,75

La premiscela utilizzata come integrazione mineral-vitaminica presentava la composizione riportata nella tabella 9.

Tab 9. Composizione della premiacela

Componente	Unità di misura	Valore
Vit A	U.I.	2.400.000
Vit. D ₃	U.I.	200.000
Vit. E	mg	1.820
Vit. K ₃ (mg)	mg	800
Vit. B ₁ (mg)	mg	800
Vit. B ₂ (mg)	mg	1.200
Vit. B ₆ (mg)	mg	400
Vit. B ₁₂ (mg)	mg	4
Vit. PP (mg)	mg	4.000
Acido D-pantotenico	mg	2.000
Vit. H	mg	15
Colina	mg	80.000
Zinco (solfato di zinco monoidrato – Zn 35%)	mg	4.000
Rame (Solfato Rameico pentaidrato – Cu 25%)	mg	7.000
Cobalto (Carbonato Basico di cobalto, monoidrato Co-10%)	mg	22
Selenio (Selenito di sodio – Se 10%)	mg	10
BHT	mg	750

Gli animali erano alimentati in modo razionato con una assunzione giornaliera di 3.4 kg di mangime a secco suddivisa in due pasti. La somministrazione di acqua era a volontà con abbeveratoi a ciucciotto collegati alla rete idrica.

Giornalmente gli animali ingerivano le quantità di micotossine indicate nella tabella 10.

Tabella 10. Contaminazione della dieta.

Micotossina	Quantità giornaliera (mg)	Concentrazione mangime (ppm)
Ocratossina	0.68	0.200
Aflatossina B ₁	0.952	0.280

La somministrazione era effettuata contaminando solo parte delle razioni e la stessa era preparata in aliquote individuali somministrate all'inizio del pasto ad ogni suino.

La supplementazione dell'adsorbente (tesi T2, 4, 6, 8) è stata nell'ordine di 6.8g/giorno pari ad un'integrazione della dieta dello 0.2% di lievito autoclavato.

La scelta dell'adsorbente è stata effettuata (tenendo conto della volontà di non utilizzare un prodotto commerciale già brevettato) attraverso una prova preliminare comparativa sull'effetto legante di alcuni prodotti, miscelati al mangime di base, sulle due micotossine (aflatossina e ocratossina).

I prodotti posti a confronto erano i seguenti:

1. *Saccharomyces cerevisiae* allo 0.2%
2. *Saccharomyces cerevisiae* autoclavato allo 0.2%
3. Clinoptinolite allo 0.5% e all'1%
4. Atox Bentonite allo 0.5 e all'1%
5. Sepiolite allo 0.5 e all'1%
6. Organotox allo 0.5 e all'1%

La valutazione della capacità adsorbente è stata determinata attraverso la quantificazione della tossina che rimaneva in soluzione nel surnatante dopo incubazione di una soluzione acquosa contenente la tossina a cui è stato addizionato l'adsorbente. Per la quantificazione della aliquota di tossina non adsorbita si è utilizzato un test immunoenzimatico (ELISA Veratox per aflatossine e ocratossine) operando secondo le procedure indicate nelle istruzioni del kit. La lettura dei risultati è stata effettuata con spettrofotometro per micropiastre.

Sulla base dei risultati di questa prova preliminare si è deciso di impiegare il lievito autoclavato in quanto all'analisi effettuata risultava maggiormente in grado di svolgere un'azione di adsorbimento delle micotossine rispetto al lievito vivo, entrambi tuttavia appaiono meno efficaci degli altri prodotti utilizzati. Le analisi sono state effettuate presso i laboratori del Servizio di Prova di Farmacologia e Tossicologia del DSPVA.

Durante il periodo sperimentale si è monitorato lo stato di salute degli animali e di alcuni parametri zootecnici.

Le rilevazioni effettuate a carico degli animali in allevamento sono consistite nel rilevamento dell'assunzione alimentare e del peso vivo ad inizio e fine prova questo per il calcolo dell'incremento ponderale giornaliero. Sulle carcasse si sono effettuate rilevazioni qualitative riguardanti il peso dei prosciutti freschi e rifilati in rapporto al peso della carcassa. Inoltre, in sede di macellazione, si è determinato il peso del fegato e dei reni. A 24 ore dalla macellazione è stato valutato il pH delle cosce e il loro colore, entrambi misurati a carico del muscolo semimembranoso.

Sugli animali sono stati prelevati campioni di muscolo (semimembranoso), fegato, rene, sangue ed urina direttamente dalla vescica.

Sono stati impiegati sedici suini alimentati rispettivamente con le diete appartenenti alle tesi sperimentali T1, 3, 5 e 7, per una valutazione *in vivo* dei coefficienti di digeribilità apparente dei nutrienti componenti la razione, con l'obiettivo di evidenziare eventuali variazioni

indotte dalle micotossine. Lo svolgimento della prova prevedeva la sostituzione settimanale del suino in gabbia con un altro a terra alimentato con la stessa dieta, questo per attenuare l'effetto animale.

La gabbia utilizzata per la prova di digeribilità è il modello in dotazione allo stabulario del DIMORFIPA, Sezione Zootecnia, Nutrizione e Alimenti (brevetto C.N.R. di Scipioni e Barbieri).

Per quanto concerne la prova di digeribilità si è proceduto giornalmente alla misurazione della quantità di mangime e acqua assunti ed alla misurazione delle *excreta* prodotte, delle stesse si è collezionato l'intera aliquota di feci e un volume di urine pari al 10% del totale giornaliero.

Sui campioni ottenuti si è proceduto alla analisi per la composizione centesimale determinazioni che hanno portato al calcolo del CUDa dell'azoto, della frazione lipidica, della componente fibrosa (fibra greggia) e delle ceneri.

La determinazione delle micotossine a carico dei campioni prelevati è stata effettuata presso il Servizio di Prova di Farmacologia e Tossicologia del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale (DSPVA), di seguito vengono brevemente riportate le metodiche utilizzate:

Ricerca di Aflatossina B1 e Aflatossina M1

- estrazione: diclorometano – acido citrico 20%
- purificazione: colonnine silica SPE (eluizione con acetone:diclorometano 1:4 v/v)
- derivatizzazione: acido trifluoroacetico
- colonna: Phenomenex Luna C18 (250x4.6 mm)
- fase mobile: acqua:isopropanolo:acido acetico 1%:acetonitrile (79:7:7:7) [0.8 ml/min]
- detector: fluorimetro (λ ecc. 365 nm; λ em. 418 nm)

Risultati HPLC

AFB1

- $r^2 = 0.9928-0.999$

- % recupero= 60-73%

- LOD = 0.05-0.25 ppb

- LOQ = 0.25-1 ppb

AFM1

- $r^2 = 0.9991-0.999$

% recupero= 50-68%

- LOD = 0.35-0.40 ppb

- LOQ = 1 ppb

Ricerca di Ocratossina A

- estrazione: diclorometano – acido citrico 30%

- purificazione: colonnine silica SPE
- eluizione:
 - rene: acetone-diclorometano 1:4 v/v
 - fegato: tetraidrofurano-n-esano 1:3 v/v + etere etilico-n-esano 1:2 v/v
 - muscolo: etere etilico-n-esano 1:2 v/v + acetone-diclorometano 1:4 v/v
 - urina: come muscolo
 - feci: come rene
- colonna: Merck Chromolith RP-18e (100x4.6 mm)
- fase mobile:
 - rene: 74% soluzione acqua:isopropanolo:acido acetico 1%:acetonitrile (79:7:7:7)- 26% acetonitrile [1 ml/min]
 - fegato: 67% acqua:isopropanolo:acido acetico 1% :acetonitrile (79:7:7:7) + 33% acetonitrile [1 ml/min]
 - muscolo: come fegato
 - urina: 75% acqua:isopropanolo:acido acetico 1% :acetonitrile (79:7:7:7) + 25% acetonitrile [1 ml/min]
 - 79% soluzione acqua:isopropanolo:acido acetico 1%:acetonitrile (79:7:7:7)- 21% acetonitrile [1 ml/min]

detector: fluorimetro (λ ecc. 340 nm; λ em. 460 nm)

Risultati HPLC

- $r^2 = 0.9975-0.9997$
- % recupero= 63-92%
- LOD = 0.5 ppb
- LOQ = 1 ppb

Elaborazione statistica

I dati ottenuti dalla sperimentazione in oggetto riguardanti parametri produttivi dei suini, e tutti i parametri oggetto di indagine nella sperimentazione sono stati sottoposti ad analisi della varianza utilizzando il pacchetto statistico SPSS/PC. Le medie sono state confrontate mediante il test t di Student per dati appaiati.

L'elaborazione statistica dei risultati concernenti le analisi tossicologiche su tutte le matrici sono stati elaborati con il test Mann-Whitney'U. Le differenze con $P < 0.05$ sono considerate statisticamente significative.

Prova 2: Effetto della diversa integrazione di metionina in diete per galline ovaiole contaminate da micotossine

Scopo della ricerca:

Lo scopo della ricerca è stato quello di valutare la possibilità di impiego di un aminoacido essenziale come elemento in grado di controllare l'influenza negativa a carico delle produzioni dell'ocratossina e della aflatossina. E' documentato in bibliografia come le micotossine in questione producano un peggioramento delle produzioni sia in termini quantitativi che qualitativi; tra le varie opportunità da attuare nel tentativo di ridurre questi effetti si è voluto valutare i possibili effetti della metionina come possibile rimedio in diete per galline ovaiole contaminate.

Nella sperimentazione in oggetto si è anche voluto valutare lo stato di intossicazione degli animali e le eventuali quote residue di ocratossina contenute nei loro prodotti.

Materiali e Metodi

La prova è stata effettuata presso gli Stabulari della Sezione di Zootecnia, Nutrizione e Alimenti del DIMORFIPA.

Per la sperimentazione si sono utilizzati 162 animali di razza Isa-Brown suddivisi in 9 gruppi di 18 animali ciascuno, posti in gabbie contenenti 3 animali ciascuna (6 ripetizioni di 3 animali).

Le condizioni di allevamento sono state mantenute costanti per l'intera durata della prova e queste prevedevano una temperatura ambientale di 20°C ed un umidità relativa del 75%, il tutto era gestito dal sistema di condizionamento automatico.

Il programma luce adottato prevedeva un fotoperiodo di 16 ore di luce ed un periodo di 8 ore di buio. La durata della prova è stata di dodici settimane.

La sperimentazione è stata autorizzata dal Ministero della Salute sulle basi del giudizio del Comitato Etico per la ricerca dell'*Alma Mater Studiorum* Università di Bologna, in accordo con la Direttiva 86/609/CE.

Dopo un periodo pre-sperimentale di circa 60 giorni e dopo 20 giorni dall'inizio della deposizione, gli animali sono stati alimentati secondo il seguente schema:

T1 = Dieta base contenente contenente 3.9 g/kg metionina (controllo)

T2 = Dieta base contenente 2.9 g/kg metionina

T3 = Dieta base contenente 5.0 g/kg metionina

T4 = Dieta base contenente 3.9 g/kg metionina e contaminata naturalmente da: 4.2 ppb AFB1 e 10 ppb OTA

T5 = Dieta base contenente 2.9 g/kg metionina e contaminata naturalmente da: 4.2 ppb AFB1 e 10 ppb OTA

T6 = Dieta base contenente 5.0 g/kg metionina e contaminata naturalmente da: 4.2 ppb AFB1 e 10 ppb OTA

T7 = Dieta base contenente 3.9 g/kg metionina e contaminata da 200 ppb OTA totali nella dieta

T8 = Dieta base contenente 2.9 g/kg metionina e contaminata da 200 ppb di OTA totali

T9 = Dieta base contenente 5.0 g/kg metionina e contaminata da 200 ppb di OTA totali

Il mangime utilizzato è riportato in tabella 11.

Tabella 11. Composizione del mangime utilizzato in prova.

<u>Componenti</u>	<u>%</u>
Mais farina	52.60
Soia pannello	20.00
Carbonato di calcio	8.40
Orzo nazionale	6.00
Medica disidratata	5.00
Mais glutine	4.00
Olio di soia	1.50
Fosfato di calcio	1.60
Premiscela	0.50
Cloruro di sodio	0.40

I tenori analitici della razione sono quelli riportati in tabella 12

Tabella 12. Composizione chimica del mangime(% sul tal quale)

<u>Composizione chimica</u>	<u>%</u>
Sostanza secca	88,80

Proteina greggia	16,46
Grasso greggio	5.00
Fibra greggia	3.81
Ceneri	12.65
Calcio	3.70
Fosforo	0.60
Sodio	0.18

La premiscela utilizzata conteneva la seguente integrazione mineral-vitaminica. (Tab. 13).

Tabella 13. composizione della premiacela impiegata.

