

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA



Dottorato di ricerca in

Produzione e sanità degli alimenti di origine animale

Indirizzo: Scienze dell'allevamento animale

XXI ciclo

## **Valutazione del rischio inquinamento da aflatossine negli alimenti ad uso zootecnico**

TUTOR:

**PROF. GIUSEPPE CAMPANILE**

CANDIDATO:

**dr. MARCO RENDINA**

COORDINATORE:

**PROF.<sup>SSA</sup> MARIA LUISA CORTESI**

Novembre 2008

## **Indice**

<b>1. Introduzione</b>	<b>4</b>
1.1 Alimentazione	6
<b>2. Micotossine</b>	<b>12</b>
2.1 Cenni storici	14
2.2 Aflatossine	19
2.2.1 Parametri di crescita	23
2.2.2 Aflatossine M	24
2.2.3 Carry over	25
2.2.4 Tossicocinetica	31
<b>3. Assorbimento</b>	<b>32</b>
3.1 Reazione di prima fase	34
3.2 Reazione di seconda fase	35
3.2.1 Effetti sull'organismo	36
<b>4. Resistenza degli animali d'interesse zootecnico alle aflatossine</b>	<b>38</b>
<b>5. Fonti e livelli di contaminazione</b>	<b>39</b>
<b>6. Prevenzione</b>	<b>42</b>
6.1 Tecniche agronomiche e di manipolazione	43
6.2 Tecniche d'ingegneria genetica	44
6.3 Trattamenti per la riduzione della contaminazione d'aflatossine	46
<b>7. Attività di Monitoraggio</b>	<b>48</b>
7.1 Monitoraggio internazionale	50
<b>8. Tossicità</b>	<b>51</b>
<b>9. Legislazione</b>	<b>56</b>
<b>10. Incidenza delle contaminazioni di latte e prodotti derivati</b>	<b>59</b>
<b>11. Scopo della tesi</b>	<b>60</b>
<b>12. Materiali e metodi</b>	<b>61</b>

12.1 Campionamento	65
12.2 Analisi del latte di massa bufalino	67
12.3 Analisi degli alimenti zootecnici	68
12.4 Standard	70
12.5 Analisi strumentale	70
12.6 Prelievi ematici	71
12.7 Analisi statistica	71
<b>13. Risultati</b>	<b>72</b>
13.1 Discussione	83
13.2 Conclusioni	87
<b>14. Bibliografia</b>	<b>90</b>

## 1. Introduzione

Nel settore alimentare ed in particolare in quello lattiero-caseario al termine qualità oggi si attribuisce un valore fondamentale. Il consumatore è molto più attento agli aspetti qualitativi di un prodotto, al punto che, proprio in questi ultimi anni, la richiesta di prodotti "biologici" è cresciuta in maniera esponenziale.

La qualità di una derrata alimentare va intesa sia come igienicità che come sanità del prodotto. La qualità igienica di un alimento è legata a particolari condizioni fisico-chimiche nella filiera produttiva che possono portare alla comparsa di fenomeni alterativi responsabili di modificazioni a carico delle caratteristiche organolettiche del prodotto. La qualità sanitaria, invece, si traduce nel controllo della contaminazione da parte di germi patogeni e/o tossine, o di residui di molecole farmacologiche che esitano in danni o fenomeni di tossinfezione per il consumatore.

Controllare la qualità dei prodotti negli ultimi anni è perciò diventata un'esigenza di tutti i settori, compreso quello zootecnico con particolare attenzione alla zootecnia da latte.

Basti pensare che il latte è un prodotto altamente deperibile a causa dei suoi costituenti principali: proteine, grassi, carboidrati (lattosio), sali minerali (in particolare il calcio), vitamine e acqua. Questo alimento completo rappresenta, infatti, un ottimo substrato colturale per la crescita di microrganismi indesiderati. Ancora, i formaggi e gli altri prodotti derivati del latte sono il risultato dello sforzo dell'uomo che da sempre ha cercato di conservare questa derrata il più a lungo possibile, sfruttando varie tecnologie (acidificazione, fermentazione, trattamenti termici, imballaggi). È tuttavia

sufficiente che il minimo dettaglio sfugga all'attenzione degli operatori della filiera produttiva o che si compiano interventi non corretti in fase di trasformazione, conservazione e distribuzione dei prodotti, per far sviluppare nel prodotto microrganismi indesiderati, provocandone l'immediato deterioramento e riducendo la "shelf life" (vita di scaffale).

Il settore alimentare, quindi, si trova oggi a dover affrontare due grandi sfide, quella rivolta alla necessità di offrire la massima garanzia di sicurezza e quella dettata dalla necessità di raggiungere elevati livelli di qualità e competitività.

A tal fine si stanno affermando tecniche utili alla valutazione, al controllo ed alla diminuzione del rischio nella fase di produzione degli alimenti.

L'analisi dei rischi e la programmazione di piani utili alla riduzione della contaminazione di natura chimica, fisica o microbica resta una strada da percorrere per una corretta produzione che non comprometta la salute del consumatore. È su quest'ottica che si basa la politica comunitaria a tutela della salute pubblica e ambientale.

## 1.1 Alimentazione

La qualità del latte dipende da fattori genetici che sono condizionati dall'ambiente e, particolarmente, dall'alimentazione e dallo stato di benessere animale inteso come benessere ambientale e igienico-sanitario.

Nella formulazione delle diete deve essere posta particolare attenzione oltre alle caratteristiche chimiche, a quelle igieniche degli alimenti. L'alimentazione, infatti, riveste un ruolo di primaria importanza nel garantire la sicurezza delle derrate alimentari e la qualità dei prodotti.

Gli alimenti che vengono somministrati agli animali si dividono in tre grosse categorie: foraggi, concentrati ed integratori. Per evitare contaminazioni di natura biotica e abiotica degli stessi risulta necessario che le modalità di preparazione, conservazione e somministrazione seguano precise indicazioni.

L'esigenza da parte degli organi di controllo di ridurre al minimo i rischi derivanti da errori nella preparazione degli alimenti che possono pregiudicare la sicurezza delle derrate, ha portato all'emanazione del decreto n° 123/99.

Questo decreto legislativo prevede il monitoraggio di tutto il processo di produzione dei mangimi utilizzati per l'alimentazione animale, in modo da assicurare una corretta alimentazione per il bestiame, specialmente per i monogastrici quali il maiale, il pollo ecc.; per i quali costituiscono l'unica fonte di alimento, e, solo attraverso il controllo di questi, si potranno ottenere derrate sane ed accettabili. Nei ruminanti, invece, a seconda della tipologia di allevamento e della specializzazione produttiva, dal 40% all'80% della sostanza secca ingerita è rappresentata da foraggi coltivati in azienda o acquistati. Risulta, pertanto, importante valutare la corretta esecuzione delle

modalità e delle tecniche di conservazione dei foraggi, che possono condizionare il loro utilizzo e l'igienicità della razione.

L'epoca dello sfalcio e le modalità di conservazione dei foraggi rappresentano, inoltre, dei momenti molto importanti per la determinazione della qualità igienica degli alimenti che si ripercuote sulla salubrità delle derrate alimentari di origine animale destinate all'alimentazione umana. La sanità degli alimenti da destinare al razionamento degli animali è uno dei principali requisiti richiesti per produrre derrate alimentari sane. Per sanità si intende l'assenza sia di contaminazioni batteriche che possono compromettere l'utilizzazione digestiva e alterare lo stato di salute degli animali, sia l'assenza di muffe e loro tossine, che possono passare come tali o sotto forma di metaboliti nelle derrate di origine animale e arrecare danni alla salute dell'uomo.

La presenza di muffe nei fieni, ad esempio, è normalmente legata ad una eccessiva umidità nella raccolta che ne facilita lo sviluppo. Queste ne riducono l'ingestione e creano problemi per lo stato di salute degli animali a causa della produzione di tossine. Risulta, pertanto, importante la programmazione dell'epoca dello sfalcio in funzione delle condizioni atmosferiche, in modo da permettere la raccolta, l'imballaggio del foraggio da affienare e la perdita di circa il 60% dell'umidità (sostanza secca nel prodotto pari a circa l'80%). L'elevata piovosità e/o l'improvviso modificarsi delle condizioni atmosferiche nei mesi in cui normalmente si affienano sono responsabili del dilavamento e dell'ammuffimento dei foraggi, fattori questi che riducono l'appetibilità della dieta e l'igienicità delle derrate alimentari di origine animale.

La produzione di un insilato con buone qualità chimiche ed igieniche dipende da fattori legati al foraggio, alle modalità di insilamento e di

stoccaggio. L'acidificazione della massa foraggera dipende in gran parte dalla quantità di carboidrati fermentescibili presenti nella pianta, in quanto essi rappresentano un pabulum indispensabile per i batteri lattici. Effetti negativi giocano, invece, le proteine se attaccate dai clostridi (fermentazioni indesiderate), con la formazione di ammoniaca che neutralizza gli acidi di fermentazione e ostacola i processi di acidificazione della massa insilata; in questo modo si compromette la conservazione e la successiva utilizzazione.

Si ritiene che un rapporto "zuccheri: proteine" di 1 sia ottimale; che un rapporto di 0,5 possa essere accettabile; che un rapporto di 0,25 sia invece intollerabile. Tale rapporto è di norma ben più elevato nel foraggio di graminacee rispetto a quello di leguminose: è per questo che il primo è più facilmente insilabile del secondo.

Un ruolo non trascurabile sull'esito dell'insilamento viene infine giocato dal potere tampone del foraggio.

Potere tampone viene definita la capacità di un mezzo di opporsi alle variazioni di pH; nel caso specifico si identifica con la resistenza del foraggio all'acidificazione. Sarà quindi tanto più facile conservare un foraggio quanto più basso è il suo potere tampone. Il valore del potere tampone dipende essenzialmente dal contenuto di sali organici (citrati, malati/succinati) e in secondo ordine dal tenore proteico. Esso risulta molto più elevato nella pianta giovane (quindi nei foraggi "immaturi") e tendenzialmente superiore nelle leguminose rispetto alle graminacee.

Il contenuto in sostanza secca delle foraggere da insilare risulta fondamentale nell'ottenimento di un buon insilato in quanto al diminuire dell'umidità delle piante aumentano la concentrazione degli zuccheri fermentescibili, dei soluti e quindi della pressione osmotica che gioca un

ruolo essenziale nell'inibire i clostridi e altri batteri responsabili delle fermentazioni anomale della massa insilata.

Le modalità di insilamento e la tipologia dei sili condizionano notevolmente la qualità dell'insilato e di conseguenza la quantità da utilizzare nell'alimentazione animale.

Com'è noto i processi fermentativi degli insilati constano di due fasi fondamentali, di cui una si esplica in presenza di ossigeno (fase aerobica-respirazione) e l'altra in perfetta anaerobiosi ed è legata allo stadio vegetativo della pianta e alle sue caratteristiche chimiche. Alla fase aerobica, cioè alla sua durata ed intensità, è legata l'entità delle perdite per i processi ossidativi che coinvolgono gli esosi e che portano a liberazione di acqua, anidride carbonica e calore.

Questa fase è in parte di natura endogena (respirazione cellulare) ed in parte esogena, espletata da lieviti, muffe e batteri aerobi legati al foraggio. Ciò comporta perdite di pabulum per batteri lattici e ritardi dell'acidificazione della massa insilata. Questa fase può prolungarsi anche nella massa già insilata per una cattiva compressione (presenza d'aria) durante le operazioni di insilamento o quando la chiusura del silo avviene dopo diversi giorni per elevate dimensioni del silos.

In sintesi il repentino abbassamento del pH risulta un fattore fondamentale nell'ottenimento di insilati di buona qualità, e nella riduzione delle perdite di sostanza organica. La repentina acidificazione della massa insilata dipende principalmente dalle ottimali condizioni che trovano i batteri lattici, che pur sviluppandosi in presenza di tracce di ossigeno, sono, comunque, anaerobi; essi attaccano prevalentemente gli zuccheri e formano acido lattico.

Le perdite di sostanza organica relative al processo fermentativo di questi batteri risultano molto basse (1-2%). Le capacità dei lattobacilli di iniziare le fermentazioni in presenza di piccole quantità di ossigeno e la produzione di acido lattico, che rappresenta il principale agente dell'abbassamento del pH, ostacolano la proliferazione e le fermentazioni dei clostridi e degli enterobatteri che inficiano la qualità dell'insilato.

I clostridi sono strettamente anaerobi e sporigeni. Essi possono essere saccarolitici o proteolitici. I clostridi saccarolitici fermentano gli esosi e gli acidi organici (acido lattico) e portano alla produzione di acido butirrico, anidride carbonica e idrogeno. Questo processo provoca una perdita di sostanza secca ed energia rispettivamente del 50% e del 18%.

L'attività fermentativa dei proteolitici è molto complessa; essa può limitarsi al processo di deaminazione degli aminoacidi con liberazione di ammoniaca (in questo caso si hanno perdite modeste), oppure può procedere sino alla decarbossilazione degli aminoacidi stessi con formazione di ammine tossiche (putrescina, cadaverina, ecc.) e di anidride carbonica (la presenza di quest'ultima sottintende una perdita di sostanza secca e di energia), oppure può risolversi in fenomeni ossido-riduttivi, con produzione di acidi grassi (acetico, butirrico, valerico, ecc.), ammoniaca e anidride carbonica.

Il metabolismo dei clostridi è sempre negativo: quello dei saccarolitici perché provoca delle perdite, quello dei proteolitici principalmente perché frena il processo di acidificazione della massa e perché può originare composti tossici per il bestiame.

L'attività degli enterobatteri è negativa ma piuttosto limitata. Essi riescono a sviluppare bene soltanto nelle fasi iniziali dell'insilamento (nelle prime 24 ore); successivamente vengono sopraffatti o dai batteri lattici, oppure dai clostridi.

I lieviti si distinguono in aerobi ed anaerobi facoltativi. Essi attaccano gli zuccheri durante la fase iniziale dell'insilamento e l'acido lattico presente nel fronte di taglio durante l'utilizzazione dell'insilato (fenomeni post-fermentativi).

L'attività di questi microrganismi è evidentemente negativa ma, di norma, con conseguenze di lieve portata.

Le muffe sono strettamente aerobiche e sono inibite dalla presenza di acidi, in particolare di quelli a lunga catena; esse possono svilupparsi soltanto negli strati esterni della massa insilata non fermentata (fasi iniziali dell'insilamento), oppure sulla parete di taglio se questa resta per molto tempo esposta all'aria e soggetta al dilavamento degli acidi di fermentazione. Sono in grado di attaccare molti metaboliti causando perdite anche consistenti di sostanza secca ed energia.

Alcune muffe (*Fusarium spp.*, *Aspergillus fumigatus*, *Byssochlamys nivea*), inoltre, producono tossine che possono arrecare gravi danni al bestiame.

## 2. Micotossine

Il termine micotossine trae origine dal greco, "*mykes*" che significa fungo e "*toxicon*" veleno. Queste tossine, sono metaboliti secondari dei funghi; che a loro volta poi, oltre ai comuni processi metabolici tipici degli eterotrofi, possiedono un metabolismo molto complesso che origina i metaboliti. Questi ultimi si formano durante la fine della fase di crescita esponenziale e non hanno un ruolo evidente nello sviluppo dell'organismo che li produce; vengono poi generati da specie anamorfe, ubiquitarie e ambientali, che generalmente vengono associate ad alcuni disturbi degli animali e dell'uomo. Le micotossine non sono correlate direttamente alla crescita del fungo, ma risultano essere piuttosto una sua risposta a determinati stimoli ambientali (Steyen, 1998). Esse sono prodotte, nel corso del processo di crescita della pianta, da funghi endofiti, mentre durante la conservazione degli alimenti, da funghi saprofiti (Hussein e Brasel, 2001). Il metabolismo primario è sostanzialmente uguale per tutte le specie fungine, viceversa quello secondario dipende dalla specie e talvolta dal ceppo fungino. Caratteristiche queste, che hanno generato la grande diversità di molecole prodotte, anche se per famiglie di prodotti simili (Piva et al., 2005). La forte stabilità delle micotossine, le rende persistenti anche dopo la scomparsa delle muffe che le hanno prodotte. Se ricerchiamo le unità formanti colonia, in un alimento, il dato riscontrato non darà un'indicazione della presenza di micotossine (ad es. il trattamento termico di pellettatura di un mangime, abbatte le unità formanti colonia, ma non distrugge le micotossine). La differente sensibilità di specie, dipende dalla diversa efficienza di bioattivazione. Nei ruminanti si è osservata una minore suscettibilità alle tossicosi rispetto ai monogastrici, grazie ad una maggiore efficacia dei sistemi di detossificazione GSH-

dipendenti e grazie alla flora ruminale, che secondo alcuni autori, riveste un ruolo importante nella demolizione delle tossine ingerite (Hussein e Brasel, 2001). Il ruminale è pertanto una barriera all'assorbimento delle sostanze tossiche grazie alla capacità di alcuni microrganismi, in modo particolare protozoi, di operare una detossificazione (Kiesling et al., 1984), meccanismo che contribuisce a tenere bassi i livelli plasmatici di tossine e derivati (Prelusky et al., 1990). Buona parte delle micotossine è priva di intrinseca attività tossica o mutagena, queste si manifestano quando la sostanza ingerita con l'alimento subisce una biotrasformazione, principalmente nel fegato e meno frequentemente in altri tessuti degli animali e dell'uomo. Questa trasformazione dà origine a metaboliti idrofili particolarmente reattivi. Una volta in sede cellulare, le micotossine interferiscono con i meccanismi di trasporto attivo delle sostanze attraverso le membrane cellulari, da quella citoplasmatica a quella mitocondriale, causando la disorganizzazione dei processi metabolici delle cellule dei tessuti bersaglio (fegato, rene, midollo osseo).

## 2.1 Cenni storici

Le micotossicosi verosimilmente già descritte nell'antico testamento (1200-1400 a.C.), sembrerebbero essere state una delle grandi piaghe d'Egitto; numerose narrazioni raccontano di casi di morte degli addetti alla raccolta dei cereali nei silos, dovuti presumibilmente ad inalazione di *Stachybotris*. Già in epoca romana la conoscenza delle specie fungine era tale da permettere la distinzione di alcune specie che potevano cagionare alcune micotossicosi. Lucrezio descrive per la prima volta i sintomi dell'ergotismo cronico (causato da *Claviceps purpurea*), chiamandoli "Ignis sacer", in seguito gli stessi sono stati ascritti da Farrer (1987), alla patologia del Fuoco di Sant'Antonio. Successivamente in epoca Medioevale sono state descritte epidemie dovute a consumo di cereali contaminati da *Claviceps purpurea*. Kilbourne M.M., professore di storia dell'Università del Maryland, ha indagato sulle relazioni esistenti fra grandi evenienze epidemiche in Europa, dal quattordicesimo al diciottesimo secolo, e il consumo alimentare di cereali contaminati. Studi che hanno evidenziato le dinamiche alla base della grave depressione demografica dell'epoca. Una corretta analisi epidemiologica si ebbe solo a seguito dell'intuizione che portò alla correlazione tra manifestazioni epidemiche e non convenzionali condizioni climatiche. La pandemia che colpì l'Europa intorno al 1350 è una tra le più importanti testimonianze dei gravi effetti prodotti dalle micotossicosi sull'uomo e sugli animali. Successivamente all'inizio del 1600 alcuni medici francesi consigliavano alle donne in periodo di allattamento di non consumare pane di segale al fine di evitare il pericolo di spasmi per i neonati. Il rischio di ergotismo (intossicazione caratterizzata da necrosi degli arti dovuta ad ingestione di graminacee contaminate da *Claviceps purpurea*, parassita che forma sclerozi,

corpi fruttiferi del fungo stesso, simili a clavette che contengono alcaloidi velenosi del gruppo delle ergotine), in Europa, si ridusse drasticamente grazie alla progressiva sostituzione della segale con il frumento, al miglioramento dei sistemi di molitura e alle nuove tecniche di setacciamento della granella. Verso la metà del diciassettesimo secolo autorevoli medici inglesi resero nota la relazione fra dieta a base di segale e disturbi nervosi derivanti. Dimostrarono inoltre che il calo di fertilità ad andamento variabile che aveva colpito il popolo inglese in quegli anni seguiva la tendenza delle oscillazioni dei prezzi di mercato di segale e frumento, infatti la fertilità diminuiva all'accrescersi del prezzo del frumento ed all'aumentare dei consumi di segale. Uno dei primi casi di micotossicosi di uomini ed animali, si è verificato nel 1722, quando all'esercito russo guidato da Pietro il Grande, raccolto sul delta del fiume Volga ad Astrakan, venne data farina di segale per i soldati e cereali e fieno per i cavalli, contaminati da micotossine. In un breve periodo, successivo al consumo, gli uomini ed i loro cavalli vennero colpiti, da prima da un ardente prurito e dopo da paralisi. Migliaia di uomini morirono prima di poter combattere con l'esercito turco. Gli effetti tossici delle aflatossine, sono stati descritti per la prima volta già nel 1913, anche se non si riuscì ad isolarle. La scoperta degli effetti tossici di alcune muffe spiegò anche le morti improvvise di alcuni archeologi egizi, valga per tutte nel 1922, quella di Lord Carnavon, stroncato da una broncopolmonite fulminante; in conseguenza di una massiccia contaminazione delle vie respiratorie. Altri fenomeni di intossicazione da micotossine si ebbero in Russia tra il 1942 e il 1947, infatti ci furono in alcuni villaggi rurali, numerosi casi di leucopenia tossica alimentare dell'uomo, (più volte segnalata in Europa centrale, è una micotossicosi con sintomatologia progressiva: nausea, vomito, emorragie gastrointestinali, laringiti e faringiti necrotiche, infezioni sistemiche) ad

