

# INDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUZIONE</b>	<b>pag</b>
1.1	<b>Micotossine: aspetti generali</b>	
1.2	<b>Fattori che influenzano la crescita fungina e la biosintesi delle micotossine</b>	
1.3	<b>Micotossine e alimenti</b>	
1.3.1	<i>Produzione di micotossine in campo</i>	
1.3.2	<i>Produzione di micotossine in post-raccolta</i>	
1.3.3	<i>Diffusione delle micotossine nella catena alimentare</i>	
1.4	<b>Diffusione delle principali micotossine nelle produzioni di mais del nord Italia</b>	
1.5	<b>Disposizioni legislative</b>	
<b>2</b>	<b>FITOPATOLOGIE CAUSATE DA <i>FUSARIUM</i> SPP.</b>	
2.1	<b>Tracheofusariosi</b>	
2.2	<b>I marciumi della spiga</b>	
2.3	<b>Interazione <i>Fusarium</i>-pianta: decorso patologico</b>	
2.4	<b>Misure preventive per il contenimento della contaminazione da micotossine</b>	
2.4.1	<i>Preraccolta</i>	
2.4.2	<i>Raccolta</i>	
2.4.3	<i>Postraccolta</i>	
<b>3</b>	<b>MICOTOSINE E MICOTOSSICOSI DI INTERESSE ZOOTECNICO</b>	
3.1	<b>Forme di micotossicosi negli animali</b>	
3.1.1	<i>Micotossicosi acute primarie</i>	
3.1.2	<i>Micotossicosi croniche primarie</i>	
3.1.3	<i>Patologie secondarie conseguenti a micotossicosi</i>	
3.2	<b>Detossificazione biologica</b>	
3.3	<b>Effetti comuni e sensibilità specie specifica</b>	
3.3.1	<i>Fumonisine</i>	
3.3.2	<i>Zearalenone (ZEA)</i>	
3.3.3	<i>Tricoteceni</i>	
3.3.4	<i>Aflatossine</i>	
3.3.5	<i>Ocratossina A</i>	
3.4	<b>Effetti specifici delle micotossine nelle diverse specie animali</b>	
3.4.1	<i>Effetti specifici delle micotossicosi nei suini</i>	
3.4.2	<i>Effetti specifici delle micotossicosi negli avicoli</i>	
3.4.3	<i>Effetti specifici delle micotossicosi negli equidi</i>	
3.4.4	<i>Effetti specifici delle micotossicosi nei ruminanti</i>	
<b>4</b>	<b>PROGETTO SPERIMENTALE MICOSAFE: METODOLOGIE DI ANALISI E RISULTATI DELL'INDAGINE REGIONALE</b>	
4.1	<b>Introduzione</b>	
4.2	<b>Articolazione delle attività</b>	
4.3	<b>Analisi del rischio e valutazione della contaminazione</b>	
4.3.1	<i>Raccolta dei campioni</i>	
4.3.2	<i>Quantificazione della concentrazione di micotossine</i>	
4.3.3	<i>Risultati – Livello di contaminazione in Friuli Venezia Giulia</i>	
4.4	<b>Innovazione delle metodiche analitiche</b>	
4.4.1	<i>Le metodiche tradizionali</i>	
4.4.2	<i>La metodica innovativa: spettroscopia nel vicino infrarosso (NIRS)</i>	
4.4.3	<i>Risultati – L'analisi NIR e il modello previsionale per la contaminazione da fumonisine nella farina di mais</i>	
4.5	<b>Ricadute future del progetto</b>	
<b>5</b>	<b>CONTAMINAZIONE DA MICOTOSSINE NEGLI ALLEVAMENTI: IMPATTO</b>	

## **ECONOMICO E ASPETTI GESTIONALI**

- 5.1** Influenza delle micotossicosi sui costi produttivi e sulla qualità del latte
- 5.2** Gestione degli alimenti contaminati e considerazioni generali

## **6 PRINCIPALI MICOTOSSINE: SCHEDE TECHICHE**

- 6.1** Fumonisina B1 (FB1)
- 6.2** Zearalenone (ZEA)
- 6.3** Tossina T-2 (T-2)
- 6.4** Deossinivalenolo (DON)
- 6.5** Ocratossina A (OTA)
- 6.6** Aflatossina B1 (AFB1)

## **1. INTRODUZIONE**

**Torelli E., Sandri M. e Firrao G.**

### **1.1 Micotossine: aspetti generali**

La maggior parte dei prodotti alimentari di origine vegetale, ed in particolare i cereali, possono subire contaminazioni fungine durante ogni stadio del ciclo produttivo, dal campo alla fase di immagazzinamento, qualora si presentino le condizioni favorevoli alla crescita dei funghi.

Lo sviluppo di questi microrganismi può avere molteplici implicazioni, in particolare economiche e sanitarie, e portare oltre che ad una riduzione della quantità e della qualità delle derrate, anche alla formazione di micotossine, ovvero metaboliti fungini secondari dotati di attività tossica.

Nei miceti, come nella maggior parte degli altri organismi, sostanze a basso peso molecolare vengono utilizzate per la crescita nel corso del cosiddetto metabolismo primario. Quando lo sviluppo attivo rallenta o cessa i miceti rispondono con una serie di processi di differenziazione morfologica e biochimica.

Un aspetto della differenziazione biochimica è rappresentato dalla produzione di una serie di metaboliti secondari, anch'essi a basso peso molecolare, spesso caratterizzati da una notevole attività biologica che spazia dalla antibiosi alla fitotossicità ed alla tossicità nei confronti dell'uomo e degli animali. A quest'ultimo gruppo di metaboliti secondari appartengono le micotossine, attive nei confronti dell'uomo e degli animali a sangue caldo e caratterizzate da alcuni aspetti comuni:

- vengono prodotte in modo ottimale dopo una fase di crescita e spesso, anche se non sempre, sono associate a cambiamenti morfologici come la sporulazione;
- sono sintetizzate solo da un ristretto numero di specie e la loro produzione è specifica a livello di genere, specie o addirittura ceppo;
- la loro formazione prevede l'intervento di enzimi codificati da geni specifici;
- non sono essenziali per la crescita.

In qualità di contaminanti dei mangimi destinati alle specie da reddito le micotossine rappresentano un problema sanitario di primaria importanza.

Gli attuali controlli di qualità e l'applicazione di standard internazionali per la coltivazione dei cereali, dei semi oleosi e delle foraggere, oltre che le moderne tecniche di preparazione dei mangimi hanno in larga misura ridotto la comparsa di micotossicosi a carattere epidemico. Esiste tuttavia notevole preoccupazione relativamente ai fenomeni di tossicità cronica, in quanto molte micotossine sono noti carcinogeni, estrogeni ed agenti immunosoppressivi.

Il sistema immunitario rappresenta un bersaglio comune a diverse tossine fungine e perciò infezioni batteriche, virali o parassitarie possono rappresentare la conseguenza di una malattia

primaria indotta da micotossine.

Le derrate alimentari più a rischio di contaminazione diretta, derivante dallo sviluppo del fungo direttamente sul prodotto, sono rappresentate da cereali (mais, frumento, orzo e avena), semi oleaginosi, spezie, frutta secca, cotone, manioca e cocco.

La contaminazione indiretta dei prodotti di origine animale (latte, carne, uova e formaggi) avviene in seguito al fenomeno del "carry over", durante il quale le micotossine presenti nei mangimi contaminati vengono ingerite e depositate nei tessuti (carne) od escrete (latte).

Le micotossine di maggiore rilevanza per la salute dell'uomo e degli animali sono prodotte da funghi appartenenti a generi cosmopoliti quali *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, come riportato in Tabella 1.

**Tabella 1 – Principali funghi produttori di micotossine**

<b>Micotossina</b>	<b>Principali funghi produttori</b>
Aflatossine (AF)	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>
Ocratossina A (OTA)	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. niger</i> , <i>P. verrucosum</i>
Patulina	<i>P. expansum</i> , <i>P. vulpinum</i> , <i>P. griseofulvum</i>
Fumonisine (FB1 e FB2)	<i>F. verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. subglutinans</i> , <i>F. dlamini</i> , <i>F. napiforme</i> , <i>F. nygamai</i>
Zearalenone (ZEA)	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i>
Deossinivalenolo (DON)	<i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i>
Nivalenolo (NIV)	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i>
Moniliformina (MON)	<i>F. acuminatum</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. subglutinans</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. chlamydosporum</i>
Tossina T-2 (T-2)	<i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. acuminatum</i>

I generi *Aspergillus* e *Penicillium* sono diffusi in tutti gli ambienti e sono generalmente saprofiti, ovvero si sviluppano a carico di sostanza organica non più viva come i residui colturali. Vengono comunemente definiti funghi "di magazzino", ovvero contaminanti di derrate e prodotti alimentari durante le fasi di lavorazione, essiccamento e magazzinaggio.

Questi due generi fungini presentano una differente distribuzione geografica, che riflette le diverse condizioni ambientali necessarie alla loro crescita e al metabolismo secondario. Ad esempio alcuni funghi del genere *Aspergillus* si sviluppano rapidamente in ambienti caldi e umidi, mentre altri del genere *Penicillium* prediligono climi temperati.

Le micotossine prodotte da *Aspergillus* prevalgono quindi nei prodotti provenienti da ambienti tropicali, mentre le tossine prodotte da ceppi fungini appartenenti al genere *Penicillium* sono più frequenti nei prodotti tipici dei climi temperati.

I funghi del genere *Fusaria*, anch'essi ubiquitari, non tollerano invece la siccità e le alte temperature, mentre si sviluppano rapidamente in condizioni di forte umidità e con temperature miti, motivo per cui sono comunemente denominati "funghi di campo" (Hussein e Brasel, 2001).

L'appartenenza dei diversi miceti alle categorie "di campo" o "di magazzino" non può comunque essere considerata univoca o assoluta, in quanto ad esempio la contaminazione di una partita di granella da parte di un fungo "di magazzino" spesso avviene in campo, per contatto con il suolo o con detriti. D'altra parte la presenza di micotossine originate da questi funghi può essere rilevata sui prodotti ancora prima della loro raccolta, qualora le condizioni ambientali ne favoriscano la biosintesi.

## **1.2 Fattori che influenzano la crescita fungina e la biosintesi delle micotossine**

La contaminazione fungina dei prodotti destinati all'alimentazione dell'uomo e degli animali è un problema di difficile risoluzione, in quanto la stabilità termica delle micotossine permette loro di preservarsi durante la preparazione degli alimenti.

L'assenza di muffe in un substrato non è inoltre sempre indice di assenza delle tossine, e viceversa la presenza di ceppi fungini micotossigeni non implica necessariamente la presenza di micotossine, che vengono sintetizzate solo qualora si verificano opportune condizioni biosintetiche (Pitt et al., 2000).

I principali fattori che influenzano la produzione di micotossine possono essere:

- di tipo intrinseco, ovvero legati al ceppo fungino;
- di tipo estrinseco, rappresentati cioè dall'insieme delle condizioni ecologiche dell'ambiente determinanti per lo sviluppo fungino e per la produzione di micotossine;
- di tipo chimico, fisico-chimico e fisico, quali l'attività dell'acqua ( $a_w$ ) e la natura del substrato, la temperatura e la composizione gassosa dell'ambiente e i danni meccanici alle cariossidi;
- di tipo biologico, quali gli insetti (sia come vettori delle spore fungine che come agenti delle lesioni alle cariossidi, vie preferenziali per l'insediamento fungino), la microflora presente (con risultante competizione tra le specie fungine), lo stress della pianta (siccità) e la resistenza del substrato, intesa sia come resistenza genetica sia come integrità delle cariossidi (Haouet e Altissimi, 2003).

Il presupposto fondamentale per la produzione di micotossine, considerando i fattori di diversa natura sopra riportati, è costituito dall'insieme delle caratteristiche ambientali, che ovviamente devono essere favorevoli alla crescita fungina.

I fattori che maggiormente influenzano lo sviluppo fungino sono l'attività dell'acqua ( $a_w$ ), la temperatura, il pH e l'ossigeno. La conoscenza di queste variabili e delle esigenze dei diversi funghi è di fondamentale importanza per la messa a punto di strategie di prevenzione che ambiscano a limitare la produzione di micotossine negli alimenti ostacolando la crescita dei funghi produttori.

Per tutti gli scambi metabolici i microrganismi necessitano di acqua e ogni sottrazione di questo

elemento comporta un ritardo nello sviluppo.

L'acqua da un punto di vista chimico può essere legata a differenti substrati quali sali, zuccheri e proteine, ed in questa condizione non è più disponibile per lo sviluppo microbico. L'aumento della concentrazione delle sostanze in grado di trattenere l'acqua comporta la diminuzione della tensione del vapore, che risulta direttamente proporzionale alla quantità d'acqua effettivamente a disposizione dei microrganismi. Come misura dell'acqua disponibile è stato introdotto il concetto di attività dell'acqua  $a_w$ .

L'acqua pura possiede un valore di  $a_w$  uguale a 1 e qualsiasi aggiunta di sostanze in grado di legare acqua fa sì che il valore di  $a_w$  risulti inferiore a 1 (Kramer, 1990). In generale si può considerare che il valore minimo di  $a_w$  per la crescita della maggior parte delle muffe sia pari a 0,80.

L'*Aspergillus flavus* può tollerare condizioni di relativa siccità e riesce a sopravvivere con valori di  $a_w$  prossimi a 0,78, sebbene gli accrescimenti maggiori si verifichino con disponibilità idriche superiori. Il *Fusarium verticillioides* è invece molto esigente per quanto riguarda la disponibilità di acqua e, nonostante riesca a sopravvivere ad  $a_w$  di 0,87-0,88, gli accrescimenti maggiori si verificano con  $a_w$  attorno a 0,96-0,98.

Come si può notare osservando i valori riportati in Tabella 2, la disponibilità di acqua richiesta per la crescita fungina è differente da quella necessaria per la biosintesi di micotossine.

**Tabella 2 – Valori di  $a_w$  necessari per la crescita e la tossinogenesi di alcune specie fungine**

Specie fungina	Crescita ( $a_w$ )		Tossinogenesi ( $a_w$ )	
	Minimo	Optimum	Minimo	Optimum
<i>A. flavus</i>	< 0,80	0,99	0,82	0,95 – 0,99
<i>A. parasiticus</i>	0,84	0,99	0,82	0,95 – 0,99
<i>A. ochraceus</i>	0,77	0,99	0,80	0,95 – 0,99
<i>P. verrucosum</i>	0,80			
<i>F. verticilloides</i>	0,87		0,90	
<i>F. graminearum</i>	0,90		0,97	
<i>F. moniliforme</i>	0,87		0,92	
<i>F. proliferatum</i>	0,87		0,92	

Da: Northolt et al., 1977; Pitt e Miscamble, 1995; ICMSF, 1996; Kozakiewicz e Smith, 1994; Pitt e Christian, 1968; Adebajo et al., 1994.

Per quanto concerne le condizioni termiche necessarie allo sviluppo, i funghi possono essere raggruppati in tre grandi categorie:

- psicrofili (amanti del freddo);
- mesofili (che si sviluppano a temperature moderate);
- termofili (amanti del caldo).

Nonostante questa prima classificazione è opportuno sottolineare che gli intervalli termici a cui fanno riferimento queste categorie sono diversi da quelli indicati per la crescita dei batteri, nel senso che pochi funghi crescono a 37 °C (temperatura del corpo umano e di sviluppo batterico ottimale).

In massima parte i funghi sono mesofili, sviluppandosi entro i 10 e i 35 °C, benché con tolleranze diverse all'interno di questo intervallo e con valori ottimali tra 20 e 30 °C, anche se per indagini di routine quasi tutti i funghi possono essere coltivati a temperatura ambiente (22-25 °C) (Deacon, 2000).

Indicazioni più dettagliate sulle esigenze termiche di alcune specie fungine sono fornite in Tabella 3.

**Tabella 3 – Valori di temperatura necessari per la crescita e la tossinogenesi di alcune specie fungine**

Specie fungina	Temperatura di crescita (°C)		Temperatura tossinogenesi (°C)	
	Intervallo	Optimum	Intervallo	Optimum
<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	da 10/12 a 42/43	da 32 a 38	da 12 a 40	
<i>A. ochraceus</i>	da 8 a 37	da 24 a 37	da 12 a 37	31
<i>P. verrucosum</i>	da 0 a 31	20		
<i>F. verticilloides</i>		da 22,5 a 27,5		da 15 a 30
<i>F. graminearum</i>		da 24 a 26		da 18 a 29,5
<i>F. sporotrichioides</i>	da -2 a 35	da 22,5 a 27,5		
<i>F. culmorum</i>	da 0 a 31	21		25
<i>F. proliferatum</i>	da 2/5 a 32/37	da 22,5 a 27,5	> a 25 che a 30	

Da: ICMSF, 1996; Koehler et al., 1985; Pitt e Hocking, 1997; Sweeney et al., 1998.

Per quanto riguarda il pH, su substrati colturali tamponati molti funghi si sviluppano nell'intervallo tra 4,0-8,5 o talora anche tra 3,0-9,0, e mostrano optimum di crescita relativamente ampi, tra 5,0 e 7,0.

Diversi funghi, fra i quali alcune specie di *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, sono acido tolleranti in quanto capaci di crescere anche a pH 2,0, ma con un optimum in coltura pari a 5,5-6,0 (Deacon, 2000).

I valori di pH specie-specifici dei funghi di principale interesse per i prodotti alimentari sono riportati in Tabella 4.