Componente	Unità di misura	Valore
Vit A (U.I.)	U.I.	2.600.000
Vit. D ₃ (U.I.)	U.I.	600.000
Alfa Tocoferil acetato (mg)	mg	4.000
Vit. K ₃ (mg)	mg	400
Vit. B ₁ (mg)	mg	1.000
Vit. B ₂ (mg)	mg	6.000
Vit. B ₆ (mg)	mg	4
Vit. B ₁₂ (mg)	mg	400
Vit. PP (mg)	mg	6.000
Biotina	mg	20
Acido folico	mg	100
Acido D-pantotenico	mg	2.000
Colina	mg	100.000
Zinco	mg	10.000
Ferro	mg	10.000
Manganese	mg	12.000
Rame	mg	1000
Iodio	mg	200
Cobalto	mg	100
Selenio	mg	40
BHT	mg	1.000
Xantofille totali	mg	6.000

Durante l'intera durata della prova sono stati registrati i consumi alimentari attraverso la misurazione di alimento somministrato e, quotidianamente, è stata effettuata la raccolta delle uova per la valutazione delle *performance* zootecniche.

L'analisi qualitativa delle uova è stata effettuata ad inizio ed a fine prova per una durata di tre giorni consecutivi prelevando un uovo per ogni gabbia (la gabbia rappresenta la singola replicazione di ogni gruppo sperimentale).

I parametri oggetto di valutazione sono stati il peso dell'uovo il colore e lo spessore del guscio e la determinazione percentuale delle tre componenti dell'uovo (tuorlo, albume e guscio). A carico dell'albume si è misurato il pH e determinato l'indice di Haugh e nel tuorlo si è determinato il colore attraverso un colorimetro.

I tuorli sono stati sottoposti ad analisi chimica per determinare la loro composizione centesimale.

Al termine della sperimentazione si è provveduto a raccogliere un campione di circa 250g di feci per l'analisi tossicologica.

Per ogni gruppo 10 animali sono stati pesati e sacrificati (2 animali da 5 gabbie per gruppo). Fegati e reni sono stati pesati. Sono stati raccolti campioni di fegato e reni di animali sacrificati che sono stati successivamente sottoposti ad analisi per la ricerca di micotossine e/o loro metaboliti.

Sulle uova, a carico dell'albume, sono state effettuate analisi per valutare la presenza delle micotossine o loro metaboliti. Le analisi sono state effettuate presso il laboratorio del Servizio di Prova di Farmacologia e Tossicologia del DSPVA. Di seguito viene brevemente illustrata la metodica utilizzata.

Ricerca di Ocratossina A.

- estrazione: diclorometano – acido citrico 30%
- purificazione: colonnine silica SPE (non per campioni di albume)
- eluizione: rene: acetone-diclorometano 1:4 v/v
fegato: tetraidrofurano-n-esano 1:3 v/v + etere etilico-n-esano 1:2 v/v
feci: come rene
- colonna: Merck Chromolith RP-18e (100x4.6 mm)
- fase mobile:

- rene: 74% soluzione acqua:isopropanolo:acido acetico 1%:acetonitrile (79:7:7:7)- 26% acetonitrile [1 ml/min]
- fegato: 67% acqua:isopropanolo:acido acetico 1% :acetonitrile (79:7:7:7) + 33% acetonitrile [1 ml/min]
- 81% soluzione acqua:isopropanolo:acido acetico 1%:acetonitrile (79:7:7:7)- 19% acetonitrile [2 ml/min]
- per albumi: 68% soluzione acqua:isopropanolo:acido acetico 1%:acetonitrile (79:7:7:7)- 32% acetonitrile [1 ml/min]

detector: fluorimetro (λ ecc. 340 nm; λ em. 460 nm)

Risultati HPLC

- $r^2 = 0.9981-0.9993$
- % recupero= 65-92%
- LOD = 0.5 – 2 ppb
- LOQ = 0.5 – 2 ppb

Elaborazione statistica

I dati ottenuti dalla sperimentazione in oggetto riguardanti parametri produttivi delle galline, qualità della produzione, peso degli organi degli animali alla macellazione sono stati sottoposti ad analisi della varianza utilizzando il pacchetto statistico SPSS/PC. Le medie sono state confrontate mediante il test t di Student per dati appaiati.

Risultati e Discussione

Prova 1: Effetto della intossicazione di diete per suini con micotossine e residui nelle carni.

Nella tabella 13 sono riportati i valori di digeribilità apparente *in vivo* per le diete contenenti le micotossine e per quella di controllo.

I valori mostrati in tabella sono in accordo con quanto evidenziato da altri Autori in prove di digeribilità *in vivo* su suini (Scipioni *et al.*, 1993; Sardi, *et al.*, 1998).

La prova di digeribilità *in vivo* per la determinazione dei CUDa dei diversi nutrienti non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra i vari gruppi; tuttavia è possibile notare valori più elevati nelle diete che contenevano le tossine, ciò è in accordo con quanto evidenziato anche in altre prove sperimentali ove in diete contaminate da aflatossina B₁ somministrate ad ovini si osservò un aumento dei coefficienti di utilizzazione digestiva nelle diete contaminate (Rizzi *et al.*, 1995, 1996).

Tabella 13 - Coefficienti di digeribilità apparente (CUDa %)

Tesi	CUDa SS	CUDa SO	CUDa N	CUDa GG	CUDa FG	CUDa ceneri
0	80.90	82.69	84.23	62.53	45.11	48.53
OTA	83.29	85.20	86.60	68.68	51.01	53.26
AFB1	84.77	88.12	86.38	69.97	45.35	56.88
AFB1+OTA	85.52	88.78	86.93	68.74	48.44	52.46
SEM	0.75	1.32	0.57	1.54	1.70	2.16
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Dove: SS = sostanza secca; SO = sostanza organica; N = azoto; GG = grassi greggi; FG = fibra greggia.

SEM = errore standard della media

Valutazione della prova di allevamento.

Alla visita ispettiva gli animali sono sempre risultati in buone condizioni di salute e non hanno evidenziato alcun sintomo riferibile ad uno stato di intossicazione da micotossine. La quantità di razione somministrata ad ogni pasto è sempre stata consumata totalmente e non si sono verificati atteggiamenti di rifiuto o indicanti scarsa appetibilità dell'alimento somministrato.

I dati relativi ai parametri zootecnici considerati sono riportati in tabella 14. Come si può notare dai valori riportati in tabella non si sono rilevate differenze statisticamente significative riguardanti il peso finale e l'incremento ponderale giornaliero fra i vari gruppi.

L'incremento ponderale giornaliero è risultato nella norma per la categoria produttiva dei suini utilizzati in prova e rientra nella media per questa fase produttiva tipicamente italiana (Monetti, 1997). L'assenza di significatività per questo dato fra i vari gruppi a confronto potrebbe essere in relazione alla durata della prova sperimentale.

Sebbene non ci sia significatività statistica tra le differenze osservate nei pesi medi finali si osserva che nei gruppi, le cui diete contenevano la tossina in presenza del lievito, si ha un migliore incremento ponderale giornaliero e un maggior peso vivo medio alla macellazione.

Secondo quanto riportato da Hussein e Brasel (2001), la dose massima tollerata dai suini in finissaggio è pari a 385 ppb, superata questa soglia si ha un progressivo e lineare calo della resa alimentare. Si sono osservate riduzioni di incremento ponderale giornaliero in suini pari al 26, 24 e 52% rispettivamente alimentati con diete contenenti 2 ppm di AFB1, 2 ppm di OTA ed entrambe contemporaneamente (Huff *et al.*, 1988). Nella stessa ricerca gli Autori sostengono che vi sia un effetto sinergico negativo tra le due micotossine a carico dell'incremento ponderale nel suino.

In una recente ricerca condotta da Malagutti *et al.* (2005) l'allevamento di suini dai 41 kg di peso alla macellazione (circa 160 kg) con produzione tipica del suino pesante da salumeria hanno osservato che l'aggiunta di 25 ppb di OTA determinava alla fine della sperimentazione un peso vivo finale del gruppo trattato di 163.4 kg *vs* 170.9 kg ($P < 0.05$), un IPG medio di 1030 g *vs* 1094 g, ($P < 0.01$) e un indice di conversione alimentare per il gruppo con l'OTA di circa il -7% ($P < 0.05$). L'assunzione alimentare non differiva tra i due gruppi. Da questa sperimentazione Malagutti *et al.* dedussero che la presenza a bassi livelli di ocratossina per periodi prolungati possa dare origine a differenze nelle performance degli animali.

In una prova condotta da Harvey *et al.* (1994) la somministrazione di OTA a tenori di 2.5 ppm nelle diete somministrate a suinetti di 18 kg per 30 giorni produsse una riduzione delle performance zootecniche e un peggioramento dei parametri ematologici; quando nella dieta era presente anche la T-2 gli Autori osservarono un effetto sinergico nel peggioramento delle condizioni degli animali.

Marin *et al.* (2002) dimostrano come a dosaggi di AFB₁ di 140 e 280 ppb pertanto simili a quelli utilizzati in questa prova si sono osservati riduzioni dell'incremento ponderale giornaliero in suinetti alimentati con tali diete per 4 settimane, la differenza era però statisticamente significativa solo per il dosaggio più elevato; evidentemente, nonostante nella prova sperimentale oggetto della dissertazione sia stato impiegato un dosaggio più elevato di AFB₁ rispetto alle normali condizioni di campo, i suini in fase di finissaggio sopportano questa concentrazione di tossina.

I parametri relativi alla macellazione sono riportati in tabella 15. Non si sono evidenziate differenze statisticamente significative nel confronto fra le varie tesi sperimentali, inoltre gli stessi rientrano nella norma per la categoria di peso degli animali (Monetti, 1997). La percentuale di coscia sul peso della carcassa non risulta influenzata dalle diete intossicate e rientra anch'essa in una condizione di normalità di resa della carcassa; sulla coscia, a carico del muscolo semimembranoso, sono stati rilevati i parametri inerenti il colore della carne e il pH a 24 ore dalla macellazione, per entrambi questi parametri non si evidenziano differenze statisticamente significative.

In sede di macellazione si sono pesati i fegati e i reni degli animali appartenenti ai vari gruppi sperimentali, i dati, espressi in percentuale sul peso vivo a fine prova, sono riportati in tabella 16. All'analisi statistica non vi sono differenze di peso tra i vari organi che si presentavano di aspetto normale. Secondo quanto riportato da Hussein e Brasel (2001), un aumento del peso del fegato sarebbe riscontrabile a dosi uguali o superiori a 385 ppb di tossina, a questo dosaggio però non si evidenzerebbero lesioni istologiche che, secondo gli Autori, si manifesterebbero a dosaggi di 1.48 ppm.

Le differenze osservate nei pesi medi finali del fegato (espressi in % sul p.v.), relativi ai gruppi sperimentali che hanno assunto la dieta con la sola AFB₁ e la sola OTA assieme al *S. cerevisiae* (rispettivamente T4 e T6), seppur in assenza di significatività statistica presentano un peso medio dell'organo inferiore ai rispettivi trattamenti privi di *S. cerevisiae*.

Non ci sono differenze statisticamente significative per quanto riguarda il peso dei reni, nei vari gruppi.

Tabella 14. Dati zootecnici.

TESI	Peso vivo iniziale (kg)	Peso vivo finale (kg)	Incremento ponderale (kg/d)
1	144.9	163.2	0.522
2	144.3	161.4	0.490
3	145.3	162.1	0.479
4	147.1	166.6	0.558
5	145.5	165.6	0.573
6	152.2	174.5	0.638
7	146.2	162.7	0.472
8	151.1	171.0	0.570
RMSE	5.48	8.44	0.147
	n.s.	n.s.	n.s.

Tabella 15. Parametri relativi alla macellazione e alla qualità della carne.

Tesi	Peso macellaz.	Peso carcassa	Resa mac. %	% Coscie [#]	pH 24h	Parametric colore		
						L*	Tinta	Croma
1	163.2	135,4	82.96	23.69	5,66	52,57	0.60	11.39
2	161.4	130.8	81.03	24.30	5.60	53.96	0.57	11.42
3	162.1	134,8	83.19	24.76	5,54	54,11	0.58	11.82
4	166.6	138.2	82.99	24.01	5.58	53.42	0.61	11.53
5	165.6	137,6	83.08	24.16	5,55	52,11	0.57	11.62
6	174.5	144.8	83.01	23.98	5.70	52.53	0.58	11.67
7	162.7	135,3	83.18	24.97	5,58	53.05	0.59	11.53
8	171.0	142.6	83.40	24.62	5.47	54.33	0.58	11.41
RMSE	9.11	0.96	0.96	1.59	0.14	3.31	0.08	2.38
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

= % peso della carcassa.

Tabella 16. Pesì del fegato e rene (% peso vivo finale).

Tesi	Fegato	Rene
1	1.09	0.12
2	1.08	0.11
3	1.15	0.12
4	1.07	0.12
5	1.26	0.12
6	1.17	0.12
7	1.10	0.13
8	1.15	0.14
RMSE	0.18	0.02
	n.s.	n.s.

Analisi tossicologica nelle varie matrici.

Preliminarmente alla prova *in vivo* sugli animali è stata effettuata presso i laboratori del Servizio di Prova di Farmacologia e Tossicologia del DSPVA una prova *in vitro* sulla capacità adsorbente di alcune sostanze per valutarne l'efficacia e conseguentemente possedere elementi di scelta sul composto da utilizzare.