elevato tasso di mortalità, (80 % dei casi)), “Alimentary Toxic Aleukia (ATA)”, conseguenti l’ingestione di frumento e miglio contaminati da *Fusarium sporotrichoides* e da *Fusarium poae*. Altri esempi meglio documentati di micotossicosi umana, sono quelli del distretto di Oremberg dove fu descritta l’insorgenza di numerosi casi di tossicosi alimentare e quelli delle improvvise morti in tutta l’Unione Sovietica di alcuni addetti allo stoccaggio delle granaglie nei sili; morti ricondotte successivamente all’inalazione di muffe molto tossiche di origine naturale, presenti nelle vie aeree dei soggetti deceduti. Nel 1951 in Francia meridionale, più precisamente a Pont Saint-Esperit, un grave episodio epidemico coinvolse numerosissime persone. L’inizio della moderna tossicologia è databile al 1960, anno in cui venne dato grosso impulso alla ricerca delle micotossine, in conseguenza di un emergenza sanitaria che coinvolse centomila tacchini, colpiti da acuta necrosi al fegato e da iperplasia del dotto biliare. Le aflatossine prodotte dall’*Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* e la loro presenza venne correlata alla “malattia X del tacchino” (Sargeant et al., 1961; Asplin e Carnaghan, 1961), la causa venne poi imputata all’utilizzo di farine di noci brasiliane ed arachidi contaminate da aflatossina B<sub>1</sub>, che in brevissimo tempo produssero danni epatici e successiva morte dei soggetti colpiti (Krog, 1987; Tiecco, 2001); quest’evento venne poi riscontrato anche in giovani fagiani. Nel 1963, successivi studi, (Asao et al.; van Dorp et al. e van der Zijden), hanno portato all’identificazione, all’isolamento e alla caratterizzazione della chimica e della natura fisica delle aflatossine, si scoprì inoltre che tali sostanze potevano essere separate cromatograficamente in quattro diverse componenti (Nesbitt et al. 1962, Hartley et al. 1963), alle quali venne dato il nome di aflatossine, le stesse furono poi distinte in B<sub>1</sub> (C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), B<sub>2</sub> (C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>), G<sub>1</sub> (C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>) e G<sub>2</sub> (C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>), a seconda del colore della fluorescenza emessa (*blue o green*) in

relazione all'irradiazione con luce ultravioletta a 360 nm e alla loro mobilità cromatografia (O' Neil et al., 2001). Successivamente alla scoperta delle aflatossine Allcroft e Carnaghan (1963), ipotizzarono che alcuni residui di aflatossina ingeriti dagli animali con la razione, potessero ritrovarsi nel latte o in altri derivati. In vacche da latte alimentate con prodotti contaminati da aflatossina B<sub>1</sub>, venne ritrovata una sostanza tossica, che in esperimenti condotti sulle anatre risultò nociva quanto l'aflatossina B<sub>1</sub>, e che risultò legata anche alle frazioni caseiniche della cagliata. Tale sostanza rivelò una fluorescenza blu-viola simile a quella precedentemente osservata per l'aflatossina B<sub>1</sub>, ma in questo caso dato il primitivo isolamento dal latte gli venne attribuito il nome di aflatossina M o "*milk toxin*" la cui struttura chimica era C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>. L'aflatossina M<sub>1</sub> è stata quindi il primo metabolita idrossilato della B<sub>1</sub> ad essere isolato e identificato (Holzapfel et al., 1966). Campbell et al., (1970), nel cercare di chiarire l'eziologia del cancro al fegato nell'uomo, prodotto dall'aflatossina B<sub>1</sub>, scoprirono per la prima volta, la presenza dell'aflatossina M<sub>1</sub> nelle urine. Successivamente, Patterson et al., (1978), hanno isolato a partire dalle urine e dal latte le aflatossine M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub> (C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>), identificandole come metaboliti della B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> dei mammiferi. Successivi studi sulle strutture dell'aflatossine rivelarono che l'aflatossina M<sub>2</sub>, emetteva una fluorescenza viola (van Egmond 1989). Queste sono state successivamente inserite e classificate (1993), dall'International Agency for Research on Cancer (IARC), nel gruppo 2 come probabili agenti cancerogeni per l'uomo. Infine gli effetti tossici delle aflatossine sono stati valutati al fine di un possibile utilizzo come arma biologica nei programmi della guerra del Golfo, (Zilinskas, 1997; comitato consultivo presidenziale malattie dei veterani). Betina (1984) ha identificato oltre 300 micotossine; il 7% delle quali è riscontrabile negli alimenti a livelli in grado di costituire un pericolo per la

salute. I primi casi in Italia di micotossicosi animale risalgono ai primi anni settanta, quando, in Romagna alcuni allevamenti di tacchini segnalavano consistenti perdite dovute a lesioni epatiche riconducibili ad ingestione di tossine e in tutta l'Italia settentrionale in allevamenti di vitelloni vennero riscontrati casi di necrosi caudale.

## 2.2 Aflatossine

Come precedentemente evidenziato per le micotossine anche le aflatossine sono metaboliti secondari prodotti da alcuni miceti come l'*Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. L'*Aspergillus flavus*, rappresenta la forma conidiofora (imperfetta) di un ascomicete la cui forma perfetta è caratterizzata dalla produzione di un asco, mentre nella forma imperfetta produce spore agame dette conidi. Le muffe appartenenti all'*Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* (molto raro nel mais, secondo Pitt, 1993, 1994), sono estremamente diffuse nell'ambiente ed hanno la capacità di insediarsi, grazie alle micro-fessure operate da insetti e parassiti nei tessuti vegetali, e nel proseguo del loro accrescimento, di produrre micotossine e numerose spore fungine che per diffusione anemofila raggiungono altre piante. Sostanze nutritive specifiche, come i minerali, in modo particolare lo zinco, le vitamine, gli acidi grassi, gli aminoacidi e le fonti di energia come l'amido, sono richiesti per la formazione di aflatossine (Wyatt, 1991). L'alta concentrazione di carboidrati come nel caso del grano e del riso ed in misura minore per i semi oleosi come cotone, arachidi ect., favoriscono la sintesi dell'aflatossine (Davis e Diener, 1968). L'aspetto pulverulento delle muffe è dovuto ad una fitta rete di ife (filamenti) e di sporangi (contenitori di spore), che invadono l'ospite infiltrandosi in modo capillare. Alcune specie di Aspergilli sono dannose per uomo ed animali, mentre altre possono essere impiegate per fini utilitaristici, come per l'*Aspergillus nidulans* adoperato negli ultimi cinquanta anni per svelare molti processi cellulari fondamentali, l'*Aspergillus oryzae*, capace di fermentare lo zucchero nel processo di produzione del sakè ed utilizzabile anche per la produzione del miso (pasta di soia) e delshoyu (salsa di soia) e l'*Aspergillus wentii*, anch'esso utilizzato per la preparazione della salsa di soia. Dalle

colture di *Aspergillus flavus* e *A. fumigatus* (uno dei principali costituenti del compost, identificato per la prima volta nel 1848), si possono ricavare antibiotici come: la flavicidina, la flavicina e la fumagatina. Un gruppo di ricercatori internazionali, (Galagan et al., 2005; Machida et al., 2005; Nierman et al., 2005), guidato dall'Università di Manchester, ha decifrato il codice genetico dell'*Aspergillus nidulans*, dell'*A. fumigatus*, dell'*A. orizae*, svelando che gli stessi condividono solo il 68% circa delle proteine. Successivamente i tre funghi sono stati distinti per dimensione di genoma: quello dell'*A. orizae* è risultato più grande di quello dell'*A. fumigatus* del 31%, mentre rispetto a quello dell'*A. nidulans* è risultato più grande solo del 24%. Oltre il 30% dei 14500 geni identificati dal gruppo internazionale, è risultato completamente sconosciuto per funzione e struttura. Recentemente anche la specie *Aspergillus ochraceoroseus*, descritta da Bartoli e Maggi (1978), è stata inserita tra quelle produttrici d'aflatossina. In Giappone, poi, sono stati isolati l'*Aspergillus tamaris* e l'*Aspergillus pseudo tamaris*, (Goto et al., 1996), mentre in Australia Geiser et al., (1998), effettuando studi sulla genetica di popolazione dell'*Aspergillus flavus*, hanno dimostrato l'esistenza di due distinti sottogruppi. In un prossimo futuro probabilmente il gruppo II, potrà essere descritto come *Aspergillus australis*. Bottalico (1988), riporta poi che, su 3460 ceppi di *A. flavus* isolati da alimenti contaminati, solo il 74% è in grado di produrre aflatossine. Quando le fonti inquinanti sono l'*Aspergillus flavus* e *parasiticus*, funghi saprofiti che possono svilupparsi in campo, così come in magazzino (Steinhart, 1996), la contaminazione prodotta può ricondursi a quattro aflatossine, esiste però anche una possibilità remota di inquinamento da *Aspergillus nomius*. L'*Aspergillus flavus* (maggiormente ubiquitario), produce le aflatossine (B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>) e talvolta la micotossina (acido ciclopiazonico), mentre l'*Aspergillus parasiticus* (più frequente nei climi subtropicali e tropicali

ha elevata affinità di crescita in frutta e semi oleosi), produce le aflatossine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (Schroeder & Boller, 1973; Dorner et al., 1984; Lillehoj, 1986; Diener et al., 1987; Klich & Pitt, 1988; Pitt, 1993; D'Mello & MacDonald 1997). L'*Aspergillus nomius* è poi, strettamente legato all'*A. flavus*, anche se differisce da quest'ultimo per la più piccola forma degli sclerozi. La specie *A. nomius*, si distingue inoltre dall'*A. flavus*, per la possibilità di poter produrre aflatossine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (Saito et al., 1989; Pitt, 1993). Inoltre è stata recentemente descritta una nuova specie legata all'*Aspergillus nomius*, il cui nome è *Aspergillus bombycis*, (Peterson et al., 2001). Queste due specie sono state distinte per differenze nel DNA e per temperatura d'accrescimento. Così come per l'*Aspergillus nomius*, anche l'*Aspergillus bombycis*, può produrre le aflatossine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>. L' *Aspergillus tamarii*, isolato in Giappone da Goto et al., (1996), produce le aflatossine B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e l'acido ciclopiazonico. Infine Geiser et al., (1998), evidenziano l'unicità dell'*Aspergillus australis*, non solo produttore dell'aflatossine (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>), ma anche dell'acido ciclopiazonico. La sua presenza sembra essere confinata nell'emisfero sud, è stata infatti ad oggi verificata, in Argentina, in Australia, in Indonesia e in Sud Africa. L'enorme mole di dati internazionali indicano l'*Aspergillus flavus* e l'*Aspergillus parasiticus*, come i maggiori responsabili, della percentuale d'aflatossine presente negli alimenti di tutto il mondo. Alla stregua di questi anche l'*Aspergillus australis* può considerarsi un grande serbatoio di aflatossine per il sud del mondo. Queste aflatossine oltre ad essere distinte chimicamente, derivano nel caso della B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, da curarine policicliche insature, rispettivamente metossi-disolfuro-cumarone e metossi-disolfuro-cumaro-lattone, mentre loro diidroderivate sono la G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, le aflatossine hanno quindi un nucleo cumarinico fuso, da una parte, con un sistema bifuranico altamente reattivo e dall'altra con un pentanone (B) o un lattone a

sei termini (G), queste producono una vasta gamma di effetti biologici dovuti alla loro capacità di colpire organi e sistemi bersaglio (Hsieh, 1987). Tale logica ha portato ad una loro classificazione in immunotossine, dermatossine, epatotossine, nefrotossine, neurotossine e sulla scorta del loro effetto cronico ad un'ulteriore distinzione tra mutagene, cancerogene e teratogene (Krogh, 1974). Le aflatossine possono dirsi inoltre, contaminanti ambientali e agenti cancerogeni ad elevata stabilità (resistenti anche alla degradazione derivante dai trattamenti termici), con la peculiare caratteristica dell'essere inodori, insapori e incolori. Inoltre sono moderatamente solubili in acqua (10-30 µg/ml), in solventi organici polari (cloroformio e metanolo) e soprattutto in dimetilsolfossido, viceversa risultano insolubili in solventi non polari, (Cole & Cox, 1981).

### 2.2.1 Parametri di crescita

Condizioni ottimali di crescita per questi funghi sono temperature di circa 25°C (anche se possono accrescersi a temperature comprese tra 6 e 46°C) e umidità relativa ambientale pari o superiore all'85%, caratteristiche che in parte spiegano il maggior numero di casi rilevabili di aflatossine nelle derrate provenienti da paesi a clima tropicale. Northolt e van Egmond (1981) hanno indicato come parametri di crescita per l'*Aspergillus flavus*, un range di temperatura pari a 19°-35°C, mentre Scott et al., (1970), Sanchis e Magan (2004) hanno indicato, invece, per l'aflatossina B<sub>1</sub> una temperatura di 28°C. Le condizioni termiche possono dirsi comunque molto variabili e più in generale specie specifiche. Nel caso dell'*Aspergillus flavus*, la produzione di aflatossine avviene preferibilmente intorno ai 25°C e comunque in letteratura non vi è notizia di casi di tossinogenesi a temperature inferiori a 10°C. Nel caso di formaggi e latte in polvere umidificato, la presenza di aflatossine prodotte dall'*Aspergillus parasiticus* è stata osservata con condizioni di temperature simili a quelle riportate in precedenza. L'impatto della disponibilità d'acqua ( $a_w$ ), sulla crescita e la produzione delle micotossine è notevole. È stata ribadita più volte la necessità di una disponibilità d'acqua per i ceppi pari a 0.73  $a_w$  e per le micotossine pari a 0.85  $a_w$ . Sulla scorta delle conoscenze attuali è possibile affermare che 15°C e 0.83  $a_w$  sono condizioni limite per la crescita e la produzione di aflatossine da ceppi di *Aspergillus flavus*. Risulta per tanto intuibile la necessità di stratificare più livelli di informazioni al fine di correlare i rischi potenziali d'esposizione alle contaminazioni con le informazioni climatiche provenienti dalle singole regioni.

## 2.2.2 Aflatossine M

L'aflatossina M<sub>1</sub> può dirsi tossica al 100% parimenti all'aflatossina B<sub>1</sub>, cancerogena al 33% e mutagena al 3,3 %, rispetto all'aflatossina B<sub>1</sub> (Ewaidah, 1987). Secondo altre fonti letterarie l'aflatossina M<sub>1</sub> presenta sì la stessa tossicità dell'aflatossina B<sub>1</sub>, ma ha cancerogenicità in vivo inferiore (2-10%). Inoltre, a seguito di attivazione metabolica in vitro, l'aflatossina M<sub>1</sub> ha solo il 10% della mutagenicità dell'aflatossina B<sub>1</sub> (Wogan e Paglialunga, 1974). Circa lo 0,3-6,2% delle aflatossina B<sub>1</sub> contenute nelle razioni per animali è trasformata in M<sub>1</sub> nel latte. La contaminazione del latte può essere correlabile al tipo di alimento somministrato nella razione, nel senso che la concentrazione finale di M<sub>1</sub> è maggiore quando aumenta la sostanza secca ingerita e le quantità di insilato di mais e di cotone presenti, viceversa risulta più bassa in razioni con più soia e fieno. Secondo Rodricks & Stoloff (1976) e Stubblefield et al., (1983), vacche alimentate con mangimi contaminati da aflatossina B<sub>1</sub>, hanno presentato notevoli livelli di aflatossina M<sub>1</sub>, in tessuti muscolari ed organi, in particolare: nel cervello, nella cistifellea, nel cuore, nell'intestino, nei reni, nel fegato, nei polmoni, nella ghiandola mammaria, nella milza e nella lingua, con livelli massimi rilevati, per i reni, per la ghiandola mammaria e per il fegato, rispettivamente di 57,9, 25,1 e 13,2 µg L<sup>-1</sup>.

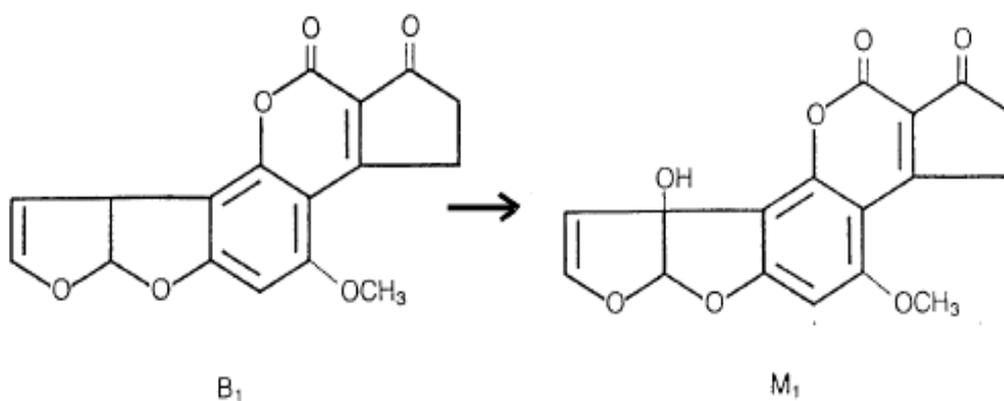
### 2.2.3 Carry over

In genere quando si parla di carry over delle micotossine si intende il rapporto fra la quantità di micotossina escreta e quella ingerita dall'animale, esprimendo entrambi in  $\mu\text{g}/\text{die}$ .

Se gli alimenti ingeriti risultano contaminati da aflatossina  $B_1$ , la stessa viene trasformata dal fegato in metaboliti polari generalmente meno tossici, eliminati attraverso le urine, la bile ed il latte.

La popolazione può essere quindi indirettamente esposta alle aflatossine per il consumo di latte. In questo alimento viene riscontrata l'aflatoossina  $M_1$  che è stato il primo metabolita della  $B_1$  ad essere identificato.

L'aflatoossina  $B_1$  subisce un'idrossilazione del legame furofurano costituendo l'aflatoossina  $M_1$ .



Il carry over dell' aflatoossina  $M_1$  nel latte raggiunge valori variabili dall'1 al 3%. Esiste tuttavia un'elevata variabilità individuale e di razze, anche se non sono presenti in letteratura dati conclusivi su questi aspetti.

L'elevata variabilità è dovuta:

- Entità del metabolismo;
- Specie animale;
- Razza;
- Fattori individuali, quali ad esempio le infezioni mammarie che aumentano il carry over in quanto gli animali affetti da mastite presentano un'aumentata permeabilità degli alveoli che consentono un maggior passaggio di  $M_1$  nel latte;
- Livello produttivo. Da diversi esperimenti, infatti, è emerso che a parità di quantità di micotossina ingerita, il tasso di trasferimento complessivo della  $B_1$  negli alimenti a  $M_1$  nel latte è più elevato a inizio lattazione rispetto ad una fase avanzata ed è linearmente correlato con il livello produttivo.

Nonostante l'elevata variabilità individuale, per stimare il trasferimento di  $M_1$  in un'intera mandria viene utilizzata l'equazione proposta da Vendelman ed alt. (1992):

$$\text{AFM1 (ng/kg latte)} = 1,9 \times \text{AFB1}(\mu\text{g/capo/die}) + 1,9$$

Da questa equazione si può dedurre che l'ingestione media di AFB1 deve essere inferiore a 40  $\mu\text{g/capo/die}$  se si vuole produrre latte con una concentrazione di AFM1 inferiore a 50 ng/kg, livello massimo ammesso dalla vigente legislazione Ue recepita anche dall'Italia.

L'aflatossina M<sub>1</sub> si trova legata alla frazione proteica del latte in cui inizia a comparire circa 12 ore dall'inizio della somministrazione di un alimento contaminato (anche se occorrono 2-3 giorni di somministrazione continua perché il livello di M<sub>1</sub> si stabilizzi). Invece, con il passaggio ad una dieta non contaminata si garantisce, già a partire dalla prima mungitura successiva, una riduzione dei livelli di M<sub>1</sub> e il raggiungimento di valori vicini allo 0 in 3-5 giorni.

Il valore di aflatossina M<sub>1</sub> è in rapporto diretto con la concentrazione di aflatossina B<sub>1</sub> dei mangimi consumati dagli animali (Dragacci, Gleizes, Fremi e Candlish, 1995). Nella vacca, il passaggio da aflatossina B<sub>1</sub> ad M<sub>1</sub> può variare dallo 0,13% al 3%, fino a raggiungere, in certi casi, punte massime del 6%; mentre la molecola originaria risulta non riscontrabile. Una regola empirica vuole che la concentrazione di aflatossine nel latte sia circa l'1,7 % della concentrazione di aflatossine nella razione totale di sostanza secca. Inoltre, è stato dimostrato che l'aflatossina M nel latte vaccino è associata alla caseina e rimane con il latte quando è precipitata con rennina. Quindi poiché l'aflatossina M<sub>1</sub> è legata alle proteine del latte, la sua concentrazione è maggiore (raddoppia), in cagliata, rispetto al latte.

Il rapporto tra concentrazione di aflatossina B<sub>1</sub> assunta con la razione finale (razionamento e/o unifeed) e aflatossina M<sub>1</sub> escreta nel latte, nelle bovina da latte, può raggiungere in taluni casi, l'ordine di 300:1, questo valore è però talvolta approssimativo poiché il range del rapporto varia notevolmente, da 34:1 a 1600:1, in funzione della razza; in vacche da latte Holstein alimentate con razioni contenenti concentrazioni di aflatossina B<sub>1</sub> di 80, 86, 470, 557 1493 e 1089 µg/kg di sostanza secca, sono state riscontrate concentrazioni di aflatossina M<sub>1</sub> non sempre crescenti (1,5; 0,245; 13,7; 4,7;

12,4; 20,2 µg/L di latte), mentre in vacche Brindle con razioni contaminate da 540 ppb di aflatossina B<sub>1</sub> l'inquinamento del latte da aflatossina M<sub>1</sub> è stato di 0,92 ppb; più in generale in altre razze alimentate con razioni contaminate con valori di aflatossina B<sub>1</sub>, oscillanti tra 64 e 1799 ppb, si è riscontrato un inquinamento da aflatossina M<sub>1</sub> del latte tra 0,35 e 14,2 ppb (Rodricks & Stoloff, 1977; Gimeno & Martins, 2000). Secondo Edds, (1979), un apporto di aflatossina B<sub>1</sub> di 2-60 mg/vacca/die, produce un inquinamento da aflatossina M<sub>1</sub> del latte da 1 a 50 ppb. L'escrezione mammaria di aflatossina M<sub>1</sub>, compare dopo 12 h dalla somministrazione dell'alimento contaminato e scompare dopo 24 h dalla sua eliminazione dalla dieta. L'effetto tossico è dovuto quindi al legame tossina-acidi nucleici, tossina-nucleoproteine.