**Tabella 4 – Valori di pH necessari per la crescita e la tossinogenesi di alcune specie fungine.**

Specie fungina	Crescita pH		Tossinogenesi pH	
	Minimo	Optimum	Minimo	Optimum
<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	2.1	3.5 – 8.0	3.5	6.0
<i>A. ochraceus</i>	2.2	3.0 – 10.0		
<i>P. verrucosum</i>	2.1	6.0 – 7.0		

Da: Buchanan e Ayres, 1976; ICMSF, 1996; Wheeler et al., 1991

Considerando infine l'ossigeno, quasi tutti i funghi sono organismi aerobi stretti, che necessitano cioè di ossigeno almeno in una fase del ciclo vitale (Deacon, 2000).

### 1.3 Micotossine e alimenti

#### 1.3.1 Produzione di micotossine in campo

Le condizioni essenziali per la produzione di micotossine in preraccolta sono diverse, ma sicuramente le più importanti sono la presenza contemporanea di un fungo tossigeno, di un ospite suscettibile e delle condizioni climatiche idonee allo sviluppo del fungo (Bilgrami e Choudhary, 1998).

I fattori che favoriscono lo sviluppo dei funghi in campo includono un alto grado di umidità relativa (maggiore del 70%) e forti escursioni termiche. Oltre ai fattori climatici l'aggressione della pianta ospite da parte degli insetti è particolarmente predisponente nei confronti dell'infezione.

Le piante presentano dei meccanismi naturali di resistenza, ma in condizioni di stress quali carenze minerali, aumento della salinità del suolo, attacco da insetti e stress idrico possono diventare suscettibili. Tra i meccanismi di difesa da parte delle piante possiamo ricordare la produzione di tossine, modulabile grazie a differenti sistemi enzimatici. In realtà pare che tali sostanze vengano progressivamente traslocate dal sito di produzione al baccello ed al fusto e quindi alle foglie (Haouet e Altissimi, 2003), compromettendo quindi parte della loro funzione.

L'infezione della pianta è più frequente nella fase dell'antesi (apertura del fiore) ed è necessario che la superficie vegetale sia umida per 48-60 ore a temperatura non inferiore ai 15 °C.

Fra i ceppi fungini che frequentemente attaccano le piante in campo, quelli appartenenti al genere *Fusarium* presentano delle esigenze termiche comprese tra i 5 ed i 30 °C con un optimum a 25 °C, richiedono un'umidità relativa ambientale piuttosto elevata e sono in grado di persistere a lungo

nel suolo e nei residui dei tessuti vegetali che permangono a terra dopo la mietitura.

Il genere *Aspergillus* (in particolare *A. flavus* e *A. parasiticus*) possono sintetizzare le aflatossine su qualsiasi pianta infettata, ma il pericolo esiste soprattutto nelle regioni a clima tropicale o simile. Elevati livelli di contaminazioni da aflatossine sono stati osservati in genere su mais, arachidi e uva, mentre altre leguminose come soia e fagiolo, e altri cereali quali sorgo, frumento, orzo, avena e riso sono normalmente resistenti.

In linea generale l'alto contenuto di micotossine nei cereali sembra correlato ad alti livelli di umidità in campo, in particolare durante l'ultima fase di accrescimento e prima della raccolta.

### 1.3.2 Produzione di micotossine in post-raccolta

I funghi cosiddetti "di magazzino" normalmente si rinvergono dopo la raccolta ed alcuni di essi, isolati da insilato, sono in grado di svilupparsi anche in condizioni di parziale anaerobiosi e di pH basso, anche se in questo caso il loro potenziale di sopravvivenza è limitato dalla competizione con i batteri anaerobi. In genere lo sviluppo dei funghi di magazzino è favorito da valori di pH della massa insilata piuttosto alti, condizione dovuta ai lieviti consumatori di acido lattico che si attivano con l'introduzione di ossigeno al momento dell'apertura del silos.

Per quel che riguarda le granelle è necessario tenere in debita considerazione le condizioni che si possono instaurare quando le cariossidi vengono disposte in cumuli dal post-raccolta fino all'essiccazione. Durante questo periodo i semi non essiccati, per effetto della loro stessa respirazione, si riscaldano instaurando nella massa condizioni caldo-umide favorevoli allo sviluppo fungino e alla sintesi di micotossine la cui concentrazione risulta di conseguenza essere proporzionale ai tempi di attesa in essiccatoio, all'umidità del prodotto e alla temperatura ambientale (Ferrero, 1997; Bertocini et al., 2002).

Studi condotti da Blandino et al. (2008) nel triennio 2002-2004, per verificare l'influenza delle condizioni di pre-stoccaggio del mais non essiccato sulla contaminazione fungina e la relativa produzione di micotossine, hanno permesso di riscontrare un aumento della contaminazione con il procedere della permanenza della granella nei cumuli umidi, differenti crescite delle diverse specie e produzione di diverse tossine in funzione dell'aumento della temperatura. Le nuove condizioni che si vengono via via a creare nei cumuli sfavoriscono infatti le specie prevalenti nel corso della maturazione della granella in campo, favorendone altre di natura termofila e saprofitaria. In relazione all'aumento della temperatura è stata inoltre osservata una diminuzione delle infezioni da parte di ceppi appartenenti al genere *Fusarium*, in particolare *F. verticillioides*, prevalente al momento della formazione dei cumuli (2-3 ore dalla trebbiatura), a cui è corrisposto un aumento della presenza di *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp..

Mentre la sintesi delle micotossine da *Fusarium* avviene principalmente durante la fase di coltivazione, la produzione di aflatossine e ocratossina ad opera rispettivamente di *Aspergillus* e

*Penicillium* si verifica soprattutto durante lo stoccaggio degli alimenti.

Al contrario di quanto si verifica durante la coltivazione (formazione di aflatossine in paesi tropicali e subtropicali), la sintesi delle aflatossine durante l'immagazzinamento può avvenire anche nelle zone temperate e più fredde.

L'umidità della granella al momento dell'allestimento dei cumuli ed i tempi di attesa prima dell'essiccamento hanno una grande influenza sulla produzione e la presenza di micotossine in stoccaggio. Valori di umidità di raccolta superiori al 24-26% determinano infatti una più rapida fermentazione e un deterioramento della massa e l'aumento del rischio di tossinogenesi e di conseguente contaminazione. Al contrario la granella raccolta con valori di umidità del 20-22% risulta notevolmente più stabile e quindi con minori rischi di inquinamento (Blandino et al., 2008). Sfortunatamente data la grande varietà di fattori predisponenti lo sviluppo dei funghi, le micotossine sono in grado di contaminare la maggior parte degli alimenti ad uso zootecnico. Sono soggetti a sviluppo fungino gli insilati di mais, attualmente maggiori responsabili delle contaminazioni, e altre materie prime quali mais, orzo, grano, semi di cotone e sorgo, oltre che loro sottoprodotti conservati o manipolati in modo non corretto.

### *1.3.3 Diffusione delle micotossine nella catena alimentare*

Uno degli aspetti più preoccupanti dell'inquinamento da micotossine riguarda la possibilità che queste sostanze possano arrivare, attraverso i diversi passaggi della catena alimentare, in una derrata destinata al consumo umano normalmente ritenuta non a rischio di sviluppo fungino.

Tra gli alimenti di origine animale il latte è uno dei prodotti in cui la migrazione di aflatossine è più consistente, qualora le bovine assumano alimenti molto contaminati. Le aflatossine sono dei derivati della cumarina e subiscono nel fegato una trasformazione in metaboliti polari, generalmente meno tossici, che possono essere eliminati attraverso l'urina. Nonostante ciò durante la detossificazione può esserci la formazione di un prodotto secondario molto reattivo in grado di legarsi covalentemente, oltre che alle molecole di RNA e DNA, anche alle proteine cellulari. Ne consegue la comparsa di molecole idrossilate delle aflatossine B1 e B2, denominate M1 e M2 e associate alle proteine del latte, che possono quindi essere ritrovate in seguito anche nei prodotti lattierocaseari.

Il tasso di carry-over (trasferimento) nel latte della AFB1 ingerita è influenzato da numerosi fattori. Nelle bovine può variare da meno dell'1 al 3% (Sieber et al., 1978; Veldman et al., 1992) con punte fino al 6% riportate all'inizio della lattazione (Pitet, 1998). Alcuni autori hanno elaborato equazioni di previsione della contaminazione del latte partendo dalla quota ingerita (Veldman et al., 1992), ma spesso i risultati ottenuti matematicamente non corrispondono al reale livello di inquinamento e a quanto riscontrato durante prove sperimentali.

La cinetica e il metabolismo delle tossine funginee negli animali lattiferi sono influenzati da

numerosi fattori difficilmente standardizzabili (Van Eijkeren et al., 2006) tra cui:

- livello e fonte di contaminazione
- concentrazione della tossina nella razione
- ingestione giornaliera complessiva di alimento e ingestione di tossina
- livello di assorbimento intestinale della tossina
- funzionalità epatica
- quota di tossina escreta per altre vie (urina) o metabolizzata a composti non tossici
- stadio di lattazione
- razza e livello produttivo
- variabilità individuale

Gli stessi autori considerate queste variabili hanno elaborato una serie di equazioni per prevedere, partendo dall'ingestione e dal livello produttivo piuttosto che dalla contaminazione della razione, la corrispondente contaminazione del latte o dell'alimento.

Nonostante i risultati non sempre coerenti pare comunque che il limite di contaminazione da AFB1 della razione imposto dai regolamenti comunitari (5 µg/kg) garantisca la sicurezza del latte e il rispetto del relativo limite di contaminazione da AFM1 (0,05 µg/kg) (Van Eijkeren et al., 2006), anche se Veldman et al. (1992) consiglia un limite massimo di contaminazione della razione pari a 4 µg/kg.

I rischi di carry-over di altre micotossine nel latte sembrano fortunatamente minori. Nel latte di bovine alimentate con una razione contenente 75 ppm (mg/kg) di fumonisina B1 non sono state trovate tracce della tossina (Richard et al., 1996) e la perfusione della tossina in mammella non ha provocato un trasferimento nel latte tale da poter essere considerato un rischio per la salute umana (Spotti et al., 2001).

Tra i tricoteceni sembra che nè il DON nè il suo maggiore metabolita DOM-1 vengano escreti nel latte, nemmeno partendo da livelli di contaminazione della dieta di 6,4 ppm (mg/kg) protratti per 10 settimane (Charmley et al., 1993).

La tossina T-2 è stata invece individuata nel latte bovino in seguito a prove sperimentali (Robinson et al., 1979; Yoshizawa et al., 1981) con dosaggi di tossina comunque difficilmente raggiungibili in condizioni normali negli alimenti, a meno di una evidente contaminazione da muffe. Per questa tossina pare dunque non esserci un rischio concreto per la salute dei consumatori (Robinson et al., 1979; Eriksen e Pettersson, 2004), anche se probabilmente saranno necessari ulteriori studi per valutare il trasferimento non solo della tossina tal quale, ma anche dei suoi derivati e metaboliti nel latte.

Anche il rischio di trasferimento al latte dell'OTA o del suo idrolisato OTA-α sembra essere molto

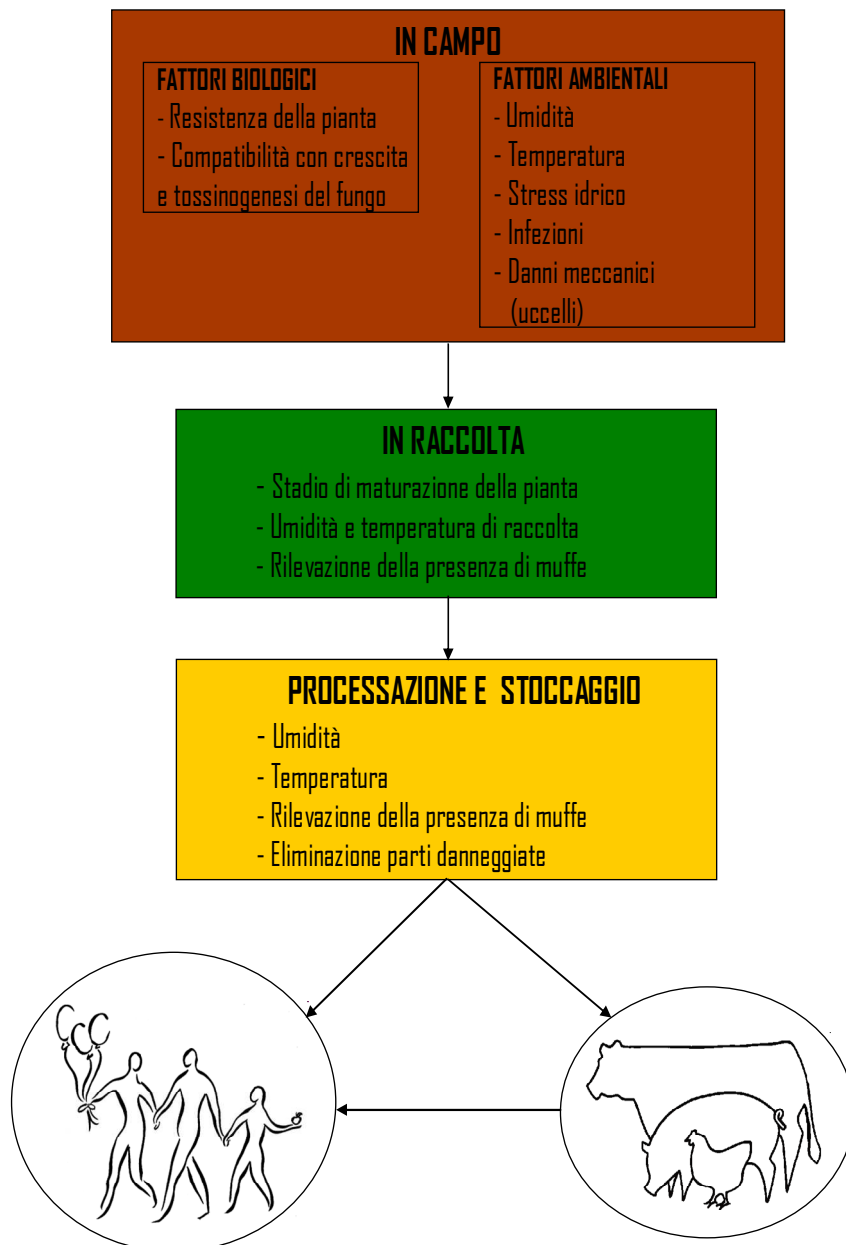
basso anche in presenza di contaminazioni massive, dato che l'inquinamento del latte in ogni caso risulta largamente al di sotto delle disposizioni legislative relative agli alimenti destinati al consumo umano (Ribelin et al., 1978; Boudra et al., 2007).

Per lo zearalenone non sono previsti limiti di contaminazione e gli autori di diversi studi hanno concluso che il latte bovino non costituisce una possibile fonte dello zearalenone o dei suoi derivati (Sundlof e Strickland, 1986).

Per quanto riguarda le uova, la contaminazione da micotossine è piuttosto rara e deriva generalmente dalla somministrazione di mangimi fortemente inquinati. Per la migrazione delle aflatossine ad esempio è stato calcolato un fattore di conversione pari a 2200 (occorrono cioè 2200 ppb nei mangimi per ritrovare 1 ppb di tossina nelle uova deposte) (Haouet e Altissimi, 2003).

In seguito a queste considerazioni appare evidente che gli aspetti che portano a considerare le micotossine come un problema di primaria importanza per la salute dell'uomo e degli animali sono molteplici e di varia natura. Nella prima parte della catena alimentare comprendono la diffusione degli organismi in grado di produrre micotossine, la capacità di adattamento di tali organismi (capaci di svilupparsi sui substrati più svariati) e il rischio di contaminazione in preraccolta, in raccolta e in post raccolta. Oltre al rischio di contaminazione dei prodotti destinati all'alimentazione dell'uomo e degli animali è necessario tenere conto anche della possibilità che queste tossine si accumulino nell'organismo degli animali da reddito e vengano successivamente trasferite nei prodotti derivati.

**Figura – 1: Fattori che influenzano la presenza delle micotossine nella catena alimentare**



#### 1.4 Diffusione delle principali micotossine nelle produzioni di mais del nord Italia

Data la crescente attenzione nei confronti dei rischi associati alle micotossine, nell'ultimo decennio si sono realizzate numerose indagini per valutare la loro diffusione in differenti aree geografiche. Pietri et al. in uno studio del 2004, relativo al mais coltivato in Nord Italia, hanno rilevato livelli sempre molto bassi di aflatoossina B1, mentre la fumonisina B1 è risultata presente in tutti i campioni a livelli estremamente variabili, compresi tra 62 e 51690 µg/kg. In alcuni casi il mais campionato è risultato dunque non conforme a tutte le categorie di alimenti destinati all'uomo, e inoltre poco al di sotto del limite previsto per le materie prime destinate all'alimentazione animale. Nel corso di un'altra indagine europea (SCOOP 3.2.10) svoltasi nel 2003 sono è stato raccolto qualche migliaio di campioni di cereali e derivati per valutare l'incidenza di *Fusarium* tossine (FB1, FB2 e FB3). I paesi interessati sono stati l'Austria, il Belgio, la Germania, la Francia, l'Italia, i Paesi

Bassi, la Svezia e il Regno Unito. Dei 1147 campioni provenienti da 4 zone italiane differenti (nordovest, nordest, centro e sud) tutti quelli costituiti da mais sono risultati positivi alla FB1 con valori compresi tra 64 e 10200 mg/Kg. Nella maggior dei campioni (88.9%) è stata rintracciata anche la FB2. Coerentemente Reyneri e Blandino (2003) hanno concluso che l'86% del mais raccolto in quell'anno era risultato contaminato da fumonisine, e che era ipotizzabile che i livelli di contaminazione potessero raggiungere diverse ppm.

In Friuli Venezia Giulia un'indagine condotta dal 2002 al 2006 ha permesso di constatare come raramente la granella di mais raccolta in regione fosse contaminata da micotossine quali zearalenone, deossinivalenolo, ocratossina ed aflatossina, mentre frequenti sono risultati i campioni contaminati da fumonisina. In particolare, la presenza di aflatossina è stata registrata solo nel 2003 (Snidaro et al., 2006), anno caratterizzato da un'estate particolarmente secca con scarsa piovosità (Battilani et al., 2005).