I dati relativi alle prove di adsorbimento sono riportati in tabella 17 e 18 rispettivamente per l'aflatossina B₁ e l'ocratossina; la prova è stata condotta utilizzando una soluzione acquosa contenente la tossina a cui è stato addizionato l'adsorbente.

Come evidenziato dai dati contenuti nelle tabelle, il lievito mostra capacità adsorbenti inferiori agli altri composti impiegati in prova, il lievito autoclavato risulta però essere più efficace del lievito vivo che, nella prova di adsorbimento nei confronti dell'ocratossina, risulta incapace di produrre un effetto di adsorbimento. Nella prova *in vivo* si è scelto di utilizzare il lievito autoclavato oltre che per le migliori capacità adsorbenti anche per evitare il possibile effetto interferente dovuto all'attività enzimatica delle cellule vive.

Tabella 17. Concentrazione della AFB1 nel surnatante.

Campione	Conc. AFB1 (nel surnatante diluito 1:160 con MeOH)	Conc. AFB1 (nel surnatante)
Bentonite + AFB1	< 1 ppb	Non quantificabile
Sepiolite + AFB1	< 1 ppb	Non quantificabile
Organotox + AFB1	< 1 ppb	Non quantificabile
Sbal + AFB1	< 1 ppb	Non quantificabile
Clinoptilolite + AFB1	< 1 ppb	Non quantificabile
Liev. Ucc. + AFB1	2.46 ppb	329.01 ppb
Liev. Vivo + AFB1	2.92 ppb	390.28 ppb
Bianco (H ₂ O + AFB1)	4.90 ppb	654.26

Tabella 18. Concentrazione di OTA nel surnatante.

Campione	Conc. OTA (nel surnatante diluito 1:160 con MeOH)	Conc. OTA (nel surnatante)
Bentonite + OTA	4.11 ppb	658.40 ppb
Sepiolite + OTA	5.12 ppb	818.96 ppb
Organotox + OTA	< 0.5 ppb	Non quantificabile
Sbal + OTA	> 6.5 ppb	Non quantificabile
Clinoptilolite + OTA	> 6.5 ppb	Non quantificabile
Liev. Ucc. + OTA	5.76 ppb	921.50 ppb
Liev. Vivo + OTA	> 6.5 ppb	Non quantificabile
Bianco (H ₂ O + OTA)	6.48 ppb	1036.87 ppb

Nelle tabelle 19 e 20 sono riportati i valori di LOD e LQD e le percentuali di recupero a carico delle diverse matrici oggetto d'indagine rispettivamente per l'aflatossina e l'ocratossina. Il metodo analitico impiegato è stato validato presso il Servizio di Prova di Farmacologia e Tossicologia del DSPVA e risulta possedere un grado di sensibilità sufficiente per le indagini oggetto della sperimentazione.

Tabella 19. LOD, LOQ e recupero (%) delle analisi relative a matrici diverse.

Matrice biologica	LOD* (ppb) AFB1	LOD (ppb) AFM1	LOQ* (ppb) AFB1	LOQ (ppb) AFM1	Recupero % AFB1	Recupero % AFM1
Fegato	0.05	0.40	0.25	1	70	63
Rene	0.05	0.40	0.25	1	70	68
Muscolo	0.25	0.40	1	1	70	67
Sangue	0.25	0.40	1	1	60	90
Urine	0.08	0.40	1	1	60	67
Feci	0.28	0.35	1	1	58	79

*(LOD = limite di detenzione; concentrazione minima di un analista che può essere rilevata in modo attendibile. LQD = limite di quantificazione; concentrazione minima di un analista che può essere quantificata con accettabile accuratezza e precisione)

Tabella 20. Recupero percentuale relativo a matrici diverse ocrato

Matrice	LOD (ppb)	LOQ (ppb)	% recupero
Fegato	0.5	1	77
Rene	0.5	1	63
Muscolo	0.5	1	67
Sangue	0.5	1	92
Urine	0.5	1	80
Feci	0.5	1	75

Quote residuali di micotossine nelle matrici esaminate

Dalle analisi effettuate non si evidenziano positività nelle varie matrici appartenenti agli animali dei gruppi di controllo (T1 e T2); i risultati di questi gruppi non vengono riportati.

Nella tabella 21 sono riportati i valori relativi alle concentrazioni di AFB₁ e AFM₁ rilevate nelle matrici degli animali appartenenti ai gruppi T5 (dieta base + 280 ppb di AFB₁), T6 (dieta base + 280 ppb di AFB₁ + 0,2 % di *S. cerevisiae*), T7 (dieta base + 280 ppb di AFB₁ e 200ppb di OTA) e T8 (dieta base + 280 ppb di AFB₁ e 200ppb di OTA + 0,2 % di *S. cerevisiae*).

Nelle tabelle 22-26, sono riportati i valori medi, la deviazione standard, il valore massimo e minimo di aflatossine riscontrati per ogni matrice.

Dalla tabella si può notare l'esiguità delle quote di AFB₁ riscontrate nei fegati e nei reni degli animali dei diversi gruppi sperimentali; tali quote sono infatti sempre ampiamente inferiori a 1 ppb. Questo dato sembra confermare la bassa tendenza dell'AFB₁ e dell'AFM₁ ad accumularsi nei tessuti degli animali (Yiannikouris e Jouany, 2002; Rizzi *et al.* 2003).

I campioni di muscolo (in tutte le tesi) risultano negativi all'analisi tossicologica, questo evidenzia una bassissima capacità da parte della tossina di accumularsi in tale tessuto.

Va sottolineato come all'analisi statistica dei dati (T5 *vs* T6 e T7 *vs* T8) non ci siano differenze statisticamente significative tra le quantità di aflatossine (AFB₁ e AFM₁) ritrovate nelle matrici dei vari gruppi. Nel caso dei gruppi T5 e T6 all'analisi della contaminazione del fegato da aflatossina B1 risulta che il gruppo T6, che conteneva nella dieta anche l'adsorbente, era contraddistinto da una percentuale di positività del 44,4 % rispetto all'80 % del gruppo T5; apparentemente, secondo questi dati, il lievito sembra in grado di produrre un effetto di contenimento sul grado di contaminazione da diete intossicate.

Secondo alcuni Autori infatti, il *S. cerevisiae* per le caratteristiche della sua parete cellulare sarebbe in grado di adsorbire l'AFB₁ (Prelusky *et al.*, 1994; Newman, K. 2000; Devegowda, *et al.*, 1998; Yiannikouris *et al.*, 2005).

I livelli di contaminazione della dieta relativamente bassi possono supportare i risultati ottenuti. Va infatti ricordato che la capacità di questo lievito di legare la micotossina è dose-dipendente (Mahesh e Devegowda, 1996); inoltre, sebbene numerosi studi condotti *in vitro* indichino una capacità adsorbente anche molto elevata (Mahesh e Devegowda, 1996), va considerato che la condizione *in vivo* è suscettibile di molteplici variabili difficilmente riproducibili *in vitro*. È necessario precisare che gli studi compiuti sul suino pesante, tipologia di produzione quasi esclusivamente italiana, non sono numerosi e, per quanto riguarda gli effetti sulle produzioni zootecniche già dimostrate per altre categorie (suinetti), non è stata ancora dimostrata l'efficacia della somministrazione dei mannanoligosaccaridi neppure sui parametri di crescita nella fase finale del finissaggio (Pettigrew, 2000).

In accordo con la cinetica dell'aflatossina, non si è rinvenuta AFB₁ a livello urinario ma solo il rinvenimento del suo metabolita M₁, molecola caratterizzata da un maggior grado di idrofilia (Pompa 1994; Yiannikouris e Jouany, 2002). Si nota inoltre una più elevata quantità e maggiore positività nelle varie matrici di AFM₁ rispetto all'AFB₁ questo dato è anch'esso in accordo con la cinetica delle due tossine (Galtier, 1998; Neal, 1998).

I quantitativi molto bassi di micotossina sono in parte giustificabili anche dal livello non particolarmente elevato addizionato alla dieta (280 ppb). Quest'ultimo è stato però scelto

considerando la sovrapposibilità con una situazione “di campo”, ove, in genere, buone pratiche di raccolta e conservazione delle materie prime e la produzione dei mangimi dovrebbero garantire contenuti in micotossine negli alimenti per animali non elevati. Va inoltre tenuto conto che per legge non è possibile somministrare ai suini mangimi completi che contengano un quantitativo di aflatoxine superiore a 0.02 ppm (Direttiva CEE 2003/100). I dati ottenuti avvalorano anche nel suino quanto osservato in altre specie animali: la AFB₁ è una molecola che viene eliminata (combinazione di metabolismo ed escrezione) piuttosto velocemente e che, anche per assunzioni prolungate nel tempo, non ha tendenza ad accumularsi nell'organismo in genere e nemmeno nel fegato che ne rappresenta l'organo bersaglio.

Leeson *et al.* (1995) riportano che i volatili sono in grado di metabolizzare ed eliminare la tossina in tempi piuttosto brevi (72-96 h). Nella bovina i livelli più elevati di AFM₁ nel latte si rinvenivano due giorni dopo la somministrazione e diminuiscono drasticamente nei giorni successivi (Yiannikouris e Jouany, 2002).

Bonomi (1999) riporta che somministrando a suini all'ingrasso diete sperimentalmente contaminate con AFB₁ con dosaggi di 500, 650, 800 ppb, si sono rilevati nelle varie matrici i seguenti valori residuali: fegato (da 1,10 a 1,80 ppb), rene (da 0,25 a 0,65 ppb), muscolo (da 0,15 a 0,25 ppb); il livello di contaminazione è risultato tendenzialmente proporzionale alla dose assunta dall'animale. In un'altra ricerca compiuta negli USA per valutare l'entità dei residui nel fegato e nel muscolo in suini alimentati con mangimi naturalmente contaminati da AFB₁, gli Autori hanno riportato quote residuali comprese fra 0,01 e 0,44 ppb. Nessun caso di positività è stato rilevato nel muscolo, sia fra i soggetti risultati negativi alla ricerca nel fegato, sia fra quelli risultati positivi (Stubblefield *et al.*, 1991).

Questi dati sono piuttosto rassicuranti per la salute dell'uomo pur tenendo sempre presente il potere cancerogeno di questa micotossina e quindi la pericolosità anche di quantitativi estremamente bassi.

È interessante notare come nella prova in esame i residui nei tessuti edibili risultino inferiori all'unico limite per le aflatoxine previsto dalla legislazione per gli alimenti di origine animale, ovvero 50 ppb per l'AFM₁ nel latte (Reg. CE 1881/2006). Pur non essendo possibile l'estensione di un limite riferito ad una matrice ed a una specie diversa (il latte vaccino), questo dato può essere preso come indice di sicurezza dei tessuti edibili del suino.

Le condizioni climatiche del nostro Paese seppur più favorevoli rispetto a quelle nord europee per la contaminazione da aflatoxine (EFSA 2004) raramente consentono il raggiungimento di

valori di contaminazione pari a 280 ppb. Ad esempio, analisi compiute sul mais raccolto nel 1995 hanno dato esito negativo nel 52 % dei casi; i campioni risultati positivi evidenziano un valore medio di $2,3 \pm 12,4$ ppb, con due campioni aventi un livello superiore a 10 ppb ed un solo campione caratterizzato da un valore elevato (109 ppb) (Pietri, 1998). Nel 1996 i livelli invece sono risultati nettamente inferiori. Queste differenze possono essere in parte dovute alle diverse condizioni ambientali al momento della raccolta nelle zone di provenienza del mais analizzato delle due annate: il 1996 caratterizzato da clima temperato, caldo ed umido ha infatti favorito la contaminazione da zearalenone e tricoteceni, mentre nel 1995 un clima più caldo e secco ha determinato la presenza soprattutto di fumosine e aflatossine (Pietri, 1998).

La tabella 27 riassume i dati delle analisi tossicologiche effettuate per la ricerca dell'ocratossina nelle varie matrici. Nelle tabelle 28-33 sono riassunti i valori medi, la deviazione standard, i valori massimi e minimi di OTA riscontrati.

Per quanto riguarda i gruppi alimentati con l'ocratossina la positività nelle matrici analizzate è risultata pari al 100% ad eccezione di tre campioni di urine la cui causa si è ritenuto sia da imputare alla elevata diluizione delle stesse. I dati pubblicati da Jorgensen e Petersen (2002) indicano che in un indagine di campo la positività di rene e muscolo in suini allevati in normali condizioni era rispettivamente del 94.6 e 76% dei campioni prelevati, le carni presentavano un contenuto medio di OTA inferiore a quello dei reni. Dati riportati da Curtui *et al.* (2001) indicano positività in siero, rene, fegato e muscolo rispettivamente del 98, 79, 75, 17,% delle matrici di animali prelevate al macello. In campioni di vari prodotti derivati dal suino in una recente ricerca italiana si è osservata una positività dei campioni all'OTA pari al 47%. (Pietri *et al.*, 2006).

Secondo i dati riportati nell' *Opinion* della commissione sui contaminanti della catena alimentare (EFSA 2004) la somministrazione di OTA ai suini determina una positività dose dipendente all'analisi tossicologica di vari tessuti.