Esiste però una elevata variabilità, individuale e consequenziale allo stadio di lattazione, difatti all'inizio della lattazione il valore sarà direttamente proporzionale al livello produttivo. Solitamente nelle prime fasi della lattazione il carry over è maggiore di 3,3-3,5 volte rispetto ai valori riscontrabili nelle fasi avanzate della lattazione. La dimostrazione del carry over dell'aflatossina M<sub>1</sub> è stata effettuata per diverse specie di mammiferi usati comunemente per la produzione di latte (capre, pecore, vacche, bufale). In uno studio condotto nella zona occidentale della Sicilia, sul contenuto in aflatossina B<sub>1</sub> ed M<sub>1</sub> in 15 campioni di mangime e 40 campioni di latte di pecora, prelevati nel periodo novembre 2001 - giugno 2002, in 11 aziende agricole di varie dimensioni e consistenze, Finoli e Vecchio (2003) hanno osservato presenza da aflatossina M<sub>1</sub> nel 30 % dei campioni di latte con concentrazioni comprese fra 4 e 23 ng/l e nel 13 % dei campioni di formaggio con concentrazione compresa fra 21 e 101 ng/kg. L'aflatossina B<sub>1</sub> è oscillata fra < 10 e 769 ng/kg nei mangimi. In generale i livelli rilevati nei campioni positivi di latte e mangimi non hanno superato i limiti stabiliti dall'Unione

Europea (50 ng/l e 5 µg/kg), mentre quelli nei formaggi rientrano nei limiti fissati dalla legislazione olandese (200 ng/kg). Wood (1991) e Smith et al., (1994) hanno riscontrato, alimentando per fini sperimentali alcune capre con 100 µg di aflatossina B<sub>1</sub> kg<sup>-1</sup>, livelli di 0,053 µg di aflatossina M<sub>1</sub> kg<sup>-1</sup> nel latte, con un carry over medio dello 0,55%. Rao e Chopra (2001), alimentando alcune capre con la stessa concentrazione, 100 µg di aflatossina B<sub>1</sub> kg<sup>-1</sup>, hanno riscontrato un notevole aumento della concentrazione dell'aflatoxina M<sub>1</sub> nel latte all'aumentare del tempo di esposizione degli animali alle diete contaminate. La specie sembra condizionare la permeabilità passiva dal sangue alle cellule alveolari della ghiandola mammaria. La maggiore permeabilità degli alveoli durante le infezioni (mastiti), può essere alla base dell'incremento del carry over, che risulterà direttamente proporzionale al numero di cellule somatiche. Negli ovini il rapporto tra aflatoxine B<sub>1</sub> ingerite e aflatoxine M<sub>1</sub> escrete nel latte è secondo alcuni autori basso (Battacone et al., 2003), diversamente da ciò che riportano Veldman et al. (1992), per i bovini. Un studio condotto da Battacone et al., (2002), su pecore con bassa produzione (lattiero-casearia), ha riscontrato che la quantità di aflatoxine B<sub>1</sub> ingerite incrementa la concentrazione dell'aflatoxina M<sub>1</sub> nel latte e nella cagliata. Nell'indagine di Battacone et al. (2005), le concentrazioni di aflatoxina M<sub>1</sub> nel latte raggiungono la condizione di steadystate (o plateau), due, sette giorni dopo l'inizio del trattamento, viceversa in un precedente studio, (Battacone et al., 2003), segnalavano a parità di concentrazione, la condizione di steadystate, nove giorni dopo l'inizio del trattamento e/o 216 h dopo. La diversa cinetica dell'aflatoxina M<sub>1</sub>, nel latte potrebbe essere spiegata dalle diverse razioni utilizzate per gli esperimenti. La dieta del primo esperimento conteneva più fibra e quindi consentiva un inferiore transito di digestione e conseguentemente una maggiore decontaminazione

da parte dei microrganismi ruminanti (Westlake et al., 1989). Frobish (1986), effettua una valutazione del tasso di trasferimento delle aflatossine dall'alimento ( $B_1$ ) al latte ( $M_1$ ), dichiarandolo di 55:1. Generalmente per le vacche, l'1% circa dell'aflatossina  $B_1$  contenuta negli alimenti, si ritrova nel latte sottoforma di aflatossina  $M_1$ . La quantità di aflatossina  $M_1$  escreta nel latte è pari a valori tra l'1% e il 3% dell'aflatossina  $B_1$  ingerita (Masri et al., 1969; Polan et al., 1974), altri valori sono stati segnalati nel tempo da altri autori. La presenza di aflatossina  $B_1$  è invece stata segnalata nel latte, di bufala, di mammiferi non ruminanti e di donna. Ahmad et al., (1996), hanno condotto un'indagine in Pakistan, più precisamente nella città di Caraci, in cui è presente un patrimonio bufalino di circa 200.000 capi, sul carry-over delle aflatossine del latte e dei prodotti lattiero caseari, finalizzata al loro controllo. Lo studio è durato oltre dieci anni, nel corso dei quali il 21% di 441 campioni di latte raccolti è risultato positivo all'aflatossina  $M_1$ , con valori da 0,03 a 0,98  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

## 2.2.4 Tossicocinetica

Conseguenzialmente all'assunzione di aflatossina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, ed attraverso processi metabolici e opportune condizioni, si originano, diversi metaboliti come l'aflatossina M<sub>1</sub>, l'aflatossina M<sub>2</sub>, (secrete per via biliare, urinaria e mammaria), l'aflatossicolo, l'aflatossina B<sub>2a</sub>, l'aflatossina P<sub>1</sub> e l'aflatossina Q<sub>1</sub>, escreti per via biliare (in forma di aflatossina B<sub>1</sub>-glutazione), per via urinaria (come aflatossina M<sub>1</sub> e aflatossina B<sub>1</sub>-N<sub>7</sub>-guanina), (Concon, 1988; Pittet, 1998). Queste trasformazioni, comprendono reazioni di prima e di seconda fase; processi illustrati in corso di trattazione. Le forme "milk toxins" M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives, 1998) e M<sub>4</sub>, ANZFA, (Australia New Zealand Food Authority, 2006), possono dirsi, rispettivamente sottoprodotti del metabolismo epatico di detossificazione dell'aflatossina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e B<sub>4</sub> ottenute mediante una reazione di idrossilazione che conduce alla formazione di molecole più polari e meglio trasportabili attraverso il circolo sanguigno.

### 3. Assorbimento

Le aflatossine ingerite dai ruminanti con la razione arrivano al rumine dove avviene una bioconversione, solo il 2-5 % di queste arriva in sede intestinale viene assorbito e passa nel sangue per legarsi alle albumine seriche. Hsieh e Wong (1994), rilevano che il principale sito di assorbimento dell'aflatossina B<sub>1</sub> è il duodeno e dato il basso peso molecolare di quest'ultima, segnalano la diffusione passiva negli enterociti come meccanismo d'assorbimento. Le aflatossine in generale, possono quindi dirsi, composti caratterizzati da elevata liofila (Leeson et al., 1995). L'ipotesi di una specifica attività ruminale è supportata da ricerche condotte da Engel e Hagemester (1978), che riscontrarono la totale degradazione delle tossine in vitro e in vivo ad opera dei microrganismi ruminali, viceversa studi effettuati da Kiessling et al., (1984), sembrano rigettare questa ipotesi; dimostrando, diversamente dai risultati attesi ed in virtù di indagini effettuate in vitro mediante l'utilizzo di liquido ruminale, l'assenza di processi di metabolizzazione a carico dell'aflatossina B<sub>1</sub> e l'incapacità dei microrganismi ruminali di abbattere la concentrazione della tossina. La forma B<sub>1</sub>, secondo alcuni autori, pare possa godere di elevata resistenza alle condizioni di ambiente ruminale e alla degradazione da parte della popolazione batterica presente (inferiore al 10%), oltre che della capacità di ridurre crescita ed efficienza. Nelle varie fasi del processo digestivo le aflatossine assorbite vengono come precedentemente evidenziato, trasportate al fegato dove avviene la loro metabolizzazione, che da origine a diversi idrossi-derivati, destinati a lunghe percorrenze nel torrente circolatorio, prima dell'allontanamento dall'organismo per mezzo di escrezioni e secrezioni come urina, bile e latte. Inoltre la quantità di tossina ingerita è correlabile alla presenza di residui in sede epatica. Tale rapporto

nel bovino è di 14000:1 (Piva e Pietri, 1988). Una piccola parte di tutte le aflatossine ed in particolare della M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub> si può depositare nei tessuti muscolari, mentre gran parte di essa è escreta dalla sede epatica e renale per mezzo del latte. L'aflatossina B<sub>1</sub> una volta assorbita dalle mucose del sistema gastro-intestinale è rilevabile nel plasma dopo 15 minuti dall'ingestione e nel latte nella mungitura successiva. La condizione di steadystate (o plateau), raggiunge il massimo valore stabile dopo 6 giorni di interrotta assunzione di livelli costanti d'aflatossina B<sub>1</sub>. Le forme M<sub>2</sub> e M<sub>4</sub> (ANZFA;2006), sono presenti in concentrazione minore rispetto alla M<sub>1</sub> e pertanto possono considerarsi di minor impatto per la sanità pubblica.

### 3.1 Reazione di prima fase

La reazione di prima fase nel metabolismo dell'aflatossina B<sub>1</sub> è l'ossidazione da parte degli enzimi microsomiali che avviene prevalentemente in sede epatica. L'aflatossina B<sub>1</sub> ingerita è generalmente biotrasformata in sede epatica dalle ossidasi a funzione mista citocromo P450 dipendenti, CYP450, enzimi microsomiali con funzione detossificante (Zinedine et al., 2007), dove viene convertita in diversi metaboliti come l'aflatossina Q<sub>1</sub>, l'aflatossina P<sub>1</sub>, l'aflatossina B<sub>2a</sub>, le aflatossine M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub> (a seconda della predisposizione genetica della specie) e l'aflatossicolo ed intermedi epossidi. L'azione degli enzimi a funzione mista citocromo P450 dipendenti, produce l'aflatossina B<sub>1</sub> 8.9-eossido, tra le sostanze a più alto potere cancerogeno ad oggi conosciute (Ceruti, 1993, Yiannikouris e Jouany, 2002). Numerosi studi su diverse specie animali hanno dimostrato che la mutagenicità, la cancerogenicità e l'attività di legame con il DNA dell'aflatossina B<sub>1</sub> derivano dalla sua attivazione da parte del citocromo P450 e la successiva formazione del suo 8.9-eossido. Questo composto pur avendo vita breve è molto reattivo, per questo viene indicato come principale mediatore del danno cellulare. Un dispositivo di detossificazione dell'aflatossina B<sub>1</sub> 8.9-eossido è la formazione del suo derivato con il glutatione, mediata dall'enzima glutatione S-transferasi; l'attività di quest'ultimo varia notevolmente a seconda della specie animale, questo è il motivo alla base della differente suscettibilità a questa tossina, (Smela et al., 2001). Mediante idrossilazione si formano le aflatossine M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, e Q<sub>1</sub>, mentre attraverso una reazione di O-demetilazione si ottiene l'aflatossina P<sub>1</sub>. Mentre l'aflatossicolo, prodotto dalla riduzione dell'aflatossina B<sub>1</sub>, in natura viene velocemente riconvertito in B<sub>1</sub> e ne costituisce quindi una riserva (Yiannikouris e Jouany, 2002).

### 3.2 Reazione di seconda fase

Il processo di detossificazione delle aflatossine aumenta l'idrosolubilità e la polarità dei composti favorendone l'escrezione attraverso la bile ed in minor misura attraverso le urine e il latte; questa fase si sviluppa prevalentemente attraverso due reazioni: il B<sub>1</sub> 8.9-eossido viene legato al glutatione ed in misura minore trasformato in aflatossicolo; mentre gli altri metaboliti (aflatossina M<sub>1</sub>, l'aflatossina P<sub>1</sub>, l'aflatossina Q<sub>1</sub>) vengono coniugati con l'acido glicuronico, (Yiannikouris e Jouany, 2002). Il metabolismo dell'aflatossina B<sub>1</sub> nel suo eossido e nell'aflatossina M<sub>1</sub>, può essere bloccato attraverso trattamenti con l'*Oltipraz*, farmaco approvato dalla Food and Drug Administration degli Stati Uniti (FDA) utilizzato negli anni 80 contro la schistosomiasi e con il *fenobarbitale* farmaco antiepilettico; entrambi in grado di fermare la formazione dell'eossido e indurre l'enzima che ha maggiore attività detossificante nei confronti delle aflatossine, ossia la glutatione S-transferase. Indagini di laboratorio pare abbiano dimostrato che la formazione degli addotti aflatossina-DNA e il derivante tumore epatico, possano essere inibiti dall'*Oltipraz*, che ha inibito il metabolita cancerogeno dell'aflatossina B<sub>1</sub>, 8.9-eossido, in vitro fino al 50% e negli animali trattati in vivo in media fino al 53%.

### 3.2.1. Effetti sull'organismo

Come evidenziato da più autori le aflatossine, hanno la capacità di interferire con il metabolismo energetico, inibendo l'attività delle catene di trasporto degli elettroni. Successivamente alla biotrasformazione, tali sostanze interagiscono con diverse macromolecole dell'organismo (DNA, RNA, proteine e carboidrati) e possono indurre mutazioni genetiche, inibizione dei sistemi enzimatici e alterazioni del metabolismo dell'interferone coinvolto nelle risposte immunitarie e nelle reazioni antinfiammatorie. Attualmente sono noti due tipi di interazione con il DNA da parte delle aflatossine; la prima consiste in un legame reversibile non covalente con i siti attivi della macromolecola, la seconda in un legame molto stabile di tipo covalente che porta alla formazione degli addotti del DNA; caso in cui non si lega al DNA l'aflatossina, ma un suo metabolita, il derivato epossidico (derivante dal coinvolgimento del citocromo P450 epatico). Metabolita quest'ultimo ad elevato potenziale cancerogenico a sua volta determinato dalle reazioni con gli acidi nucleici. Anche la diminuzione della sintesi proteica operata dalle aflatossine avviene mediante due meccanismi; un'azione disaggregante sui poliribosomi e sul RER epatici e il blocco della trascrizione da parte della RNA-polimerasi DNA-dipendente, con conseguente diminuzione della sintesi proteica cellulare. La diminuita sintesi di proteine utili al trasporto dei lipidi generata dal danno epatico della tossina, causa alterazione della mobilizzazione e del trasporto dei lipidi con conseguente degenerazione grassa del fegato. Infine le aflatossine determinano anche alterazione del metabolismo dei carboidrati con diminuzione delle riserve epatiche di glicogeno. Quindi l'organo di elezione per le aflatossine può dirsi il fegato, questo presenterà necrosi emorragiche e ingrossamento delle cellule epatiche

(colore grigiastro, struttura fibrosa, lobi allargati e bordi arrotondati); inoltre, possono essere interessati anche, reni, sistema nervoso centrale e tessuti, questi ultimi mostreranno una maggiore predisposizione alle lesioni cutanee, con ritardo della coagulazione ematica (Hesseltine, 1976; Edds, 1979). Danni di tipo acuto dovuti alle aflatossine quali emorragie provocate da fragilità capillare, necrosi degli epatociti sono evidenti dopo appena 3-6 ore dall'ingestione. Le aflatossicosi croniche nei ruminanti adulti possono causare anoressia, disidratazione e desquamazione della pelle del musello, prolasso rettale, edema addominale, diminuzione della fertilità, aborto ed infine pare abbiano anche un effetto sulla microflora del rumine. Nei ruminanti quindi, l'esposizione ad aflatossine può produrre una diminuzione, dell'efficienza nutrizionale, dell'immunocompetenza, delle prestazioni riproduttive e della produzione latte, come ampiamente dimostrato da studi su bovini da latte di Diekman e Green (1992). L'ingestione di diete contaminate non produce alcun effetto diretto sulla riproduzione; viceversa innesca attraverso altri sistemi fisiologici un'azione indiretta, che si manifesta anche attraverso cicli estrali irregolari (troppo lunghi e/o troppo brevi) e più in generale disturbi del metabolismo ormonale. Mangimi contaminati possono produrre alterata motilità e/o funzionalità ruminale, ridotta digestione della cellulosa e minore produzione e/o proteolisi degli acidi grassi volatili. L'inibizione della capacità di difesa dell'organismo (immunodepressione), fa aumentare drasticamente l'insorgenza di sintomi come, anoressia, perdita di peso, opacità della cornea, diarrea, tenesmo (spasmo doloroso dell'ano), calo delle produzioni (~25 %), minor peso dei vitelli alla nascita, mastiti, metriti, problemi respiratori, aborti, prolassi uterini, danni epatici, ittero, ipercolesterolemia, aumento della bilirubina ematica, del G.O.T., della lattato deidrogenasi, della fosfatasi alcalina e diminuzione livello ematico di Vit. A.

#### **4. Resistenza degli animali d'interesse zootecnico alle aflatossine**

La suscettibilità di specie alle aflatossine è secondo Howard et al., (1990), dipendente principalmente dai sistemi di detossificazione del fegato, dalla genetica, dall'età e da altri fattori nutrizionali. Devegowda et al. (1999), descrivono la resistenza di alcuni animali in produzione zootecnica alle aflatossine; indicando per gli avicoli un'elevata sensibilità e per bovini, equini e suini una sensibilità bassa. Tra i ruminanti si è osservata poi, una maggiore resistenza degli ovi-caprini e dei bufalini rispetto ai bovini. Nei caprini dosi d'aflatossine B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub> e M<sub>1</sub>, di 1.3-1.5 mg/die, fino alla morte, hanno prodotto anoressia, depressione, itterizia, fegato e reni danneggiati, urine scure e muco nasale. Fernandez et al., (1995), descrivono poi, la determinazione del tempo di protrombina come un possibile indicatore di aflatossicosi negli agnelli. Gli effetti delle aflatossicosi nei bovini sono più evidenti nei vitelli maggiormente sensibili. Una dose di 0.2 mg/kg di peso corporeo, può causare una diminuzione velocità di accrescimento e di conseguenza dell'incremento di peso, attribuibile in parte alla scarsa utilizzazione dei mangimi ed in parte all'aumento delle attività fosfatasi alcalina nel rumine. Vitelli bovini di 225 kg, hanno mostrato sintomi cronici da aflatossicosi successivamente all'assunzione continua con i mangimi di 700-1000 ppb di aflatossina, mentre per le manze è stato segnalato che un apporto di 1000 ppb per 59 giorni può portare alla morte. Altri studi tossicologici hanno riscontrato nel caso dei vitelli, a seguito di una singola dose sub-cutanea di aflatossina B<sub>1</sub>, la presenza di aflatossine B<sub>1</sub> ed M<sub>1</sub>, nei tessuti e nelle urine; a seguito poi, di dosi di 0,8 mg/kg di peso corporeo, le risposte sono state parimenti positive, così anche a dosi di 1,8 mg/kg di peso corporeo, viceversa dosi giornaliere di 42 mg, sopra i 3 mesi hanno dato esito negativo. Nel caso specifico della bufala

l'assunzione di alimenti contaminati produce una netta riduzione dell'ingestione e conseguentemente un lento calo della produzione latte, viceversa i parametri reologici (velocità e consistenza del coagulo), rimangono inalterati (Pietri et al., 2003).