Tra il 2007 e il 2008 il Dipartimento di Biologia e Protezione delle Piante dell'Università degli Studi di Udine ha effettuato analisi su oltre 200 campioni di mais raccolti da cinque essiccatoi, situati sul territorio regionale, durante il conferimento. Nel 2007 i valori massimi di concentrazione di DON e ZEA (1745 e 150 µg/kg) sono risultati al di sotto dei tenori CE previsti per il mais non trasformato per l'alimentazione umana (Torelli et al., 2008). Questo a conferma di come le contaminazioni da DON e ZEA siano meno probabili in annate caratterizzate da clima temperato e secco. Il clima e la piovosità coinvolgono ed influenzano profondamente la biologia dei funghi produttori di micotossine, e probabilmente per questo motivo nello stesso anno la presenza di fumonisine, prodotte anch'esse dal genere *Fusarium*, risultò piuttosto contenuta, attestandosi tra 163 e 3663 µg/kg (Torelli et al., 2008). Battilani et al. nel 2008 hanno osservato lo stesso fenomeno nel corso di un'indagine effettuata sempre su campioni di mais raccolti nel Nord Italia tra il 2002 e il 2007, mentre nel 2008 la contaminazione è stata molto maggiore, con concentrazioni tra 333 e 11473 µg/kg (Torelli et al., 2008).

Da questi dati emerge come la contaminazione da fumonisine nel mais dipenda da numerosi fattori, molti dei quali ancora da chiarire. Certamente coinvolge tutta la filiera produttiva, a partire dal campo, dove le caratteristiche degli areali climatici, quelle biologiche della coltura, le tecniche agronomiche e l'andamento meteorologico possono condizionare la contaminazione (Piva et al., 2004). Il livello di contaminazione risulta estremamente variabile in base alla presenza della piralide, all'andamento climatico, all'agrotecnica ed al momento della raccolta. Quest'ultimo aspetto in Friuli Venezia Giulia riveste una particolare importanza, in quanto la frammentazione delle proprietà agricole e il ridotto numero di aziende che operano per conto terzi porta i piccoli produttori a ritardare molto la raccolta del mais, favorendo in questo modo lo sviluppo di *Fusarium spp.* durante il periodo autunnale, caratterizzato da elevata umidità.

All'interno del genere *Fusarium spp.* sono presenti diverse specie, non tutte tossinogeniche, ma

Gobbi et al. nel 2004, analizzando mais proveniente dal FVG hanno sottolineato una diffusione epidemica del fungo ed un alto rischio di contaminazione da fumonisine. Questo in considerazione del fatto che il 91% dei campioni analizzati è risultato positivo alla tossina e soprattutto che quasi il 60% dei ceppi di *Fusarium spp.* isolati si sono dimostrati effettivi produttori di FB1 *in vitro*. Questi dati, se si considera anche la difficoltà per decontaminare le partite inquinate e la pericolosità per la salute umana e animale inquadrano situazioni piuttosto imprevedibili, data la complessità dell'argomento e la conseguente mancanza di metodi sicuri ed efficienti di prevenzione.

### 1.5 Disposizioni legislative

La diffusione della contaminazione da micotossine, stimata ogni anno nel 25% dei raccolti di tutto il mondo (Akande et al., 2006) e la sua pericolosità per la salute dell'uomo e degli animali da reddito, hanno spinto alla graduale imposizione di limiti normativi relativi alla concentrazione di diverse tossine negli alimenti destinati al consumo umano e animale, in funzione della gravità degli effetti e della sensibilità delle specie.

La Commissione della Comunità Europea con la Direttiva 2003/100/CE del 31 ottobre 2003 ha fissato il contenuto massimo di aflatossina B1 nei mangimi destinati all'alimentazione degli animali (Tabella 5). I valori di riferimento relativi invece alla presenza di deossinivalenolo, ocratossina A, tossine T-2 e HT-2 e fumonisine in prodotti destinati all'alimentazione degli animali sono stati indicati nella Raccomandazione della Commissione del 17 agosto 2006 (2006/576/CE) (Tabella 6).

**Tabella 5 – Direttiva 2003/100/CE della Commissione del 31 Ottobre 2003.**

<b>Prodotti destinati all'alimentazione degli animali</b>	<b>Contenuto massimo di AFB1 in mg/Kg (ppm) di mangime al tasso di umidità del 12%</b>
Tutte le materie prime per mangimi	0,020
Mangimi completi per bovini, ovini e caprini ad eccezione di:	0,020
- mangimi completi per animali da latte	0,005
- mangimi completi per vitelli e agnelli	0,010
Mangimi completi per suini e pollame (salvo animali giovani)	0,020
Altri mangimi completi	0,010
Mangimi complementari per bovini, ovini e caprini (ad eccezione dei mangimi complementari per animali da latte, vitelli e agnelli)	0,020
Mangimi complementari per suini e pollame (salvo animali giovani)	0,020
Altri mangimi complementari	0,005

**Tabella 6 – Raccomandazione della Commissione del 17 agosto 2006 sulla presenza di deossinivalenolo, zearalenone, ocratossina A, tossine T-2 e HT-2 e fumonisine in prodotti destinati all'alimentazione animale (2006/576/CE).**

<b>Micotossina</b>	<b>Prodotti destinati all'alimentazione degli animali</b>	<b>Valore di riferimento (mg/Kg) di mangime al</b>
--------------------	---	--

	<b>tasso di umidità del 12%</b>	
<b>Deossivalenolo</b>	<i>Materie prime per mangimi</i>	
	- Cereali e prodotti a base di cereali, fatta eccezione per i sottoprodotti del granturco	8,00
	- Sottoprodotti del granturco	12,00
	<i>Mangimi complementari e completi, ad eccezione di:</i>	5,00
	- mangimi complementari e completi per suini	0,90
	- mangimi complementari e completi per vitelli (< 4 mesi), agnelli e capretti	2,00
<b>Zearalenone</b>	<i>Materie prime per mangimi</i>	
	- Cereali e prodotti a base di cereali, fatta eccezione per i sottoprodotti del granturco	2,00
	- Sottoprodotti del granturco	3,00
	<i>Mangimi complementari e completi</i>	
	- per suinetti e scrofette (giovani scrofe)	0,10
	- per scrofe e suini da ingrasso	0,25
	- per vitelli, bovini da latte, ovini (inclusi agnelli) e caprini (inclusi capretti)	0,50
<b>Ocratossina A</b>	<i>Materie prime per mangimi</i>	
	- Cereali e prodotti a base di cereali	0,25
	<i>Mangimi complementari e completi</i>	
	- per suini	0,05
	- per pollame	0,10
<b>Fumonisine B1+B2</b>	<i>Materie prime per mangimi</i>	
	- Granturco e prodotti derivati	60,00
	<i>Mangimi complementari e completi per</i>	
	- suini, equini ( <i>Equidi</i> ), conigli e animali da compagnia,	5,00
	- pesci,	10,00
	- pollame, vitelli (< 4 mesi), agnelli e capretti,	20,00
	- ruminanti adulti (> 4 mesi) e visoni	50,00

Per quanto riguarda la presenza di micotossine nei prodotti alimentari ad uso umano, i limiti sono stati specificati a livello comunitario nel Regolamento (CE) N. 1881/2006, che ha abrogato il Regolamento (CE) N. 466/2006 e le successive modifiche. Il 28 settembre 2007 è stato pubblicato nella Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, il Regolamento (CE) N. 1126/2007 che ha modificato il Regolamento (CE) N. 1881/2006 con i nuovi tenori massimi di deossivalenolo, zearalenone e fumonisine nei prodotti alimentari (nelle Tabelle 7 e 8 sono riportati alcuni dei tenori massimi imposti dai rispettivi Regolamenti). Con il Regolamento (CE) N. 165/2010 del 26 febbraio 2010 è stato ulteriormente modificato il Regolamento (CE) N. 1881/2006, e sono stati stabiliti i nuovi tenori massimi di contaminanti per prodotti alimentari quali le mandorle, le nocciole ed i pistacchi. Questo regolamento è entrato in vigore il 9 marzo 2010.

**Tabella 7 - Regolamento (CE) N. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari.**

<b>Prodotti alimentari</b>	<b>Tenori massimi (µg/kg)</b>
----------------------------	-------------------------------

<b>Aflatossine</b>	<b>B1</b>	<b>Somma di B1, B2, G1 e G2</b>	<b>M1</b>
Tutti i cereali e loro prodotti derivati, compresi i prodotti trasformati a base di cereali, eccetto i prodotti alimentari di seguito elencati	2,00	4,00	
Granturco da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari	5,00	10,00	
Latte crudo, latte trattato termicamente e latte destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte			0,050
Alimenti a base di cereali destinati ai lattanti e ai bambini	0,10		
Alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento, compresi il latte per lattanti e il latte di proseguimento			0,025
Alimenti dietetici a fini medici speciali destinati specificatamente ai lattanti	0,10		0,025
<b>Ocratossina A</b>			
Cereali non trasformati		5,00	
Tutti i prodotti derivati dai cereali non trasformati, compresi i prodotti trasformati a base di cereali e i cereali destinati al consumo umano diretto, eccetto i prodotti alimentari di seguito elencati		3,00	
Alimenti a base di cereali e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini		0,50	
Alimenti dietetici a fini medici speciali destinati specificatamente ai lattanti		0,50	

**Tabella 8 – Regolamento (CE) N. 1126/2007 della Commissione del 28 settembre 2007 che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari per quanto riguarda le *Fusarium*-tossine nel granturco e nei prodotti a base di granturco.**

<b>Prodotti alimentari</b>	<b>Tenori massimi (µg/kg)</b>
<b>Deossivalenolo</b>	
Cereali non trasformati diversi da grano duro, avena e granturco	1250
Grano duro e avena non trasformati	1750
Granturco non trasformato ad eccezione del granturco non trasformato destinato alla molitura ad umido	1750
Cereali destinati al consumo umano diretto, farina di cereali, crusca e germe come prodotto finito commercializzato per il consumo umano diretto (eccetto alcuni prodotti elencati nel regolamento stesso, fra cui il seguente)	750
Alimenti a base di cereali trasformati e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	200
<b>Zearalenone</b>	

Cereali non trasformati diversi dal granoturco	100
Granoturco non trasformato ad eccezione del granoturco non trasformato destinato alla molitura ad umido	350
Cereali destinati al consumo umano diretto, farina di cereali, crusca e germe come prodotto finito commercializzato per il consumo umano diretto (eccetto alcuni prodotti elencati nel regolamento stesso, fra cui i seguenti)	75
Granoturco destinato al consumo umano diretto, merende a base di granoturco e cereali da colazione a base di granoturco	100
Alimenti a base di cereali trasformati (esclusi quelli a base di granoturco) e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	20
Alimenti a base di granoturco e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	20
<b>Fumonisine</b>	<b>Somma di B1 e B2</b>
Granoturco non trasformato ad eccezione del granoturco non trasformato destinato alla molitura ad umido	4000
Granoturco destinato al consumo umano diretto, prodotti a base di granoturco destinati al consumo umano diretto, ad eccezione degli alimenti elencati di seguito	1000
Cereali da colazione e merende a base di granoturco	800
Alimenti a base di granoturco e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	200

## **2. FITOPATOLOGIE CAUSATE DA *FUSARIUM* SPP.**

**Torelli, E. e Firrao G.**

Dal punto di vista fitopatologico le diverse specie appartenenti al genere *Fusarium* assumono importanza sia per il numero delle specie vegetali che danneggiano, sia per la loro ampia diffusione geografica. Fra le alterazioni prodotte, le più importanti sono quelle che interessano i vasi conduttori (tracheofusariosi) ed i marciumi della spiga.

### **2.1 Tracheofusariosi**

Le tracheofusariosi sono generalmente accompagnate da manifestazioni esterne quali nanismo, appassimento, giallume e necrosi. Questi diversi sintomi appaiono contemporaneamente o in successione in funzione della pianta ospite, del patotipo, del patogeno e delle condizioni ambientali. E' da notare tuttavia che i sintomi analoghi possono essere determinati anche da malattie di altro tipo, ad esempio da marciumi radicali, mentre caratteristica specifica è l'imbrunimento dell'apparato vascolare legnoso.

La maggior parte delle piante può essere colpita da tracheofusariosi in tutti gli stadi di sviluppo ma, almeno nel caso di specie erbacee, sono le infezioni precoci a causare i danni economici di maggiore entità. Le infezioni si verificano solitamente attraverso le porzioni apicali delle giovani radichette, in corrispondenza delle quali la suberificazione dell'epidermide è ancora incompleta e conseguentemente l'accesso del patogeno nel cilindro centrale è facilitato. Anche le ferite causate da operazioni di trapianto o dalla stessa emissione di radici laterali rappresentano un possibile accesso per il patogeno. Nelle cellule epidermiche, ipodermiche e del cortex radicale i parassiti vascolari provocano ispessimenti della parete in corrispondenza del punto di penetrazione che si possono evolvere in papille e lignituberi, caratteristiche formazioni coniche che si formano in seguito a deposito di callosio e lignina attorno all'ifa del patogeno. L'ifa, di diametro ridotto, può generare all'interno del lignitubero, oppure può crescere più velocemente dello stesso, uscendo e riprendendo successivamente il normale diametro. Una volta nei vasi legnosi (trachee o tracheidi), il patogeno si sviluppa e produce conidi che vengono trascinati dalla corrente xilematica fino ai setti trasversi punteggiati, in corrispondenza dei quali la terminazione di un vaso è raccordata all'inizio del vaso successivo. Il patogeno attraversa questi setti con nuovo micelio e produce nuovi conidi con i quali estende la colonizzazione verso l'alto. La colonizzazione dello xilema è accompagnata dal deposito di gomme di natura pectinica ed emicellulosica, dapprima sui setti trasversi quindi sulle pareti laterali dei vasi, e dalla formazione di tille. Queste occlusioni contribuiscono con la presenza fisica, talvolta molto esigua, del fungo e con composti vischiosi ad alto peso molecolare, a determinare la disfunzione del sistema vascolare legnoso.

Nell'economia della pianta la funzione di gomme, tille ed iperplasie consiste nel delimitare e

chiudere le sacche di invasione di microrganismi estranei. In realtà questi processi, quando, come nelle piante suscettibili, non circoscrivono immediatamente il patogeno, si traducono in blocchi via via sempre più estesi del trasporto xilematico. In virtù della sua portata sovraottimale e della fitta rete di connessioni tra vasi e fasci fibrovascolari, che consentono il facile aggiramento delle occlusioni, la disfunzione di una parte anche rilevante dell'apparato vascolare del fusto non è necessariamente seguita da sintomi esterni evidenti. L'appassimento o l'avvizzimento diventano per contro inevitabili quando il patogeno colonizza l'apparato vascolare dei piccioli e delle nervature fogliari.

## 2.2 I marciumi della spiga

I marciumi della spiga causati dai rappresentanti del genere *Fusarium* sul mais sono essenzialmente di tre tipologie:

- marciume della spiga denominato "**marciume rosa**" o "**pink ear rot**" causato da *F. graminearum* e *F. culmorum*. Il marciume si diffonde a partire dall'apice della spiga e si espande lungo i canali creati dagli insetti sviluppando un micelio di colorazione rosa o rossastra sulla granella (Figura 4). Questa malattia è prevalente nei climi temperati, soprattutto in annate molto umide.
- marciume della spiga o "**ear rot**". E' una delle principali malattie causate dal genere *Fusarium* nel mais ed è dovuto principalmente alla presenza di *F. verticillioides*, ma anche di *F. subglutinans* e *F. proliferatum*. La malattia è favorita dal clima secco e dalla presenza di danni causati da parte di alcuni insetti.
- marciume rosso della spiga o "**red ear rot**" causato da *F. equiseti*, *F. tricinctum* e *F. sporotrichioides* (Bilgrami e Choundhary, 1998). Le specie di *Fusarium* che causano marciume della spiga presentano un'areale molto ampio, addirittura a livello mondiale, e sono caratterizzati dalla copresenza o dalla rapida successione di diverse specie. É piuttosto comune isolare più di nove differenti ceppi di *Fusarium* da un singolo frammento di tessuto infetto (Logrieco et al., 2002).

La fonte di inoculo è data principalmente dalle ascospore e dai macroconidi presenti sui residui vegetali nel terreno, o dalle spore rilasciate da funghi che si sono sviluppati su piante presenti in prossimità del mais. Anche gli insetti possono fungere da vettori di spore e i danni da essi causati possono costituire delle facili vie d'accesso per i funghi patogeni. Un'umidità sufficiente e un'adeguata temperatura sono poi le condizioni necessarie affinché la colonizzazione fungina abbia luogo (Abramson, 1998).

Il mais può venir colpito in maniera molto grave dalle varie specie del genere *Fusarium* sin dai

primi stadi di sviluppo. Le piantine infette possono marcire e morire repentinamente oppure presentare uno sviluppo stentato. Se la malattia evolve in forma leggera o tardiva, le piante sono in grado di produrre le spighe, ma queste possono, a loro volta, venire più o meno intensamente colpite. L'alterazione si manifesta allora con minore sviluppo della spiga oppure con delle zone ammuffite variamente estese, in corrispondenza delle quali le cariossidi sono striminzite e fittamente compenstrate dalle strutture miceliari del patogeno. Nella spiga la penetrazione del patogeno avviene principalmente dalla sommità dell'organo, che può essere totalmente o parzialmente alterato, e la diffusione avviene attraverso passaggi creati dagli insetti (Logrieco et al., 2002). L'attacco agli organi fiorali si manifesta di solito nel periodo intercorrente tra la fioritura e lo stadio di maturazione latte delle cariossidi. Sulle glume compaiono delle tacche brune, irregolari. La persistenza del patogeno sul seme durante la conservazione è favorita dalle basse temperature (Matta, 1996).