All'analisi statistica le tesi a confronto (T5 vs T6 e T7 vs T8) hanno rispettivamente evidenziato differenze significative tra loro. Gli animali alimentati con la sola ocratossina rispetto al gruppo che riceveva la tossina e il *S. cerevisiae* presentavano residui di OTA superiori in fegato rene e muscolo.

Per le matrici siero e urine degli stessi due gruppi (T5 vs T6) non si sono riscontrate differenze statisticamente significative.

Prove sperimentali hanno dimostrato l'efficacia nell'adsorbimento di OTA da parte di colture di *S. cerevisiae* lisate o derivati della parete del lievito come sostanze capaci di ridurre il

contenuto di micotossina in fermentazioni alcoliche per l'ottenimento di vini (Caridi e van Leeuwenhoek, 2006; Cecchini *et al.*, 2006). Altre ricerche evidenziano come i MOS (mannanoglicosaccaridi derivati della parete del lievito) risultano efficaci nell'adsorbimento e nella conseguente indisponibilità all'adsorbimento intestinale delle micotossine (Prelusky *et al.*, 1994; Newman, 2000; Devegowda, *et al.*, 1998). Dai risultati sperimentali emersi in queste prove si può dedurre come le pareti del lievito possano essere efficacemente impiegate anche in zootecnia.

Questa efficacia rilevata sperimentalmente in ordine all'efficacia del lievito nel contrastare gli effetti di accumulo dell'ocratossina nelle carni di suino è apparentemente, seppur in modo non statisticamente significativo, ravvisabile anche per le matrici fegato e muscolo nei gruppi T7 e T8 del presente lavoro. (confrontare con altra biblio?)

I valori di ocratossina a livello ematico evidenziano la caratteristica propria dell'OTA di un elevato grado di legame alle proteine sieriche e questo dato è in accordo con la cinetica di questa tossina (Pompa 1994; Creppy, 2002). I gruppi T7 e T8 mostrano una significatività ($P < 0.05$) per quanto concerne il contenuto di OTA nel sangue.

In ricerche effettuate per valutare la capacità di adsorbimento di diversi composti gli autori (Galvano *et al.* 2001) hanno indicato gli alluminosilicati (HSCAS) come buoni adsorbenti per le aflatossine, ma non molto efficaci per quanto concerne l'OTA. La zeolite e la bentonite risultano ottimi adsorbenti per le AFB₁. Il carbone attivo sembra essere un agente sequestrante di molte micotossine con buona capacità di legare *in vitro* anche l'OTA (Galvano *et al.* 1998; Galvano *et al.* 2001).

Le feci degli animali alimentati con entrambe le tossine (T7) contengono un maggior quantitativo ($P < 0.05$) di ocratossina rispetto al gruppo T3 in cui era presente la sola OTA; questo potrebbe suggerire un effetto interferente dell'aflatossina B₁ sull'assorbimento/escrezione dell'OTA. Il contenuto fecale di aflatossina all'analisi statistica non risulta influenzato dalla presenza nella dieta dell'OTA.

La normativa europea in vigore dal 09/01/2007 e applicata dal 01/03/2007 (Reg. CE 1831/2003) che definisce i tenori massimi ammissibili di alcuni contaminanti per gli alimenti per l'uomo non prevede un tenore massimo di ocratossina per i prodotti di origine animale. Pertanto seppure la bibliografia internazionale indichi come un rischio per il consumatore la presenza della tossina nelle carni suine (EFSA 2004, 2006; Pietri *et al.*, 2006; Curtui, 2001; Kotowski *et al.*, 2000) ad oggi non esiste una norma che ne indichi (quantificandola) la presenza tollerabile negli alimenti, compatibilmente con l'inevitabile contaminazione che si produce nella catena alimentare.

Tabella 21. Livelli (ppb) di AFB1 e AFM1 nelle diverse matrici (media \pm D.S.)

Tesi	AFB1		AFB1+Sacc.		AFB1+OTA		AFB1+OTA+Sacc.	
	5	6	7	8	5	6	7	8
Matrice biologica	AFB1	AFM1	AFB1	AFM1	AFB1	AFM1	AFB1	AFM1
fegato	0.08 \pm 0.03	0.39 \pm 0.10	0.12 \pm 0.04	0.54 \pm 0.29	0.09 \pm 0.04	0.34 \pm 0.09	0.09 \pm 0.02	0.40 \pm 0.12
%	80	100	44.4	100	70	100	60	100
rene	0.08 \pm 0.08	0.72 \pm 0.32	0.03 \pm 0.01	0.48 \pm 0.16	0.03 \pm 0.01	0.45 \pm 0.23	0.04 \pm 0.01	0.68 \pm 0.30
%	40%	100%	33.3%	100%	10%	100%	30%	100%
muscolo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
sangue	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
urine	n.d.	3.21 \pm 0.83	n.d.	5.22 \pm 2.77	-	-	-	-
%		100%		100%				
feci	12.61 \pm 2.38	7.27 \pm 3.13	-	-	12.34 \pm 1.68	9.90 \pm 1.9	-	-
%	100%	100%			100%	100%		

n.d. = < LOQ; - = analisi non eseguita; % = percentuale di positività

Tabella 22. Contenuto di AFB₁ in campioni di fegato

Tesi	Media	DS	Conc max	Conc min
5	0.08	0.03	0.14	0.05
6	0.12	0.04	0.15	0.08
7	0.09	0.04	0.15	0.05
8	0.09	0.02	0.12	0.06

Tabella 23. Contenuto di AFB₁ in campioni di rene

Tesi	Media	DS	Conc max	Conc min
5	0.08	0.08	0.2	0.02
6	0.03	0.01	0.04	0.03
7	0.03	0.01	0.03*	-
8	0.04	0.01	0.05	0.03

* un solo campione positivo

Tabella 24. Contenuto di AFM₁ in campioni di fegato

Tesi	Media	DS	Conc max	Conc min
5	0.39	0.10	0.55	0.26
6	0.54	0.29	1.16	0.27
7	0.34	0.09	0.47	0.24
8	0.40	0.12	0.54	0.24

Tabella 25. Contenuto di AFM₁ in campioni di rene

Tesi	Media	DS	Conc max	Conc min
5	0.72	0.32	1.36	0.31
6	0.48	0.16	0.72	0.23
7	0.45	0.23	0.84	0.26
8	0.68	0.30	1.03	0.24

Tabella 26. Contenuto di AFB₁ e AFM₁ in feci e urine

Tesi	Media	DS	Conc max	Conc min
Feci (AFB₁)				
5	12.61	2.38	14.81	10.08
7	12.34	1.68	14.24	10.41
Feci (AFM₁)				
5	7.27	3.13	11.59	4.9
7	9.90	1.9	12.05	7.46
Urine (AFM₁)				
5	3.21	0.83	4.15	1.96
7	5.22	2.77	8.70	2.20

Tabella 27. Contenuto di OTA (ppb) in matrici diverse (media \pm D.S.)

Tesi	3	4	7	8
Matrice biologica	OTA	OTA + <i>Sacc.</i>	AFB1+OTA	AFB1+OTA+Sacc.
fegato	6.3 \pm 1.7 A	3.5 \pm 0.8 B	4.4 \pm 1.0	3.8 \pm 1.6
rene	9.6 \pm 2.7 A	6.4 \pm 1.9 B	7.6 \pm 1.9	8.4 \pm 3.23
muscolo	1.9 \pm 0.6 A	1.3 \pm 0.3 B	1.5 \pm 0.5	1.3 \pm 0.4
siero	48.5 \pm 13.2	40.2 \pm 10.5	33.5 \pm 9.2 b	43.2 \pm 10.9 a
urine	4.0 \pm 4.1	4.9 \pm 3.8	1.6 \pm 1.3	2.5 \pm 2.1
feci	2.6 \pm 1.25 b	-	9.6 \pm 5.02 a	-

A, B = P< 0.01; a,b, P< 0.05.

Tabella 28. Contenuto di OTA (ppb) in campioni di fegato

Tesi	Media	DS	Conc max	Conc min
3	6.28 A	1.65	8.41	4.04
4	3.46 B	0.84	4.68	2.65
7	4.42	0.98	6.16	3.18
8	3.75	1.62	5.70	1.65

Tabella 29. Contenuto di OTA (ppb) in campioni di muscolo

Tesi	Media	DS	Conc max	Conc min
3	1.93 A	0.55	2.52	0.62
4	1.32 B	0.32	1.80	0.94
7	1.49	0.48	2.28	0.99
8	1.28	0.38	2.17	0.87

Tabella 30. Contenuto di OTA (ppb) in campioni di rene

Tesi	Media	DS	Conc max	Conc min
3	9.57 A	2.71	14.12	6.11
4	6.36 B	1.89	11.19	4.03
7	7.64	1.93	9.90	4.01
8	8.42	3.23	15.82	5.51

Tabella 31. Contenuto di OTA (ppb) in campioni di siero

Tesi	Media	DS	Conc max	Conc min
3	48.48	13.17	65.67	16.71
4	40.18	10.53	63.55	24.07
7	33.49 b	9.21	46.38	19.5
8	43.18 a	10.87	64.34	27.67

Tabella 32. Contenuto di OTA (ppb) in campioni di feci

Tesi	Media	DS	Conc max	Conc min
3	2.58 b	1.25	4.31	1.32
7	9.63 a	5.02	16.91	5.69

Tabella 33. Contenuto di OTA (ppb) in campioni di urina

Tesi	Media	DS	Conc max	Conc min
3	3.99	4.08	10.67	0.85
4	4.86	3.77	10.48	0.49
7	1.64	1.25	3.63	0.59
8	2.51	2.05	6.18	0.14

Prova 2: Effetto della diversa integrazione di metionina in diete per galline ovaiole contaminate da micotossine

Parametri zootecnici

Durante l'intera durata della prova gli animali non hanno evidenziato nessuna sintomatologia riconducibile a stati di micotossicosi. La morte di alcuni soggetti è stata dovuta a fenomeni di cloaciti e gli stessi erano omogeneamente distribuiti nei vari gruppi tanto da non permettere alcun collegamento con le tesi di appartenenza.

All'analisi autoptica degli esemplari soppressi per il prelievo dei campioni non si sono riscontrate alterazioni agli organi interni riconducibili all'azione delle tossine.

Nella tabella 32 sono riportati i dati per le tesi sperimentali a confronto riguardanti il consumo di alimento espresso come grammi/giorno per animale e la percentuale di ovodeposizione. Come si può osservare in tabella le differenze rilevabili non sono significative all'analisi statistica; per il gruppo T2 tuttavia in accordo con quanto evidenziato in bibliografia (Shafer *et al.*, 1996) il consumo di alimento è risultato superiore ai gruppi T1 e T3 alimentati con una maggiore quantità di metionina. Per quanto concerne la percentuale di ovodeposizione si assiste ad un calo seppur non significativo nelle tesi contenenti un minor tenore di metionina anche nei gruppi con la presenza di micotossine. Gli effetti positivi sulle produzioni avicole della metionina (considerato l'aminoacido limitante per il pollame) sono noti da tempo. Jackson *et al.* (1987) evidenziavano una riduzione della deposizione correlata ad una diminuzione del contenuto in metionina della dieta. Rizzi *et al.* (2004) in una prova condotta su galline ovaiole mostrarono come la dieta contenente micotossine (2ppm di OTA) non produceva effetti negativi statisticamente apprezzabili a carico dell'ovodeposizione. Altre ricerche condotte da Rizzi *et al.* (2003c) a carico di ovaiole alimentate con diete rispettivamente contenenti AFB₁ (0.893 ppm), zearalenone (10.36 ppm) e 0.171ppm di fumonisina B₁ non misero in evidenza alcun effetto sulla deposizione.

In prove condotte da Iqbal *et al.* (1983) e da Sudhakar (1990), la produzione di uova era influenzata negativamente solo quando le galline erano esposte a concentrazioni molto elevate di aflatoxina B₁, ad esempio con livelli superiori a 600 µg/kg di alimento, mentre la intossicazione con aflatoxina a tre diversi livelli di contaminazione nei mangimi (100, 300, 500 µg/kg di AFB₁) non diede effetti significativi ($P > 0,05$) sulla riduzione della produzione (Oliveira *et al.*, 2000).

In diete contaminate da OTA, Niemec *et al.* (1994) osservarono un riduzione del 16.9 e del 68.1 % per concentrazioni della tossina rispettivamente di 2 e 4 ppm. Nella prova in oggetto il dosaggio utilizzato è stato decisamente più basso rispetto alle ricerche di Niemec *et al.* (1994) (0.2vs 2/4 ppm); è pertanto ipotizzabile che l'assenza dell'effetto avverso sull'ovodeposizione si possa imputare ai bassi dosaggi impiegati.

Tabella 32. Media dei consumi e deposizioni giornalieri.