## **5. Fonti e livelli di contaminazione**

La presenza di aflatossine è stata verificata in diversi prodotti agroalimentari destinati all'alimentazione umana ed animale provenienti da diverse parti del mondo. La Food and Agriculture Organization (FAO), nel 1985, dichiarava che nel mondo circa il 25% delle derrate alimentari erano contaminate da micotossine. La contaminazione di origine animale, può dirsi, diretta se i funghi tossigeni si sviluppano sugli alimenti e indiretta se causata dall'assunzione da parte degli animali di alimenti contaminati da funghi tossigeni, cioè conseguente al fenomeno di "carry over" (Miraglia e Brera, 1999). La mancata presenza del fungo micotossigeno non è sufficiente a comprovare l'assenza delle tossine, così come un substrato ammuffito non indica necessariamente la presenza di micotossine. La massima produzione di tossine poi, non sempre coincide con il massimo sviluppo del fungo, talvolta essa può avvenire con un ritardo di poche ore o di giorni, anche se di norma coincide con il decimo giorno di sviluppo del micelio (Ceruti et al., 1993; Zaghini e Lambertini, 1995). Il tipo di substrato può influenzare la produzione di micotossine (Pietri, 1998). Nel caso delle aflatossine, la produzione 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 superiore nelle arachidi

rispetto ai cereali ed è secondo alcuni autori nulla nel riso, tanto che dalla fermentazione degli zuccheri di quest'ultimo, mediante l'aggiunta di *Aspergillus orizae*, si ottiene il *sakè*. Il substrato è correlabile quindi, alla presenza di specifiche tossine, che evidenziano un "legame" tra il fungo produttore e la matrice di accrescimento dello stesso, (Ominski, et al., 1994; Huwing et al., 2001). Le micotossine di pertinenza dei ruminanti sono quelle di origine fungina, che contaminano le fonti di supplemento proteico (spesso di origine tropicale), come cotone, farina di arachidi, oltre che cereali, prodotti associati e talune essenze impiegate nella razione. Riscontrabili nel fieno, quando è raccolto con un umidità superiore al 20%; si sviluppano frequentemente anche nei foraggi conservati ad elevato contenuto di acqua (insilati) e nei concentrati. I cereali possono considerarsi i maggiori vettori di micotossine, questo in conseguenza dei consumi umani ed animali (Pfohl-Leszkowicz, 2000). Il range mondiale di contaminazione da micotossine dei cereali è compreso tra il 25 e il 40 %, (Pittet, 1998). I cereali in uso comunemente nelle razioni, possono risultare contaminati in conseguenza di attacchi fungini di campo e soprattutto in conseguenza di condizioni di conservazione favorevoli allo sviluppo di funghi tossigeni (elevata umidità e temperatura). Le contaminazioni dei vegetali risultano più frequenti rispetto a quelle dei prodotti animali; poiché la presenza nei primi dell'amido, sembra aumentare la tossinogenesi. Le muffe presenti nelle derrate alimentari, producono riduzione quantitativa e qualitativa del valore alimentare, ad esempio in una partita di mais molto contaminata si può arrivare ad avere una diminuzione del tenore di energia, proteine e grassi, rispettivamente del 5, del 7 e del 63%; proprio la quota lipidica infatti è più sensibile all'attacco fungino. Barug et al (2004) considerano il mais tra le merci maggiormente sensibili alle micotossine. La contaminazione quindi può avvenire ad ogni

stadio della produzione alimentare, proprio per questo, l'Unione Europea, richiede la valutazione e il controllo dei maggiori componenti della catena di produzione alimentare con particolare forza per la produzione primaria. L'industria di trasformazione è oggi, consapevole della necessità di piano di gestione di filiera, che garantisca la produzione di alimenti sicuri, attraverso la definizione di un sistema di rintracciabilità, di identificazione dei punti critici di produzione, di monitoraggio e di sistemi correttivi; che origini dalla responsabilizzazione di ogni singolo comparto della filiera. La presenza di contaminanti negli alimenti comporta ogni anno perdite per milioni di euro, dovute alla non commerciabilità dei prodotti alimentari. La Food and Agriculture Organization (FAO), stima i danni economici medi annui, nel settore agro-alimentare sono pari a 715 milioni di euro per l'economia delle produzioni agricole primarie e 466 milioni di euro per l'economia delle aziende zootecniche. Nella sola Unione Europea nel 2005 si sono avute 993 notifiche di allerta (ossia obbligo di ritiro di prodotti già sul mercato), quasi tutte matrici alimentari. La Food and Drug Administration (FDA), ha stabilito i livelli d'azione per le aflatossine presenti nei mangimi, al fine di preservare la salute umana e animale. I livelli di aflatossine non devono superare i 20 ppb, nel caso di cereali, mais e cotone destinati agli animali in fase di crescita e in fase di lattazione, mentre nel caso di mais ed altri cereali destinati all'alimentazione di bovini da carne, suini e pollame adulto non devono essere superati i 100 ppb, estendibili a 300 ppb solo nel caso dei mangimi di finissaggio. Strumento utile per la stima della contaminazione da aflatossine negli alimenti per animali è il piano nazionale per l'alimentazione animale, che prevede maggiori controlli dei mangimi, per le regioni a più alta consistenza produttiva. Precedentemente l'EFSA aveva, nel 2004, fissato il limite massimo (ML), per l'aflatossina M<sub>1</sub>, nel latte a 0.05µg/kg, mentre la

Codex Alimentarius Commission (Codex), proponeva per l'aflatossina M<sub>1</sub>, nel latte intero un limite massimo di 0.5µg/kg. Generalmente il livello di contaminazione da aflatossine in Italia è contenuto, sia per ragioni climatiche, sia per le tecniche agronomiche avanzate (Pietri, 1998); questo però, non esclude la possibilità di contaminazione nelle fasi successive, come ad esempio durante la conservazione. Attualmente non esistono limiti per le aflatossine P e Q, perché pare, non raggiungano la catena alimentare ed abbiano minore tossicità rispetto all'aflatossina M<sub>1</sub>, (Fan, 1984).

## **6. Prevenzione**

Il primo passo per evitare la contaminazione da aflatossine delle colture vegetali è l'applicazione di corrette tecniche di coltivazione, che permettano di evitare stress eccessivi alle piante, condizione quest'ultima, favorevole all'insediamento dei funghi tossigeni e alla successiva produzione d'aflatossine. Il contenimento dei livelli di contaminazione va pertanto ricercato anche attraverso azioni preventive, come l'applicazione delle buone pratiche agricole e delle buone pratiche di lavorazione.

## 6.1 Tecniche agronomiche e di manipolazione

La non contaminazione delle materie prime, pur essendo in taluni casi di difficile realizzazione, deve essere perseguita per mezzo delle odierne tecniche, al fine di ottenere colture agricole con livelli di aflatossine bassi. Sintesi e rilascio di aflatossine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> possono verificarsi sia in fase di pre-raccolto che di post-raccolto in condizioni di temperature alte ed elevata umidità; talvolta anche le fasi di essiccazione, di conservazione, di trasformazione, di manipolazione e di trasporto, possono essere interessate dall'evenienza (Sargeant et al., 1963). L'avvicendamento colturale è utile per controllare la diffusione dei funghi tossigeni, è inoltre opportuno allontanare i residui colturali possibili fonti di contaminazione per le colture in rotazione. Anche le densità di semina elevate vanno evitate, perché possibile fonte di stress per la pianta; pertanto per gli ibridi a ciclo pieno sarà opportuno rispettare la condizione delle 6-6.5 piante/mq. La trebbiatura di granella troppo secca (valore ideale 20-25% di umidità), può causare danni alla stessa, favorendo la proliferazione delle aflatossine, di contro l'eccessiva umidità (28%), produrrà come effetto l'insorgenza di muffe e aumenti dei costi di essiccazione. Tecniche di raccolta adeguate come le mietitrebbie assiali riducono fortemente le lesioni alla granella, vie preferenziali per la penetrazione delle muffe. La concentrazione di aflatossina B<sub>1</sub> nei mangimi, può essere notevolmente ridotta attraverso l'impiego di buone prassi di fabbricazione e di stoccaggio. Durante la fase di pre-essiccazione, della granella verde, particolare attenzione, andrà riposta nel non superare le 48 h di sosta. Inoltre la percentuale di scarto della granella verde nelle fasi precedenti l'essiccazione, nel caso si accerti la contaminazione da aflatossine, può arrivare a livelli notevolmente più alti, raggiungendo in taluni casi il 4 %,

operazione questa, che porta ad una riduzione del 50 % ed oltre, dei livelli di contaminazione. Infine adeguati processi di trasformazione come la molitura dei cereali, possono ridurre la concentrazione delle aflatossine nella frazione più raffinata, relegandola alla parte cruscale.

## 6.2 Tecniche d'ingegneria genetica

Recenti ricerche d'ingegneria genetica promuovono l'utilizzo di piante resistenti alle infezioni tossicogene da funghi, grazie al potenziamento di alcuni geni ad attività antifungina, in grado di implementarne la resistenza. Un ruolo rilevante nella diffusione dell'infezione fungina è rivestito dagli insetti, in particolare, per il mais, il pericolo arriva dalla piralide (*Ostrinia nubilalis*), le cui larve scavano gallerie nello stocco e nella spiga, con gravi perdite quali-quantitative della granella. Le spore fungine presenti sulla superficie fogliare possono essere veicolate dalle larve "vettori" e trasportate all'interno di gallerie nella spiga. Tendenze odierne per il controllo della piralide è più in generale di altri insetti, vedono diffondere l'impiego di ibridi di mais transgenici, contenenti un gene che deriva dal batterio (*Bacillus thuringiensis* e/o *Bt*) e che produce selettive proteine insetticide nei tessuti della pianta. L'impiego negli U.S.A. di ibridi (*Bt*), finalizzato alla riduzione dell'infezione da *Aspergillus flavus* e della conseguenziale contaminazione da aflatossine, generatesi entrambe in virtù degli attacchi da (*Diatraea grandiosella*), ha mostrato significative differenze del livello di contaminazione (Williams et al., 2002). Successivamente sono stati valutati i danni riportati dalle spighe (*Bt* vs *non-Bt*), in conseguenza dell'accumulo di

aflatossine. La contaminazione sperimentale è avvenuta a mezzo di larve di (*Diatraea grandiosella*) e inoculazioni di soluzione di spore di (*Aspergillus flavus*), applicate provocando ferite inferte e non, alla spiga. In entrambi i casi (*Bt* e *non-Bt*), si sono riscontrati livelli di contaminazioni elevati da aflatossine, sia sulle spighe inoculate tramite ferite inferte e sia sulle spighe spruzzate con soluzione di spore e volutamente infestate con larve; anche se la contaminazione maggiore si è avuta nel caso dei (*non-Bt*), circostanza questa, condizionata in parte dall'assenza di condizioni naturali di contaminazione; in natura infatti, le risposte potrebbero non essere le medesime. Pietri e Piva (2000), in prove di campo condotte in Italia settentrionale in zone infestate da piralide, su ibridi di mais (*Bt*), nel biennio 1997-99, hanno riscontrato in condizioni di infestazione naturale da insetti, contaminazioni da aflatossina B<sub>1</sub> molto basse, e contenuti di ergosterolo delle cariossidi di origine *Bt* inferiore rispetto alle *non- Bt*, più precisamente il range è risultato essere compreso tra 3.5 e 6. Nel 1998 il divario tra *Bt* e *non-Bt* raggiunse livelli di maggiore divergenza, in virtù di condizioni ambientali favorevoli allo sviluppo fungino.

### 6.3 Trattamenti per la riduzione della contaminazione d'aflatossine

Nel caso in cui poi, le misure di prevenzione risultino insufficienti, l'aflatossina B<sub>1</sub> nelle diete può essere ridotta mediante miscelazione, trattamento fisico (termico, microonde, raggi gamma, raggi x e luce ultravioletta e assorbimento) o trattamento chimico. L'assorbimento delle aflatossine avviene mediante l'impiego di sodio idrato, calcio, alluminosilicati ed altri materiali inerti, comunemente impiegati nell'industria mangimistica al fine di ottenere una riduzione drastica del contenuto di aflatossina M<sub>1</sub> nel latte. Negli alimenti ad uso zootecnico talvolta, anche prestando grande attenzione alle fasi d'acquisto, di produzione e di stoccaggio, possono verificarsi contaminazioni in grado di generare eccessiva presenza di M<sub>1</sub> nel latte. Al fine di riguadagnare prontamente la qualità degli alimenti è necessario in taluni casi utilizzare sequestranti (sostanze che catturano aflatossine), in grado di ridurre il carry over. Gaspari et al., (2005), hanno verificato l'efficacia del sequestrante Atox™-bentonite, confrontando i livelli di contaminazione del latte, precedenti al trattamento mediamente pari a 169 ppt, corrispondenti a 4,78 µg escreti al giorno per bovina, (carry over 4,81% - valore min. 2,4%, valore max 11,0%) con quelli successivi al trattamento pari a 61,1 ppt (carry over 1,74%). Riscontrando che il trattamento con sequestrante aveva determinato un abbassamento del livello di contaminazione da M<sub>1</sub> del latte del 64%. La procedura chimica di maggior successo per la riduzione delle aflatossine nei mangimi animali è il trattamento ammoniacale, che porta alla decomposizione del 95%-98% dell'aflatossina B<sub>1</sub>; operazione effettuabile mediante l'utilizzo di idrossido di ammonio o ammoniaca gassosa a temperatura alta e bassa pressione, queste sono le prassi in uso in molti paesi. Anche nel caso di contaminazione da

aflatossine delle farine, ulteriori studi suggeriscono l'utilizzo del trattamento con ammoniaca. La degradazione dell'aflatossine quindi, può essere ottenuta per mezzo di reazione con ammoniaca e/o ipoclorito. Park et al. (1988), hanno dimostrato che efficaci decontaminazioni degli alimenti riducono e/o annullano il rischio di residui di aflatossina M<sub>1</sub>, nel latte. Badii e Moss (1988) hanno riferito che il fungicida fenpropimorf, aumenta significativamente la produzione di aflatossina B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> originate da *Aspergillus parasiticus*, modificando il rapporto e spostandolo in favore delle aflatossine B<sub>1</sub>. Ulteriori accorgimenti per contrastare lo sviluppo di muffe negli alimenti possono essere presi, si tratta dell'aggiunta di adeguati inibitori come il propionato di calcio o di sodio, oppure di acidi organici, in ragione dello 0,2-0,25% se il contenuto d'umidità dei cereali è di 14-17%, oppure 0,5-0,6% se l'umidità è nell'ordine di 18-24%. Recentemente poi, come mezzo di contrasto, sono state anche impiegate sostanze cosiddette "leganti", in grado di unirsi alle tossine e farle assorbire a livello gastro-intestinale; queste sono suddivisibili in quattro categorie, cioè alluminosilicati, bentonite, zeoliti, mix dei precedenti con aggiunta di vitamine ed altri minerali. Infine un importante mezzo per contrastare e/o mitigare gli effetti negativi sugli animali prodotti dalle micotossine è il trattamento con maggiori livelli di selenio, zinco, rame, manganese, Vit. A, Vit. E, e Vit. B1. Pertanto sarebbe auspicabile che tutte le materie prime utilizzate, provenissero esclusivamente da fornitori affidabili e venissero stoccate in buone condizioni ambientali (fresco-asciutte); mentre le procedure industriali di trasformazione, andrebbero supportate da adeguati programmi di sorveglianza e da sistemi HCCP.

## 7. Attività di Monitoraggio

La presenza di aflatossine nella filiera agro-alimentare oltre a produrre danni per la salute umana, incide negativamente sulle produzioni e sulla qualità dei prodotti finali; meccanismo che porta ad un calo di redditività del comparto zootecnico, che risente anche della maggiore difficoltà delle attività di monitoraggio. Nel 1985, durante il Compendio, *Worldwide Regulations for Mycotoxins*, sono stati esaminati reports provenienti da 90 Paesi, il 40% dei quali riportava dati sull'aflatossina B<sub>1</sub>, mentre il 60% riguardava le aflatossine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>. Gli esiti mostravano un range di livelli che per l'aflatossina B<sub>1</sub> era compreso tra 0 e 40 µg/kg, mentre per le aflatossine (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>) era tra 0 e 50 µg/kg. Inoltre 17 Paesi fornirono informazioni sull'aflatossina M<sub>1</sub> nel latte, il cui range fu compreso tra 0 e 1 µg/kg, con un valore medio di 0.05 µg/kg. Una notevole quantità di dati, sui livelli di contaminazione internazionali e sulla consistenza delle aflatossine è stata raccolta e resa disponibile sul *Global Environment Monitoring System (GEMS) / Food Regional Diets - World Health Organization 1998 (WHO)*. Nel 1999, la Commissione Europea, ha presentato un dettagliato rapporto sull'aflatossina M<sub>1</sub>, i cui dati provenivano da, Austria, Belgio, Finlandia, Francia, Germania, Irlanda, Paesi Bassi, Portogallo, Svezia e Regno Unito, ed erano stati rilevati su un totale di 7.573 campioni. Il 96% dei campioni, risultò avere livelli di contaminazione al di sotto del limite di rilevamento (che varia tra i paesi: 0,001-0,03 µg/kg), viceversa le concentrazioni rilevate nei campioni contaminati furono, ≤ 0,05 µg/kg (JEFCA, 2001). Recenti studi hanno proposto l'utilizzo dell'ergosterolo (costituente della parete cellulare di muffe e lieviti; poco presente nelle piante superiori), come marcatore per la rilevazione del grado di contaminazione fungina. L'ergosterolo è presente

sulle granaglie a livelli di pochi mg/kg; quindi una buona granella di mais dovrebbe averne meno di 4 mg/kg, viceversa con valori superiori ad 8 mg/kg, saranno opportune ulteriori indagini, ma senza dubbio la qualità può dirsi non eccellente (Cahagnier, 1988). Le micotossine più comunemente riscontrabili nel mais prodotto in Italia, sono, le fumonisine, il deossinivalenolo, lo zearalenone e le aflatossine (Pietri et al, 2004). Monitoraggi condotti in Emilia-Romagna, nell'anno 2006-07, hanno rilevato una maggiore sensibilità alla contaminazione da aflatossine degli ibridi più precoci (classe FAO 300-400), mentre gli ibridi più tardivi (classe FAO 600-700), sono risultati maggiormente soggetti alla contaminazione da fumonisine. La scelta dell'ibrido dovrebbe essere operata in funzione, della natura dei suoli, delle condizioni climatiche e dell'ambiente di coltivazione. Costituisce, condizione di rischio estremo di contaminazione da *Aspergillus flavus*, la presenza di stress idrico successivo alla maturazione cerosa della granella. Una drastica riduzione dei rischi di contaminazione in campo da aflatossine, si può ottenere per mezzo della raccolta di granella di mais con umidità inferiore al 22-24%.

## 7.1 Monitoraggio internazionale

Il Dipartimento di Alimenti e Igiene Ambientale di Hong Kong (Food and Environmental Hygiene Department, HKSAR), nel periodo dal 1998 al 2000, ha attuato un programma di monitoraggio e valutazione dell'aflatossine negli alimenti, finalizzato ad aumentare i livelli di allerta e sorveglianza riguardanti queste molecole. Nell'anno 1998, la percentuale complessiva di alimenti con livelli di aflatossina al di sopra dei limiti di legge fu dello 0,19 %, ulteriori analisi quantitative rilevarono che il 92,4% dei campioni analizzati era privo di aflatossine, mentre la restante quota, risultò contaminata da livelli di aflatossine compresi tra 0,1 µg/kg e 26 µg/kg. In particolare su 92 campioni di cereali e prodotti derivati, solo quattro mostrarono livelli di aflatossine rilevabili, con percentuali pari al 4,3% (range 1,3 e 5,8 µg/kg) e livello medio di contaminazione di 0,27 µg/kg. Kubrak et al. (1995), riportano i dati riguardanti uno studio effettuato nella Repubblica del Kirghizistan, sul monitoraggio dei contaminanti alimentari con particolare riferimento all'aflatossina B<sub>1</sub> e all'aflatossina M<sub>1</sub>. L'indagine effettuata è durata quattro anni durante i quali sono stati analizzati 591 campioni alimentari sui i quali sono state rilevate contaminazioni da aflatossina B<sub>1</sub> nel 9,3% dei casi, con una variazione regionale tra settentrione e meridione rispettivamente di 2,2 % e 27,3 %. Nello stesso periodo il tasso di contaminazione da aflatossina M<sub>1</sub>, del latte e dei prodotti lattiero-caseari è risultato essere, su 597 campioni testati, del 9,8 %, con concentrazioni massime di 0,5 µg/kg e una variazione regionale, tra settentrione e meridione rispettivamente di 4 % e 27,8 %. L'Australia New Zealand Food Authority (ANZFA), evidenziava nel 1999, la necessità di disporre un limite massimo (ML) australiano, per le aflatossine nel latte, anche in virtù della consistente mole di dati raccolta tra il 1987 e il

1992, dall'Australian Mycotoxin Data Centre (AMDC), riscontri effettuati dagli stessi su 227 campioni di latte, diedero nel 4,4 % dei casi, esito positivo principalmente per il latte in polvere, recentemente poi (2000-2004), ulteriori indagini non hanno rilevato alcuna contaminazione di latte e prodotti trasformati. Spiace profondamente che le regioni più colpite dalla contaminazione da aflatossine, siano tra quelle meno ricche al mondo. Nell'anno 2003, in un sondaggio effettuato in India è emerso che l'87,3%, dei campioni scelti per i controlli era contaminato da aflatossine, di questi il 99% era poi, al di sopra dei limiti europei (Rastogi et al., 2004). Dato allarmante visto che l'India è il più grande produttore al mondo di latte.

## **8. Tossicità**

Le manifestazioni di tossicità generate possono essere di vario ordine in conseguenza dell'ampia gamma di specie fungine che le producono, della diversa tossicità intrinseca, della dose, dell'organo bersaglio, del sesso, dell'età e della specie animale. L'incidenza di certi tipi di cancro pare essere fortemente condizionata dall'elevata tossicità di alcune aflatossine, proprio questo aspetto desta perplessità circa la sicurezza di mangimi ed alimenti. Piva (2006), ha sottolineato in una sua relazione, che l'evenienza dell'ingestione di alimenti contaminati non è remota e nel riportare dati presentati al World Mycotoxin Forum (2005), ha ribadito che le popolazioni fra il 42° parallelo nord e sud sono maggiormente esposte alle aflatossine. In alcune aree geografiche del Sud Africa e del Sud-Est Asiatico, l'elevato livello di contaminazione degli alimenti da aflatossina B<sub>1</sub> è stato correlato all'elevata

incidenza epidemiologica di epatocarcinomi e di cirrosi epatica. La dose giornaliera ammissibile per l'uomo è derivata in gran parte da limiti basati su dati di origine animale, talvolta troppo alti a causa della differente sensibilità, mostrata dalle diverse specie animali (Creppy, 2002). Recenti studi hanno inoltre dimostrato, in animali da laboratorio, che la somministrazione prolungata per via orale di alimenti contaminati può produrre tumori al fegato. Studi effettuati da Norted (1979), sugli effetti tossici delle aflatossine nei ratti, hanno dimostrato che somministrando mais macinato, mescolato ad alte dosi di aflatossine (10-20 mg di AF. / kg di peso corporeo), si possono osservare i segnali tipici dell'aflatossicosi. Quindi gli effetti prodotti in conseguenza dell'ingestione di alimenti contaminati, variano in relazione alla tipologia d'animale, al tessuto colpito, alla quantità ingerita, e ad altri fattori che possono condurre alla formazione di carcinomi (Coulombe, 1993). Varie organizzazioni internazionali come la Food and Agriculture Organization, la World Health Organization, la Food and Drug Administration, l'International Agency for Research on Cancer e il Joint Expert Committee on Food Additives (FAO, WHO, FDA, IARC, JECFA), sono costantemente impegnate nella valutazione del rischio per la salute umana ed animale derivante dalle micotossine. L'Istituto Superiore della Sanità ha più volte ribadito, che qualora mangimi contaminati vengano usati nell'alimentazione di animali da allevamento; anche i prodotti da questi derivati (latte, carne e uova), possono risultare contaminati; dichiarazione questa che conferma l'ipotesi di "carry over" lungo la catena alimentare. Nel 1987 il Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA), ha dichiarato che l'aflatossina B<sub>1</sub> è il più potente epatocancerogeno naturale conosciuto per tutte le specie di mammiferi studiate, caratteristica questa, che la rende agente ad alto potenziale carcinogenico e mutagenico, con possibilità di conversione in un altro,

potenzialmente cancerogeno come l'aflatossina M<sub>1</sub>, (derivato metabolico), presente nel secreto mammario degli animali. Nell'uomo l'aflatossina B<sub>1</sub> è epatotossica e negli animali è nefrotossica e immunosoppressiva. L'aflatossina M<sub>1</sub> talvolta presente nel latte, è bene ricordare, produce negli individui portatori del virus dell'epatite B (HBV) tossicità circa 30 volte superiore a quelle di origine. Nel caso di latte e derivati di bufala l'escrezione di aflatossine, riguarderebbe secondo Pietri et al., (2003), non solo le forme M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub>, ma anche la B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, con percentuale di escrezione riscontrabile rispetto alla quantità ingerita rispettivamente del (0,2%, 2%, 0,05%, e 0,2%), quindi con rischi elevati di cancerogenesi.