### **2.3 Interazione *Fusarium*-pianta: decorso patologico**

Il ciclo di sviluppo di *Fusarium verticillioides* sul mais è costituito da una fase saprofitica e da una parassitaria. Durante la fase saprofitica, *Fusarium verticillioides* ricava i nutrienti di cui necessita da tessuti deperienti o morti. Durante la fase parassitaria il fungo si sviluppa invece a spese delle cellule vive dell'ospite attraverso una colonizzazione intracellulare. La colonizzazione dell'ospite può avvenire attraverso due vie. Nel primo caso si può avere la colonizzazione a partire da un inoculo aereo ambientale, e quindi l'attacco alla spiga avviene partendo dalla sommità della stessa. Nel secondo caso, che è anche quello più importante, il fungo riesce a raggiungere il seme in via di maturazione attraverso le setole nel momento in cui si ha l'emissione di queste ultime (Logrieco et al., 2002).

Lo stadio di sviluppo della granella può costituire un fattore molto importante per la biosintesi di fumonisina, il cui contenuto nella granella tende ad aumentare man mano che procede la maturazione. È ormai noto che la sintesi di fumonisine inizia *in planta*, durante la maturazione delle cariossidi. Di norma, queste tossine vengono rilevate a partire da 30 giorni dopo l'impollinazione, quindi dalla maturazione cerosa, mentre nelle fasi precedenti esse risultano assenti o presenti al di sotto dei limiti di determinazione (Warfield et al., 1999). Una delle possibili spiegazioni per l'assenza di fumonisine nelle prime fasi di sviluppo della spiga, pur in presenza di colonizzazione fungina delle cariossidi, è legata alla composizione chimica delle cariossidi stesse. Al fine di indagare questo aspetto, sono state eseguite prove *in vitro* utilizzando terreni colturali a base di farina ottenuta dalla macinazione delle spighe raccolte in diverse fasi fenologiche (dall'emissione delle setole fino alla maturazione fisiologica del mais). In accordo con i dati di campo, la FB1 non viene sintetizzata prima di 15 giorni dall'impollinazione e la temperatura ottimale per la sintesi della tossina sembra essere di 25 °C (Battilani et al., 2004).

Quanto sopra può essere spiegato tenendo presente che durante la maturazione della granella, si verificano numerosi cambiamenti circa la sua composizione e questi cambiamenti possono costituire uno stimolo per *F. verticillioides* a produrre micotossine. Tra le trasformazioni che si verificano durante la maturazione della cariosside, la più importante è sicuramente la conversione dello zucchero in amido. Nel momento in cui l'amido comincia ad accumularsi, inizia anche la sintesi proteica. Si può osservare infatti che verso il ventottesimo giorno dopo la fecondazione si ha un picco, relativo al contenuto di azoto solubile, di amminoacidi e di nucleotidi, che poi tende a diminuire quando cominciano a formarsi le proteine di riserva. L'ipotesi è che il fungo riesca a percepire queste variazioni della composizione della cariosside e che questo possa fungere da segnale e indurre la formazione di FB1.

## **2.4 Misure preventive per il contenimento della contaminazione da micotossine**

Poiché la contaminazione da micotossine può avvenire non solo prima della raccolta, ma anche durante la raccolta, l'immagazzinamento e la lavorazione dei prodotti, le tecniche di prevenzione dovrebbero essere applicate ad ognuna di queste fasi.

Nel 2002 il Codex Alimentarius ha sviluppato delle linee guida di buona pratica al fine di prevenire e ridurre il contenuto di micotossine nei cereali e nella frutta (mele e arachidi). I produttori dovrebbero mettere in pratica i principi forniti dal General Code of Practice del Codex tenendo conto della coltura, del clima e delle pratiche agronomiche. Tali linee guida sono denominate Good Agricultural Practice (GAP) e Good Manufacturing Practice (GMP) (Kabak et al., 2006).

### *2.4.1 Preraccolta*

#### *Scelta varietale*

All'interno del percorso agronomico volto alla riduzione degli stress per la coltura, la semina anticipata rappresenta un fattore di primaria importanza per il miglioramento della qualità delle produzioni e per ottenere evidenti vantaggi produttivi. Questi effetti positivi si ottengono grazie al verificarsi simultaneo di alcune condizioni:

- anticipo della fioritura, che sfugge in questo modo al periodo più critico di siccità estiva;
- riduzione dell'esposizione alle larve di seconda generazione della piralide (*Ostrinia nubilalis*). Gli stadi larvali più dannosi compaiono così in un momento in cui la fase di riempimento della granella è più avanzata e conseguentemente il danno produttivo si riduce;
- raggiungimento precoce dell'umidità ottimale di raccolta. Da un lato il rapido raggiungimento di basse umidità diminuisce l'accumulo di fumonisine prodotte da *F. verticillioides*, dall'altro si evita che la coltura resti in campo nel momento in cui cominciano ad abbassarsi le temperature e ad aumentare la possibilità di precipitazioni. Queste condizioni climatiche da una parte

favoriscono lo sviluppo di *F. graminearum*, produttore di deossinivalenolo e zearalenone e dall'altra possono determinare perdite di granella.

Il successo della semina anticipata dipende anche dalle caratteristiche varietali dell'ibrido seminato, in particolare dalla sua resistenza ai ritorni di freddo, possibili quando si semina a marzo, e dal vigore di partenza della pianta (Maiorano et al., 2007). Nella scelta dell'ibrido è necessario dare precedenza alle varietà che offrono le migliori garanzie dal punto di vista qualitativo, con particolare riferimento alla tolleranza agli attacchi fungini e alla migliore resistenza agli stress idrici. L'impiego di ibridi con spighe coperte da brattee poco spesse e che non coprono completamente la spiga fino alla raccolta è da considerare un fattore favorevole allo sviluppo di infezioni fungine.

#### *Epoca di semina*

Le semine tardive (indicativamente dalla terza decade di aprile) sono quelle esposte ad un maggiore rischio di contaminazione da fumonisine, in particolare modo per quel che riguarda gli ibridi a ciclo pieno (Classe FAO 600-700). Per questo motivo sarebbe opportuno effettuare la semina in maniera tempestiva, cioè non appena si presentano buone condizioni agronomiche e climatiche (temperatura del terreno di almeno 10 °C da alcuni giorni), oppure utilizzare ibridi precoci o medio precoci per raggiungere livelli produttivi simili a quelli delle varietà più tardive, ma accorciando il ciclo e raccogliendo la granella prima del periodo delle piogge autunnali.

#### *Densità di semina*

È importante scegliere il giusto investimento perchè densità elevate in ambienti fertili e in prima epoca di semina (8 piante/m<sup>2</sup> per ibridi a ciclo pieno) possono aumentare il rischio di stress idrico delle piante e comportare condizioni microclimatiche favorevoli allo sviluppo di funghi tossigeni. Si consiglia quindi di ridurre gli investimenti e di non superare le 5,5 piante/m<sup>2</sup> per ibridi medio tardivi e le 6 piante/m<sup>2</sup> per ibridi medioprecoci.

#### *Concimazioni*

Una corretta gestione della nutrizione minerale della coltura è importante per evitare stress nutrizionali (carenze ed eccessi) che possono favorire elevati tenori di micotossine. In condizioni di carenza azotata si può verificare contaminazione da fumonisine ed aflatossine, mentre in condizioni di eccesso può presentarsi un ritardo nella maturazione e lo sviluppo di muffe sulla spiga e sulla pianta. Di fondamentale importanza risulta l'impostazione di un bilancio dei nutrienti calcolato sulla base dei fabbisogni della coltura, della dotazione del terreno e di altri importanti parametri agronomici.

### *Irrigazione*

L'irrigazione nel mais risulta essere uno degli strumenti agronomici più importanti per il controllo della contaminazione da micotossine più comuni. Condizione ad alto rischio di infezioni in campo da *Aspergillus* spp. è lo stress idrico successivo alla maturazione cerosa della granella. I trattamenti irrigui andrebbero effettuati in maniera corretta non solo nel periodo immediatamente antecedente la fioritura maschile, ma anche nella fase più avanzata della coltura (maturazione latte), qualora le condizioni di umidità del terreno fossero insufficienti ad assecondare la richiesta idrica della pianta.

### *Lotta ad Ostrinia nubilalis*

La piralide del mais (*Ostrinia nubilalis*) è l'insetto in assoluto più dannoso per questa coltura. L'insetto può attaccare diverse parti della pianta, quali le foglie, il fusto e ovviamente anche la spiga. Per penetrare all'interno della spiga può utilizzare numerose vie d'accesso, ma le due principali sono sicuramente la zona di congiunzione tra la spiga e lo stocco e la sommità della spiga stessa.

Il danno che determina alla granella non è sempre visibile, in quanto può creare delle gallerie al di sotto della superficie della cariosside, andando a nutrirsi in primo luogo del germe. Le larve della piralide possono costituire un vettore molto importante per la disseminazione all'interno della pianta di funghi quali *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp.. Questo avviene perché i funghi che si localizzano sulla superficie delle cariossidi o sulle setole possono sfruttare la via di penetrazione dell'insetto per accedere all'interno della spiga. Anche gli escrementi delle larve possono costituire un'importante fonte di inoculo dal momento che possono essere colonizzati da una vasta gamma di funghi tossigeni e possono quindi costituire il punto di partenza per la crescita della biomassa fungina all'interno della pianta (Dowd, 1998).

Nelle aree maidicole con forte presenza di *Ostrinia nubilalis* la lotta contro questo fitofago diventa fondamentale per prevenire la contaminazione da micotossine. In particolare, i trattamenti vanno effettuati esclusivamente sulla seconda e terza generazione, vista l'evidenza che, in queste situazioni, un'efficace difesa dalla piralide permette una consistente riduzione dei tenori di contaminazione da fumonisine (Snidaro e Paliotti, 2002).

### *2.4.2 Raccolta*

Nel corso della raccolta sarebbe opportuno adottare adeguati accorgimenti al fine di evitare lesioni alla granella. La permanenza in campo in condizioni climatiche non idonee può causare un rapido deterioramento della qualità del prodotto, con forti incrementi di FB1, in particolar modo per gli ibridi tardivi (Classe 600). Dovrebbe quindi essere preferita la raccolta anticipata, possibilmente entro settembre o appena si raggiunge un'umidità della granella pari al 27%. Il prodotto raccolto

dovrebbe inoltre essere immediatamente consegnato al centro di raccolta in modo da essere tempestivamente essiccato per evitare che si creino le condizioni favorevoli allo sviluppo fungino.

#### *2.4.3 Postraccolta*

La crescita di funghi micotossigeni può avvenire durante l'immagazzinamento in seguito alle variazioni di umidità della granella o alla formazione di condensa lungo le pareti dei silos: il controllo dell'aerazione e dell'umidità interna è molto importante per contenere lo sviluppo fungino.

Anche il controllo della temperatura, l'impiego di strutture che permettano la protezione dalla pioggia, dagli uccelli e dai roditori sono fattori da tenere in considerazione al fine di contenere la proliferazione fungina (Kabak et al., 2006).

### 3. MICOTOSSINE E MICOTOSSICOSI DI INTERESSE ZOOTECNICO

**Sandri M. e Stefanon B.**

La struttura chimica delle micotossine determina gli effetti biologici che esse hanno sui diversi organismi animali. Le tossine prodotte da *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* possono essere cancerogene, mutagene, teratogene, estrogeniche, neurotossiche o immunotossiche.

La IARC (International Agency for Research on Cancer), sulla base di prove scientifiche, ha espresso un parere sul potenziale effetto cancerogeno delle principali micotossine sull'uomo e sugli animali (Tabella 9), anche se per alcune di esse non ci sono sufficienti dati per esprimere un giudizio univoco e certo.

**Tabella 9 – Pareri IARC sul potenziale dannoso delle principali micotossine**

<b>Micotossina</b>	<b>Classe di rischio</b>	<b>Valutazione generale</b>
Aflatossine (B1, B2, G1, G2)	Gruppo 1	Genotossica, cancerogena, epato e nefrotossica
Aflatossina M1	Gruppo 2B	Potenzialmente cancerogena per l'uomo
Ocratossina A	Gruppo 2B	Potenzialmente cancerogena per l'uomo
Zearalenone	Gruppo 3	Limitata evidenza di cancerogenicità negli animali
Desossinivalenolo	Gruppo 3	Inadeguata evidenza di cancerogenicità negli animali
Nivalenolo	Gruppo 3	Inadeguata evidenza di cancerogenicità negli animali
Fumonisine (B1, B2, Ac. fusarico)	Gruppo 2B	Potenzialmente cancerogena per l'uomo
Tossina T-2	Gruppo 3	Limitata evidenza di cancerogenicità negli animali

Come già accennato, la contaminazione fungina degli alimenti può comportare l'alterazione delle loro caratteristiche organolettiche e nutrizionali, oltre che rappresentare un rischio concreto di intossicazione nel caso di produzione di tossine.

I funghi, anche se spesso naturalmente presenti in varia misura negli alimenti, possono costituire un problema concreto per le produzioni animali a causa di fattori di diversa natura come:

- la selezione genetica spinta a cui sono sottoposte le specie domestiche di interesse zootecnico e che spesso penalizza le caratteristiche di rusticità e resistenza;
- le tecniche di allevamento e le elevate produzioni raggiunte che possono costituire una causa di stress in grado di compromettere l'efficienza delle difese immunitarie;
- il maggiore rischio di contaminazione delle derrate a causa della globalizzazione dei mercati e degli scambi di cereali e di materie prime con zone climatiche della terra caratterizzate da condizioni ambientali favorevoli allo sviluppo fungino;
- l'aumento sensibile della temperatura e di situazioni ambientali estreme, legate anche al cambiamento climatico, quali siccità, piogge abbondanti e inondazioni, che possono indurre le specie tossigene alla produzione dei loro metaboliti secondari;

- la nuova consapevolezza e la maggiore attenzione degli organi di governo, dei media e dei consumatori stessi verso la sicurezza alimentare e il benessere animale;
- il livello di bio-sicurezza nei sistemi produttivi delle filiere agroalimentari, in termini di pulizia, gestione e stoccaggio delle materie prime e degli alimenti da parte degli operatori.

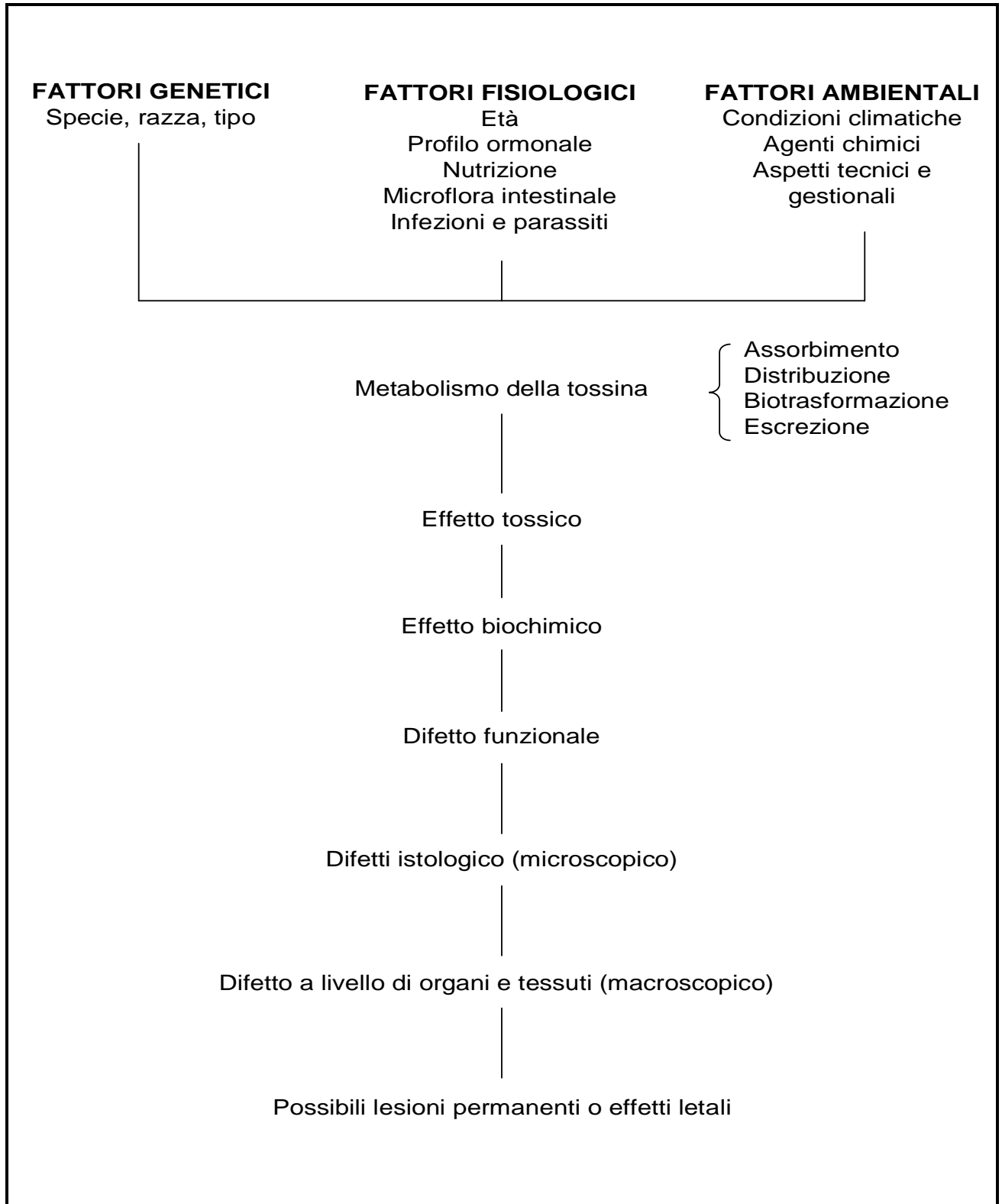
### **3.1 Forme di micotossicosi negli animali**

La natura, la soglia e l'entità dell'effetto biologico provocato dalle micotossine dipendono principalmente dalla quantità di tossina ingerita, dal tipo di tossina e dalla copresenza di più tossine, dalla biodisponibilità (quota assorbita dall'apparato gastro-enterico), dalla specie e dallo stato fisiologico dei soggetti interessati ed infine dalla sensibilità e variabilità genetica individuale.