Tesi		Consumo g/d/gallina	Deposizione %
T1	Controllo	109.98	92.92
T2	Metionina -	114.29	89.53
T3	Metionina +	110.79	92.36
T4	Controllo e (AFB1 + OTA)	117.42	93.48
T5	Metionina - e (AFB1 + OTA)	110.21	90.18
T6	Metionina + e (AFB1 + OTA)	103.55	92.74
T7	Controllo e OTA	106.53	91.07
T8	Metionina - e OTA	104.81	92.37
T9	Metionina + e OTA	110.16	93.60
	SEM	1.27	0.76
		n.s.	n.s.

SEM = errore standard della media

All'analisi della qualità delle produzioni ottenute non si sono evidenziate differenze all'inizio della sperimentazione, i dati pertanto non vengono riportati.

nelle tabelle 33-35 sono riportati i parametri qualitativi dell'uovo oggetto dell'indagine alla conclusione della sperimentazione

Il peso dell'uovo è stato, all'analisi statistica, significativamente influenzato ($P < 0.01$) sia dal contenuto di metionina nella dieta che dalla presenza delle micotossine.

Come si può notare in tabella 33 i gruppi tesi T1 e T2 presentano i maggiori pesi dell'uovo, il gruppo T2 mostra un dato apparentemente in contrasto da quanto riscontrabile in bibliografia ma tenendo conto della minore percentuale di ovodeposizione ciò potrebbe avere una spiegazione in accordo con la bibliografia, sull'argomento che vorrebbe per contenuti in metionina bassi un peso medio dell'uovo inferiore. (Peterson *et al.* 1983; Jackson *et al.* 1987).

I gruppi trattati con le micotossine presentano mediamente il più basso peso dell'uovo, ancora il dato risulta peggiorato quando si considerano i gruppi a più scarso contenuto di metionina.

In particolare l'associazione tra la micotossina e carenza di metionina determina i più bassi valori, il dato peggiore è quello relativo al gruppo T8 ove al basso tenore in metionina si unisce la più alta concentrazione di tossina usata in prova (200 ppb di OTA).

Le percentuali delle tre componenti costitutive dell'uovo evidenziano differenze statisticamente significative solo a carico dell'albume ($P < 0.05$). Le percentuali di albume più basse riscontrate appartengono alle diete intossicate (questo è vero anche per quei gruppi che non evidenziano differenze significative) e, complessivamente, i peggiori valori risultano essere quelli delle diete con meno metionina.

Da quanto emerge da questi dati la “carenza” di metionina sembrerebbe influenzare maggiormente l’albume rispetto al tuorlo.

Lo spessore del guscio, il colore del guscio e l’indice di Haugh non evidenziano differenze statisticamente significative fra i gruppi in prova. Il valore dello spessore sembra comunque peggiorare nei gruppi intossicati; questo dato è in accordo con quanto evidenziato da Niemec *et al.* (1994) e da Rizzi *et al.* (2004). Il pH dell’albume evidenzia una differenza significativa all’analisi statistica ($P < 0.01$) per i gruppi che assumevano le diete povere di metionina e contenenti le micotossine, è in accordo con quanto osservato da Rizzi *et al.* (2004).

Tabella 33. Alcuni parametri qualitativi fine prova

Tesi		P uovo (g)	% guscio	% tuorlo	% albume
T1	Controllo	65.08 D	11.55	23.12	65.31 b
T2	Metionina -	65.05 D	11.74	24.86	63.43 a
T3	Metionina +	64.44 C	11.34	23.15	65.52 b
T4	Controllo e (AFB1 + OTA)	64.50 C	11.25	24.82	63.93 a
T5	Metionina - e (AFB1 + OTA)	58.88 B	11.73	24.41	63.85 a
T6	Metionina + e (AFB1 + OTA)	61.54 C	11.13	23.89	64.98 b
T7	Controllo e OTA	62.73 C	11.30	24.62	64.08 ab
T8	Metionina - e OTA	56.73 A	11.87	24.91	63.19 a
T9	Metionina + e OTA	61.40 B	11.40	24.55	64.04 ab
	SEM	0.44	0.06	0.44	0.20
		P< 0.01	n.s.	n.s.	P< 0.05

Tabella 34. Alcuni parametri qualitativi fine prova

Tesi		Spessore guscio (mm)	Indice di Haugh	pH albume	Colore guscio %
T1	Controllo	0.361	84.60	8.23 A	30.48
T2	Metionina -	0.367	86.78	8.14 A	32.51
T3	Metionina +	0.350	86.26	8.36 B A	30.61
T4	Controllo e (AFB1 + OTA)	0.351	88.75	8.16 A	32.81
T5	Metionina - e (AFB1 + OTA)	0.353	86.97	8.60 B	27.78
T6	Metionina + e (AFB1 + OTA)	0.336	86.29	8.38 A	30.46
T7	Controllo e OTA	0.339	87.21	8.22 A	30.36
T8	Metionina - e OTA	0.357	84.96	8.55 B	29.66
T9	Metionina + e OTA	0.346	85.56	8.31 A	29.72
	SEM	0.003	0.51	0.03	0.19
		n.s.	n.s.	P< 0.01	n.s.

I parametri riguardanti il colore del tuorlo sono riportati in tabella 35 le differenze nei parametri considerati, eccetto il parametro b (tendenza al giallo), sono influenzate in modo statisticamente significativo dalla presenza di micotossine nella dieta ($P < 0.01$).

Le micotossine influenzano il parametro colore, fenomeno riscontrato frequentemente (Rizzi *et al.*, 1999, 2001, 2003a, b; Zaghini *et al.*, 2005).

La variazione di alcuni parametri del colore (luminosità, tendenza al rosso, tendenza al giallo e CN), potrebbe essere collegata all'interferenza della micotossina con il metabolismo lipidico (Tung *et al.*, 1972) ed anche con la deposizione dei pigmenti nel tuorlo, come osservato da Genedy *et al.* (1999).

Le complesse interazioni dovute alle aflatossine sono state dimostrate dalla scoperta che l'assorbimento dei carotenoidi è inibito dalle aflatossine in diete maggiormente contenenti bassi livelli di grasso che non in diete ad elevato tenore lipidico (Smith *et al.*, 1971).

Alimentando ovaiole con diete intossicate da OTA si sono osservate riduzioni del colore del tuorlo, questo in accordo con quanto emerso dalla presente ricerca sembra confermare un'influenza dell'ocratossina su questo parametro (Scholtyssek, 1987).

Huff *et al.* (1975) hanno osservato una elevata tendenza al giallo del colore del tuorlo in ovaiole alimentate con diete contenenti 10µg di aflatoxina B1 per grammo di alimento.

Va osservato inoltre che l'uso di vari adsorbenti nei confronti delle micotossine non sempre è in grado di prevenire il danno relativo alla pigmentazione del tuorlo (Rizzi *et al.*, 1999, 2001, 2003a). In esperimenti di Rizzi *et al.* (2003b) sia la luminosità che la tendenza al giallo del colore del tuorlo presentano i medesimi valori in uova di gruppi sia intossicati con aflatoxina B1 sia di gruppi le cui diete presentano la clinoptilolite al 2% e la micotossina.

Tabella 35. Alcuni parametri qualitativi fine prova (colore del tuorlo)

Tesi		L	a	b	CN
T1	Controllo	54.35 A	-0.11 D	42.81	10.38 B
T2	Metionina -	54.25 A	-0.12 D	41.91	10.48 B
T3	Metionina +	53.73 A	-0.47 C	41.65	10.40 B
T4	Controllo e (AFB1 + OTA)	54.68 A	-1.87 B	41.86	9.77 A
T5	Metionina - e (AFB1 + OTA)	55.05 B	-1.13 C	41.68	9.92 AB
T6	Metionina + e (AFB1 + OTA)	55.33 B	-1.93 B	40.29	9.61 A
T7	Controllo e OTA	54.28 A	-0.94 C	42.27	10.14 B
T8	Metionina - e OTA	55.82 B	-1.63 B	42.12	9.60 A
T9	Metionina + e OTA	55.19 B	-2.47 A	40.11	9.48 A
	SEM	0.14	0.10	0.24	0.05
		P< 0.01	P< 0.01	n.s.	P< 0.01

I dati riguardanti l'analisi chimica del tuorlo a fine prova sono riportati in tabella 36.

Non si sono riscontrate differenze per quanto riguarda il contenuto in sostanza secca e di ceneri mentre sia per il contenuto proteico che lipidico si sono riscontrate differenze significative all'analisi statistica (rispettivamente $P < 0.01$ e $P < 0.05$). Le differenze del contenuto proteico più che influenzate dall'addizione alla dieta delle micotossine sembra essere in rapporto al contenuto in metionina della stessa. I dati ottenuti sono in contrasto con quanto osservato da Shafer *et al.* (1996) i quali hanno osservato un maggiore contenuto proteico in tuorli di galline alimentate a più alto contenuto in metionina.

Per quanto riguarda il contenuto lipidico, si osservano tenori più bassi nei gruppi alimentati con più bassi livelli di metionina, tra questi i gruppi a più basso tenore di grassi sono quelli alimentati anche con le tossine.

Risultati diversi da quelli scaturiti dalla prova in oggetto furono riscontrati da Stanley *et al.* (1999) e da Rizzi *et al.* (1999, 2003b).

Tabella 36. Analisi chimica del tuorlo d'uovo a fine prova

Tesi		SS	PG	GG	CG
T1	Controllo	51.84	32.42 AB	62.13 c	3.14
T2	Metionina -	51.73	33.95 B	60.05 b	3.16
T3	Metionina +	51.77	31.45 A	61.46 c	3.22
T4	Controllo e (AFB1 + OTA)	51.34	32.52 AB	61.26 bc	3.25
T5	Metionina - e (AFB1 + OTA)	51.63	33.90 B	59.35 a	3.24
T6	Metionina + e (AFB1 + OTA)	51.47	32.51 AB	61.13 bc	2.97
T7	Controllo e OTA	51.52	33.45 B	60.64 b	3.38
T8	Metionina - e OTA	50.96	35.13 C	58.52 a	3.73
T9	Metionina + e OTA	51.98	33.32 B	60.32 b	3.07
	SEM	0.08	0.22	0.27	0.08
		n.s.	P< 0.01	P< 0.05	n.s.

In tabella 37 sono riportati i pesi degli organi (fegato e rene) e degli animali alla fine della prova, come si può osservare all'analisi statistica i dati riportati in tabella non evidenziano differenze significative tra loro.

Tabella 37. Pesi di fegato e rene rapportati al peso vivo e peso degli animali a fine prova

Tesi		Fegato % /PV	Rene % /PV	Peso vivo (kg)
T1	Controllo	2.13	0.70	1.86
T2	Metionina -	2.36	0.71	1.69
T3	Metionina +	2.08	0.64	1.83
T4	Controllo e (AFB1 + OTA)	2.13	0.68	1.84
T5	Metionina - e (AFB1 + OTA)	2.42	0.66	1.72
T6	Metionina + e (AFB1 + OTA)	1.81	0.64	1.84
T7	Controllo e OTA	1.92	0.63	1.83
T8	Metionina - e OTA	2.14	0.64	1.74
T9	Metionina + e OTA	1.93	0.59	1.90
	SEM	0.07	0.02	0.03
		n.s.	n.s.	n.s.

Quote residuali di micotossine nelle matrici esaminate

In tabella 38 sono riportati i valori di LOD e LQD e le percentuali di recupero nelle diverse matrici analizzate.

I dati riguardanti il contenuto di ocratossina nei vari organi e substrati è riportato in tabella 39. Come si può osservare si tratta di dati preliminari in quanto parte delle analisi è ancora in

corso; in particolare non sono tutt'ora disponibili i valori riguardanti il tuorlo. Trattandosi di dati ancora incompleti, non si è ritenuto opportuno effettuare un'analisi statistica per la valutazione delle possibili interferenze sul grado d'accumulo delle tossine in funzione della dieta.

L'analisi tossicologica nei confronti dell'aflatossina non è stata eseguita poiché dall'esperienza maturata in precedenti prove e dalle evidenze sperimentali rilevabili in letteratura l'aflatossina possiede un scarso grado di accumulo nell'organismo. Tenendo conto di quanto sopra scritto, va inoltre considerato che i livelli utilizzati in questa sperimentazione erano sensibilmente più bassi rispetto a quelli normalmente impiegati in altre prove sperimentali (mediamente nell'ordine di 1-2 ppm contro i 4.2 ppb di questa prova).

In una recente sperimentazione condotta da Zaghini *et al.* (2005) su ovaiole alimentate con diete contenenti 2.5 ppm di AFB₁, gli autori hanno evidenziato la totale assenza (non rilevabilità) di AFB₁ e metabolita AFM₁ sia nel tuorlo che nell'albume d'uovo. Questi dati sono in accordo con quanto riportato da Trucksess *et al.* (1983) e Micco *et al.* (1987) e confermano la scarsa capacità dell'aflatossina e dei suoi metaboliti di accumularsi nell'uovo. Nella stessa ricerca i dati relativi alla presenza di AFB₁ nell'uovo evidenziano residui molto bassi, la positività era pari al 100% e con tenori di 4.13 ± 1.95 ppb; quando alla stessa dieta erano supplementati dei mannanologossaccaridi (MOS) il contenuto si riduceva sensibilmente (2.21 ± 1.37 ppb). In un'altra ricerca condotta da Fernandez *et al.* (1994) furono ritrovati nel muscolo di ovaiole, alimentate con diete contenenti 2.5-5-ppm di AFB₁, tenori 0.05 e 0.09 ppb rispettivamente di AFB₁ e AFM₁; in tutta la sperimentazione un solo uovo fu trovato positivo alla AFB₁ con tenori di 0.32 ppb.