Nella specie bufalina la maggiore permanenza in sede ruminale degli alimenti contaminati da aflatossina B<sub>1</sub> è indice di una più elevata degradazione della stessa e quindi di un minor assorbimento in sede intestinale. Inoltre il minor livello produttivo di latte della bufala può essere associato favorevolmente ad un minor rischio di contaminazione dei prodotti trasformati, anche se la maggiore concentrazione di grasso suggerisce un più intenso passaggio nel latte dell'aflatossina B<sub>1</sub>, meno polare rispetto all'aflatossina M<sub>1</sub> e quindi maggiormente liposolubile.

È dimostrato sperimentalmente che le aflatossine sono potenti cancerogeni in grado produrre cancro al fegato anche in virtù di un'azione combinata tra aflatossine e HBV nell'eziologia del tumore epatico primario. Studi epidemiologici effettuati nei primi anni settanta in alcuni Stati dell'Africa e del Sud Est Asiatico hanno dimostrato che in casi di prolungata esposizione umana alle aflatossine esiste una correlazione lineare fra consumo alimentare e incidenza di epatocarcinoma. Recenti studi effettuati in una fascia sociale ad alto rischio come quella dei consumatori di stupefacenti marijuana ed eroina, ottenuti da piante che veicolano aflatossine, hanno rilevato un'infezione più

aggressiva da HBV ed HIV. Nel 20% dei casi di eroinomani esaminati in Olanda ed Inghilterra vi è la positività sierica per l'aflatossina B<sub>1</sub>, l'aflatossina B<sub>2</sub> e l'aflatossicolo. Altri studi sono orientati alla ricerca del rapporto tra M<sub>1</sub> e livello di metaboliti presenti nei tessuti. Il peso medio della concentrazione dell'aflatossina M<sub>1</sub> nel latte secondo la Joint Expert Committee on Food Additives (2001), Creppy (2002) è di 0,023 µg/kg per una dieta di tipo europeo, mentre nelle diete latino-americane è di 0,022 µg/kg, nelle diete dell'Estremo Oriente è di 0,36 µg/kg, nelle diete del Medio Oriente è di 0,005 µg/kg e in quelle dell'Africa è di 0,002 µg/kg. Recenti osservazioni hanno riscontrato la presenza dell'aflatossina B<sub>1</sub>, in un'ampia varietà di prodotti alimentari, confermando così la persistenza della stessa nel mais, grano, semi di lupino, fava, latte, yogurt, formaggi e uova (Hifnawy et. al., 2004; Martins et. al., 2000 e 2004; Oliveira et. al., 2003). Altri autori come Strange (1991), Yoshizawa (1991) e Shotwell (1991), riportano dati sui livelli mondiali di contaminazione da micotossine in nocciole, farine, semi di cotone, cereali e nei semi oleosi. Particolare attenzione merita uno studio effettuato su campioni di sorgo provenienti dall'Uganda, il 38% dei quali è risultato positivo per le aflatossine con livelli totali che vanno da 1 a più di 1000 µg/kg, con valori medi di 152 µg/kg. In India poi sono stati riscontrati elevati livelli di aflatossina B<sub>1</sub>, in arachidi (26700 µg/kg) e in semi di cotone (520 µg/kg) da Strange (1991). Reddy et al., (2002) dichiarano che la ricerca sulle aflatossine in India si è intensificata a partire dal 1994, quando ad Andhra Pradesh c'è stato il più grande evento di contaminazione da aflatossine delle derrate in conseguenza del quale morirono duecentomila broiler. Una delle prime relazioni sulle aflatossicosi negli animali è stata quella di Andhra Pradesh, che ha rivelato la presenza di sintomi caratteristici in 24 bufale di razza Murrah, segnalando poi anche la presenza di casi necrosi epatica

centrolobulare e di casi di aborto. Paul et al., (1976), in India, riportano per il latte di bufala, l'evenienza dell'aflatossine, con livelli di contaminazione simili a quelli vacche. L'alta incidenza della contaminazione da aflatossine, delle diete condotte dagli uomini in Ghana, Nigeria, Sierra Leone, Sudan, Thailandia ed Emirati Arabi Uniti è resa evidente dalla presenza di aflatossina M<sub>1</sub> nel latte materno umano; oltre che in campioni di sangue provenienti dal Ghana, Kenia, Nigeria e Sierra Leone. Lamplugh et al. (1988), hanno rilevato livelli alti di aflatossina M<sub>1</sub>, (7320 ng L<sup>-1</sup>), nel cordone ombelicale; dimostrando che l'aflatossina M<sub>1</sub> è rilevabile nel sangue del cordone neonatale e che quindi attraverso la placenta può raggiungere il feto. Ulteriori indagini effettuate, hanno dimostrato che anche il frequente consumo di bassi livelli di aflatossine è generalmente associabile a malattie croniche come il cancro, aspetto questo, che desta particolare timore. Van Egmond (1989), valutando la conversione da alto a basso livello di contaminazione dei prodotti caseari, ha concluso che l'aflatossina M<sub>1</sub>, può dirsi sia epatotossica che cancerogena, inoltre dal punto di vista quantitativo l'aflatossina M<sub>1</sub>, in studi effettuati su anatroccoli e ratti sembra avere tossicità simile all'aflatossina B<sub>1</sub>, anche se il potenziale cancerogeno stimato è inferiore a quello dell' aflatossina B<sub>1</sub>. Il discorso é del tutto analogo per la forma M<sub>2</sub> (presente nel latte di bufala), che proviene dalla detossificazione della aflatossina B<sub>2</sub> (secondo alcuni autori anche G<sub>1</sub>).

## 9. Legislazione

Lo IARC (Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro) ha classificato numerose sostanze in base all'intensità dell'effetto cancerogeno e tra queste anche le Aflatossine. La classificazione è la seguente:

**Gruppo 1** Cancerogena per l'uomo

**Gruppo 2A** Probabilmente cancerogena per l'uomo

**Gruppo 2B** Possibilmente cancerogena per l'uomo

**Gruppo 3** Non classificabile come cancerogena per l'uomo

L'aflatossina B<sub>1</sub> è stata classificata come cancerogena per l'uomo e quindi rientra nel primo gruppo della tabella riportata dallo IARC, e il metabolita M<sub>1</sub> nel gruppo 2B.

Per questo motivo l'Ue ha emanato nel 1998 un regolamento (Reg. CE 1525/98), entrato in vigore nel 1999, in cui viene stabilito un limite pari a 50 ng/kg (ppt) per la M<sub>1</sub>, tenendo in considerazione il notevole consumo di latte da parte di categorie particolarmente esposte al rischio tossicologico (bambini, degenti, anziani). Questo limite venne introdotto prima in Svizzera e poi in altri paesi, giustificandolo con la considerazione che la dose giornaliera, tale da produrre un rischio di 1:10<sup>6</sup>, è dell'ordine di 1-10 ng/individuo. Pertanto la concentrazione media di M<sub>1</sub> nel latte, considerati i livelli medi di ingestione giornaliera, dovrebbe essere inferiore ad alcune decine di ng/kg.

La normativa vigente nell'Ue, in merito alle aflatossine viene riportata in tabella 1:

**Tabella 1. Quadro Normativo di riferimento**

Tossine	Alimentazione umana	Alimentazione animale
Aflatossine	Reg. (CE) 2174/2003 Reg. (CE) 683/2004	Direttiva 2003/100

Nella tabella 2 vengono riportati i limiti massimi di aflatossine, in diverse matrici, per l'alimentazione umana come da Regolamento (CE) 466/2001 della commissione del 8 marzo 2001 e sue modifiche: Regolamento (CE) 472/2002 della commissione del 12 marzo 2002; Regolamento (CE) 2174/2003 della commissione, del 12 dicembre 2003; Regolamento (CE) 683/2004 della commissione del 13 aprile 2004; Regolamento (CE) 123/2005 della commissione del 26 gennaio 2005.

**Tabella 2. Limiti massimi per le diverse matrici**

Prodotto	Aflatossina (ppb)*		
	B <sub>1</sub>	B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>
Infanzia, lattanti e dietetici per fini	0,10	-	0,025
Latte	-	-	0,05
Cereali e derivati per consumo	2,0	4,0	-
Cereali non lavorati	2,0	4,0	-
Mais non lavorato	5,0	10,0	-
Arachidi frutta a guscio e secca per			
Arachidi non lavorate	8,0	15,0	-
Spezie	5,0	10,0	-

\* unità di misura ppb = µg/kg

Per quanto, invece, concerne il campionamento le aflatossine sono così regolamentate:

**Tabella 3. Norme che disciplinano il campionamento**

<b>Tossina</b>	<b>Limiti legislativi</b>	<b>Campionamento</b>
Aflatossina	Reg. (CE) 2174/2003 Reg. (CE) 683/2004 (alimentazione umana)	Dir (CE) 53/1998 Dir. (CE) 27/2002
Aflatossina	Direttiva 2003/100 (alimentazione animale)	D.M. 20/04/1978

## 10. Incidenza delle contaminazioni di latte e prodotti derivati

Esigenza comune a tutti i settori, (zootecnia da latte compresa), è il controllo della qualità dei prodotti (Molinari, 2000). Nel 2001, Bakirci riferiva, che esiste una relazione lineare tra quantità di aflatossina  $M_1$  nel settore lattiero e aflatossina  $B_1$  negli alimenti ad uso zootecnico consumati dagli stessi animali. L'incidenza della contaminazione da aflatossina  $M_1$  nel latte crudo e nel formaggio di bufala è stata rilevata recentemente. Pietri et al., (2003), che hanno riscontrato nel latte e nella mozzarella di bufala oltre all'aflatossina  $M_1$  anche bassi livelli di  $B_1$ . La presenza dell'aflatossina  $B_1$  nella mozzarella lascia supporre che nel caso della specie bufalina non tutta la  $B_1$  ingerita con la dieta è stata bio-trasformata in aflatossina  $M_1$ . Prove sperimentali hanno riscontrato mediamente valori di aflatossina  $B_1$  nella mozzarella pari al 23 % dell'aflatossina  $M_1$  presente (Fedele et al., 2007). Il livello di inquinamento da aflatossina  $M_1$  è stato differenziato da altri autori, anche in funzione della stagione e del clima, difatti le pabulari utilizzate comunemente dagli animali nei periodi primaverili estivi provocano un aumento dei livelli di  $M_1$ , mentre nei periodi di maggiore consumo di mangimi concentrati si è registrata una diminuzione dei livelli di contaminazione del latte (Galvano et al., 1996; Pittet, 1998; Sarimehmetoğlu et al., 2003). Corbett et al., (1987), suggeriscono che l'analisi dell'aflatossine  $M_1$  in campioni di latte sono un migliore indicatore di contaminazione rispetto all'analisi delle aflatossine  $B_1$  negli alimenti.

## 11. Scopo della tesi

L'obiettivo della presente tesi è stato quello di verificare il pericolo inquinamento da lieviti, muffe e aflatossine negli alimenti utilizzati nel razionamento delle principali specie in produzione zootecniche. Ciò si è reso necessario per valutare i punti critici della produzione di alimenti per uso zootecnico al fine di delineare le linee guida per la messa a punto di una bozza di comportamento per gli operatori del settore agricolo e per quelli che operano nella produzione dei mangimi da destinare all'alimentazione animale così come riportato nel **Regolamento (CE) N. 178/2002**, utile alla:

- a) Individuazione del pericolo ;
- b) caratterizzazione pericolo;
- c) valutazione esposizione al rischio;
- d) caratterizzazione del rischio;
- e) comunicazione del rischio.

## 12. Materiali e metodi

Lo studio è stato svolto nei tre anni di dottorato e allo scopo sono state effettuate indagini mirate ad evidenziare la contaminazione da aflatossine e dai loro metaboliti nel latte, nei foraggi e nei mangimi semplici e composti integrati in aziende bovine, bufaline e ovine, localizzate nelle zone a più elevato patrimonio zootecnico della regione Campania e della regione Lazio. E' stato, inoltre, valutato il rischio inquinamento da aflatossine durante i processi di lavorazione dei mangimi composti integrati da destinare al razionamento degli animali in produzione zootecnica in mangimifici di dimensioni e tecnologie differenti.

**Primo anno:** Per l'attuazione della tesi, sono state individuate 15 aziende bufaline della Regione Lazio di cui 4 (provincia di Latina) localizzate in pianura e le restanti 11 (provincia di Frosinone) in collina. La consistenza media delle aziende oggetto del presente studio è stata di 127 capi con una superficie che assicura un ettaro ogni 6 capi presenti in azienda.

Le aziende utilizzate rispecchiano per gestione e per tipologia, quella tipica dell'area di intervento. Si tratta cioè, di allevamenti in cui la razione alimentare è composta, mediamente, dai comuni alimenti (Tab. 4), quali: insilati, fieni, concentrati e mangimi integrati, ed in qualche caso, da sottoprodotti dell'industria conserviera (es. buccette di pomodoro) e cascami di lavorazione di ortaggi (carote, carciofi, fagiolino).

**Tabella 4.** Alimenti utilizzati nelle aziende in prova per il razionamento delle bufale

Aziende	Alimenti
1	Insilato di mais, fieno medica e trifoglio, soia, crusca, mangime
2	Insilato di mais, fieno loietto, paglia, crusca, mangime
3	Insilato di mais, fieno loietto, paglia, crusca, carote, mangime
4	Insilato di mais, fieno medica e avena, soia, mangime
5	Insilato di mais, fieno medica, paglia, farina di mais, polpe di bietola, nucleo
6	Insilato di mais, fieno medica e loietto, farina di estrazione di soia, farina di grano, polpe di bietola, mangime
7	Insilato di mais, fieno loietto, paglia, carote, mangime
8	Insilato di mais, fieno loietto, paglia, mangime
9	Insilato di mais, fieno loietto, paglia, crusca, mangime
10	Insilato di mais, fieno medica e loietto, soia, polpe di bietola, crusca, buccette di pomodoro, mangime
11	Insilato di mais, insilato di medica, fieno medica e prato, soia, farina di mais, farinaccio
12	Insilato di mais, fieno avena, paglia, trebbie di birra, soia, polpe di bietola, mangime
13	Insilato di mais, pastone di mais, fieno loietto, soia, glutine mais
14	Insilato di mais, fieno loietto, soia, frina di mais, crusca mangime
15	Fieno medica e loietto, polpe di bietola, crusca, mangime

**Secondo anno:** La ricerca delle aflatossine si è svolta in due fasi principali:

- Prelievi di latte di massa bufalino;
- Prelievi di UNIFEED somministrati alle bufale in fase di lattazione.

L'indagine ha avuto corso nel periodo intercorrente tra aprile e settembre 2007, in cui sono stati effettuati 4 cicli di prelievi rispettivamente per il latte di massa e per gli UNIFEED (tab. 5) prelevati in 9 aziende dislocate nelle province di Latina e Caserta.

**Tabella 5.** Composizione dell'Unifeed delle aziende in prova

Aziende	Unifeed
A	Mangime, soia, fieno di medica, insilato di mais
B	Mangime, paglia, insilato di mais
C	Mangime, fieno, insilato di mais, soia fioccata, farina di mais
D	Mangime, fieno, insilato di mais, farina di estrazione di soia, farina di mais
E	Mangime, fieno, insilato di mais, farinaccio
F	Mangime, fieno, insilato di mais, farinaccio
G	Mangime, fieno misto (loietto-avena), insilato di mais, fieno medica, soia fioccata
H	Mangime, insilato di mais, fieno, paglia, farina di estrazione di soia
I	Mangime, insilato di mais, paglia

**Terzo anno:** In questa fase della sperimentazione sono state testate per la presenza di aflatossine nel latte 155 aziende bovine, localizzate nelle province di Benevento (n. 7), di Caserta (n. 85) e di Salerno (n. 63); sono state, inoltre, esaminate 47 aziende bufaline localizzate nelle province di Caserta (n. 29) e Salerno (n. 18) e soltanto 6 aziende ovine localizzate tra le province di Salerno e Caserta.

In tutte le aziende in cui sono stati trovati valori di allarme (0,25 - 0,50 µg/kg) o positività nel latte ( > 0,50 µg/kg) si è provveduto ad effettuare un campionamento di tutti gli alimenti componenti la razione.

In un'ulteriore fase sono stati individuati tre industrie mangimistiche caratterizzate da tipologie e dimensioni differenti. La prima industria (mangimificio L) è di dimensioni elevate e tutto il processo di lavorazione risulta computerizzato e meccanizzato, le altre due presentano lo stesso processo di lavorazione che risulta manuale e differiscono esclusivamente per le dimensioni e per i volumi lavorati (C = medio; F = piccolo). Nelle tre industrie oggetto della presente tesi si è provveduto, pertanto, a verificare la possibilità di inquinamento da aflatossine durante il processo di lavorazione dei mangimi composti integrati. E' stato, inoltre, verificata, la possibilità di inquinamento del mangime composto integrato in alcune aziende clienti dei tre mangimifici per valutare il rischio inquinamento da aflatossine durante lo stoccaggio e l'utilizzo.

## 12.1 Campionamento

Per il latte di massa ogni campione, di circa 200 ml, è stato prelevato in provettoni di plastica sterili e conservati in freezer a una temperatura di -20°C fino al momento delle analisi.

Per questo tipo di campionamento sono stati seguiti degli accorgimenti, che hanno previsto prelievi effettuati :

- Sull'intera massa lattea alla fine della mungitura di tutti gli animali;
- Dopo aver fatto mescolare il latte nella vasca di raccolta per circa 10 minuti;
- Utilizzando contenitori sterili al fine di evitare contaminazioni.

Gli alimenti, invece, sono stati prelevati in una quantità pari a circa 500 g in buste chiuse e conservati in un luogo fresco ed asciutto, ad eccezione dell'insilato di mais e dell'unifeed che dopo il campionamento sono stati congelati fino al momento dell'analisi. Nella ricerca della contaminazione da micotossine, il campionamento delle derrate è una delle fasi più critiche. Negli alimenti solidi, infatti, la distribuzione della contaminazione non è mai uniforme, come invece accade per il latte, ma segue una diffusione di tipo aggregato o "a macchia di leopardo".

Per ottenere un campione quanto più rappresentativo anche in questo caso sono stati presi in considerazione alcuni criteri:

- Sono state individuate al meglio le partite di alimento (granella, fieno, concentrato o altro);
- Sono stati fatti più prelievi (5-10) da circa 1-2 Kg in punti diversi della partita (campioni elementari);
- Sono stati raggruppati i campioni elementari e rimescolati accuratamente su un grosso contenitore (campione globale);
- Da quest'ultimo sono stati poi prelevati dei sub-campioni di alimento di almeno 1 Kg e inviati al laboratorio di analisi.

Limitatamente al primo anno di prova si è provveduto a determinare l'inquinamento da lieviti e muffe, secondo la metodologia descritta da Sarli et al. (1996), su campioni di alimenti entro le due ore dal prelievo e mantenuti a temperatura di + 4°C fino al momento delle analisi.

I campionamenti nelle tre industrie mangimistiche hanno interessato le principali materie prime utilizzate nella formulazione del mangime composto integrato durante l'intera fase di lavorazione e precisamente nei silos di stoccaggio, prima e dopo la miscelazione. Si è provveduto, infine, a prelevare un campione di mangime composto integrato nelle aziende clienti dei mangimifici allo scarico e dopo circa 10 giorni di stoccaggio (periodo medio di stoccaggio nelle aziende zootecniche).

## 12.2 Analisi del latte di massa bufalino

I campioni di latte di massa sono stati analizzati nei laboratori del Dipartimento di Scienze Zootecniche ed Ispezione degli Alimenti, mediante la seguente metodica: dopo scongelamento, i campioni sono stati trasferiti in provettoni da centrifuga per poter separare tutto il grasso superficiale. Successivamente alla centrifuga il latte è stato posto in filtri di carta Wathman e il latte così scremato è stato caricato su colonnine ad immunoaffinità, contenente anticorpi specifici per l'aflatossina M<sub>1</sub>.

Le fasi acquose precedentemente ottenute sono state eluite attraverso le colonnine di immunoaffinità, successivamente lavate con 10 ml di acqua e portate a secco sotto un flusso di azoto. Le aflatossine, eventualmente presenti, sono state eluite a loro volta con 3 ml di metanolo.

Per rilevare la presenza di aflatossine è stato necessario derivatizzare e preparare degli standard che dessero una curva di calibrazione.

### 12.3 Analisi degli alimenti zootecnici

Le caratteristiche igieniche degli alimenti sono state valutate attraverso la determinazione delle aflatossine e esclusivamente al primo anno di prova si è provveduto, anche, alla determinazione dello zearalenone e alla conta delle colonie di muffe e lieviti. Le analisi su gli alimenti costituenti la dieta delle bufale sono state effettuate presso il laboratorio di analisi degli alimenti dell'Azienda Improsta di Eboli.

Per l'estrazione degli alimenti sono stati pesati 20 g di ciascun campione in una beuta da 300 ml con tappo smeriglio a cui sono stati poi aggiunti 100 ml di miscela estraente (metanolo al 70% e acqua al 30%). Il composto è stato posto in agitatore meccanico per 30 minuti da cui è stata estratta la componente liquida (surnatante), successivamente posta a filtrare su filtri di carta Wathman. Del filtrato ottenuto sono stati prelevati 10 ml a cui sono stati aggiunti 30 ml di acqua. Da questa soluzione sono stati prelevati 10 ml successivamente filtrati con Millex e iniettati in colonnine di immunoaffinità per aflatossine (Easi-Extract Aflatoxin), precedentemente condizionate con 5 ml di PBS. Le colonnine, ferme per 10 minuti con il filtrato, sono state poi lavate con 30 ml di acqua. Il campione è stato successivamente eluito con 2 ml di metanolo, filtrato nuovamente con Millex, e portato a volume con 2 ml di acqua e 2 ml di cloroformio. Il tutto è stato poi agitato vigorosamente e sonicato in bagno ad ultrasuoni.