Oltre agli effetti tossici primari le micotossine comportano generalmente la compromissione del sistema immunitario dell'animale, rendendolo più sensibile ad altre patologie (soprattutto quelle infettive), e possono comportare intossicazione di tipo cronico a carattere subdolo con sintomatologie e quadri clinici spesso generici, che rendono difficile la formulazione di diagnosi certe. I molteplici fattori coinvolti e le fasi identificabili nell'evoluzione di una micotossicosi sono schematizzati in Figura 2.

La possibilità che gli animali entrino in contatto contemporaneamente con più micotossine può comportare lo sviluppo di effetti additivi o interazioni che abbassano la soglia di tossicità per singola tossina. Questo fa sì che non ci sia un livello "sicuro" di contaminazione, e che la strategia migliore resti in ogni caso la prevenzione. L'attenta osservazione degli animali e delle loro performance, produttive e riproduttive, le analisi di tipo biochimico su soggetti vivi o di tipo anatomico-patologico *post-mortem*, associate a controlli sistematici sugli alimenti, rappresentano i migliori strumenti per la diagnosi accurata delle micotossicosi.

**Figura - 2: Rappresentazione semplificata di una micotossicosi**



Da: Smith et al., 1994

Le forme di micotossicosi, identificabili sulla base dell'entità dell'intossicazione e dell'evoluzione della patologia sono essenzialmente tre, ovvero le micotossicosi acute primarie, le micotossicosi croniche primarie e le patologie secondarie conseguenti a micotossicosi (Smith et al., 1994).

### 3.1.1 Micotossicosi acute primarie

Colpiscono generalmente soggetti isolati che manifestano chiaramente la sintomatologia e che in casi estremi possono anche andare incontro a decesso. Eventi acuti di questo tipo sono fortunatamente rari in quanto le contaminazioni generalmente non raggiungono livelli tali da provarli e in ogni caso gli alimenti presenterebbero evidenti alterazioni quali muffe che in situazioni normali ne comporterebbero l'eliminazione.

Questo tipo di sindrome acuta è di solito associato a:

- epatiti
- fenomeni emorragici
- nefriti
- necrosi dell'epitelio orale ed enterico

E' da sottolineare come, oltre alle conseguenze patologiche più gravi, un'intossicazione acuta da micotossine possa coinvolgere tutti i sistemi fisiologici dell'organismo animale, causando sintomatologie di vario tipo come illustrato in Tabella 10.

**Tabella 10 – Sistemi fisiologici coinvolti nelle micotossicosi**

<b>Apparato/sistema</b>	<b>Effetto</b>	<b>Micotossina</b>
Vascolare	fragilità dei vasi emorragie tissutali	aflatossine, dicumarina
Digerente	diarrea emorragie intestinali epatotossicità con necrosi epatica proliferazione e fibrosi del dotto biliare effetto caustico sulle mucose occlusione del dotto biliare rifiuto del cibo	aflatossine  tossina T-2 sporidesmina vomitossina
Respiratorio	adenomatosi polmonare	4-ipomenolo
Nervoso	tremori, incoordinazione, coma	ergotamina, alcaloidi
Cutaneo	fotosensibilizzazione desquamazione e necrosi delle estremità	sporidesmina ergotina
Urinario	nefrosi, uremia	ocratossina, citrinina
Riproduttivo	infertilità, estro prolungato	zearalenone, tossina T-2

Da: Smith et al., 1994

### *3.1.2 Micotossicosi croniche primarie*

Negli animali da reddito sono le forme più comuni e subdole di intossicazione in quanto non si manifestano con segni macroscopicamente visibili nei singoli soggetti.

La sintomatologia, aspecifica, interessa gruppi di animali e di solito comporta:

- peggioramento della produttività
- riduzione dell'accrescimento e dell'efficienza riproduttiva
- diminuzione della produzione di latte
- diminuzione della produzione di uova
- peggioramento dell'indice di conversione alimentare
- peggioramento della qualità delle produzioni

La diagnosi di solito avviene per riscontro negativo di altre patologie o per verifica della contaminazione degli alimenti.

L'analisi delle materie prime e delle razioni complete dovrebbe diventare una pratica routinaria, viste anche le disposizioni legislative in materia di sicurezza degli alimenti e le importanti conseguenze che tali intossicazioni possono avere sul benessere animale e sul bilancio economico aziendale.

### *3.1.3 Patologie secondarie conseguenti a micotossicosi*

Queste malattie sono il risultato dell'assunzione di alimenti contaminati per lunghi periodi, con la conseguente compromissione della funzionalità dell'organismo e soprattutto del sistema immunitario. In particolare sembra che l'effetto immunotossico delle micotossine coinvolga le reazioni cellulo-mediate e i fattori umorali aspecifici associati ai processi immunitari.

Anche in questo caso la diagnosi risulta difficile giacché il quadro patologico in questa situazione spesso non deriva solo dagli effetti della tossina, ma anche da funzioni fisiologiche già compromesse o da altri fattori quali squilibri nutrizionali, presenza di altre sostanze antinutrizionali o tossiche, microrganismi e altri contaminanti.

Le conseguenze sul sistema immunitario in seguito all'ingestione cronica delle principali micotossine (aflatossine, ocratossina A e tricoteceni) sono generalmente:

- aplasia del timo
- inibizione della fagocitosi nei macrofagi
- ritardo delle reazioni di ipersensibilità cutanea
- proliferazione dei linfociti e migrazione leucocitaria

La comparsa di una patologia infettiva conseguente ad una micotossicosi è influenzata, oltre che

dalle caratteristiche dell'agente infettivo, anche e soprattutto dalle condizioni del soggetto interessato e dalla variabilità della risposta individuale, a sua volta determinata da una molteplicità di fattori.

Un altro aspetto da non sottovalutare è la contaminazione multipla degli alimenti con più micotossine. In questa situazione si osservano nella maggior parte dei casi effetti generici sulla crescita, sull'ingestione di alimento (Harvey et al., 1996; Kubena et al., 1997a) e sulla percentuale di mortalità (Javed et al., 1993b) (Tabella 11).

**Tabella 11 – Effetti della contaminazione multipla da micotossine in alcune specie di interesse zootecnico**

<b>Origine delle micotossine</b>	<b>Micotossine</b>	<b>Specie animale</b>	<b>Marker biologico</b>	<b>Tipo di interazione</b>	<b>Rif. Bibliografico</b>
Cereali contaminati naturalmente	DON + acido fusarico	Suini	Crescita	sinergica	Smith et al., 1996
Mais inoculato e micotossina pura	DON + tossina T-2	Suini	Ingestione e crescita	effetti negativi del DON ridotti con livelli intermedi di T-2	Friend et al., 1992
Frumento contaminato	DON + FB1	Suini	Accrescimento	sinergica	Harvey et al., 1996
Micotossina pura	Tossina T-2 + OTA	Suini	Ingestione e accrescimento	additiva	Harvey et al., 1994
Materiale da coltura e micotossina pura	DON + MON	Pulcini (pollo)	Ingestione e accrescimento	meno che additiva	Harvey et al., 1997
Materiale da coltura e micotossina pura	DON + fumonisine	Pulcini (pollo)	Accrescimento	meno che additiva	Kubena et al., 1997a
Micotossina pura e materiale da coltura	tossina T-2 + fumonisine	Pulcini (pollo)	Accrescimento	additiva	Kubena et al., 1997a
Micotossina pura	FB1+MON	Pulcini (pollo)	Mortalità	additiva	Javed, et al., 1993b
Micotossina pura e materiale da coltura	tossina T-2 + fumonisine	Pulcini (tacchino)	Accrescimento	additiva	Kubena et al., 1995
Materiale da coltura e micotossina pura	DAS, fumonisine o OTA	Pulcini (tacchino)	Accrescimento	additiva o meno che additiva	Kubena et al., 1997b
Riso inoculato e micotossina pura	DAS + aflatossina	Agnelli	Accrescimento e GGT	sinergica	Harvey et al., 1995

Da: D'Mello et al., 1999

### **3.2 Detossificazione biologica**

Per "detossificazione biologica" si intende la biotrasformazione o degradazione, da parte di enzimi o microrganismi, di una micotossina ad un metabolita non tossico o con tossicità molto ridotta rispetto al composto originale in modo tale che possa essere rapidamente eliminato dall'organismo. L'efficienza nel metabolizzare ed eliminare questi composti tossici influenza la sensibilità delle varie specie ai diversi livelli di contaminazione e l'entità dei danni riportabili dall'organismo.

L'eliminazione di queste molecole o dei loro metaboliti avviene, in base alla quota assorbita nel tratto gastrointestinale, per via fecale, urinaria o attraverso il latte e l'assorbimento è molto variabile a seconda della specie animale interessata, del tipo di molecola, della dose assunta e della velocità di transito nel tubo digerente.

Tutte le specie sono in varia misura sensibili alle micotossine ed entro ciascuna specie le categorie maggiormente a rischio sono i riproduttori e i soggetti giovani nei quali l'esposizione può avvenire anche prima dello svezzamento, se l'alimento ingerito dalla madre è contaminato e la tossina o i suoi residui sono trasferiti nel latte di cui si nutre il redo.

Le variabili che influenzano la risposta dei diversi animali alle micotossine sono numerose, ma in linea di massima si può affermare che i ruminanti, grazie all'attività della microflora presente nei prestomaci, sono le specie meno sensibili a queste molecole sia in termini di soglia di tossicità che di effetto nocivo.

Nel ruminante la degradazione della tossina avviene prima che essa raggiunga il tratto gastrointestinale ed essendo di conseguenza limitata la quantità assorbibile, diminuisce sensibilmente la quantità di tossina che attraverso il sangue può raggiungere i tessuti e gli organi vitali.

In ogni caso il potenziale dannoso di tali contaminanti compromette primariamente il benessere degli animali influenzando di conseguenza le loro capacità produttive.

La contaminazione da funghi tossigeni può inoltre rappresentare un pericolo per la salute umana in virtù delle tossine o dei residui che possono essere trasferiti agli alimenti destinati al consumo umano, come accade nel caso del metabolita dell'aflatossina B1 (AFM1) nel latte.

### **3.3 Effetti comuni delle micotossine negli animali**

Gli aspetti particolari del metabolismo e dell'attività biologica delle principali micotossine saranno trattati nelle relative schede tecniche. Oltre agli effetti specie-specifici che saranno presi in considerazione nei successivi paragrafi, per le micotossine di interesse (Tabella 12) verranno descritti anche gli effetti comuni.

**Tabella 12 – Principali micotossine rinvenibili negli alimenti di interesse zootecnico**

<b>Micotossina</b>	<b>Fungo produttore</b>
Aflatossine B1, B2, G1, G2	<i>Aspergillus flavus, A. parasiticus</i>
Ocratossina A	<i>Aspergillus ochraceus, Penicillium verrucosum</i>
Fumonisine FB1 FB2	<i>Fusarium proliferatum, F. verticillioides</i>
Zearalenone (ZEA)	<i>Fusarium culmorum, F. graminearum</i>
Tricoteceni - Tipo A tossina T-2 tossina HT-2 diacetossiscirpenolo (DAS) neosolaniolo - Tipo B deossinivalenolo (vomitossina)(DON) nivalenolo (NIV) fusarenone X 3-acetildeossinivalenolo (3AcDON) 15-acetildeossinivalenolo (15AcDON)	<i>Fusarium culmorum, F. graminearum</i>
Moniliformina	<i>Fusarium proliferatum, F. verticillioides</i>

### 3.3.1 Fumonisine

Ad oggi sono 6 le molecole isolate nel gruppo delle fumonisine: FB1-FB4, FA e FA2 (Smith et al., 1994). Gli effetti tossici comuni di queste sostanze, documentati in più specie, riguardano principalmente:

- riduzione delle performance
- danni fetali
- cianosi di pelle e mucose
- ittero
- lesioni epatiche, gastrointestinali, polmonari e del sistema nervoso

La FB1 risulta essere la tossina che più frequentemente contamina gli alimenti, arrivando a costituire oltre il 70% delle fumonisine totali. E' la maggiore responsabile delle intossicazioni causate da questo gruppo di molecole (Conkova et al., 2003), nonché l'oggetto principale degli studi finora realizzati relativamente a questa tipologia di micotossine (Cavret et al., 2006).

Oltre alle intossicazioni acute primarie, a livelli sub-letali essa provoca un'alterazione della risposta immunitaria che rende gli animali più suscettibili ad altre patologie, in particolar modo infettive (D'Mello et al., 1999), e che compromette anche la risposta alle vaccinazioni.

### 3.3.2 Zearalenone (ZEA)

Lo zearalenone possiede un grado di tossicità acuta relativamente basso (2-10 g/kg peso vivo nei topi, secondo Flannigan, 1991) ed è stato definito più propriamente come un "micoestrogeno", ovvero un blando estrogeno non steroideo con proprietà anabolizzanti (Smith et al., 1994), nonostante nel lungo periodo sia anche potenzialmente cancerogeno (IARC).

Questa tossina nei mammiferi altera il normale funzionamento dell'apparato endocrino con effetti sia nei maschi che nelle femmine di differenti specie. L'attività estrogenica si manifesta già con contenuti nella razione di 1.5-3 mg/kg (ppm), quando l'esposizione alla tossina è cronica (D'Mello et al., 1999).

Nelle femmine e specialmente negli animali lattiferi gli effetti primari, comunque dipendenti dalle dosi assunte, possono essere così riassunti (Jones et al., 1994):

- anticipo della maturità sessuale e ingrossamento delle ghiandola mammaria e degli organi riproduttivi
- riduzione dell'ingestione di cibo
- diminuzione della produzione di latte
- scolo vaginale e vaginite
- prolasso rettale e/o vaginale
- peggioramento delle performance riproduttive

L'entità e la durata degli effetti sono variabili tra specie e anche all'interno della stessa specie, a seconda della categoria e dello stato fisiologico degli animali interessati. I processi metabolici a cui sono sottoposte queste molecole (assorbimento, biotrasformazione, escrezione con la bile, riassorbimento e ricircolo) possono prolungarne il tempo di ritenzione e di conseguenza anche gli effetti tossici (D'Mello et al., 1999).

Oltre allo zearalenone esistono numerosi suoi derivati che dimostrano differenti gradi di attività estrogenica e che possono essere prodotti nell'organismo animale come metaboliti o essere già presenti nell'alimento al momento dell'ingestione (Gromadzka et al., 2008).

### 3.3.3 Tricoteceni

I sintomi di un'intossicazione da tricoteceni sono essenzialmente digestivi e caratterizzati da fenomeni come il rifiuto dell'alimento o il vomito (Conkova et al., 2003).

Le tossine del tipo A risultano essere molto più potenti di quelle del tipo B e gli effetti comuni della loro ingestione, soprattutto nel caso di intossicazioni croniche sono generalmente:

- riduzione dell'ingestione di cibo e dell'accrescimento ponderale

- irritazione dei tessuti, in particolare lesioni della mucosa orale e intestinale e dermatiti
- alterazione della risposta immunitaria
- peggioramento delle performance riproduttive

### 3.3.4 Aflatossine

Le aflatossine sono molecole estremamente tossiche che, anche in bassissime quantità (variabili in base ad età, sesso e taglia dell'animale), possono causare tossicosi acute (Flannigan nel 1991 osservò in animali da laboratorio la morte di metà dei soggetti con esposizione all'aflatossina B1 variabile tra 1 e 17,9 mg/kg di peso vivo).

Le tossine più importanti di questo gruppo sono quattro, ovvero le aflatossine B1, B2, G1 e G2, mentre altre possono generarsi negli organismi animali come metaboliti (ad esempio la M1 nel latte). L'aflatossina più tossica risulta essere la AFB1, seguita da AFG1, AFB2 e AFG2.

A dosaggi elevati la AFB1 può indurre:

- cancerogenesi (insorgenza di tumori)
- mutagenesi (modificazioni del DNA)
- teratogenesi (alterazioni gravi dello sviluppo embrionale)
- morte degli epatociti
- induzione di fragilità capillare
- alterazione della coagulazione

L'intossicazione primaria cronica da aflatossine per l'ingestione regolare di bassi livelli di tossina provoca invece:

- riduzione delle produzioni (latte ma anche uova)
- riduzione dell'ingestione e dell'accrescimento
- peggioramento dell'indice di conversione alimentare
- peggioramento delle performance riproduttive
- danni epatici, rilevabili anche attraverso l'alterazione di alcuni parametri ematici quali GGT (gamma-glutamyl transferasi) e ALP (fosfatasi alcalina)
- alterazione della risposta immunitaria, con diminuzione della resistenza alle infezioni

### 3.3.5 Ocratossina A

L'Ocratossina A (OTA), prodotta da alcuni funghi del genere *Penicillium* e *Aspergillus*, risulta essere particolarmente pericolosa per le specie avicole e suine, e gli effetti conseguenti alla sua ingestione di norma sono i seguenti:

- riduzione dell'ingestione
- riduzione dell'accrescimento
- peggioramento delle performance produttive e riproduttive
- maggiore sensibilità alle infezioni (effetto immunotossico)
- danni renali (effetto nefrotossico) con polidipsia e poliuria, iperproteinemia e azotemia
- effetto genotossico
- effetto teratogeno
- fetotossicità

Nei paragrafi che seguono sono indicati gli effetti delle principali micotossine sulle maggiori specie di interesse zootecnico, divise quando possibile per categoria di animali e con i relativi livelli di contaminazione della dieta (ppm ovvero mg/kg oppure ppb ovvero µg/kg di alimento) o di ingestione giornaliera di tossina.