Questi dati confermano una scarsa capacità di accumulo dell'AFB₁ nei tessuti, questo in accordo con quanto riportato anche da altri autori (Galtier, 1998; Micco, 1988a,b)

Per quanto concerne i tenori in ocratossina rilevabili nelle matrici oggetto della prova, si nota un effetto dose dipendente con una positività all'analisi maggiore per i gruppi T7, T8 e T9, contenenti un più elevato tenore di OTA.

L'albume risulta essere non interessato dai residui di ocratossina, es anche il fegato. A livello renale ed ematico invece si notano delle positività con valori superiori a carico del rene in accordo con lo spiccato tropismo dell'ocratossina per quest'organo (Pompa 1994; Jorgensen e Petersen 2002; Curtui *et al.*, 2001).

I dati contenuti in una ricerca di Micco *et al.* (1988b) evidenziano un effetto sinergico sull'accumulo dell'aflatossina e dell'ocratossina in diversi organi e tessuti sia in boiler che ovaiole.

In una ricerca, ove cui si sono alimentate ovaiole con livelli crescenti di ocratossina a dosaggi di 1.3 ppm (livello iniziale di inclusione nella dieta), si osservava accumulo di OTA sia nel tuorlo che nell'albume (Bauer *et al.*, 1988). Questo è in contrasto con quanto evidenziato nella presente prova ove gli albumi sono risultati negativi all'analisi tossicologica, va però ricordato il più basso tenore di OTA somministrato.

Come si può osservare in tabella l'albume non risulta contenere residui di ocratossina nemmeno nei gruppi a più alta contaminazione.

Tabella 38. Recupero percentuale relativo a matrici diverse ocrati

Matrice	LOD (ppb)	LOQ (ppb)	% recupero
Fegato	1	1	82
Rene	1	1	92
Sangue	0.5	1	79
Feci	2	2	75
Albume	0.5	0.5	65

Tabella 39. Contenuto di micotossine nelle diverse matrici analizzate

Tesi	Sangue		Fegato		Rene		Feci		Albume	
	(ppb)	posit.	(ppb)	posit.	(ppb)	posit.	(ppb)	posit.	(ppb)	posit.
T 4	n.d.	0	n.d.	0	0.45	20%	7.67	50%	n.d.	0
T 5	n.d.	0	n.d.	0	n.d.	0	31.74	50%	n.d.	0
T 6	n.d.	0	n.d.	0	n.d.	0	13.19	50%	n.d.	0
T 7	n.d.	0	n.d.	0	0.86	60%	n.d.	0	n.d.	0
T 8	0.80	20%	n.d.	0	0.74	80%	49.89	50%	n.d.	0
T 9	0.51	50%	n.d.	0	1.38	100%	n.d.	0	n.d.	0

Conclusioni

La pericolosità e gli effetti tossici a carico degli animali sono noti fin dalla scoperta delle micotossine stesse.

L'interesse della ricerca per capirne i meccanismi d'azione, gli effetti negativi a carico delle produzioni zootecniche e gli effetti tossici sugli animali e l'uomo è ben documentato dal rilevante numero di lavori scientifici pubblicati a tale riguardo.

Nelle prove sperimentali oggetto della presente dissertazione si è osservato come bassi livelli di micotossine in diete somministrate a suini nell'ultima fase del finissaggio non determinano cambiamenti nei parametri zootecnici rilevati e nemmeno sui parametri relativi alla resa di macellazione e qualità della carne ottenuta. Questi risultati sono in parziale disaccordo con quanto emerso in letteratura ma va sottolineato come l'età e conseguentemente il peso degli animali possono aver determinato una migliore sopportazione della dose somministrata.

In ordine all'analisi tossicologica effettuata su varie matrici si può affermare che i dati emersi in questa sperimentazione sono in accordo con quanto riportato in letteratura; le due tossine si comportano in modo diverso con fenomeni di accumulo dell'ocratossina nelle diverse matrici analizzate, l'aflatossina è invece risultata avere grado di contaminazione inferiore alla sensibilità delle metodiche ad eccezione degli organi bersaglio.

La sperimentazione condotta su ovaiole con l'impiego delle stesse micotossine ha prodotto invece (seppur i dosaggi non siano stati elevati) effetti a carico della produzione delle uova e della loro qualità.

In accordo con altre ricerche la positività all'analisi tossicologica delle diverse matrici è risultata evidenziare una scarsa contaminazione delle matrici stesse, l'analisi degli albumi ha evidenziato una totale negatività alla contaminazione confermando la apparente salubrità di questo prodotto che, anche da quanto emerge dalla bibliografia, risulta essere scarsamente contaminato da micotossine.

Bibliografia

- AA.VV. 2006. Mais e sicurezza alimentare. Luigino Disegna (ed). Veneto Agricoltura. Legnaro (PD) Italy.
- Aibino E., Garella E., 1999. Micotossine, un nemico sempre in agguato. Rivista di Suinicoltura, 8: 33-39.
- Anadòn A., Martinez-Larranagam M.R., 1995. Mycotoxin effects on breed animals and risk of carry-over to products from animal origin. Vet. Human. Toxicol. 37: 43-55.
- Argentiere M. 2002. Micotossine, insidia per l'allevatore. Rivista di Avicoltura, 4: 20-21.
- Atroschi F., Rizzo A., Westermarck T., Ali-Vhemas T., 2002. Antioxidant nutrients and mycotoxins. Toxicology 180: 151-167.
- Avantaggiato G., Visconti A. 2003. Misure di controllo della contaminazione da micotossine e strategie di detossificazione. Tecnica Molitoria 10:1025-1038.
- Bartolini R. 2002. Come limitare le micotossine. Rivista di Suinicoltura. 4: 83-85.
- Bauer, J., Niemiec, J., Scholtyssek, S. 1988. Ochratoxin A im Legehennenfutter. II. Ruckstaende in Serum, Leber und Ei.[Ochratoxin A in laying hen feed. II. Residues in plasma, liver and eggs.] Arch. Geflugelkd. 52(2): 71-75.
- Bennet J.W., Keller N.P., 1997. Mycotoxins and their prevention. In: Anke T. ed., Fungal Biotechnology. International Thompson Publishing Company, Weinheim, pp. 265-273. Cit. da Atroschi *et al.*, 2002.
- Biagi G., Nannipieri S., Signorini G., Zarengi L. 2002. Le micotossine: Disposizioni di legge. L. Anim. Rev, 8(1): 5-11.
- Biagi G., Signorini F., Pizzin G. 2000. Fiducia del consumatore e sicurezza delle carni. Rivista di Suinicoltura 12: 67-71.

- Biró, K., Barna-Vetró, I., Pécsi, T., Szabó, E., Winkler, G., Fink-Gremmels, J., Solti, L. 2003. Evaluation of spermatological parameters in ochratoxin A-challenged boars. *Theriogenology* 60: 199-207.
- Blackwell, B.A., Gilliam J.T., Savard, M.E., Miller, J.D., Duvick, J.P. 1999. Oxidative deamination of hydrolyzed fumonisin B1 (AP1) by cultures of *Exophiala spinifera*. *Natural Toxins* 7(1): 31-38.
- Bodine A.B., Mertens D.R. 1983. Toxicology, metabolism, and physiological effects of aflatoxin in the bovine. In: Diener U.L., Asquit R. L. e Dickens J.W. eds, *Aflatoxin and Aspergillus flavus in corn*. Alabama Agric. Exp. Sta. Coop. Ser. Bull. 279: 46. Cit. da Edrington *et al.*, 1994.
- Bonomi A., 1999. Influenza dell'aflatossicosi cronica sulla qualità della carne e sull'efficienza riproduttiva dei suini. *L'informatore agrario* 14: 49-53.
- Bonomi A., Quarantelli A., Mazzali I. 1993. Effetti di razioni contaminate da aflatossina G1 sull'efficienza produttiva e sulle caratteristiche quanti-qualitative della carne nei suini all'ingrasso (contributo sperimentale). *Rivista di Scienza dell'Alimentazione*, anno 22, n. 3: 351-375.
- Bonomi A., Quarantelli A., Mazzali I., 1996. La contaminazione dei mangimi per suini all'ingrasso con aflatossine B1 e G1: effetti sui prosciutti stagionati (contributo sperimentale). *Rivista di Scienza dell'Alimentazione* 25(1): 69-75.
- Booth N.H.E., Macdonald I.E. 1982. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 5th ed., Iowa State University Press, AMES, U.S.A..
- Brown R.L., Cleveland T. E., Payne G.A., Woloshuk C.P., Campbell K.W., White D.G., 1995. Determination of resistance to aflatoxin production in maize kernels and detection of fungal colonization using an *Aspergillus flavus* transformant expressing *Escherichia coli* B-glucuronidase. *Phitopathology* 85: 983-989. Cit. da D'Mello e Macdonald, 1997.

- Buck W.B., Preston k. S., Abel M., Marshall Y.L. (1966): Perirenal edema in swine: a disease caused by common weeds. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 148: 1525.
- Caridi, A., 2006. Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *A. van Leeuw.* 89: 417-422.
- Cecchini, F., Morassut, M., Moruno, E.G., di Stefano, R. 2006. Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. *Food Microb.* 23(5): 411-417.
- Ceruti A., Ceruti M., Vigano G., 1993. *Botanica medica farmaceutica e veterinaria con elementi di biologia vegetale.* Zanichelli, Bologna, Italy.
- Creppy E.E., 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters* 127: 19-28.
- Creppy E.E., Kane A., Dirheimer G., Lafarge-Frayssinet C., Mousset S., Frayssinet C. 1985. Genotoxicity of ochratoxin A in mice: DNA single-strand break evaluation in spleen, liver and kidney. *Toxicol. Lett.*, 28: 29-35.
- Curtui. V.G., Gareis, M., Usleber, E., Märtlbauer, E. 2001. Survey of omanian slaughtered pigs for the occurrence of mycotoxins ochratoxins A and B, and Zearalenone. *Food Add. Contam.* 18(8): 730-738.
- Deacon J. W., 1997. *Modern Mycology.* Blackwell Science, Oxford
- Derache R., 1986. *Tossicologia e sicurezza degli alimenti.* Tecniche Nuove, Milano, Italy.
- Devegowda G., Raju M.V.L.N., Nazar A., Swamy H.V.L.N., 1998. Mycotoxin picture worldwide: novel solutions for their counteraction. In Lyons T. P. e Jaques K.A., *Proceedings of Altech's XIV Annual Symposium*, Nottingham University Press, Nottingham, 241-253.

- Devegowda, G., Raju, M.V.L.N., Nazar A., Swamy, H.V.L.N., 1998. Mycotoxin picture worldwide: novel solutions for their counteraction. In: T.P. Lyons e K.A. Jacques (eds.) *Biotechnology in the Feed Industry Proceedings of Alltech's XIV Annual Symposium*. Nottingham University Press, Nottingham, UK. 241-255.
- Direttiva 86/609/CEE del Consiglio del 24 novembre 1986 concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati Membri relative alla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee L 358 del 18/12/1986*.
- Direttiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 7 Maggio 2002 relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee L-140 del 30/05/2002*.
- D'Mello J.P.F. e Macdonald A.M.C., 1997. Mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 69: 155-166.
- Doster r. C., Sinnhuber R.O.E, Wales J.H. 1972. Acute intraperitoneal toxicity of ochratoxins A and B in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Food Cosmet. Toxicol.*, 10: 85.
- Douplik B.E Peckham J.C. 1970. Mycotoxicity of *Aspergillus ochraceus* to chicks. *Appl. Microbiol.*, 19: 594-597
- Edrington T.S., Harvey R.B., Kubena L.F., 1994. Effect of Aflatoxin in Growing Lambs Fed Ruminally Degradable or Escape Protein Sources. *J. Anim. Sci.* 72: 1274-1281
- Edrington T.S., Harvey R.B., Kubena L.F., 1994. Effect of Aflatoxin in Growing Lambs Fed Ruminally Degradable or Escape Protein Sources. *J. Anim. Sci.* 72: 1274-1281.
- EFSA, European Food Safety Agency. 2006. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to ochratoxin A in food. *The EFSA Journal* (2006) 365, 1 – 56.