Dopo questa fase il cloroformio, cui si legano le eventuali aflatossine presenti, viene recuperato allontanando il surnatante. A questo punto l'estratto viene portato a secco sotto flusso di azoto a cui sono stati poi aggiunti 200 ml di esano e 50 ml di acido trifluoroacetico. Il campione è stato poi lasciato a derivatizzare per 30 minuti al riparo della luce e a temperatura ambiente.

Una volta derivatizzato il campione è stato nuovamente portato a secco e poi ripreso con 1 ml di fase mobile (acetonitrile al 20%, metanolo al 20%, acqua al 60%). L'ultimo passaggio è stato quello di porre l'estratto in bagno ultrasuoni, ad avvenuta solubilizzazione del tutto, successivamente filtrato su Millex e iniettato.

## 12.4 Standard

Per ottenere delle curve di calibrazione sono stati utilizzati 4 livelli di concentrazione per ogni standard di aflatossina (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>). Partendo da una soluzione madre di 50 ppb (ng/ml) sono stati preparati gli standard a 3 diversi livelli di concentrazione: 1ppb; 2,5 ppb; 10ppb.

## 12.5 Analisi strumentale

Per l'analisi dei residui delle aflatossine è stato utilizzato un cromatografo in fase liquida ad elevate prestazioni (HPLC). La determinazione delle aflatossine è avvenuta nelle seguenti condizioni: il detector del fluorimetro è stato impostato ad una  $\lambda$  ecc.=362 nm, e  $\lambda$  emiss.=456 nm.

La colonna HPLC utilizzata era caratterizzata da: una fase stazionaria C18, dimensioni particelle particelle di 5  $\mu$ m, lunghezza 250 mm e diametro 4,6 mm.

La fase mobile impiegata era costituita da acetonitrile al 20%, metanolo al 20%, acqua al 60%.

Il flusso era di 1,2 ml/min con una quantità iniettata di 20  $\mu$ l.

## **12.6 Prelievi ematici**

Nel primo anno di prova, per verificare gli effetti dell'ingestione di aflatossine sull'attività epatica, sono state identificate due aziende simili per tipologia e tecniche di allevamento, ma che differivano per i quantitativi di aflatossine ingerite con la dieta (azienda 3 = < 30 ppb/die vs. azienda 15 = > ai 300 ppb/die). Su 10 bufale in lattazione per azienda si è proceduto al prelievo di campioni di sangue, a digiuno, dalla giugulare, trasportati refrigerati ai laboratori del DISCIZIA prontamente separati e congelati a -18°C fino al momento delle analisi. Sul siero sono state determinate mediante metodo enzimo-colorimetrico gli enzimi serici (GOT, GGT, GPT, CPK) (cinetica a 37°C), mentre la frazione proteica del siero è stata determinata mediante elettroforesi. Inoltre è stato calcolato il rapporto Albumine/Globulina.

## **12.7 Analisi statistica**

Le differenze tra i valori medi dei livelli di aflatossine riscontrate nel latte e negli alimenti e per le costanti ematiche considerate sono state testate attraverso l'ANOVA.

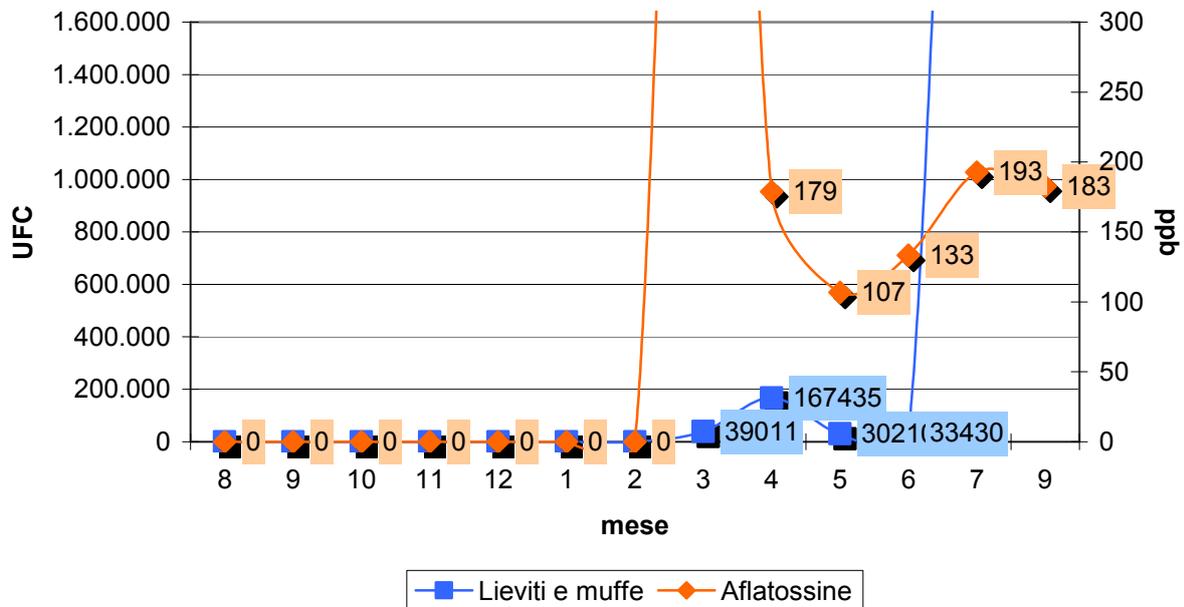
## 13. Risultati

### Primo anno

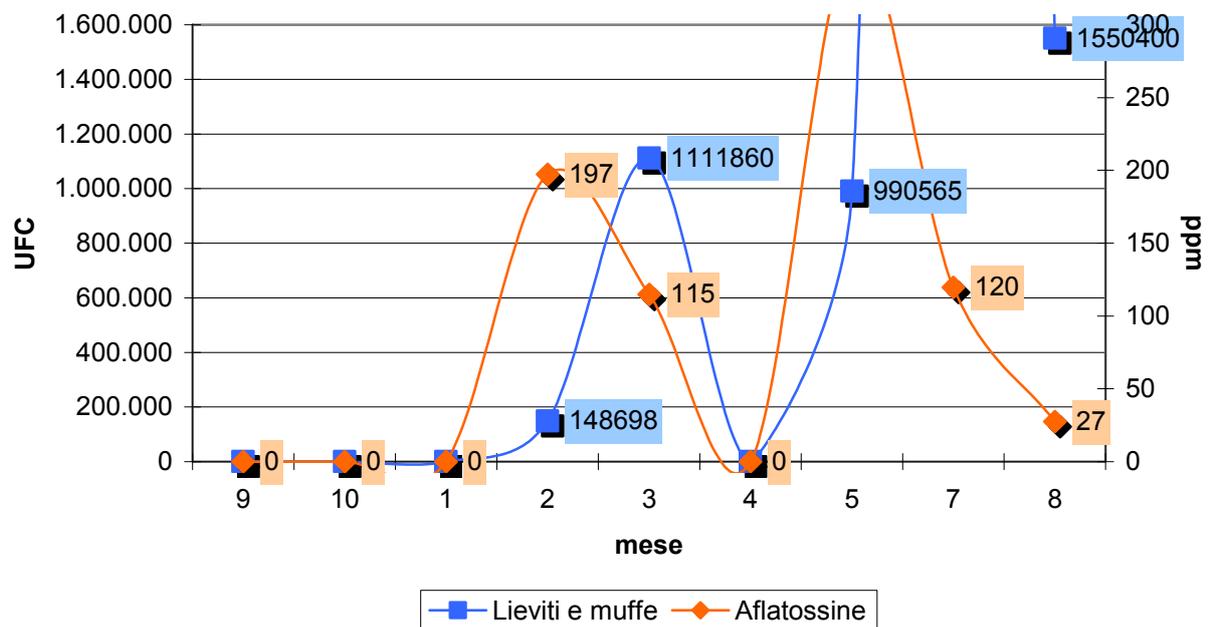
Dall'esame dei dati relativi al primo anno di prova è emerso che nel 73,3% (11/15) delle aziende è stata registrata una presenza significativa di muffe e lieviti mediamente per 1,73 prelievi. La colonizzazione da parte di questi microrganismi si è verificata per il 63,16% delle volte nel periodo estivo. Le elevate temperature e l'umidità che caratterizzano questo periodo, unitamente all'utilizzazione della parte finale del silomais, componente principale di gran parte delle diete somministrate, probabilmente rappresentano la causa dei valori elevati riscontrati.

I valori di aflatossine dosate nei singoli alimenti e calcolati sul totale delle razioni somministrate rientrano in gran parte del periodo nei limiti stabiliti per la B<sub>1</sub> dal regolamento CEE n. 1525/98, tranne che per la azienda 4 (Figura 1) nel prelievo effettuato nel mese di marzo i cui valori totali superavano i 1000 ppb e per le aziende 8 e 15 (Fig. 2 e 3) nel prelievo effettuato nel mese di luglio i cui valori, invece, superavano di poco i 300 ppb.

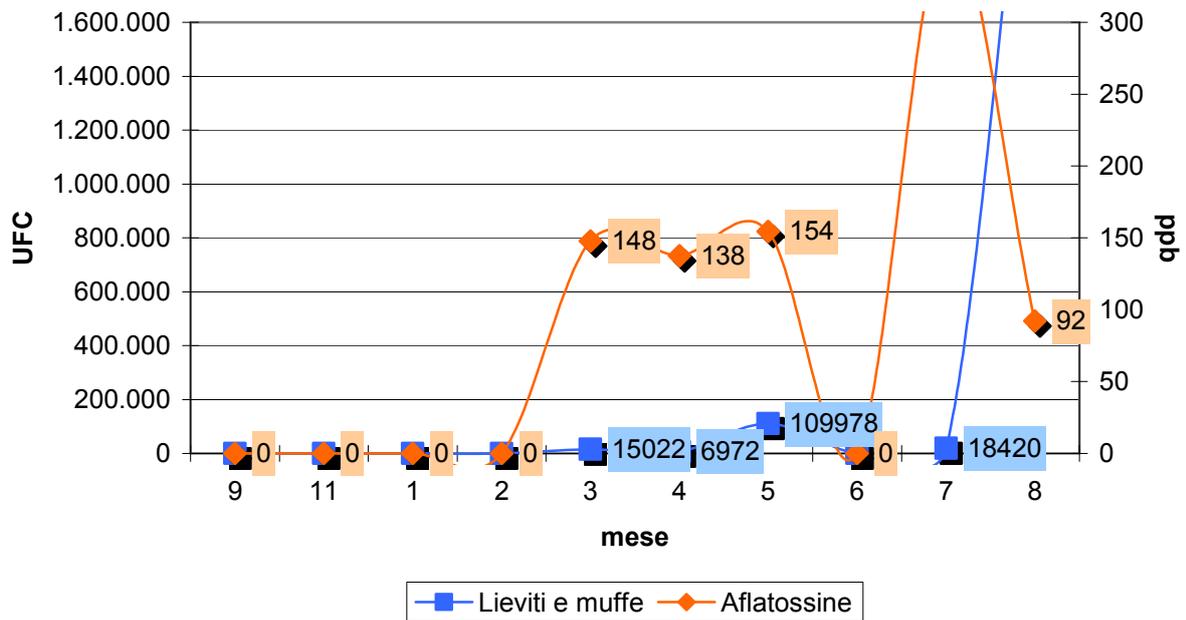
**Figura 1 - Andamento dei livelli di aflatossine e delle UFC di lieviti e muffe riscontrate nell'unifeed somministrato alle bufale dell'azienda 4, nei diversi mesi dell'anno**



**Figura 2 - Andamento dei livelli di aflatossine e delle UFC di lieviti e muffe riscontrate nell'unifeed somministrato alle bufale dell'azienda 8, nei diversi mesi dell'anno**



**Figura 3 - Andamento dei livelli di aflatossine e delle UFC di lieviti e muffe riscontrate nell'unifeed somministrato alle bufale dell'azienda 15, nei diversi mesi dell'anno**

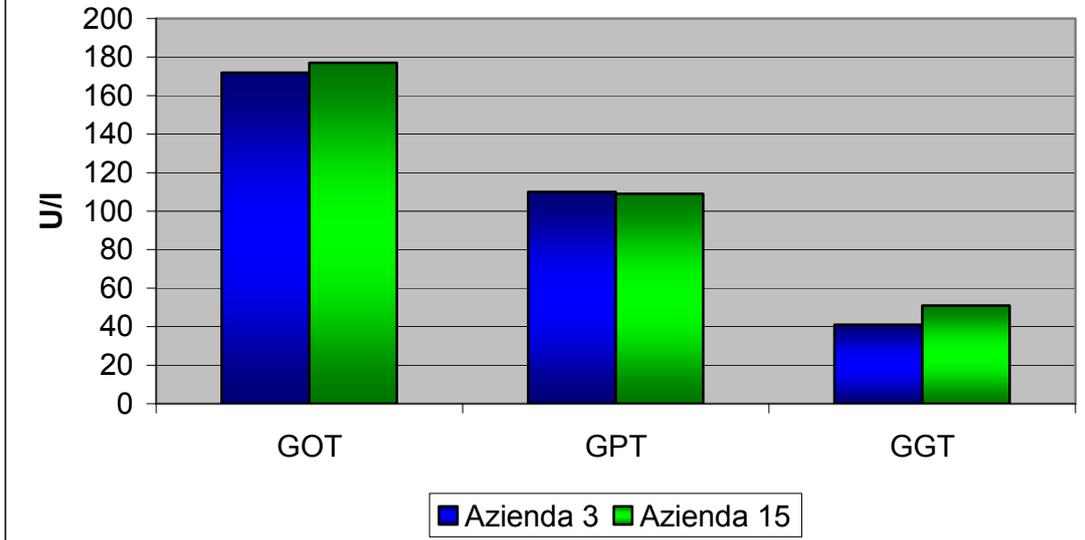


Secondo alcuni autori i livelli totali di aflatossine ingerite superiori ai 300 ppb sono tossiche per i bovini e sono lesivi principalmente per il tessuto epatico, con compromissione dell'attività. La sintomatologia risulta, però, apprezzabile soltanto quando il livello di tossine ingerite è superiore alle 600-800 ppb.

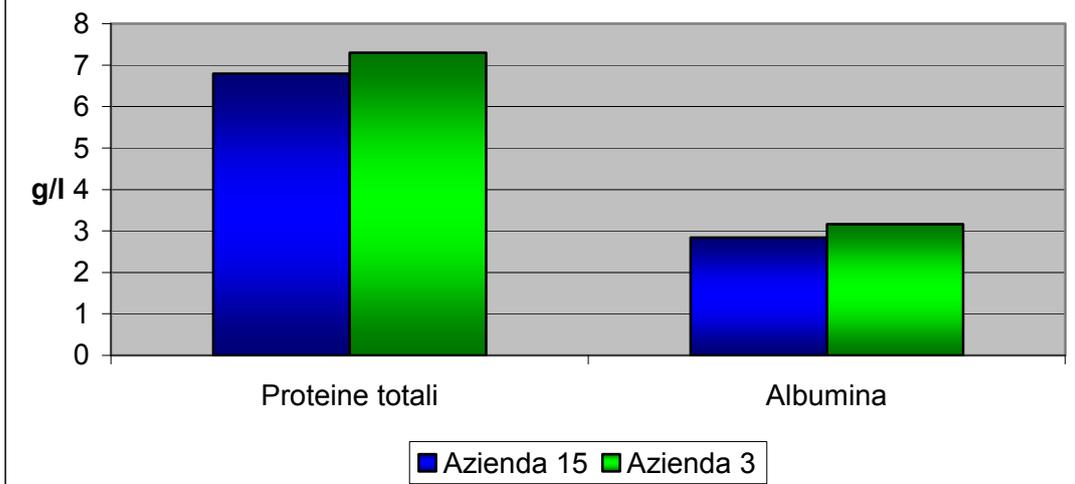
Nelle aziende che hanno aderito al progetto non si sono verificati effetti visibili sui soggetti allevati, probabilmente per la sporadicità dell'evento, ovvero una sola volta nel corso dei 13 mesi di intervento.

Tale ipotesi risulta avvalorata dai dati rilevati dalle analisi ematiche del profilo epatico delle bufale prelevate in diverse fasi di lattazione. Dall'esame dei grafici si evidenzia che gli enzimi indicatori del danno epatico non presentano differenze tra le due aziende esaminate e i valori risultano sovrapponibili ai range ritenuti fisiologici per questa specie (ASPA, 1999). Un lieve sovraccarico epatico è testimoniato dai più bassi livelli ( $P < 0.05$ ) delle proteine totali legate alla minore sintesi di albumina serica ( $P < 0,05$ ) nell'azienda in cui è stata rilevata presenza di aflatossine (azienda 15).

**Figura 4: Livelli degli enzimi serici nelle aziende utilizzate per la prova**



**Fig 5: Livelli ematici delle proteine totali e dell'albumina**



La presenza di aflatossine negli alimenti non ha fatto, comunque, registrare nel latte consegnato al caseificio presenza di tossine del gruppo M, che rappresentano i metaboliti di idrossilazione dell'aflatossina B. Non sono, inoltre, emerse correlazioni tra la quantità di aflatossine presenti negli alimenti ed il grado di contaminazione degli stessi da muffe.

## Secondo anno

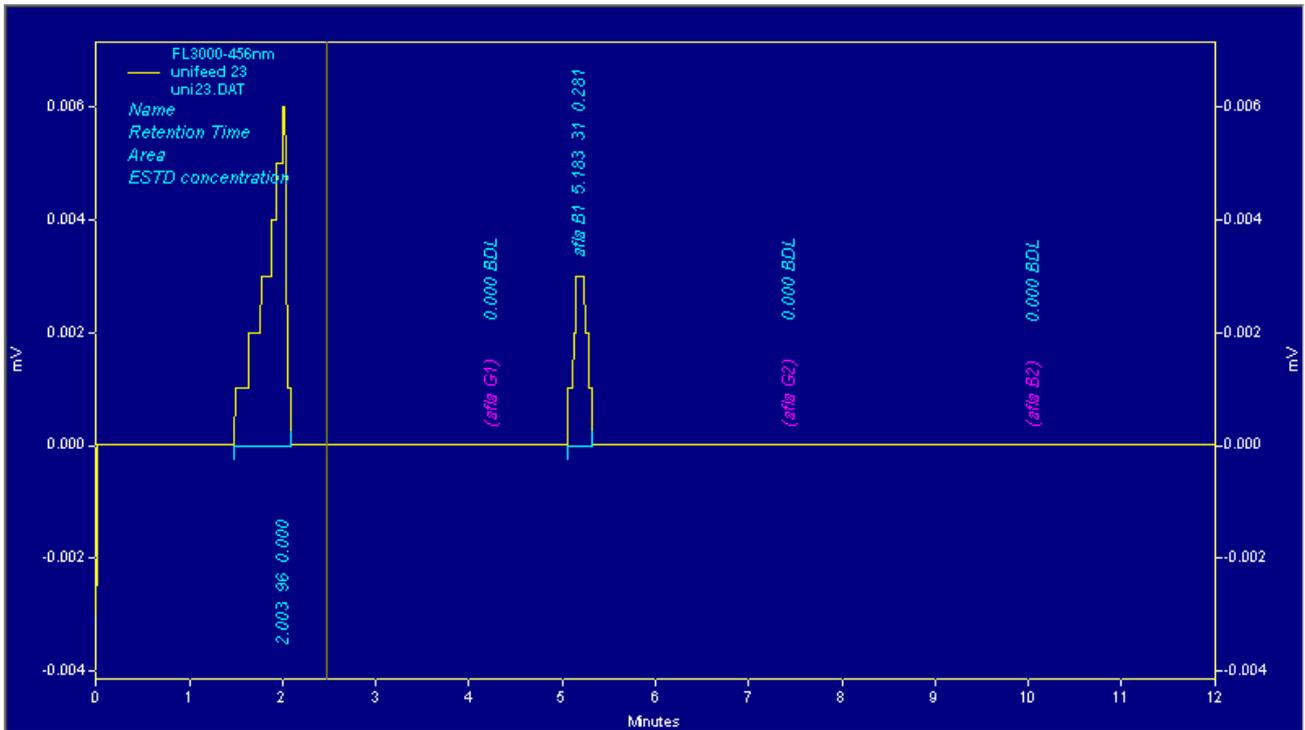
Dall'indagine effettuate nel secondo anno di prova non sono emerse positività per l'aflatossina M<sub>1</sub> nei campioni di latte di massa prelevati nell'arco di tempo tra aprile e settembre 2007. Inoltre, per il periodo aprile-maggio, soltanto nel 22,2% delle aziende utilizzate per l'espletamento della prova e nell'11,1% dei campioni è stata rilevata la presenza di aflatossina B e precisamente nel campione prelevato ad aprile nell'azienda H e in quello effettuato a maggio nell'azienda E (tab. 6).