Le specie considerate sono elencate in base alla sensibilità, alle micotossine e per primi sono esposti gli effetti specifici delle tossine prodotte da *Fusarium*, il genere più diffuso in nord Italia nei cereali utilizzati per l'alimentazione animale.

### **3.4 Effetti specifici delle micotossine nelle diverse specie animali**

#### *3.3.1 Micotossicosi nei suini*

Tra le specie monogastriche i suini sono particolarmente sensibili alle micotossine, sia in termini di soglia di comparsa della sintomatologia che di gravità degli effetti (Tabella 13).

La fumonisina B1 si è dimostrata responsabile nel suino della comparsa di edema polmonare (PPE, porcine pulmonary edema) in maniera dose dipendente fino a provocare la morte dell'animale.

L'edema pare essere la conseguenza della vasocostrizione dovuta alla compromissione del sistema cardiovascolare, probabile causa della patologia (Smith et al., 1996a,b; Constable et al., 2000).

Anche nei confronti dei tricoteceni i suini appaiono molto sensibili. La comparsa di sintomi tipici come la diminuzione dell'ingestione si verifica infatti a livelli di esposizione inferiori rispetto alle altre specie monogastriche.

Lo zearalenone, il micoestrogeno che altera la funzionalità riproduttiva, provoca nel suino importanti alterazioni del ciclo estrale e peggioramento delle performance nelle scrofe adulte e nei verri, ma colpisce anche le scrofette prepuberi fino a provocare lesioni macroscopiche.

E' dimostrato che anche i suinetti allattanti possono subire gli effetti nocivi delle micotossine a causa dell'intossicazione della madre e del trasferimento nel latte di alcune tossine come la T-2 e lo stesso zearalenone. Le conseguenze dell'intossicazione dei neonati o dei soggetti molto giovani sono tra l'altro ancora più gravi, potendo portare alla morte in pochi giorni dalla nascita.

**Tabella 13 - Effetti delle principali micotossicosi nel suino**

<b>Categoria di suini</b>	<b>Concentrazione tossina</b>	<b>Effetto</b>	<b>Rif. bibliografico</b>
<i>Fumonisine</i>			
suinetti in svezzamento		iperplasia nodulare del fegato; lesioni all'esofago; ulcere gastriche;	Casteel et al., 1993
suinetti svezzati		edema polmonare dose dipendente; morte	Zomborszky et al., 1997 Fazekas et al., 1998
suini in accrescimento	1-10 ppm	riduzione dell'incremento di peso; ingestione e accrescimento irregolari; aumento colesterolo sierico; aumento rapporto sfinganina/sfingosina in fegato, polmoni e reni	Rotter et al., 1996
	200 ppm	aumento di peso di fegato e polmoni riduzione della clearance polmonare; ipertensione polmonare; inibizione dei macrofagi polmonari	Harvey et al., 1996 Smith et al., 1996b
suini in finissaggio	>1000 ppm	edema polmonare  ingestione e accrescimento irregolari; aumento di grasso nella carcassa; aumento del colesterolo sierico	Harrison et al., 1990  Rotter et al., 1997
<i>Zearalenone</i>			
scrofette prepuberi		tumefazione vulvare; prolasso vaginale e setticemia con intossicazioni importanti	Gaumy et al., 2001
scrofe	1-10 ppm 6-9 ppm 25 ppm	sindrome iperestrogenica pseudogavidanza; assenza dell'estro infertilità; estro permanente; pseudogavidanza con sviluppo mammario; diminuzione numerosità nidiate e peso suinetti alla nascita; malformazioni e riassorbimenti fetali	Coulombe, 1993 Young e King, 1986 Chang et al., 1979
	220 ppm	diminuzione degli embrioni vitali; aumento suinetti nati morti; aumento aborti	Kordic et al., 1992
suinetti allattanti da madre intossicata		gonfiore con edema e rossore della vulva; necrosi della coda; lesioni congenite ai genitali	Da Casto et al., 1995

verri	30-60 ppm	esterni depressione del testosterone sierico; diminuzione peso testicoli e spermatogenesi; peggiore qualità del seme; soppressione della libido; femminilizzazione	Diekman e Green, 1992
-------	-----------	---	-----------------------

---

**T-2**

	>0,4 ppm >0,5 ppm >2 ppm	diminuzione dell'ingestione diminuzione dei linfociti	Friend et al., 1992
		diminuzione degli elementi corpuscolari e dell'emoglobina sanguigna	Rafai et al., 1995b
	4 ppm	dermatite del muso; ulcerazione delle mucose di naso e bocca ed esofago; aumento P e Mg inorganici nel sangue;	Rafai et al., 1995a
		diminuzione dell'ingestione e dell'accrescimento del 20%	Diekman e Green, 1992 Placinta et al., 1999
	12 ppm	rifiuto dell'alimento	Young et al., 1983
scrofa nell'ultimo quarto di gravidanza	24 mg/dia	passaggio della tossina al latte; suinetti malati a 48-72ore dalla nascita; debolezza; diarrea; collasso; morte	Vanyi et al., 1991

---

**DON**

	0,9 ppm	apparizione della sintomatologia	Eriksen e Petterson, 2004
	1,7 ppm	aumento del peso del fegato; riduzione dell'ingestione; riduzione dell'accrescimento; riduzione dell'efficienza alimentare;	Bergsjo et al., 1993
		riduzione del peso della carcassa; riduzione delle proteine ematiche totali, albumina, Ca, P;	
	1,3 -2 ppm	riduzione dell'efficienza alimentare; dimagrimento	Young et al., 1983 Trenholm et al., 1984
	4 ppm	diminuzione dell'ingestione e dell'accrescimento del 20% riduzione dose-dipendente della risposta anticorpale al richiamo del vaccino antitetanico;	Diekman e Green, 1992 Placinta et al., 1999 Overnes et al., 1997
	12 ppm	rifiuto dell'alimento	Young et al., 1983

---

## **OTA**

suinetti e suini in accrescimento	25 ppb	riduzione dell'accrescimento; peggioramento efficienza alimentare;	Malagutti et al., 2005
	1000 ppb	polidipsia; poliuria; azotemia anoressia e vomito; aumento temperatura rettale; congiuntivite; disidratazione;	Straw e Taylor, 2006 Chu et al., 1972 Chu, 1974 Marquardt et al., 1992
verri	20 ppb/dia	peggioramento qualità seme	Birò et al., 2003
<hr/>			
<b>Aflatossine</b> suini in accrescimento	2 ppm	riduzione dell'accrescimento; riduzione Ca, Na, P, glucosio, colesterolo ematici	Harvey et al., 1989
<hr/>			



Lesioni da Fusario-tossine (da: [www.knowmycotoxins.com](http://www.knowmycotoxins.com))



Lesioni da Fusario-tossine (da: [www.knowmycotoxins.com](http://www.knowmycotoxins.com))



Lesioni da Fusario-tossine (da: [www.knowmycotoxins.com](http://www.knowmycotoxins.com))

### *3.3.2 Micotossicosi negli avicoli*

Tutte le specie avicole sono sensibili alle micotossine ed anche i principali sintomi sono comuni.

Esistono comunque tra le specie differenze di sensibilità in relazione al tipo di tossina e al livello di contaminazione e particolare attenzione è da riservare ai casi in cui è possibile una "cross-contamination" diretta ai prodotti alimentari destinati al consumo umano, come il trasferimento di DON e aflatossina B1 o loro residui nelle uova dopo ingestione di alimento contaminato (Prelusky et al., 1987; Oliveira et al., 2000).

Dai dati presentati in Tabella 14 si deduce che rispetto agli altri monogastrici gli avicoli sembrano essere meno sensibili ad alcune tossine, come zearalenone e deossinivalenolo, soprattutto se si considerano evidenti sintomatologie cliniche.

Risultano invece maggiormente sensibili ad altri tricoteceni quali la tossina T-2 e il diacetossiscirpenolo (DAS). Nei confronti di queste tossine le lesioni del cavo orale sono considerate un sintomo indicativo per formulare una diagnosi (Jewers, 1990), mentre gli effetti clinici delle altre micotossine appaiono abbastanza generici, riguardando più che altro la riduzione dell'ingestione e il peggioramento delle performance (accrescimento, produzione di uova).

In merito alle differenze tra specie i tacchini e le anatre sembrano essere le più sensibili, queste ultime soprattutto verso le aflatossine, anche se la bibliografia specifica non è esaustiva.

**Tabella – 14: Effetti delle principali micotossicosi in diverse specie avicole**

<b>Specie/categoria di avicoli</b>	<b>Concentrazione tossina</b>	<b>Effetto</b>	<b>Rif. bibliografico</b>
<i>Fumonisine</i>			
broiler	25-50 ppm	aumento del rapporto epatico sfinganina:sfingosina;	Broomhead et al., 2002
tacchini		riduzione dell'ingestione; riduzione dell'accrescimento; riduzione dell'efficienza alimentare;	
pulcini di tacchino	300 ppm	riduzione di peso; riduzione dell'ingestione; riduzione dell'efficienza alimentare; lesioni orali	Kubena et al., 1997b
	>100 ppm	riduzione dell'ingestione; riduzione dell'accrescimento; aumento del peso di vari organi (fegato, cuore, reni...)	Bermudez et al., 1995 Ledoux et al., 2003
broiler e pulcini di tacchino		manifestazioni cliniche dose-dipendenti; riduzione dell'ingestione; riduzione dell'accrescimento; aumento mortalità (andatura traballante, estensione di arti e collo, paralisi, dispnea); diarrea	Javed et al., 1993b
ovaiole in deposizione	8 ppm		Prathap Kumar et al., 1997
<i>Zearalenone</i>			
		tossicità limitata; maggiormente resistenti tra i monogastrici di allevamento;	Gaumy et al., 2001

<b><i>T-2</i></b>			
broiler	0,4 ppm 0,5 ppm 2 ppm	diarrea lesioni a cuore, fegato, duodeno e reni riduzione dell'ingestione; riduzione dell'accrescimento;	Cavret e Lecoeur, 2006 Grabarevic et al., 1992 da Eriksen e Pettersson 2004 Richard et al., 1978
ovaiole	20 ppm	diminuzione produzione uova e peggioramento qualità del guscio	Pier et al., 1980
tacchini	0,2-982 ppm	gravi lesioni cavità orale; modificazioni cellulari nell'intestino tenue;	Sklan et al., 2003
oche		riduzione produzione e schiudibilità uova; aumento mortalità	Vanyi et al., 1994
pulcini e pulcini di tacchino pulcini di anatra		riduzione dell'accrescimento; lesioni alla cavità orale; perdita di peso; riduzione del peso di timo, milza e borsa di Fabrizio; ulcere alla cavità orale e all'esofago	Kubena et al., 1995 Kubena et al., 1997a Neiger et al., 1994
<b><i>DON</i></b>			
broiler	16 ppm	riduzione dell'efficienza alimentare aumento del peso relativo di ventriglio, borsa di Fabrizio e cuore	Kubena et al., 1989a Kubena et al., 1997a
<b><i>OTA</i></b>			
broiler	2 ppm  >2 ppm	riduzione dell'accrescimento; riduzione dell'efficienza alimentare; aumento peso relativo di fegato, ventriglio, reni e pancreas; anemia; degenerazione tubuli renali;	Kubena et al., 1989b  Huff et al., 1975
ovaiole	1-4 ppm	riduzione dell'accrescimento; ingrossamento dei reni; diminuzione della clearance renale; diminuzione produzione di uova; riduzione ingestione alimento; diminuzione proteine sieriche	Jewers, 1990
<b><i>Aflatossine</i></b>			
polli	500 ppb	lesioni al fegato	Jewers, 1990
pulcini di anatra	30 ppb	lesioni al fegato	Jewers, 1990
pulcini di tacchino	300 ppb 0,25-0,5 ppm	lesioni al fegato predisposizione a infezioni batteriche e virali	Jewers, 1990 Edds, 1973



Lesioni da Fusario-tossine (da: [www.knowmycotoxins.com](http://www.knowmycotoxins.com))



Lesioni da AF e OTA (da: [www.knowmycotoxins.com](http://www.knowmycotoxins.com))  
(riduzione della pigmentazione)



Lesioni da AF e OTA (da: [www.knowmycotoxins.com](http://www.knowmycotoxins.com))  
(lesioni renali, reni ingrossati e pallidi)

### *3.3.3 Micotossicosi negli equidi*

Relativamente agli equidi (cavalli e asini) (Tabella 15) le informazioni specifiche riguardanti le micotossicosi sono ancora scarse. Particolare attenzione è comunque da riservare alle intossicazioni da fumonisine, responsabili di neuro ed epatotossicità, che possono causare una patologia conosciuta come leucoencefalomalachia equina (ELEM).

Il decorso e la sintomatologia clinica sono legati all'entità e alla durata dell'esposizione alla tossina, oltre che alla variabilità individuale, e le manifestazioni iniziali comprendono atassia, paresi, disordini locomotori e ipersensibilità (D'Mello et al., 1999).

La leucoencefalomalachia equina può avere decorso acuto fatale (Ross et al. nel 1993 riportarono la morte di un poni in 9 giorni dall'inizio della somministrazione di una dieta con 44 ppm di fumonisina B1), con lesioni importanti al cervello come edema e necrosi liquefattiva di uno o entrambi gli emisferi (D'Mello et al., 1999). Altre volte la morte può sopraggiungere per lesioni epatiche irreversibili con sintomatologia comprendente ittero, petecchie delle membrane mucosali e gonfiore delle labbra o del muso (Uhnlinger, 1991; Ross et al., 1993).

Come nelle altre specie trattate, a livello ematico l'intossicazione da fumonisine comporta un sensibile aumento del rapporto sfinganina:sfingosina nel siero (Goel et al., 1996).

Questa categoria di tossine pare inoltre essere una concausa nel cavallo dell'infiammazione del duodeno e del digiuno prossimale (DPJ, duodenitis/proximal jejunitis), patologia chiamata anche enterite prossimale o anteriore, gastroduodenite-digiunite, duodenite-digiunite prossimale emorragica fibronecrotica (Cohen, 2003).

I segni clinici maggiori sono i sintomi della colica e un importante reflusso nasogastrico, con

complicazioni variabili dalla laminite alla perforazione dell'esofago e alla peritonite settica (Cohen, 2003).

Nei confronti dei tricoteceni gli equini appaiono generalmente più resistenti delle altre specie monogastriche, anche se, nei risultati delle prove sperimentali, si rilevano differenze a volte consistenti in termini ad esempio di riduzione di ingestione e perdita di peso. Queste differenze possono essere tuttavia interpretate, nei soggetti sottoposti ad attività sportiva, come effetto dei maggiori fabbisogni energetici legati all'esercizio fisico più o meno intenso (Caloni et al., 2009).

Visto il comune sistema di stabulazione su paglia non è da sottovalutare inoltre la possibilità che il contatto con le micotossine avvenga, oltre che per ingestione anche per inalazione dal materiale di lettiera di scarsa qualità, con il rischio dell'insorgenza anche di disordini respiratori.

**Tabella 15 – Effetti delle principali micotossicosi negli equidi**

<b>Specie/categoria di equidi</b>	<b>Concentrazione tossina</b>	<b>Effetto</b>	<b>Rif. bibliografico</b>
<i>Fumonisine</i>			
cavalli adulti	65-200 ppm	ELEM;	Schumacher et al., 1995
poni	1-88 ppm	aumento della GGT ematica ELEM in tutti i soggetti;	Ross et al., 1993
asini	0,6-28,5 ppm	epatopatia in alcuni soggetti riportata morte per ELEM di 100 soggetti	Rosiles et al., 1998
stalloni riproduttori	seme in vitro	possibile infertilità per effetto genotossico sugli spermatozoi	Minervini et al., 2010
<i>Zearalenone</i>			
fattrici	7 mg/dia	nessun effetto significativo sul ciclo estrale;	Juhasz et al., 2001
	2,6 ppm	lesioni attorno alla bocca in alcuni soggetti rifiuto del cibo; edema vulvare; prolasso vaginale; ingrossamento e emorragie uterine	Gimeno e Quintanilla, 1983
stalloni	2,6 ppm	genitali flaccidi	Gimeno e Quintanilla, 1983
<i>T-2</i>			
fattrici	7 mg/dia	nessun effetto significativo su attività ovarica e fertilità; lesioni al cavo orale in alcuni soggetti;	Juhasz et al., 1997
<i>DON</i>			
cavalli	98-120 mg/d	nessun effetto significativo rilevato	Jhonson et al., 1997
cavalli da sella	0,5-2,7 ppm paglia lettiera	perdita di peso	Zeyner et al., 2002
<i>Aflatossine</i>			
poni	0,075 ppm	inappetenza, depressione; aumento temperature; tremori, atassia;	Cysewski et al., 1982

	0,3 ppm	epatotossicità (ittero, statosi, necrosi); entrite emorragica; morte; inappetenza, depressione; aumento temperature; tremori, prostrazione, atassia; scolo nasale; tosse, rantoli; epatotossicità (ittero, statosi, necrosi); entrite emorragica; morte;	Cysewski et al., 1982
cavalli	12,5 ppb	ingestione di acqua e cibo invariate; feci molli	Hasso, 2003

### 3.3.4 Micotossicosi nei ruminanti

Le specie ruminanti rispetto a quelle monogastriche sembrano essere più resistenti ai tricoteceni conosciuti (Trenholm et al., 1985) (Tabella 16), grazie al ruolo che la microflora ruminale e in particolare la frazione protozoaria esercitano sulla detossificazione di alcune di queste tossine (Yiannikouris e Jouany, 2002).