- EFSA, European Food Safety Agency. 2004a. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. The EFSA Journal, 39: 1-27.
- EFSA, European Food Safety Authority. 2004b. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to ochratoxin A (OTA) as undesirable substance in animal feed. The EFSA Journal, 101: 1-36.
- Fanelli, C., Fabbri, A.A. 1989. Relationship between lipids and aflatoxin biosynthesis. Mycopathologia, 107: 115-120.
- FAO (Food and Agriculture Organization) 1997. Worldwide Regulations for Mycotoxins 1995. A compendium. FAO Food and Nutrition Paper 64. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- FAO: Food and Agriculture Organization. 2004: Worldwide Regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. A compendium. FAO Food and Nutrition Paper, 81: 1-165
- Fernandez, A., Verde, M.T., Gascon, M., Ramos, J.J. Gomez, J. 1994. Aflatoxin its metabolites in tissue from laying hens and boiler chickens fed a contaminated diet. J. Sci. Food Agric. 65(4): 407-414.
- Galtier P. 1974. Devenir de l' ochratoxine A dans l' organisme animal. II. Distribution tissulaire and élimination chez le rat. Ann. Rech. Vét. 5: 319-328.
- Galtier P. 1991. Pharmacokinetics of ochratoxin A in animals. IARC, Sci. Publ., 115: 187-200.
- Galtier P., Camguilhem R., Bodin G. 1980. Evidence for *in vitro* and *in vivo* interaction between ochratoxin A and three acidic drugs. Food Cosmet. Toxicol. 18: 493-496.
- Galtier, P. 1998. Biological fate of mycotoxins in animals. Rev. Med. Vet. 145: 549-554.

- Galvano, F., Pietri, A., Bertuzzi, T., De Angelis, A., Piva A., Chies, L., Galvano M. 1998
Activated carbons: *in vitro* affinity for ochratoxin A and deoxynivalenol and relation of
absorption ability to physicochemical parameters, J. Food Prot. 61: 469-475.
- Genedy, S.G.K., El-Naggar, N.M., Issahak N.S., Qota, E.M.A., 1999. Effectiveness of
available commercial products to alleviate the toxic severity of aflatoxin diets on egg
production and its quality of two local hen strains. Egypt. Poult. Sci. J. 19:569-589.
- Gerola F. M., Gerola P.D. 1986. Botanica per i corsi di Medicina Veterinaria e di Scienze
della Produzione Animale. Utet, Torino
- Haouet, M.N., Altissimi, M.S. 2005. Micotossine negli alimenti e micotossicosi animale e
umana. http://www.pg.izs.it/arretrati/numero_18/micot.html
- Harvey R.B., Kubena L.F., Huff W.E., Corrier D.E., Clark D.E., Phillips T.D., 1989. Effects
of aflatoxin, deoxynivalenol, and their combinations in the diets of growing pigs. Am. J.
Vet. Res. 50: 602-607.
- Harvey R.B., Kubena L.F., Huff W.E., Corrier D.E., Clark D.E., Phillips T.D., 1989. Effects
of aflatoxin, deoxynivalenol, and their combinations in the diets of growing pigs. Am. J.
Vet. Res. 50: 602-607.
- Harvey R.B., Kubena L.D., Elissalde, M.H., Rottinghaus, G.E., Corrier, D.E. 1994
Administration of ochratoxin A and T-2 toxin to growing swine. Am. J. Vet. Res.
55(12):1757-1761.
- Harvey R.B., Kubena L.D., Phillips T.D., Corrier D. E., Elissalde M.H., Huff W.E., 1991.
Diminution of aflatoxin toxicity to growing lambs by dietary supplementation with
hydrated sodium calcium aluminosilicate. American Journal of Veterinary Research, n.
52:152. Cit. da Edrington *et al.*, 1994.

- Hoogenboom L.A.P., Tulliez J., Gautier J.P., Coker R.D., Melcion J.P., Nagler M.J., Polman Th.H. G., Delort-Laval J., 2001. Absorption, distribution and excretion of aflatoxin-derived ammoniation products in lactating cows. *Food Add. Contam.* 18(1): 47-58.
- Huff W.E., Doerr J. A.E Hamilton P.B. (1977): Decreased bone strength during ochratoxicosis and aflatoxicosis. *Poultry Sci.* 56: 1724 (Abstr.).
- Huff W.E., Wyatt R.D., Tucker t. L.E Hamilton P B. (1974): Ochratoxicosis in the broiler chicken. *Poultry Sci.* 53: 1585-1591.
- Huff, W.E., Kubena, L.F., Harvey, R.B., Doerr, J.A., 1988. Mycotoxin interactions in poultry and swine. *J. Anim. Sci.* 66: 2351-2355.
- Huff, W.E., Wyatt, R.D., Hamilton, P.B., 1975. Effects of dietary Aflatoxin in certain egg yolk parameters. *Poult. Sci.* 54:2014-2018.
- Hult K., Teiling A.E., Getenbeck S. 1976. Degradation of ochratoxin A by a ruminant. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 443-444.
- Hussein S.H., Brasel, J.M: 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. a review. *Toxicology* 167: 101-134.
- Huwig, A., Freimund, S., Käppeli, O., Dutler H. 2001. Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbets. *Toxicology Letters* 122: 179-188.
- IARC, 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene: views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon, 12-19 February 2002. IARC, Lyon, France.
- Iqbal, Q.K., Rao, P.V., Reddy, S.J., 1983. Dose-response relationship of experimentally induced aflatoxicosis in commercial layers. *J. Anim. Sci.* 53:1277-1280.

- Jackson M.E., Hellwing, H.M., Waidroup, W.P. 1987. Shell quality: Potential for improvement by dietary means and relationship with egg size. *Poult. Sci.* 66: 1702-1713.
- Jorgensen, K., Petersen, A. 2002. Content of ochratoxin A in paired kidney and meat samples from healthy Danish slaughter pigs. *Food Add. Contam.*19(6): 562-567.
- Kabar, B., Dobson, A.W., Var, I. 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(8): 593-619.
- Kitchen D.N., Carlton W.W., Tuite J. 1977. Ochratoxin A and citrinin induced nephrosis in beagle dogs. I. Clinical and clinicalpathological features. *Vet. Path.* 14: 154-172.
- Kotowski, K., Grabarkiewicz -Szczesna, J., Waskiewicz, A., Kostecki, M., Golinski, P. 2000. Ochratoxin A in porcine blood and in consumed feed samples. *Myc. Res.* 16: 66-72.
- Krogh P. (1992). Role of ochratoxin in disease causation. *Food Chem. Toxicol.* 30: 213-224.
- Krogh P., Elling F., Hald B., Jyilling B., Petersen V.E., Skadhauge E. Svendsen C.K. 1976. Experimental avian nephropathy. Changes of renal function and structure induced by ochratoxin A-contaminated feed. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 84A: 211.
- Kuiper-Goodman T.,e Scott, P.M. 1989. Review: Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed. Environ. Sci.* 2: 179-248.
- Kumagai S. 1988. Effects of plasma ochratoxin A and luminal pH on the jejunal absorption of ochratoxin A in rats. *Food Chem. Toxicol.* 26: 753-758.
- Kumagai S. e Aibara K. (1982): Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 64: 94-102.
- Lacey, J., 1989. Citato da Ominski *et al.*, 1994

- Larsen, T.O., Svendsen, A., Smedgaard, J. 2001. Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8): 3630-3635.
- Leeson, S., Gonzalo, J.D.G., Summers, J.D. 1995. *Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins*. University Books, Guelph, Ontario, Canada.
- Madhyastha M.S., Bhat R.V. 1985. Evaluation of Substrate Potentiality and Inhibitory Effects to Identify High Risk Spices for Aflatoxin Contamination. *J. Food Sci.* 50: 376-378.
- Madhyastha S.M., Marquardt R.R., Frohlich A.A., Platford G. e Abramson D. 1990. Effects of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *Aspergillus alutaceus* and *Penicillium verrucosum*. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1506-1510.
- Madsen A., Mortensen H.P., Hald B. (1982): Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs. I. Influence on pigs performances and residues. *Acta Agric. Scand.* 32: 225-239.
- Mahesh B.K., Dewegowda G. 1996. Ability of aflatoxin binder to bind aflatoxin in contaminated poultry feed-an in vitro study. *Proceedings of the 20th World Poultry Congress, New Delhi*, 4: 296. Cit. da Devegowda *et al.*, 1998.
- Malagutti,L., Zannotti, M., Scampini, A., Sciaraffia, F. 2005. Effects of Ochratoxin A on heavy pig production. *Anim. Res.* 54: 179–184.
- Marcato P.S., 1998. *Patologia suina*. Edagricole, Bologna, Italy.
- Mari R., 1997. Micotossine, un pericolo per l'allevamento. *Rivista di Avicoltura* 3: 22-23.
- Marin, D.E., Taranu, I., Bunaciu, R.P., Pascale, F., Tudor, D.S., Avram, N., Sarca, M., Cureu, I., Criste, R.D., Suta, V., and Oswald, I.P., 2002. Changes in performance, blood parameters, humoral and cellular immune responses in weanling piglets exposed to low doses of aflatoxin, *J. Anim. Sci.*, 80:1250-1257.

- Marquardt R., Frohlich A. 1992. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J. Anim. Sci.*, 70: 368-398.
- Micco, C., Brera, C., Miraglia, M., Onori, R.. 1987. HPLC determination of the total content of aflatoxins in naturally contaminated eggs in free and conjugate forms. *Food Addit. Contam.* 4: 407-414.
- Micco, C., Miraglia, M., Onori, R., Brera, C., Mantovani, A., Ioppolo, A., Stasolla, D. 1988a. Long-term administration of low doses of mycotoxins to poultry. 1. Residues of aflatoxin B1 and its metabolites in broilers and laying hens. *Food Addit. Contam.* 5(3): 303-308.
- Micco, C., Miraglia, M., Benelli, L., Onori, R., Ioppolo, A., Mantovani, A. 1988b. Long term administration of low doses of mycotoxins in poultry. 2. Residues of ochratoxin A and aflatoxins in broilers and laying hens after combined administration of ochratoxin A and aflatoxin B1. *Food Addit. Contam.* 5(3): 309-314.
- Minervini F., 2000. Detossificazione delle micotossine. *Rivista di Suinicoltura*, n. 7: 43-46.
- Ministero della Sanità, Circolare n.10 del 9 giugno 1999. - Direttive in materia di controllo ufficiale sui prodotti alimentari: valori massimi ammissibili di micotossine nelle derrate alimentari di origine nazionale, comunitaria e Paesi terzi. pubblicata sulla G.U. n. 135 del 11 giugno 1999).
- Ministero della Salute, Decreto 15 maggio 2006. Determinazione dei limiti di ocratossina A negli alimenti per animali. G.U. n. 121 del 26/05/2006
- Monetti, P.G. 1997. *Appunti di suinicoltura*. Cristiano Giralì Editore, Ozzano E. (Bo), Italy.
- Moss M. O. 1996. Mode of formation of ochratoxin A. *Food Addit. Contam.* 13: 5-9.
- Neal, G.E., 1998. Participation of animal biotransformation in mycotoxin toxicity. *Revue Méd. Vét.*, 149:555-560.

- Newman, K. 2000. The biochemistry behind esterified glucomannans - titrating mycotoxins out of the diet. In: *Biotechnology in the Feed Industry, Proceedings of Alltech's 16th Annual Symposium* (T. P. Lyons and K. A. Jacques, eds.). Nottingham University Press, UK, pp 369-382.
- Niemec, J., Borzemska, W., Golinski, P., Karpinska, E., Szeleszczuc, P., Celeda, T. 1994. The effect of ochratoxin A on egg quality, development of embryos and the level of toxin in eggs and tissue of hens and chicks. *J. Anim. Sci.* 4: 309-316.
- O'Callaghan, J., Stapleton, P.C., Dobson, A.D.W. 2006. Ochratoxin Abiosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. *Fungal Genet. Biol.* 43: 213-221.
- Oliveira, C.A.F., Kobashigawa, E., Reis, T.A., Mestieri, L., Albuquerque, R., Corrêa, B., 2000. Aflatoxin B1 residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin. *Food. Addit. Contam.* 17:459-462.
- Ominski, K.H., Marquardt, R.R., Sinha, R.N., Abramson D., 1994. Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi. In: J.D. Miller e H.L. Trenholm (eds.) *Mycotoxins in Grain, Compounds Other Than Aflatoxin*. Eagan Press, St. Paul, MN, USA. 287- 312.
- Osweiler G.D., 1999. Mycotoxins. In Straw B.E., D'Allaire S., Mengeling W. L., Taylor D. J., *Disease of Swine*, Blackwell Science, Oxford.
- Panagala V. S., Giambrone J. J. Diener U. L., Davis N. D., Hoer F. J., Mitra A., Shultz R. D., Wilt G. R., 1986. Effects of aflatoxin on growth, performance and immune responses of weanling swine. *Am. J. Vet. Res.* 47: 2062-2067.
- Peckham J.C., Doupnik B. Jr., Jones O.H. Jr., 1971. Acute toxicity of ochratoxins A and B in chicks. *Appl. Microbiol.* 21: 492-494.