**Tabella 6. Livelli di aflatossina B<sub>1</sub> nei campioni risultati positivi**

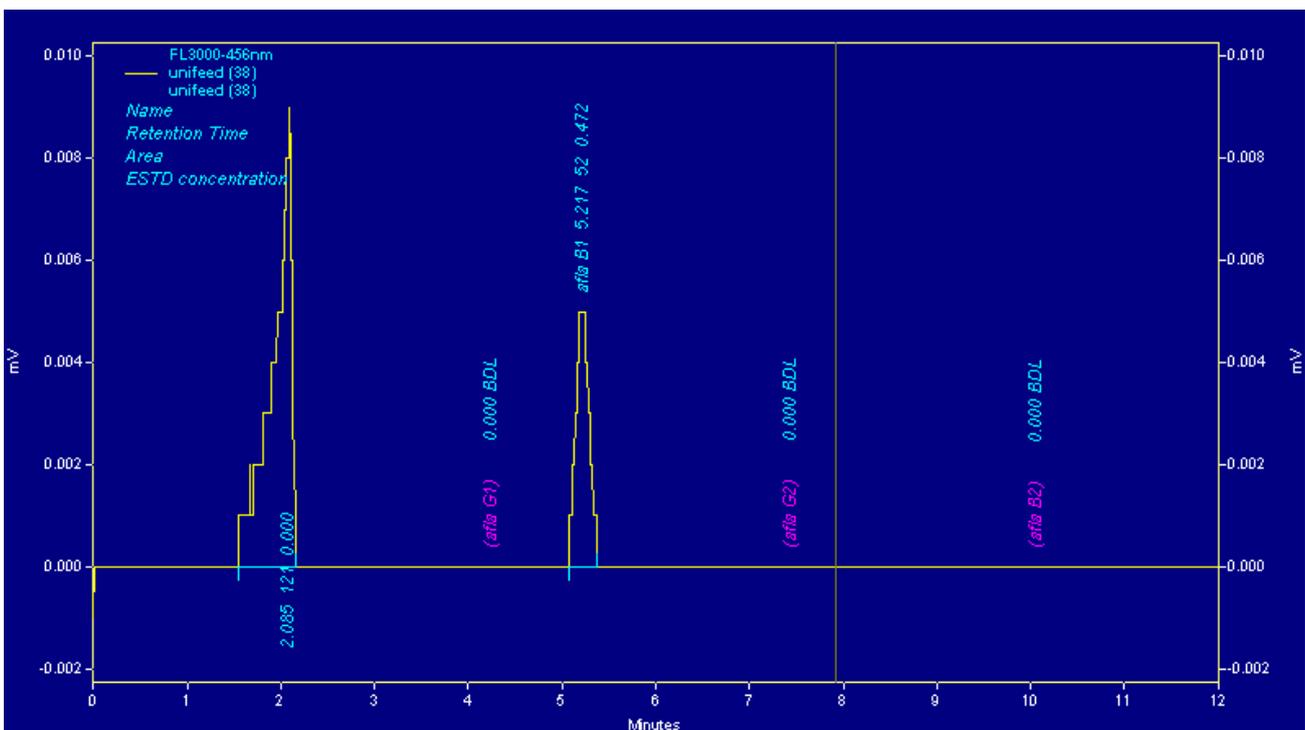
Azienda	Quantità AFB <sub>1</sub> (ppb) sul tal quale	Quantità AFB <sub>1</sub> (ppb) Ingerita/die
H	0,472	19,00
E	0,281	12,00



## Unifeed azienda E: 2° prelievo



## Unifeed azienda H: 1° prelievo



## Terzo anno

Dai dati rilevati in quest'ultimo periodo dedicato all'espletamento della tesi di dottorato è emerso che nella specie ovina e nella specie bufalina non sono state rilevati valori di  $M_1$  superiori a quanto stabilito dal Regolamento (CE) 466/2001 della commissione del 8 marzo 2001 e sue modifiche. Positività ( $> 0,05$  ppb) sono state riscontrate, invece, nel latte bovino nel 5,2% dei casi con valori che hanno oscillato dai 0,051 ai 0,25 ppb. Valori di allerta (0,024-0,05) sono stati accertati nel 4,44% e nel 7,74% rispettivamente dei campioni di latte bufala e di vacca esaminati. L'analisi dei foraggi effettuata nelle aziende in cui sono stati rilevati valori elevati o di soglia di aflatossine  $M_1$  nel latte hanno fatto registrare positività alle aflatossine totali con valori che hanno oscillato da 0,1 a 57 ppb. I principali alimenti contaminati dalle aflatossine totali sono stati i mangimi, i fieni e gli insilati con valori medi rispettivamente di 27,8 ppb, 15,7 ppb e 2,93 ppb. In definitiva i soggetti che hanno presentato positività hanno ingerito dai 100 ai 505 ppb di aflatossine totali al giorno. Valori decisamente inferiori sono stati registrati negli alimenti prelevati nelle aziende con valori soglia, in queste, infatti, i soggetti ingerivano non più di 10 ppb di aflatossine totali al giorno.

Non sono emerse positività alle aflatossine in nessun punto della lavorazione dei mangimi e in nessuna tipologia di industria mangimistica controllata anche se valori leggermente più elevati, ma entro i limiti stabiliti per legge, sono stati registrati nelle industrie non meccanizzate. Analogamente non sono state rilevate positività nei mangimi composti integrati nelle aziende zootecniche clienti dei mangimifici oggetto della prova.

## 13.1 Discussione

Dai risultati ottenuti nella presente indagine, è possibile affermare che il problema riguardante la contaminazione di aflatossine nel settore zootecnico è un problema che investe non solo gli alimenti, e quindi la coltivazione o l'acquisto di materie prime, ma tutta la filiera produttiva.

La maggior parte dei prodotti alimentari di origine vegetale, ed in particolare i cereali, possono andare incontro a contaminazione da funghi durante ogni stadio del ciclo produttivo, in campo o nella fase di immagazzinamento. Nelle nostra esperienza è stato osservato che la contaminazione dei mangimi semplici e composti integrati si è verificata per lo più in seguito ad errori di immagazzinamento nelle aziende zootecniche e all'assenza di trattamenti antifungini normalmente utilizzati nelle industrie mangimistiche nei silos di stoccaggio. La stagione e le modalità di raccolta e stoccaggio dei foraggi utilizzati nel razionamento delle specie in produzione zootecnica hanno probabilmente condizionato i livelli di lieviti, muffe e aflatossine della dieta. In conseguenza della eterogeneità della struttura chimica e del diverso meccanismo di azione, che caratterizzano le micotossine, nonché della diffusione casuale nelle diverse matrici agroalimentari, non si dispone ancora di un metodo di controllo unico, in grado di assicurare la riduzione di ogni tossina presente in qualsiasi derrata agraria. In considerazione dell'elevata resistenza di delle aflatossine ai più comuni mezzi fisici, chimici e/o biologici di preparazione, conservazione e sanificazione dei prodotti alimentari, gli interventi più efficaci contro la loro formazione e diffusione di queste tossine devono essere basati essenzialmente sulla prevenzione della crescita di muffe in ciascuna delle fasi della filiera agro-alimentare.

Nella nostra sperimentazione sono emersi risultati confortanti per la sanità del latte dell'allevamento bufalino, essendo in gran parte mancate positività alle analisi sia dei campioni di latte di massa. Infatti nei due anni di prova nessun campione di latte ha presentato positività, e degli altrettanti unifed esaminati solo in tre aziende nel primo anno e in 2 esaminate nel secondo anno di prova sono emerse contaminazioni da aflatossine.

Tali risultati possono essere attribuiti a diversi fattori, quali:

- Corretta gestione attuata in:
  - Fase di coltivazione;
  - Fase di raccolta, condizionamento e stoccaggio;
  - Valutazione del fornitore e acquisto delle materie prime;
  - Controllo dell'integrità delle partite scaricate e conservate;
  - Pulizia dei silos, trincee, magazzini ed altri luoghi di stoccaggio degli alimenti;
  - Pulizia periodica alle mangiatoie;
  - Verifica presenza infiltrazioni di acqua con conseguente aumento dell'umidità.
  - Minor presenza di granelle nel razionamento del bufalo.

Infatti, la minor richiesta di carboidrati fermentescibili nella dieta delle bufale riduce l'impiego di farine di mais e di altri cereali che notoriamente rappresentano gli alimenti che più facilmente vanno incontro a contaminazione da parte dei funghi produttori di aflatossine;

- Condizioni climatico- ambientali non particolarmente favorevoli alla produzione di alimenti inquinati.

Risultati analoghi sono stati osservati nei pochi campioni effettuati nelle aziende ovine, mentre condizioni allarmanti sono presenti ancora in quelle bovine che nella nostra esperienza risultano, per consistenza di capi, medio-piccole.

Le differenze emerse tra le tre specie, nel terzo anno di prova, sono probabilmente attribuibili alle diverse tecniche di allevamento e alla differente fisiologia digestiva. Gli allevamenti ovini testati sono transumanti e, pertanto, i componenti la razione sono rappresentati dal prato-pascolo, da foraggi affienati e da piccole quantità di mangimi semplici o composti. La maggiore consistenza di capi allevati, registrata nelle aziende bufaline rispetto a quelle bovine, e la conseguente possibilità di rivolgersi a un servizio tecnico specializzato, che orienti l'allevatore nelle scelte agronomiche per migliorare la qualità igienico sanitaria degli alimenti componenti la razione, giustifica l'assenza dei metaboliti delle aflatossine nel latte. In ogni caso va ricordato che la particolare fisiologia digestiva della specie bufalina e, principalmente, le peculiari caratteristiche relative ai tempi di ruminazione che risultano di gran lunga superiori alla specie bovina Campanile et al. (1997), favoriscono la permanenza dei foraggi a livello ruminale e di conseguenza la degradazione della aflatossina B<sub>1</sub>. Nei ruminanti si è osservata, infatti, una minore suscettibilità alle tossicosi rispetto ai monogastrici, grazie ad una maggiore efficacia dei sistemi di detossificazione GSH-dipendenti e grazie alla flora ruminale, che secondo alcuni autori, riveste un ruolo importante nella demolizione delle tossine

ingerite (Hussein e Brasel, 2001). Il ruminale è pertanto una barriera all'assorbimento delle sostanze tossiche grazie alla capacità di alcuni microrganismi, in modo particolare protozoi, di operare una detossificazione, Kiessling et al., (1984), meccanismo che contribuisce a tenere bassi i livelli plasmatici di tossine e derivati (Prelusky et al., 1990).

Nella specie bufalina la maggiore permanenza in sede ruminale degli alimenti contaminati da aflatossina B<sub>1</sub> è indice di una più elevata degradazione della stessa e quindi di un minor assorbimento in sede intestinale. Inoltre il minor livello produttivo di latte della bufala può essere associato favorevolmente ad un minor rischio di contaminazione dei prodotti trasformati, anche se la maggiore concentrazione di grasso suggerisce un più intenso passaggio nel latte dell'aflatoxina B<sub>1</sub>, meno polare rispetto all'aflatoxina M<sub>1</sub> e quindi maggiormente liposolubile.

Risulta fondamentale ricordare che ingestioni di aflatoxine possono, in ogni caso, causare danni epatici più o meno evidenziabili che oltre a procurare riduzioni delle prestazioni produttive e riproduttive non garantiscono il benessere degli animali allevati.

In definitiva la bassa incidenza dei metaboliti dell'aflatoxina B<sub>1</sub> riscontrata nel latte di bufala rappresenta una notevole garanzia igienico-sanitaria per i prodotti trasformati a base di latte proveniente da questa specie ma non garantisce il benessere dei soggetti che ingeriscono razioni i cui componenti risultano contaminati.

## 13.2 Conclusioni

Le problematiche presenti nelle aziende zootecniche ed in quelle dedite all'allevamento della bufala sono molteplici; l'attenta valutazione dei punti critici dell'intera filiera produttiva, a partire dall'azienda zootecnica, rappresenta uno degli obiettivi da perseguire per migliorare la qualità e la vita commerciale del prodotto; tale aspetto attualmente risulta di estrema importanza in quanto i consumi, ormai, travalicano la culla di origine della mozzarella D.O.P..

Nel caso della "Mozzarella di Bufala Campana" risulta essenziale partire da una materia prima ineccepibile sia sotto l'aspetto qualitativo che sotto quello igienico per ottenere un prodotto che mantenga le caratteristiche tipiche della zona di provenienza. L'individuazione e la valutazione dei punti critici dell'allevamento bufalino e la loro correzione, attraverso una migliore gestione della mandria permette un abbassamento dei costi di produzione ed un incremento dei ricavi.

Un possibile approccio alla riduzione del rischio di contaminazione potrebbe essere lo sviluppo di un sistema integrato del tipo HACCP il quale dovrebbe avvalersi dei principi generali delle buone pratiche agricole e delle buone pratiche di produzione, quali:

- il ricorso a cultivar resistenti all'attacco di funghi micotossigeni, appropriate tecniche di irrigazione e fertilizzazione, uso di pesticidi e rotazioni colturali;
- il miglioramento di tecniche post-raccolta, in grado di conservare la sanità dei prodotti e di prevenire la contaminazione da funghi micotossigeni, quali l'essiccamento delle derrate, il trattamento con

agenti antimicrobici (naturali o di sintesi), l'immagazzinamento in atmosfere controllate e in condizioni di bassa temperatura e umidità relativa del substrato;

- lo sviluppo di misure di controllo operanti ad ogni livello ed accettate universalmente capaci di tutelare la salute pubblica e promuovere gli scambi commerciali a livello nazionale ed internazionale;
- il ricorso a pratiche di decontaminazione e/o detossificazione per minimizzare le perdite di derrate contaminate.

Per un razionamento ottimale è innanzitutto necessario poter disporre di alimenti idonei e qualitativamente sicuri, ovvero di materie prime che non compromettano la salute degli animali, non trasferiscano sostanze, odori o sapori sgradevoli al latte e coprano i fabbisogni nutritivi.

Gli alimenti devono essere salubri, esenti da contaminazioni e da residui tossici di vario genere e non devono determinare l'insorgenza negli animali di stati morbosi.

Cura dell'allevatore sarà quella di porre in atto tutte le possibili alternative per la produzione di alimenti di qualità fra le quali brevemente ricordiamo:

- a) l'impiego di specie e varietà foraggere più adatte alle condizioni pedoclimatiche dell'azienda;
- b) l'utilizzo di tecniche colturali appropriate;
- c) la scelta ottimale dell'epoca della raccolta;
- d) la razionale conservazione dei foraggi.

In definitiva sarebbe opportuno educare l'allevatore sulle possibili cause di contaminazione da aflatossine al fine di ridurre il rischio inquinamento negli alimenti da destinare al razionamento degli animali.

La conoscenza dell'entità dell'inquinamento degli alimenti utilizzati rappresenta il primo passo per verificare l'individuazione e la valutazione del rischio, utili ad elaborare programmi di intervento sulle tecniche colturali, sulle modalità di conservazione e sulle quantità di alimenti da somministrare agli animali per evitare danni al consumatore finale e agli stessi animali.

## 14. Bibliografia

1. **Ahmad, M.A.**, Khan, B.A., Shamsuddin, Z.A., Khan, M.A., (1996). Carry-over of aflatoxins in milk and milk products in Pakistan and their possible control. *Toxicon*, **34**, 3, 327.
2. **Alborzi, S.**, Pourabbas, B., Rashidi, M., Astaneh, B., (2006). Aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in pasteurized milk in Shiraz (South of Iran), *Food Control*, **17**, 582-584.
3. **ANZFA**, (1999). Aflatoxin in food: a toxicological review and risk assessment. In: Australia New Zealand Food Authority, eds. Canberra.
4. **ANZFA**, (2006). A Risk Profile of Dairy Products in Australia. In: Australia New Zealand Food Authority.
5. **Asao, T.**, Buchi, G., Adbel-Kadar, M.N., Chang, S.B., Wick, E.L., Wogan, G.N., (1963). *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 1706.
6. **Aspa**, (1999). Commissione Valutazione dell'assetto metabolico degli animali in produzione zootecnica, guida alla interpretazione dei profili metabolici. Università degli Studi di Perugia.
7. **Asplin, F.D.**, Carnaghan, R.B.A., (1961). The toxicity of certain groundnut meal for poultry with special reference to their effect on ducklings and chickens. *Veterinary Record*, **73**, 1215-1219.
8. **Badii, F.**, Moss, M.O., (1988). The effect of the fungicides tridemorph, fenpropimorph and fenarimol on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* Speare. *Letters in Applied Microbiology*, **7**, 37-39.
9. **Bartoli, A.**, Maggi, O., (1978). Four new species of *Aspergillus* from Ivory Coast soil. *Trans Br. Mycol Soc.* **71**, 383-394.
10. **Barug, D.**, van Egmond, H., López Garzía, R., van Osenbruggen, T., Visconti, A., (2004). Meeting the Mycotoxin Menace. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands. 319.

11. **Battacone, G.**, Nudda, A., Palomba, M., Pulina G., (2002). Trasferimento di aflatoxina dalla razione al latte ovino e alla cagliata. *Sci. Tecn. Latt. Cas.*, **53**, 283-293.
12. **Battacone, G.**, Nudda, A., Cannas, A., Cappio Borlino, A., Bomboi, G., Pulina G., (2003). Excretion of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk of dairy ewes treated with different doses of aflatoxin B<sub>1</sub>. *J. Dairy Sci.* **86**, 2667-2675.
13. **Battacone, G.**, Nudda, A., Palomba, M., Pascale, M., Nicolussi, P., Pulina, G., (2005). Transfer of Aflatoxin B<sub>1</sub> from feed to milk and from milk to curd and whey in dairy sheep fed artificially contaminated concentrates, *Journal of Dairy Science* **88**, 3063-3069.
14. **Betina, V.**, (1984). Biochemical effects of mycotoxins. In: Betina, V., Editor *Mycotoxins Production, Isolation, Separation and Purification*, Elsevier, Amsterdam, 37-44.
15. **Bottalico, A.**, (1988). Le micotossine nelle piante e nelle derrate alimentari. *L'Italia Agricola*, 125: 193-212.
16. **Cahagnier, B.**, (1988). Qualité microbiologique des grains et teneur en ergosterol. *Industries Alimentaires et Agricoles*, **105**, 5-16.
17. **Campanile G.**, Di Palo, R., De Filippo, C., Zicarelli, L., (1997). Tempi di ingestione e di ruminazione nella bufala in funzione della distanza dal parto. *Atti XII Congr. Naz. ASPA*, 211-212.
18. **Campbell, T.C.**, Caedo, J.P., Bulatao, J.J., Salamat, L., Engel, R.W., (1970). Aflatoxin M<sub>1</sub> in human urine. *Nature*, **227**, 403-404.
19. **Ceruti, A.**, Ceruti, M., Vigano, G., (1993). *Botanica medica farmaceutica e veterinaria con elementi di biologia vegetale*. Zanichelli, Bologna, Italia.
20. **Cole, R.J.**, Cox, R.H., (1981). *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*. New York, Academic Press, 1-66.
21. **Concon, J.M.**, (1988). *Contaminants and Additives. Food Toxicology. Part B*, Marcel Dekker, Inc., New York, 667-743.

22. **Corbett, W.T.**, Brownie, C.F., Hagler, S.B., Hagler, Jr., W.M., (1987). An epidemiological investigation associating aflatoxin M<sub>1</sub> with milk production in dairy cattle, *Vet. Hum. Toxicol.*, **30**, 5-8.
23. **Coulombe, Jr., R.A.**, (1993). Biological action of mycotoxins. *Journal of Dairy Science*, **76**, 880-891.
24. **Creppy, E.E.**, (2002). Update of survey, regulation and toxic effect of mycotoxins in Europe, *Toxicology Letters, Review* **127**, 19-28.
25. **Davis, N.D.**, Diener, U.L., (1968). Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* from various carbon sources. *Appl. Microbiol.* **16**, 158-159.
26. **Devegowda, G.**,(1999). Micotoxinas: assassinos escondidos nas rações animais. *Feeding Times, New York*, **1**, n. 1, 13-17.
27. **Diekman, M.A.**, Green, M.L., (1992). Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *Journal of Animal Science*, **70**, 1615-1627.
28. **Diener, U.L.**, Cole, R.J., Sanders, T.H., Payne, G.A., Lee, L.S., Klich, M.A., (1987). Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, **25**, 249-270.
29. **D'Mello, J.P.E.**, MacDonald, A.M.C., (1997). Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology*. **69**, 155-166.
30. **Dorner, J.W.**, Cole, R.J., Diener, U.L., (1984). The relationship of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* with reference to production of aflatoxins and cyclopiazonic acid *Mycopathologia*, **87**, 13-15.
31. **Dragacci, S.**, Gleizes, E., Fremi, J.M., Candlish, A.A.G., (1995). Use of immunoaffinity chromatography as a purification step for the determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in cheese. *Food Additives and Contaminants* **12**, 1, 59-65.
32. **Edds, G.T.**, (1979). Aflatoxins in Conference on Mycotoxins in Animal Feeds Grains Related to Animal Health. Shimoda, W., ed. Sponsored by: Bureau of Veterinari Medicine, Food Drug Administration, (USA), 80-164.

33. **Engel, G.**, Hagemester, H., (1978). Untersuchungen über den Verbleib von Aflatoxin B<sub>1</sub> im Verdauungstrakt von Kühen *Milchwissenschaft*, **33**, 21-23.
34. **Ewaidah, E.H.**, (1987). Aflatoxin M in Milk. A Review. *J. King Saud Univ.*, 1: *Agric. Sci.* (1,2), 37-55.
35. **Fan, T.S.L.**, Zhang, G.S., Chu, F.S., (1984). Production and characterization of antibody against aflatoxin Q<sub>1</sub>. *Applied and Environmental Microbiology*, **47**, 526-532.
34. **FAO**, (1997). *Worldwide Regulations for Mycotoxins 1995: A Compendium (FAO Food and Nutrition Paper 64)*, Rome.
36. **Farrer, K.T.H.**, (1987). *A guide to food additives and contaminants*. Carnforth: Parthenon, ISBN1-85070-127-X.
37. **Fedele, V.**, Cifuni, F.G., Sepe, L., Di Napoli, M.A., (2007). Effect of two aflatoxin level treatments on contamination of Mozzarella di Bufala cheese. 8<sup>th</sup> World Buffalo Congress., *Ital. J., Anim. Sci.*, **6**, (Suppl. 2), part 2, 1120-1122.
38. **Fernandez, A.**, Ramos J.J., Saez, T., Verde, M.T., (1995). Changes in the coagulation profile of lambs intoxicated with aflatoxin in their feed. *Vet. Res.*, **26**, 180-184.
39. **Finoli, C.**, Vecchio, A., (2003). Occurrence of aflatoxins in feedstuff, sheep milk and dairy products in Western Sicily. *Ital. J. Anim. Sci.*, **2**, 191-196.
40. **Frobish, R.A.**, Bradley, B.D., Wagner, D.D., Long-Bradley, P.E., Hairston, H., (1986). Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain, *Journal of Food Protection*, **49**, 781-785.
41. **Galagan, J.E.**, Calvo, S.E., Cuomo, C., Ma, L.J., Wortman, J.R., Batzoglou, S., Lee, S.I., Baştürkmen, M., Spevak, C.C., Clutterbuck, J., Kapitonov, V., Jurka, J., Scazzocchio, C., Farman, M., Butler, J., Purcell, S., Harris, S., Braus, G.H., Draht, O., Busch, S., D'Enfert, C., Bouchier, C., Goldman, G.H., Bell-Pedersen, D., Jones, S.G., Doonan, J.H., Yu, J., Vienken, K., Pain A., Freitag, M., Selker, E.U., Archer, D.B., Penalva, M.A., Oakley, B.R., Momany, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Asai K., Machida, M., Nierman, C.W., Denning, D.W., Caddick, M., Hynes, M., Paletti, M., Fischer, R., Miller, B., Dyer, P., Sachs, M.S., Osmani, S.A., Birren, B.W., (2005). Sequencing of *Aspergillus*

nidulans and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*, **438**, 7071, 1105-1115.