L'efficacia di tale attività è però influenzata da diversi fattori quali il tipo di tossina, la quantità assunta, il tempo di permanenza nel rumine, l'intervallo tra i pasti (Kiessling et al., 1984) e la dieta, quale fattore determinante nella composizione della microflora ruminale. Tale aspetto non è stato ancora compreso del tutto, visto che da alcune prove (Kiessling et al., 1984) pare che una dieta più ricca di foraggi favorisca ad esempio il metabolismo dell'ocratossina, mentre altre sembrano verificare il contrario (Muller et al., 1998). L'ocratossina A nel rumine viene idrolisata in larga misura a ocratossina- $\alpha$ , un composto molto meno tossico, anche se la capacità detossificante può essere compromessa da intossicazioni importanti che fortunatamente raramente si verificano in condizioni normali (Ribelin et al., 1978).

Queste considerazioni valgono per gli animali abbastanza grandi da avere i prestomaci e la flora ruminale adeguatamente sviluppati (almeno 4 mesi per i bovini), dato che i soggetti giovani si sono dimostrati molto più sensibili alla tossina (Ribelin et al., 1978).

L'ocratossina nei ruminanti può essere dunque causa più frequentemente di intossicazioni croniche senza sintomatologia evidente, causando sindromi epatiche o renali, anche se secondo Ribelin et al., (1978) questa ipotesi andrebbe presa in considerazione soltanto dopo aver escluso altre cause attraverso diagnosi differenziali.

Tra i tricoteceni il deossinivalenolo (DON) è in grossa misura convertito nel rumine ad una forma ossidata, il DOM-1 (King et al., 1984), che risulta essere meno tossica della molecola di origine (Swanson et al., 1987).

Lo zearalenone supera la barriera ruminale causando disordini riproduttivi in funzione del grado di contaminazione e di assorbimento, della biotrasformazione e del tempo di ritenzione.

**Tabella 16 – Effetti delle principali micotossicosi in diverse specie ruminanti**

<b>Specie/categoria</b>	<b>Concentrazione tossina</b>	<b>Effetto</b>	<b>Rif. bibliografico</b>
<i>Fumonisine</i>			
vitelli	15-148 ppm	nessun effetto significativo su ingestione e accrescimento; alterazione parametri di funzionalità epatica; alterazione parametri del sistema immunitario;	Osweiler et al., 1993
agnelli	45,5 ppm	abbassamento pH ruminale; modificazioni della formula plasmatica; diminuzione dell'ingestione; aumento del peso di fegato e reni; letargia, diarrea; possibile morte;	Edrington et al., 1995
<i>Zearalenone</i>			
bovine da latte	fino a 500 ppm	nessun effetto significativo sulla salute o sul comportamento; corpo luteo più piccolo;	Weaver et al., 1986a
	1 ppm	normale produzione di latte; riscontro negativo di residui nel latte	Sheevre et al., 1979
bovine	25/100 ppm	infiammazione genitali esterni	Mirocha et al., 1978
	14 ppm	infertilità	Mirocha et al., 1968
manze	14 ppm	infertilità; diminuzione del tasso di concepimento	Weaver et al., 1986b
bovine e pecore		infertilità; aumento pecore non fertili; diminuzione parti gemellari nelle pecore;	Towers e Sprosen, 1993
<i>T-2</i>			
pecore in acidosi sub clinica	0,3-0,9 mg/dia	bassi livelli di progesterone; accorciamento fase luteinica; allungamento fase follicolare	Huszenicza et al., 2000
manze in acidosi sub clinica	9 mg/dia	ritardo nell'ovulazione e nell'inizio della fase luteinica	Huszenicza et al., 2000
bovina gravida	50 ppm	rifiuto del cibo; diarrea; ulcere ruminali;	Weaver et al., 1980
vitelli		riduzione titolo anticorpale e delle proteine del complemento	Mann et al., 1983
<i>DON</i>			
vitelloni da carne	0,7-21 ppm	nessun effetto significativo su ingestione e performance	Windels et al., 1995
bovine in lattazione	2,7/6,4 ppm	nessun effetto significativo su ingestione, produzione e composizione del latte	Charmley et al., 1993

	8,5 ppm	nessun effetto significativo si ingestione, produzione e composizione del latte	Ingalls, 1996
bovine in asciutta	fino a 6 ppm	nessun effetto significativo sull'ingestione e la condizione corporea	Trenholm et al., 1985
agnelli	15,6 ppm	nessun effetto significativo sull'ingestione, sull'accrescimento sull'efficienza alimentare	Harvey et al., 1986
<hr/>			
<b><i>OTA</i></b>			
vitelli	11/25 mg per kg peso vivo singola dose	morte in 24 ore	Ribelin et al., 1978
bovine in gravidanza	0,6-1,66 mg per kg peso vivo	nessun sintomo clinico; parti normali;	
capre	3 mg/kg peso vivo 1-2 mg/kg peso vivo	diarrea, disidratazione; morte in 6 giorni nessun sintomo clinico; assenza di lesioni agli organi; alterazione di alcuni parametri di funzionalità epatica	
<hr/>			
<b><i>Aflatossine</i></b>			
bovine da latte	0,4-0,9 ppm	nessune effetto significativo sull'ingestione; riduzione della produzione di latte	Applebaum et al., 1982
bovine	77 ppm	danni epatici; aborto in gravidanza avanzata; morte	Ray et al., 1986
manze	0,8 ppm	nessun effetto significativo sull'ingestione e l'accrescimento;	Richard et al., 1983
vitelloni da carne	0,3 ppm	nessun effetto significativo sull'ingestione e l'accrescimento; nessun effetto significativo sul profilo sierico;	Helferich et al., 1986
	0,6 ppm	diminuzione dell'ingestione; riduzione dell'accrescimento; nessuna effetto significativo sull'efficienza alimentare; danni epatici	
	0,7/1,0 ppm	diminuzione dell'ingestione; riduzione dell'accrescimento; danni epatici e aumento del peso del fegato	Garrett et al., 1968
<hr/>			

## **4. PROGETTO SPERIMENTALE MICOSAFE: METODOLOGIE DI ANALISI E RISULTATI DELL'INDAGINE REGIONALE**

**Gaspardo B. e Del Zotto S.**

### **4.1 Introduzione**

Il Progetto Regionale MICOSAFE (Nuove metodologie per la lotta alle micotossine nel comparto agro-zootecnico), finanziato dalla Direzione Centrale Risorse Agricole, Naturali e Forestali – Servizio investimenti aziendali e sviluppo agricolo – della Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia ai sensi dell'art. 17 della L.R. 26/2005, è stato proposto e coordinato dal Prof. Bruno Stefanon del Dipartimento di Scienze Animali dell'Università di Udine in cooperazione con i Dipartimenti di Biologia e Protezione delle Piante e di Matematica e Informatica, con il Centro Internazionale di Ricerca per la Montagna e con l'Associazione Allevatori del Friuli Venezia Giulia che ha fornito un importante contributo come collaboratore esterno.

L'obiettivo principale del progetto è stato da un lato quello di effettuare in regione una serie di rilevamenti conoscitivi per misurare il grado di contaminazione delle derrate ad uso zootecnico, dall'altro quello di valutare le velocità e l'affidabilità di metodiche analitiche, alternative a quelle attualmente in uso, che potessero rappresentare un valido e rapido mezzo per rilevare il livello di inquinamento nei prodotti derivanti dal comparto cerealicolo.

### **4.2 Articolazione delle attività**

Lo studio ha avuto inizio nel gennaio del 2008, si è concluso nel dicembre del 2010 ed ha coinvolto 18 allevamenti di bovine da latte, localizzate in Friuli Venezia Giulia, con attività principalmente incentrata su produzioni vegetali biologiche certificate e di qualità quali il formaggio D.O.P. Montasio.

L'attività progettuale, della durata complessiva di 3 anni, è stata organizzata in 3 fasi tra loro integrate.

La **fase 1**, denominata *Risk evaluation* e dedicata all'analisi del rischio nel comparto agro-zootecnico, si è svolta durante i primi due anni (2008 – 2009) ed è stata incentrata sulla valutazione della situazione di contaminazione dei prodotti agroalimentari nella regione Friuli Venezia Giulia. La valutazione del rischio è stata realizzata individuando dapprima i principali alimenti in grado di costituire una fonte di esposizione al rischio, successivamente confrontando il livello di esposizione alla contaminazione attraverso un campionamento efficace che potesse coprire buona parte dell'iter produttivo in azienda (sulla granella durante lo stoccaggio, sull'insilato durante la preparazione e la maturazione e sul prodotto finale latte al momento della mungitura) ed infine individuando le aree geografiche regionali più suscettibili di rischio tossicologico relativo alla contaminazione in base alle caratteristiche pedoclimatiche.

La **fase 2**, denominata *Analysis* e dedicata all'innovazione delle metodiche analitiche, si è svolta durante il primo ed il secondo anno di attività, integrandosi con la fase 1, ed ha avuto come obiettivo

quello di impostare e testare un metodo analitico, alternativo a quelli classici già in uso, che fosse in grado di rilevare la presenza delle fumonisine B1 e B2 qualora presenti al di sopra della soglia di ammissibilità obbligatoria (Regolamento EC No 1126/2007). Tale metodica doveva essere applicabile in campo e doveva essere rapida ed a basso costo. Come metodo di riferimento e quantificazione sono stati utilizzati il dosaggio immuno-assorbente legato ad un enzima (test ELISA) e l'analisi in cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC).

Grazie ai risultati ottenuti con queste tecniche è stato possibile effettuare una taratura e mettere a punto una nuova potenziale metodica basata sulla spettroscopia nel vicino infrarosso (NIR).

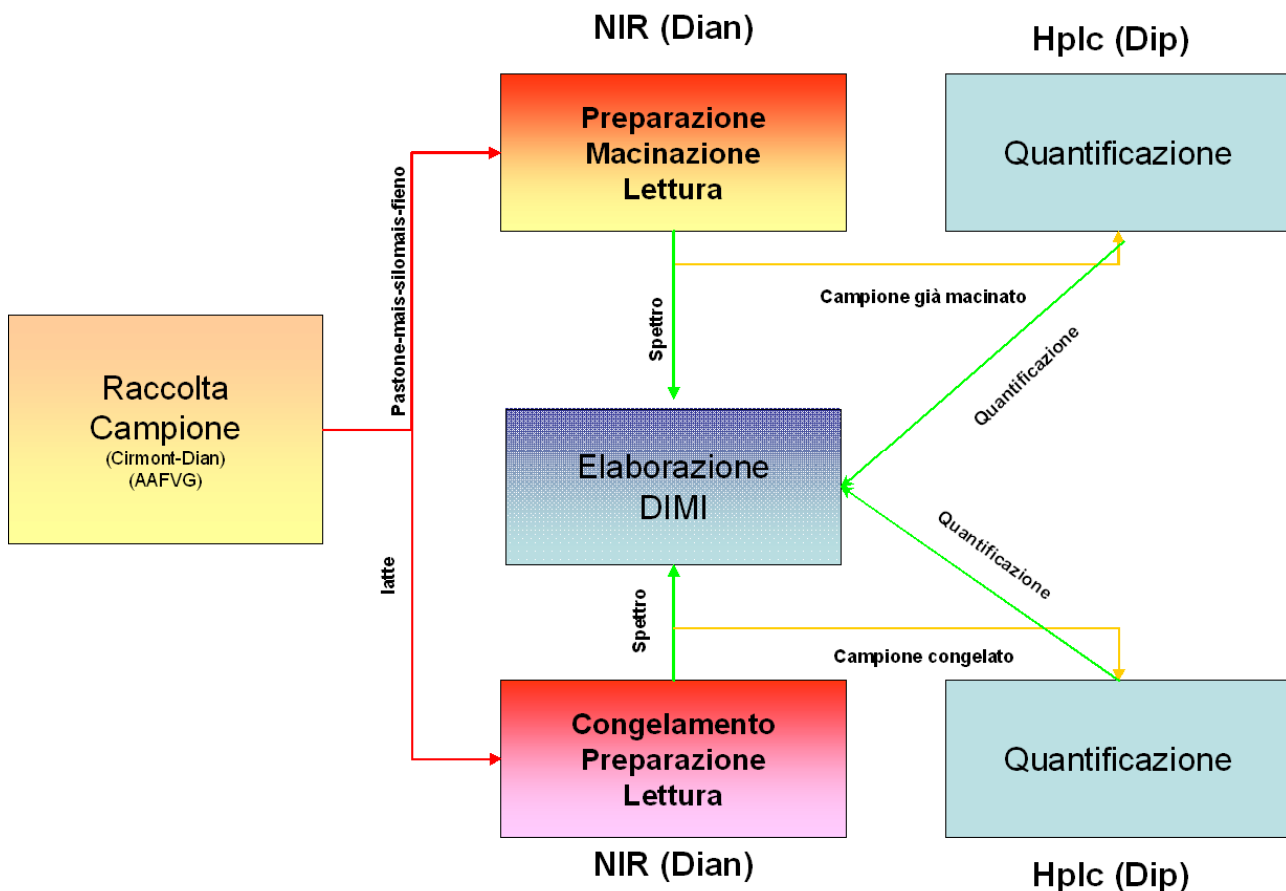
La **fase 3**, denominata *Information* e dedicata alla diffusione dei risultati, è stata sviluppata principalmente durante il terzo anno di attività progettuale ed ha avuto come obiettivi principali da un lato la diffusione dei risultati scientifici ai settori interessati dalla problematica della contaminazione da micotossine, dall'altro quello di costruire e pubblicare il presente manuale contenente le linee guida specifiche per il controllo e la gestione delle contaminazioni, in base al settore di produzione.

L'obiettivo è stato raggiunto mediante l'organizzazione di due incontri tematici informativi diretti ai coltivatori e agli allevatori, mediante la presentazione di una pubblicazione scientifica ad una rivista internazionale, di due articoli tecnico-divulgativi sulla rivista regionale *Friuli Alleva* ed infine mediante la pubblicazione del presente manuale. Gli incontri tematici sono stati organizzati in collaborazione con l'Associazione Allevatori del Friuli Venezia Giulia, in occasione delle edizioni 2009 e 2011 della fiera annuale dell'agricoltura (AGRIEST) svoltasi a Udine.

Tutte le attività sono state predisposte e realizzate grazie alla collaborazione del coordinatore (Dipartimento di Scienze Animali dell'Università di Udine - DIAN) con i 3 partner progettuali (Dipartimento di Biologia e Protezione delle Piante - DIPI, Dipartimento di Matematica e Informatica - DIMI e Centro Internazionale di Ricerca per la Montagna - CIRMONT).

La definizione delle aree territoriali di riferimento, l'identificazione delle aziende da coinvolgere nell'indagine, la raccolta e la preparazione dei campioni e l'analisi NIR sono state effettuate dal DIAN in collaborazione con CIRMONT e grazie alla consulenza esterna dell'Associazione Allevatori del Friuli Venezia Giulia. Le analisi dei campioni con metodo HPLC ed ELISA per quantificare la concentrazione delle diverse micotossine negli alimenti ad uso zootecnico e nel latte sono state realizzate dal DIPI. L'elaborazione degli spettri di assorbanza NIR, dei dati analitici quantitativi e del modello statistico previsionale sono stati infine completati dal DIMI. La sequenza delle diverse fasi operative ed il ruolo di ciascun partner sono rappresentati in Figura 3.

**Figura 3 - Sequenza delle diverse fasi operative ed ruolo di ciascun partner coinvolto nel progetto**



### 4.3 Analisi del rischio e valutazione della contaminazione

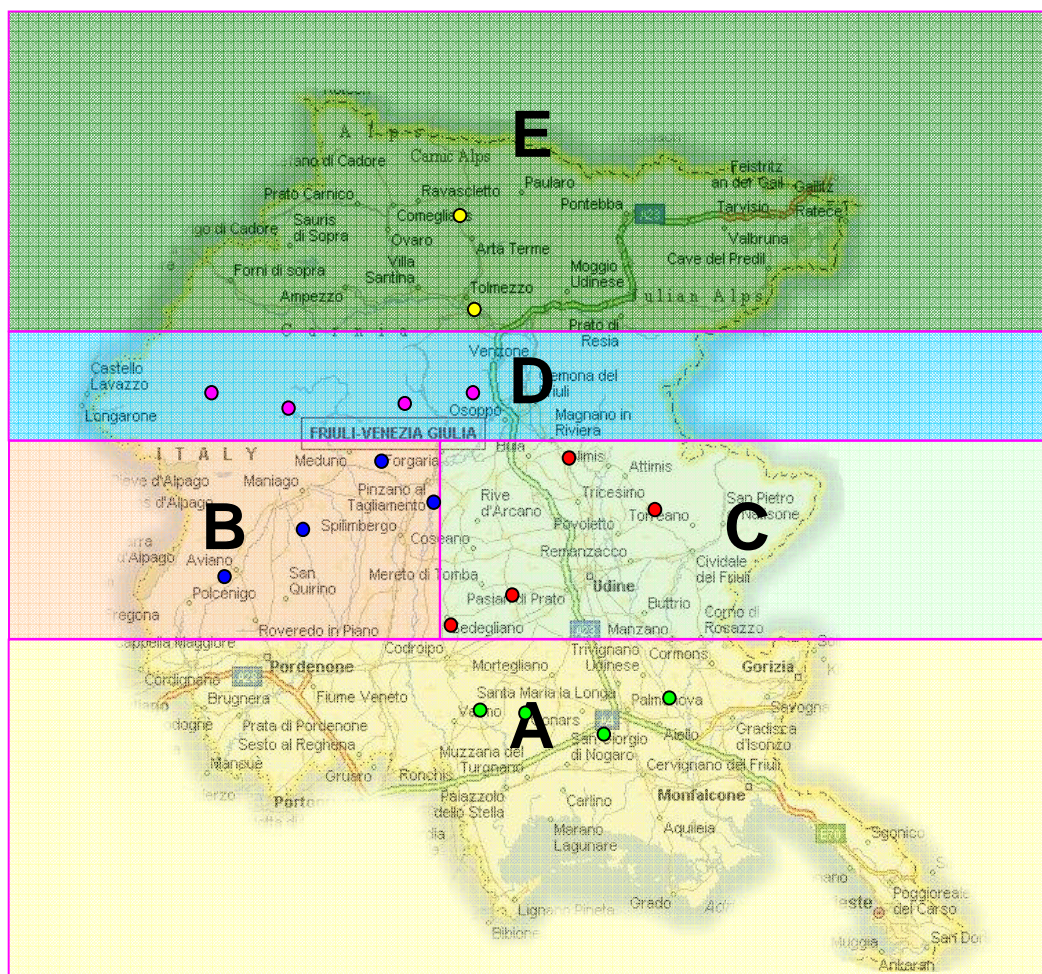
#### 4.3.1 Raccolta dei campioni

Per realizzare l'indagine conoscitiva prevista dal progetto MICOSAFE, il territorio regionale è stato suddiviso, in base alle caratteristiche climatiche, altitudinali e produttive, in cinque diverse macroaree (Figura 4) all'interno di ciascuna delle quali sono successivamente state individuate un numero di 2/4 aziende campione che risultassero adatte agli scopi del progetto. I campionamenti sono stati effettuati per due anni consecutivi (2008 – 2009) al fine di valutare il livello di contaminazione ed il suo variare in base alle possibili oscillazioni climatiche annuali. Una volta raccolti, i campioni sono stati sottoposti ad analisi per valutare la presenza delle varie tossine ed il rispettivo livello di contaminazione.