- Petersen, C.F., Sauter, E.A., Steele, E.E., Parkinson, J.F. 1983. Use of methionine intake restriction to improve egg shell quality by control of egg weight. *Poult. Sci.* 62: 2044-2047.
- Pettigrew J.E., 2000. Bio-Mos effects on pig performance: a review. In Lyons T.P. and Jaques K. A.eds. *Proceedings of Alltech's XVI Annual Symposium*. Nottingham University Press, Nottingham, 241-253.
- Pietri A., 1998. Micotossine, la situazione odierna in Italia. *Rivista di Avicoltura*1/2: 32-38.
- Pietri, A., Bertuzzi, T., Gualla, A., Piva, G. 2006. Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscles and in pork products from Northern Italy. *Ital. J Food Sci.* 18(1): 99-106.
- Pietri, A., Bertuzzi, T., Pallaroni, L., Piva, G. 2004. Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in Northern Italy. *Food Add. Cont.* 21(5): 479-487.
- Piva G., Pietri A., Moschini M., 1996. Formation and carry-over of mycotoxins. In *Residues of Veterinary Drugs and Mycotoxins in Animal products:New Methods for Risk assessment and Quality control*. Proceedings of the First Electronic Mail Conference, organized by Istituto L. Spallanzani. Internet, 15 April- 31 August: 149-158.
- Piva G. e Pietri A., 1988. Fattori che possono interferire sul rendimento energetico degli alimenti. *Rivista di avicoltura* 1: 13-22.
- Pompa G., 1994. Aflatossine. In: C. Beretta ed. *Tossicologia Veterinaria*. Casa editrice Ambrosiana, Milano, Italy, 360-365.
- Porter J.K., Wray E.M., Rimando A.M., Stancel P.C., Bacon C.W., Voss K.A., 1996. Lactational passage of fusaric acid from the feed of nursing dams to the neonate rat and effect on pineal neurochemistry in the F1 and F2 generations at weaning. *J. Toxicol. Environ. Health.* 49:161-175. Cit. da Yiannikouris e Jouany, 2002.

- Prelusky, D.B., Rotter, B.A., Rotter, R.G., 1994. Toxicology of micotoxin. In: J.D. Miller and H.L. Trenholm (eds.) Mycotoxins in Grain, Compounds Other Than Aflatoxin. Eagan Press, St. Paul, MN, USA, 359-404.
- Prior M. G., Sisodia C.S. e O'Neil J.B. 1976. Acute oral ochratoxicosis in day-old white leghorns, turkeys and japanese quail. Poultry Sci., 55: 786-790.
- Raccomandazione 2006/576/CE della commissione del 17 Agosto 2006 sulla presenza di deossinivalenolo zearalenone, ocratossina A, tossine T-2 e HT-2 e fumonisine in prodotti destinati all'alimentazione degli animali. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L-229 del 23/08/2006.
- Regolamento 2006/1881/CE della Commissione del 19/12/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L-364 del 20/12/2006.
- Regolamento 1998/1525/CE della Commissione del 16 Luglio 1998 che modifica il Reg. 1997/194/CE che stabilisce tenori massimi ammissibili per alcuni contaminanti presenti nei prodotti alimentari. Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea L-201 del 17/07/1998.
- Rizzi L., Zaghini A., Paolucci D., Simioli M., Sardi L., 1999. Mannanoligosaccharides in diet for laying hens: effects on quality of eggs and efficacy to prevent aflatoxicosis B₁, In: L.G. Cavalchini e D. Baroli (eds.) Proceedings of VIII European Symposium on the quality of the eggs and eggs products. Tipografia Benedettina, Bologna, Italia, 2:213-218
- Rizzi, L., Lambertini, L., Marchesini, L., Gramenzi, A. 1995. Effetti dell'aflatossina B₁ e di alluminosilicati sulla digeribilità *in vivo* negli agnelli. Atti S.I.S. Vet., XLIX, Grafiche Scuderi, Messina, Italy, 839-840.
- Rizzi, L., Lambertini, L., Marchesini, L., Zaghini, A. 1996. Azione sequestrante di alluminosilicati sull'aflatossina B₁: effetti sui coefficienti di digeribilità apparente negli ovini. Atti S.I.S. Vet., L, Grafiche Scuderi, Messina, Italy, 591-592.

- Rizzi, L., Simioli, M., Altafini, A., Zaghini, A., 2003a. Egg quality and mycotoxin residues of laying hens on diet containing aflatoxin B₁ and esterified glucomannan. In: Proceedings of X European Symposium on the Quality of Egg and Egg Products. Ploufragan-Saint Brieuc, Francia. 1: 157-163.
- Rizzi, L., Simioli, M., Altafini, A., Zaghini, A., 2003c. Effect of an esterified glucomannan on laying hens exposed to combined mycotoxins (aflatoxin B₁, zearalenone and fumonisin). *Ital. J. Anim. Sci.* 2(1): 465-476
- Rizzi, L., Simioli, M., Roncada, P., and Zaghini, A., 2003. Aflatoxin B₁ and clinoptilolite in feed for laying hens: effects on egg quality, mycotoxin residues in livers and hepatic MFO activities. *J. Food Prot.* 66: 860-865.
- Rizzi, L., Simioli, M., Roncada, P., Zaghini, A., 2003b. Aflatoxin B₁ and clinoptilolite in feed for laying hens: effects on eggs quality, mycotoxin residues in livers and hepatic mixed-function oxygenase activities. *J. Food Prot.* 66:860-865. galline
- Rizzi, L., Zaghini, A., Altafini, A., Roncada P., Paganelli, R., Simioli, M. 2004. Mycotoxins in diets for laying hens: effects on egg quality and residues in egg and liver. Proceedings of XXII World's Poultry Congress, Istanbul, June 8-13, CD-Rom.
- Rizzi, L., Zaghini, A., Simioli, M., Martelli, G., 2001. Egg quality as affected by fumonisin and esterified glucomannan in laying hen feed. In: M. Antongiovanni (ed.) Recent Progress in Animal Production Science. Proceedings of the ASPA, XIV Congress. Casa Editrice Giraldi, Firenze, Italy, 2:439-441.
- Roth A., Chakor, K., Creppy E.E., Kane A., Rosenthaler R. e Dirheimer G. (1988): Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice. *Toxicology*, 48: 293-308.
- Rutqvist, L., Björklund, N.E., Hult, K., Hökby, E., Carlsson, B. 1978. Ochratoxin A as the cause of spontaneous nephropathy in fattening pigs. *Applied and Environmental Microbiology*, 36(6): 920-925.

- Sajan M. P., Satav J. G., Bhattacharya R. K., 1995. Activity of some respiratory enzymes and cytochrome contents in rat hepatic mitochondria following aflatoxin B1 administration. *Toxicology Letters* 80: 55-60.
- Sardi, L., Martelli, G., Parisini, P., Scipioni, R. 1998. Influenza del metodo di raccolta e di conservazione degli *excreta* sul bilancio azotato del suino. *Zoot. Nutr. Anim.* 24: 163-170.
- Schlatter C., Studer-Rohr J. e Rasonyi T.H. (1996): Carcinogenicity and kinetic aspects of ochratoxin A . *Food Addit. Contam.* 13: 43-44.
- Scholtyssek, S., Niemiec, J., Bauer, J. 1988. Ochratoxin A in Legehennenfutter. I. Einfluss auf Legeleistung und Eiqualityet. [Ochratoxin A in laying hen feed. I. Effects on laying performance and egg quality.] *Arch. Geflugelkd.* 51(6): 234-240.
- Scipioni,R., Martelli, G., Marchetti, S., Parisini, P., Piva, A. 1993. Nitrogen balance in pigs fed with different amounts of pressed beet pulp silage (PBPS). Nitrogen flowing in pig production and environmental consequence: Proceeding of the First international Symposium, Wageningen Doorwerth, The Netherlands, 195-199.
- Scott P.M. 1994 *Penicillium* and *Aspergillus* toxins.In: J.D. Miller e H.L. Trenholm (eds.) *Mycotoxins in Grain, Compounds Other Than Aflatoxin*. Eagan Press, St. Paul, MN, USA. 261- 285.
- Shafer, D.J., Carey, J.B., Prochaska, J.F. 1996. Effect of dietary methionine intake on egg component yield and composition. *Pout. Sci.* 75: 1080-1085.
- Silvotti L., Petterino C., Bonomi A., Cabassi E.,1997. Immunotoxicological effects on piglets of feeding sows diets containing aflatoxins.*The Veterinary Record*, n. 141: 469-472

- Smith J.E., Ross K. 1991. The toxigenic Aspergilli. In: J. E. Smith and R.S. Henderson (eds), *Mycotoxins and Animal Food*. CRC Press, Boca Raton, pp. 101-118. Cit. da Leeson *et al.*, 1995
- Stanley, V.G., Sefton, A.E., 1999. Egg and serum cholesterol as influenced by mannan oligosaccharide and aflatoxin. In: J.S. Sim, S. Nakai e W. Guenter (eds.) *Egg nutrition and biotechnology*. CABI Publishing, Wallingford, UK. 441-443.
- Stein A.F., Phillips T.D., KubenA L.F. e Harvey B.B. (1985): Renal secretion and reabsorption as factors in ochratoxicosis: effects of probenecid on nephrotoxicity. *J. Toxicol. Environ. Health*. 16: 593-605.
- Steyen P.S.,1998. The biosynthesis of mycotoxins. *Rev. Méd. Vét. N.* 149: 469-478. Cit. da Yiannikouris e Jouany, 2002.
- Stoev, S.D., Vitanov, S., Anguelov, G., Petkova-Bocharova, T., Creppy, E.E. 2001. Experimental mycotoxic nephropathy in pigs provoked by a diet containing ocratoxin A and penicillic acid.. *Vet. Res. Comm.* 25: 205-223.
- Stubblefield, R.D., Honstead, J.P., and Shotwell, O.L., 1991. An analytical survey of aflatoxins in tissues from swine grown in regions reporting 1998 aflatoxin-contaminated corn. *JAOAC*, 74:897-899.
- Sudhakar, B.V., 1990. Effect of aflatoxins on egg production and its quality. *Poult. Adv.* 23:43-46.
- Suzuki S., Satoh T., Yamazaki M. 1977 The pharmacokinetics of ochratoxin A in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 27: 735-744.
- Szczecz G.M., Carlton W.W., Hinsman E.J. 1974. Ochratoxicosis in beagle dogs. III. Terminal Renal Ultrastructural Alterations. *Vet. Path.* 11: 385-406.

- Szczech G.M., Carlton W.W., Tuite J. 1973. Ochratoxicosis in beagle dogs. II. Pathology. Vet. Path. 10: 219-231.
- Tapia M.O. e Seawright A.A. 1984. Experimental ochratoxicosis A in pigs. Aust. Vet. J. 61: 219-222.
- Theron J.J., Vander-Mercue K.J., Liebenberg N., Joubert H.J.B., Nel W. 1966. Acute liver injury in ducklings and rats as a result of ochratoxin poisoning. J. Pathol. Bacteriol. 91: 521-529.
- Tiecco G., 1992. Microbiologia degli alimenti di origine animale. Edagricole, Bologna, Italy.
- Trucksess, M.W., Stoloff, L., Young, K., Wyatt R.D., Miller B.L.. 1983. Aflatoxicol and aflatoxins B1 and M1 in eggs and tissues of laying hens consuming aflatoxin-contaminated feed. Poul. Sci. 62:2176–2182.
- Tucker T.L., Hamilton P.B. 1971. The effect of ochratoxin in broilers. Poultry Sci, 50: 1637.
- Tung, H.T., Donaldson, W.E., Hamilton, P.B., 1972. Altered lipid transport during aflatoxicosis. Toxicol. Appl. Pharmacol. 22:97-104.
- Visconti A. (1997): Problematiche connesse con la presenza di micotossine in alimenti e mangimi. Tec. Molit. pp. 1113-1122.
- Weinberg R.A., 1989. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular basis of multistep carcinogenesis. Cancer Res. 49: 3713-3721. Cit. da Leeson *et al.*, 1995.
- Westlake K., Mackie R.I., Dutton M.F. 1989 *In vitro* metabolism of mycotoxins by bacterial, protozoal and ovine ruminal fluid preparations. Anim. Feed Sci. Technol. 25: 169-178.
- Williams J.D., 1971. Cit. da Booth N.H. e Mc Donald R., 1991.
- Yiannikouris A., Jouany J.P. 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals:a review. Anim. Res. 51: 81-99.

Yiannikouris, A., Bertin, G., Jouany, P. 2005. Reducing mycotoxin impact: the science behind Mycosorb®. In: T.P. Lyons and K.A. Jacques eds. Nutritional biotechnology in the feed and food industries, Proceedings of Alltech's 21st Annual Symposium, Lexington, Kentucky, USA, 265-276.

Zaghini, A., Lambertini, L., 1995. Piante e funghi di interesse veterinario. Caratteristiche Botaniche ed Aspetti Farmacologici e Tossicologici. CLUEB, Bologna, Italia.

Zaghini, A., Martelli, G., Roncada, P., Simioli, M., Rizzi L. 2005. Mannanligosaccharides and aflatoxin B₁ in feed for laying hens: effects on egg quality, aflatoxins B₁ and M₁ residues in eggs, and aflatoxin B₁ levels in liver. *Poult. Sci.* 84: 825–832

Zaghini, A., Martelli, G., Roncada, P., Simioli, M., Rizzi, L., 2005. Mannanligosaccharides and aflatoxin B₁ in feed for laying hens: effects on egg quality, aflatoxin B₁ and M₁ residues in eggs, and aflatoxins B₁ levels in liver. *Poult. Sci.* 84: 825-832.