42. **Galvano, F.**, Garofalo, V., Galvano, G., (1996). Occurrence and stability of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products a worldwide review, *Journal of Food Protection*, **59**, 1076-1090.

43. **Gaspari, F.**, Piccaglia, R., Borsari, A., Tampieri, A., (2005). Influenza del sequestrante "Atox<sup>TM</sup>-bentonite" sulla riduzione di aflatossina M<sub>1</sub> nel latte. Istituto Superiore di Sanità - Rapporti ISTISAN, 05/42. ISSN 1123-3117.

44. **Geiser, D.M.**, Pitt, J.I., Taylor, J.W., (1998). Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 388-393.

45. **Gerola, F.M.**, Gerola, P.D., (1986). Botanica per i corsi di Medicina Veterinaria e di Scienze della Produzione Animale. Utet, Torino, Italia.

46. **Gimeno, A.**, Martins, M.L., (2000). Residuos de micotoxinas en leche, huevos y tejidos comestibles de aves, cerdos y rumiantes (part. II), *Albéitar*, **37**: 44-46.

47. **Goto, T.**, Wicklow, D.T., Ito, Y., (1996). Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a sclerotium producing *Aspergillus tamaris* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 4036-4038.

48. **Hartley, R.D.**, Nesbitt, B.F., O'Kelly, J., (1963). Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature (London)*, **198**, 1056-1058.

49. **Hesseltine, C.W.**, (1976). Conditions Leading to Mycotoxin Contamination of Foods Feeds. In: *Mycotoxins Other Fungal Related Food Problems*. Rodricks, J.V., ed., American Chemical Society, Washington DC, 1-22.

50. **Hifnawy, M.S.**, Mangoud, A.M., Eissa, M.H., Nor Edin, E., Mostafa, Y., Abouel-Magd, Y., Sabee, E.I., Amin, I., Ismail, A., Morsy, T.A., et al., (2004). The role of aflatoxin-contaminated food materials and HCV in developing hepatocellular carcinoma in Al-Sharkia Governorate, Egypt, *J. Egypt Soc. Parasitol.*, **34**, 479-488.

51. **Holzappel, C.W.**, Steyn, P.S., Purchase, I.F.H., (1966). Isolation and structure of aflatoxins M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub>. *Tetrahedron Lett.*, **25**, 2799-2805.
52. **Howard, S.R.**, Eaton, D.L., (1990). Species susceptibility to Aflatoxin B<sub>1</sub> carcinogenesis. *Cancer Research*. **50**, 615-620.
53. **Hsieh, D.P.H.**, (1987). Modes of action of mycotoxin. *Mycotoxin in food*, Krogh, P., Editor, London, Accademic Press, 149-176.
54. **Hsieh, D.**, Wong, J.J., (1994). Pharmacokinetics and Excretion of Aflatoxins. In: *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural Significance* (Eaton, D.L., Groopman, J., eds), 7388. New York Academic Press.
55. **Hussein, S.H.**, Brasel, J.M., (2001). Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, **167**, 101-134.
56. **Huwing, A.**, Freimund, S., Käppeli, O., Dutler, H., (2001). Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbets. *Toxicology Letters* **122**: 179-188.
57. **JECFA**, (1998). Aflatoxins. Safety and evaluation of certain food additives and contaminants. In: *World Health Organisation*, eds., Geneva.
58. **JECFA**, (2001). Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food (WHO Food Additives, Series n. 47), 56<sup>th</sup> Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Geneva, International Programme on Chemical Safety, World Health Organization.
59. **Kiessling, K.H.**, Pettersson, H., Sandholm, H., Olsen, M., (1984). Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three tricothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 1070-1073.
60. **Klich, M.A.**, Pitt, J.I., (1988). Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **91**, 99-108.
61. **Krogh, P.**, Hald, B., Englund P., Rutqvist, L., Swahn, O., (1974). Contamination of Swedish cereals with ochratoxin A. *Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol. Apr.*, **82**, 2, 301-302.

62. **Krogh, P.**, (1987). *Mycotoxin in Food*. Academic Press, London.
63. **Krogh, P.**, (1987). In *Mycotoxins in Food*, Krogh, P., editor, San Diego, Academic Press, 97.
64. **Kubrak, E.M.**, Novikova, N.V., Zhanybayeva, D.O., Vargina, S.G., (1995). Contamination of Food Products by Mycotoxins in Kyrgyzstan. *Eurotox 95/ Toxicology Letters Supplement 1/78*, 1-88.
65. **Lamplugh, S.M.**, Apeageyi, F., Mwanmut, D.D., Hendrickse, R.G., (1988). Aflatoxins in breast milk, neonatal cord blood and serum of pregnant women. *British Medical Journal* **296**, 968.
66. **Leeson, S.**, Gonzalo, J.D.G., Summers, J.D., (1995). *Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins*. University Books, Guelph, Ontario, Canada.
67. **Lillehoj, E.D.**, (1986). The Aflatoxin in Maize Problem: The Historical Perspective. In *Aflatoxin in Maize. A Proceeding of the Workshop*. Mexico, 13-32.
68. **Machida, M.**, Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K., Arima, T., Akita, O., Kashiwagi, Y., Abe, K., Gomi, K., Horiuchi, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Takeuchi, M., Denning, D.W., Galagan, J.E., Nierman, W.C., Yu, J., Archer, D.B., Bennett, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Fedorova, N.D., Gotoh, O., Horikawa, H., Hosoyama, A., Ichinomiya, M., Igarashi, R., Iwashita, K., Juvvadi, P.R., Kato, M., Kato, Y., Kin, T., Kokubun, A., Maeda, H., Maeyama, N., Maruyama, J., Nagasaki H., Nakajima, T., Oda, K., Okada, K., Paulsen, I., Sakamoto, K., Sawano, T., Takahashi, M., Takase, K., Terabayashi, Y., Wortman, J.R., Yamada, O., Yamagata, Y., Anazawa, H., Hata, Y., Koide, Y., Komori, T., Koyama Y., Minetoki, T., Suharnan, S., Tanaka, A., Isono, K., Kuhara, S., Ogasawara, N., Kikuchi, H.,(2005). Genome Sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, **438**, 7071, 1157-1161.
69. **Martins, M.L.**, Martins, H.M., (2000). Aflatoxin M<sub>1</sub> in raw and ultra high temperature-treated milk commercialized in Portugal, *Food Additives and Contaminants*, **17**, 871-874.
70. **Martins, M.L.**, Martins, H.M., (2004). Aflatoxin M<sub>1</sub> in yoghurts in Portugal. *International Journal of Food Microbiology* **91**, 315-317.

71. **Masri, M.S.**, Paye, J.R., Garcia, V.C., (1969). Analysis for aflatoxin M in milk. *J. Ass. Office, Anal, Chem.*, **51**, 594-600.
72. **Miraglia, M.**, Brera, C., (1999). "Le micotossine". In: "Tossicologia degli alimenti. Captano, A., Dugo, G., Restani, P., Editors, UTET, Torino, Italy. 22-28.
73. **Molinari, M.**, (2000). Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell. Prolif.*, **33**, 261-274.
74. **Nesbitt, B.F.**, O'Kelly, J., Sargeant, K., Sheridan, A., (1962). *Aspergillus flavus* and Turkey. X Disease toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature (London)*, **195**, 1062-1063.
75. **Nierman, W.C.**, Pain, A., Anderson, M.J., Wortman, J.R., Kim, H.S., Arroyo, J., Berriman, M., Abe, K., Archer, D.B., Bermelo, C., Bennet, J., Bowyer, P., Chen, D., Collins, M., Coulsen, R., Davies, R., Dyer, P.S., Farman, M., Fedorova, N., Fedorova, N., Feldblyum, T.V., Fischer, R., Fosker, N., Fraser, A., Garcia, J.L., Garcia, M.J., Goble, A., Goldman, G.H., Gomi, K., Griffith-Jones, S., Gwilliam, R., Haas, B., Haas, H., Harris, D., Horiuchi, H., Huang, J., Humphray, S., Jiménez, J., Keller, N., Khouri, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Konzack, S., Kulkarni, R., Kumagai, T., Lafton, A., Latgé, J.P., Li, W., Lord, A., Lu, C., Majoros, W.H., May, G.S., Miller, B.L., Mohamoud, Y., Molina, M., Monod, M., Mouyna, I., Mulligan, S., Murphy, L., O'Neil, S., Paulsen, I., Penava, M.A., Perteua, M., Price, C., Pritchard, B.L., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Rawlins, N., Rajandream, M.A., Reichard, U., Renauld, H., Robson, G.D., de Cordoba, S.R., Rodriguez-Pena, J.M., Ronning, C.M., Rutter, S., Salzberg, S.L., Sanchez, M., Sanchez-Ferrero, J.C., Saunders, D., Seeger, K., Squares, R., Squares, S., Takeuchi, M., Tekaiia, F., Turner, G., Vazquez de Aldana, C.R., Weidman, J., White, O., Woodward, J., Yu, J.H., Fraser, C., Galagan, J.E., Asay, K., Machida, M., Hall, N., Barrell, B., Denning, D.W., (2005). Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, **438**, 7071, 1151-1156.
76. **Norted, W.P.**, (1979). Effect of ammoniation on the toxicity of corn artificially contaminated with aflatoxin B<sub>1</sub>, *Trop. Sci.* **25**, 139-154.
77. **Northolt, M.D.**, van Egmond, H.P., (1981). Limits of water activity and temperature for the production of some mycotoxins, 4<sup>th</sup> Meeting Mycotoxins in Animal Disease, 106-108.

78. **Oliveira, C.A.F.**, Rosmaninho, J.F., Castro, A.L., Butkeraitis, P., Reis, T.A., Corrêa, B., (2003). Aflatoxin residues in eggs of laying Japanese quail after long term administration of rations containing low levels of aflatoxin B<sub>1</sub>. *Food Additives and Contaminants*, **20**, 7, 648-653.
79. **Ominski, K.H.**, Marquardt, R.R., Sinha, R.N., Abramson, D., (1994). Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi. In: Miller, J.D. e Trenholm, H.L., eds., *Mycotoxins in Grain, Compounds Other Than Aflatoxin*. Eagan Press, St. Paul MN, USA. 287-312.
80. **O'Neil, M.J.**, Smith, A., Heckelman, P.E., (2001). *The Merck Index*, 13<sup>th</sup> ed., Whitehouse Station, Merck, N.J., & Co., 34-35.
81. **Park, D.L.**, Lee, L.S., Koltun, S.P., (1988). Distribution of ammonia treated aflatoxin reaction products in cottonseed meal, *J. Am. Oil Chem. SOC*, **65**, 1071
82. **Paul, R.**, Kalra, M.S., Singh, A., (1976). Incidence of aflatoxins in milk and milk products. *Indian Journal of Dairy Science*, **29**, 318-321.
83. **Peterson, S.W.**, Ito, Y., Horn, B.W., Goto, T., (2001). *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia*, **93**, 689-703.
84. **Patterson, D.S.P.**, Shreeve, B.J., Roberts, B.,A., (1978). Mycotoxin residues in body fluids and tissues of food-producing animals. In: *Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Congress Microbiology*, Munchen, Federal Republic of Germany, Sept.3-8.
85. **Pfohl-Leszkowicz, A.**, (2000). Ecologie des moisissures et des mycotoxines situation en France *Cahier Nutr. Diét.*, **35**, 379-388.
86. **Pietri, A.**, (1998). Micotossine, la situazione odierna in Italia. *Rivista di Avicoltura* 1/2: 32-38.
87. **Pietri, A.**, Piva, G., (2000). Occurrence and Control of Mycotoxins in Maize Grown in Italy *Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Feed Conference*, Food Safety: Current Situation and Perspectives in the European Community. Piacenza, Italy, 27, 28 November, 226-236.

88. **Pietri, A.**, Bertuzzi, T., Fortunati, P., Gualla, A., (2003). Excretion pattern of aflatoxins in buffalo milk and carry-over in mozzarella cheese. *Ital. J. Anim. Sci.*, **2**, (suppl.1), 302-304.
89. **Pietri, A.**, Bertuzzi, T., Pallaroni, L., Piva, G., (2004). Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in Northern Italy. *Food Additives and Contaminants*, **21**, 479-487.
90. **Pitt, J.I.**, (1993). Corrections to species names in physiological studies on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *J. Food Prot.*, **56**, 265-269.
91. **Pitt, J.I.**, Hocking, A.D., Bhudhasamai, K., Miscamble, B.F., Wheeler, K.A., Tanboon-Ek, P., (1994). The normal mycoflora of commodities from Thailand. Beans, rice, small grains and other commodities. *Int. J. Food Microbiol.*, **23**, 35-53.
92. **Pittet, A.**, (1998). Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds an updated review. *Revue de Medicine Veterinaire, Toulouse*, **149**, 6, 479-492.
93. **Piva, G.**, Pietri, A., (1988). Fattori che possono interferire sul rendimento energetico degli alimenti. *Rivista di Avicoltura* 1: 13-22.
94. **Piva, G.**, Battilani, P., Petri, A., (2005). I° Congresso nazionale. Le micotossine nella filiera agroalimentare. Istituto Superiore di Sanità, Roma, 29-30 Nov. 2004. *Rapporti ISTISAN*, **42**, 15.
95. **Piva, G.**, Battilani, P., Pietri, A., (2006). Emerging issues in Southern Europe: aflatoxins in Italy. In: Barug, D., Bhatnagar D., van Egmond H.P., van der Kamp, J.W., van Osenbruggen, W.A., Visconti, A., editors. *The mycotoxin factbook*. The Netherlands: Wageningen Academic Publisher, 39-53.
96. **Polan, C.E.**, Hayes, J.R. Campbell, T.C., (1974). Consumption and fate of aflatoxin B<sub>1</sub> by lactating cows. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, **22**, 4, 635-638.
97. **Prelusky, D.B.**, Scott, P.M., Trenholm, H.L., Lawrence, G.A., (1990). "Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy cows". *J. Environ. Sci. Health*, **1**, 87-103.

98. **Rao, S.B.N.**, Chopra, S.C., (2001). Influence of sodium bentonite and activated charcoal on aflatoxin M<sub>1</sub> excretion in milk of goats, *Small Ruminant Research*, **41**, 203-213.
99. **Rastogi, S.**, Dwivedi, P.D., Khanna, S.K., Das, M., (2004). Detection of aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. *Food Control*, **15**, 287-290.
100. **Reddy, D.V.R.**, Therumala-Devi, K., Reddy, S.V., Walinge, F., Mayo, M.A., Rami Devi, K., et al., (2002). Estimation of aflatoxin levels in selected foods and feeds in India. In: *Food safety management in developing countries*, Montpellier, France. 1-4.
101. **Rodricks, J.V.**, Stoloff, L., (1976). Aflatoxin residue in edible tissues of food producing animals resulting from feed contaminations. *Proceedings-Annual Meeting of the United States Animal Health Association*, **80**, 442-456.
102. **Rodricks, J.V.**, Stoloff, L., (1977). Aflatoxin Residues from Contaminated Feed in Edible Tissues of Food-Producing Animals in *Mycotoxins in Human and Animal Health*, eds. Rodricks, J.V., Hesseltine, C.H., Melhman, M.A., Pathotox Publishers, INC. Park Forest South Illinois, 67-79.
103. **Saito, M.**, Tsuruta, O., Siriacha, P., Manabe, M., (1989). Atypical strains of *Aspergillus flavus* isolated in maize fields. *Jpn. Agric. Res. Q.*, **23**, 151-154.
104. **Sanchis, V.**, Magan, N., (2004). Environmental conditions affecting mycotoxins. In: Magan, N., Olsen, M., Editors, *Mycotoxins in Food*.
105. **Sargeant, K.**, Sheridan, A., Kelly, J.O., Carnaghan, R.B.A., (1961). Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature*, **192**, 1096-1097.
106. **Sargeant, K.**, Sheridan, A., Kelly, J.O., Carnaghan, R.B.A., (1961). *Nature (London)*, **122**, 1096.
107. **Sargeant, K.**, Carraghan, R.B., Allcroft, R., (1963). Toxic products in groundnuts. Chemistry and origin. *Chem. And Ind.*, 53-55.
108. **Sarimehmetoğlu, B.** Küplülü, O., Çelik, T.H., (2003). Detection of aflatoxin M<sub>1</sub> in cheese samples by ELISA. *Food Control* **15**, 45-49.

109. **Sarli, T.A.**, Santoro, A., Anastasio, A., Cortesi, M.L., (1993). *Industrie Alimentari*, 593-599.
110. **Schroeder, H.W.**, Boller, R.A., (1973). Aflatoxin production of species and strains of the *Aspergillus flavus* group isolated from field crops: *Appl. Microbiol.*, **25**, 885-889.
111. **Scott, P.M.**, Lawrence, J.W., Van Walbeek, W., (1970). Detection of mycotoxins by thin layer chromatography, application to screening of fungal extracts, *Applied Microbiology*, **20**, 839-842.
112. **Stubblefield, R.D.**, Pier, A.C., Richard, J.L., Shotwell, O.L., (1983). Fate of aflatoxins in tissues, fluids, and excrements from cows dosed orally with aflatoxin B<sub>1</sub>. *American Journal of Veterinary Research*, **44**, 1750-1752.
113. **Shotwell, O.L.**, (1991). Natural occurrence of aflatoxins in corn. In: *Mycotoxins and Animal Foods*. Smith, J.E., Henderson, R.S., editors. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 325.
114. **Smela, M.E.**, Currier, S.S., Bailey E.A., Essigmann, J.M., (2001). The chemistry and biology of aflatoxin B<sub>1</sub> from mutational spectrometry to carcinogenesis, *Carcinogenesis*, **22**, 535-545.
115. **Smith, E.E.**, Phillips, T.D., Ellis, J.A., Harvey, R.B., Kubena, L.F., Thompson, J., et al., (1994). Dietary hydrated sodium-calcium aluminosilicate reduction of aflatoxin M<sub>1</sub> residue in dairy goat milk and effects on milk-production and components, *Journal of Animal Science*, **72**, 677-682.
116. **Steinhart C.E.**, Doyle M.E., Cochrane, B.A., (1996). *Food Safety*. Marcel Dekker, Inc., New York, USA, 376-394.
117. **Steyen, P.S.**, (1998). The biosynthesis of mycotoxins. *Rev. Méd. Vét.* **149**: 469-478.
118. **Strange, R.N.**, (1991). Natural occurrence of mycotoxins in groundnuts, cottonseed, soya and cassava. In *Mycotoxins and Animal Foods*. Smith, J.E., Henderson, R.S., editors, CRC Press, Boca Raton, FL, 341-362.
119. **Tiecco, G.**, (2001). *Microbiologia dei vari prodotti alimentari di origine animale*. In: Calderini Edagricole, S.r.l., Editor, *Igiene e tecnologia alimentare*, Bologna Italy.102-103.

120. **van Dorp, D.A.**, Van Der Zijden, A.S.N., Beerthuis, R.K., Spaareboom, S., Ord, W., O., De Jong, K., Kenuing, R., (1963). *Rev. Trav. Chim.*, **82**, 587.
121. **van Egmond, H.P.**, (1989). *Mycotoxins in Dairy Products*, London, editor. Oxford, Elsevier Science, 11-55.
122. **Veldman, A.**, Meijst, J.A.C., Borggreve, G.J., Heeres-van der. Tol, J.J., (1992). Carry-over of aflatoxin from cow's food to milk, *Animal Production*, **55**, 163-168.
123. **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.
124. **WHO** (World Health Organization), (2002). Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series 906. Geneva, 1-62.
125. **Williams W.P.**, et al., (2002). Aflatoxin accumulation in conventional and transgenic corn hybrids infested with Southwestern Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, **19**, 4, 227-236.
126. **Wogan, G.N.**, Paglialunga, S., (1974). Carcinogenicity of synthetic aflatoxin M<sub>1</sub> in rats. *Food Cosmet Toxicol.*, **12**, 3, 381-384.
127. **Wood, G.E.**, (1991). Aflatoxin M<sub>1</sub>. In: *Mycotoxins and Phytoalexins*, Sharma, R.P., Salunkhe, D.K., editors, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 145-164.
128. **World Health Organization International Agency for Research on Cancer (IARC)**, (1993). Monograph on Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.
129. **Wyatt, R.D.**, (1991). Poultry. In: *Mycotoxins and animal foods*, Smith, J.E., Henderson, R.S., Editor, CRC Press: Boca Raton, FL., 553-606.
130. **Yiannikouris, A.**, Jouany, J.P., (2002). Mycotoxins in feeds and their fate in animals. *Anim. Res.* 51: 81-99.

131. **Yoshizawa, T.**, (1991). Natural occurrence of mycotoxins in small grain cereals (wheat, barley, rye, oats, sorghum, millet, rice). In: *Mycotoxins and Animal Foods*. J.E., Smith, Henderson R.S., editors. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL., 301-324.
132. **Zaghini, A.**, Lambertini, L., (1995). *Piante e funghi di interesse veterinario. Caratteristiche Botaniche ed Aspetti Farmacologici e Tossicologici*. CLUEB, Bologna Italia.
133. **Zilinskas, R.A.**, (1997). Iraq biological weapons. The past and future, *JAMA (Journal of the American Medical Association)*, **278**, 418-424.
134. **Zinedine, A.**, Gonzalez-Osnaya, L., Soriano, J.M., Molto, J.C., Idrissi, L., Manes, J., (2007). Presence of aflatoxin M<sub>1</sub> in Pasteurised Milk from Marocco, *Food Control*, **114**, 25-29.