Nei primi 24 mesi di attività, sono stati realizzati in totale 6 campionamenti al fine di determinare il grado di contaminazione da fumonissina B1 e B2 e da aflatossine B1, B2, G1, G2 nelle derrate alimentari ad uso zootecnico (in particolare in prodotti derivati dal mais e dalla sua lavorazione) e il livello di inquinamento da aflatossina M1 nel latte vaccino prodotto da ciascuna azienda. Gli ultimi 12 mesi di attività progettuale sono stati invece dedicati principalmente all'elaborazione dei risultati.

I campionamenti sono stati effettuati in corrispondenza dei periodi compresi tra aprile/maggio, giugno/luglio e settembre/ottobre.

**Figura 4- Rappresentazione delle diverse macroaree individuate nel territorio regionale**



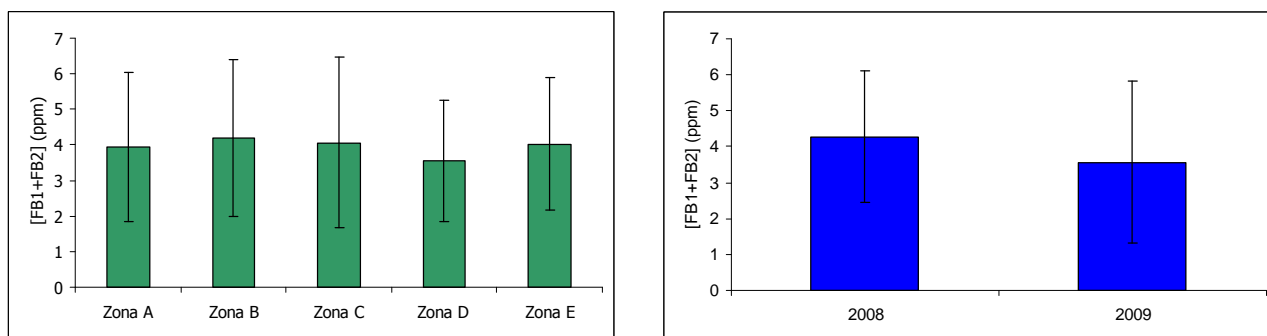
#### *4.3.2 Quantificazione della concentrazione di micotossine*

I campioni di farina di mais, subito dopo la raccolta, sono stati essiccati in stufa a 60° C per 48 ore e analizzati per determinare la concentrazione di fumonisina B1 e B2 mediante HPLC (metodo ufficiale AOAC 2001.04).

Sulla stessa farina e sui campioni di insilato di mais sono state poi realizzati i test ELISA per determinare la concentrazione di aflatossine totali. Nei campioni di latte è stata misurata solamente la concentrazione di aflatossina M1.

#### *4.3.3 Risultati – Livello di contaminazione in Friuli Venezia Giulia*

Per quanto riguarda le fumonisine, i livelli riscontrati nella farina di mais sono risultati in tutti i casi inferiori a quanto indicato dalla normativa relativa alle materie prime utilizzate per l'alimentazione animale (60 ppm – Raccomandazione 2006/576/CE).



**Figura 5- Livello medio di contaminazione da fumosinine in regione**

Rispetto alle aree e all'anno di campionamento, il livello medio di contaminazione non è risultato differente nelle 5 zone considerate (dato statisticamente significativo) e durante gli anni 2008/2009 (Figura 5).

Nel caso delle aflatossine totali le analisi sono state effettuate solo sui campioni del primo anno di attività (2008) e sono stati osservati due soli casi di positività negli insilati di mais raccolti tra aprile e maggio e altri due casi in campioni raccolti da aziende diverse tra settembre e ottobre. Nonostante questi casi di positività, non è stata osservata nel latte di massa una corrispondente concentrazione di AFM1 al di sopra dei limiti di legge previsti per il latte destinato all'alimentazione umana. Per una sola azienda, e durante un solo prelievo, è stata accertata una elevata presenza di aflatossine nella farina di mais. In questo unico caso è stata osservata una corrispondente contaminazione del latte, superiore ai livelli stabiliti dalla legge. Episodi di questo tipo sono comunque generalmente rari e controllabili, in quanto associati a partite di cereali derivanti da appezzamenti particolarmente contaminati o ad una errata conservazione della materia prima o delle farine.

#### **4.4 Innovazione delle metodiche analitiche**

L'attività sperimentale all'interno di questa fase ha previsto l'applicazione e la valutazione di due categorie di metodiche analitiche, ossia quelle tradizionali (ELISA – HPLC) e quelle innovative (NIR associato alla definizione di modelli statistici previsionali). I valori quantitativi ottenuti a partire dai campioni analizzati con l'ausilio delle metodiche tradizionali sono stati utilizzati come misure di riferimento per tarare e validare la metodica innovativa rappresentata dalla spettroscopia NIR associata ai modelli statistici.

##### *4.4.1 Le metodiche tradizionali*

Tra le metodiche tradizionali il test ELISA è un test quantitativo o semiquantitativo di larga diffusione. Permette uno screening relativamente rapido di un numero elevato di campioni. Il tempo impiegato per giungere al risultato dipende dallo stato del campione e dal numero e dalle tipologie di

manipolazione che deve subire prima dell'esame. Presenta alcuni punti di debolezza come il discreto numero di falsi positivi e la difficoltà di discriminazione tra composti strutturalmente analoghi.

L'analisi in HPLC è una metodica sensibile e accurata che può essere anche automatizzata. E' un metodo molto indicato nel caso in cui nel campione siano presenti concentrazioni molto basse di tossina, come può accadere per le aflatossine nel latte. I principali inconvenienti riguardano la notevole manipolazione cui deve essere sottoposto il campione per essere purificato prima dell'analisi, l'elevato costo di investimento sia relativo all'apparecchiatura di analisi (Figura 6) che al materiale di consumo, la necessità di personale istruito e specializzato per effettuare correttamente l'analisi e l'interpretazione dei risultati.



**Figura 6 – Cromatografo per HPLC**

#### *4.4.2 La metodica innovativa: spettroscopia nel vicino infrarosso (NIRS)*

Tra le potenziali metodiche innovative la spettroscopia nel vicino infrarosso (*Near Infrared Spectroscopy*, NIRS) è una procedura non distruttiva, accurata, rapida e largamente utilizzata per misurare il contenuto di proteine, grassi, umidità, ceneri e composti minori nei prodotti agro-alimentari. A partire dal 1960 la spettroscopia NIR ha guadagnato ampia credibilità e accettazione in vari settori industriali per il controllo della materie prime, il controllo della qualità del prodotto e il monitoraggio del processo. Il crescente interesse che la tecnica NIR ha ottenuto anche nel settore agro alimentare è probabilmente un diretto risultato dei suoi maggiori vantaggi rispetto alle altre tecniche analitiche, vale a dire una più facile preparazione del campione senza alcun pretrattamento, la possibilità di ripetere più misure sullo stesso campione e la predizione di diversi parametri chimici e fisici da un singolo spettro. Negli ultimi anni è stata utilizzata per stimare il contenuto di ergosterolo e di micotossine nella granella dei cereali. In precedenti studi (Berardo et al., 2006; Pettersson e Aberg, 2003), è stata valutata l'applicabilità della spettroscopia NIR per quantificare i funghi micotossigeni ed alcuni dei loro metaboliti come l'ergosterolo, la fumonisina B1 e il deossinivalenolo (DON) presenti nella granella e nella farina di mais e frumento in seguito a infezioni naturali e artificiali da *Fusarium*.

I risultati fino ad oggi ottenuti confermano che la tecnica NIR è in grado di predire accuratamente la

quantità delle fumonisine nella granella e nella farina di mais, mentre per quanto riguarda il DON sarebbe necessario effettuare una adeguata calibrazione dello strumento per individuare le ridotte concentrazioni proposte dalla legislazione.



**Figura 7: Spettrofotometro NIR**

Prima che uno spettrofotometro NIR (Figura 7) possa fare una analisi quantitativa è necessario sviluppare una calibrazione specifica per la matrice da analizzare usando metodi multivariati. Il processo di calibrazione principalmente prevede la selezione di un numero di campioni rappresentativo, l'acquisizione degli spettri e la determinazione dei valori di riferimento, la creazione di un modello multivariato relativo alle "variazioni spettrali" dei valori di riferimento delle proprietà analitiche del parametro di interesse e infine la validazione del modello mediante "cross validation", o validazione esterna.

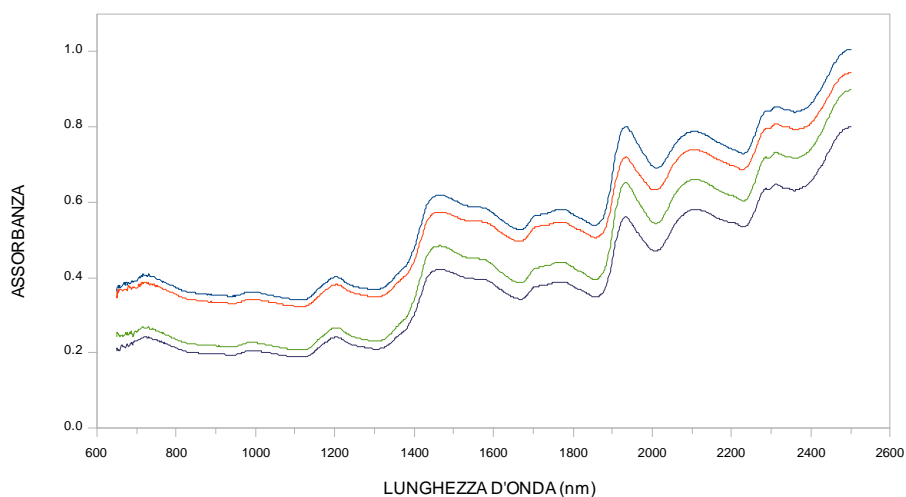
I modelli statistici previsionali sono un insieme di modelli statistici e matematici mediante i quali è possibile effettuare una previsione, la cui attendibilità può essere determinata a priori come appartenente ad un certo intervallo di oscillazione. La loro applicazione riguarda ormai i più diversi ambiti scientifici, umanistici ed economici. La prerogativa di questi modelli consiste nell'apprendimento automatico delle caratteristiche nascoste del fenomeno che si studia e, aspetto ancora più importante, nel loro aggiornamento in continuo man mano che l'applicazione, nel suo funzionamento ordinario, processa nuovi dati. Questa capacità di auto-adattamento consente la gestione in maniera quasi totalmente automatica della previsione di fenomeni che richiedono modelli complessi che si basano sull'analisi multivariata dei dati. Generalmente i sistemi reali che poniamo sotto osservazione e dai quali vogliamo trarre informazioni, sono di tipo multivariato, sono cioè governati da più variabili contemporaneamente e per questo motivo dalla fine degli anni '80 si è diffusa l'analisi multivariata in chemiometria come analisi delle relazioni fra tre o più variabili considerate simultaneamente. Le tecniche chemiometriche sono in grado di estrarre un gran numero di informazioni anche da spettri NIR, la cui complessità consiste nel dover lavorare con migliaia di variabili. In spettroscopia, si opera con un gran numero di variabili in cui, però, sono presenti informazioni ridondanti, che possono quindi

essere eliminate, riducendo la complessità formale e lasciando inalterate le informazioni. Tale esemplificazione viene praticata mediante metodi conosciuti e utilizzati in chemiometria come l'analisi delle componenti principali (Principal Component Analysis – PCA). La PCA estrae la massima informazione possibile sintetizzandola in poche combinazioni lineari delle variabili stesse tra loro completamente indipendenti. La chemiometria, infatti, tiene conto di tutte le variabili in gioco, consentendo di sfruttare al meglio tutte le informazioni contenute nei dati da analizzare al fine di massimizzare le capacità e le performance predittive dei modelli statistici. La descrizione dei dati porta alla formulazione di ipotesi per descrivere quantitativamente il valore di una o più variabili come funzione dei valori di altre variabili. Tali relazioni portano alla creazione di modelli di regressione multivariata che vengono impiegati per effettuare predizioni quantitative, o semplicemente operazioni di screening, che permettono di eliminare velocemente lotti di prodotto scadente, relativamente ad una o più proprietà del sistema in oggetto. Il loro scopo è di trovare la migliore relazione tra un insieme di variabili che descrive gli oggetti studiati ed un insieme di risposte misurate degli stessi oggetti. Tale metodologia viene utilizzata da diversi anni e con successo da una nota azienda produttrice di caffè per riuscire a prevedere, partendo dal chicco verde, la qualità del caffè in tazza, in modo da creare un Virtual Cup-Testers' Panel (Della Riccia e Petracco, 2003) in grado di effettuare un primo screening sulla qualità del caffè esaminato. Tale studio trae la sua originalità ed innovazione dall'aver calibrato lo strumento NIR per la predizione della qualità di prodotto.

#### 4.4.3 Risultati – L'analisi NIR e il modello previsionale per la contaminazione da fumonisine nella farina di mais

Prima di effettuare le analisi quantitative con le metodiche tradizionali, per tutti i campioni di farina di mais sono stati raccolti e archiviati gli spettri di assorbanza mediante spettroscopia nel vicino infrarosso (NIRs). Per fare ciò la farina, dopo essiccazione in stufa a 60 °C, è stata macinata utilizzando un mulino elettrico con griglia da 1 mm. Il campione così preparato è stato poi disposto su una piastra Petri e analizzato mediante spettrometro NIR per ottenere lo spettro di assorbanza (Figura 8). Tutti gli spettri ottenuti sono stati salvati e archiviati per la calibrazione del modello statistico.

**Figura 8 – Esempio di spettri di assorbanza ottenuti con l'analisi NIR**



Per sviluppare il modello sono stati utilizzati 102 campioni ai quali è stato applicato il metodo statistico dei Partial Least Squares (PLS) in fase di calibrazione e la cross-validation in fase di validazione. L'analisi ha permesso di definire un modello in grado di correlare efficacemente le caratteristiche dello spettro di assorbimento con i valori di contaminazione ottenuti con la metodica HPLC, applicata ai campioni raccolti. I risultati ottenuti in fase di validazione hanno inoltre evidenziato la possibilità di applicare il modello a campioni con concentrazione non nota ottenendo previsioni sufficientemente accurate della contaminazione in modo rapido ed economico. Il metodo si è dimostrato in grado di distinguere con efficacia i campioni in base alla soglia delle 4 ppm, valore limite imposto dalla legislazione attuale relativa alle fumonsine.

#### **4.5 Ricadute future del progetto**

Per tutta la filiera agro-alimentare le micotossine rappresentano attualmente uno dei problemi più critici da tenere sotto controllo per limitare gli effetti nocivi sulla salute dell'uomo e degli animali.

Il progetto ha avuto in sé diversi aspetti innovativi che hanno offerto potenziali soluzioni al mondo agricolo regionale. In primo luogo sono stati forniti dati reali sulla diffusione delle micotossine in un campione di allevamenti uniformemente distribuiti nel territorio regionale, con la possibilità quindi, per il comparto agro-zootecnico, di individuare azioni correttive e strategie di contenimento e di pianificazione degli interventi.

Data la diffusione della cerealicoltura nel nostro territorio (più della metà della superficie arativa) e vista l'importanza di ottenere un prodotto di buona qualità, sarebbe importante riuscire a prevedere il livello di contaminazione da micotossine col massimo anticipo. Una strategia di valorizzazione dei prodotti locali non può infatti limitarsi a politiche di marchio che prescindano da certificazioni della salubrità ottenute con metodi moderni. L'utilizzazione di metodiche innovative che permettano l'individuazione precoce delle partite a basso tenore di micotossine, e il loro monitoraggio lungo la filiera, concorrerebbero a generare un alto profilo qualitativo che è ormai universalmente ritenuto essenziale per l'affermazione sul mercato dei nostri prodotti tipici, come la polenta friulana o il formaggio Montasio. D'altro canto, la produzione di energia e l'alimentazione di bestiame tollerante (diverso a seconda della micotossina) rappresentano delle opzioni economicamente valide per i prodotti che venissero precocemente individuati come contaminati e pertanto esclusi dalla filiera di qualità.

I risultati della ricerca hanno consentito di individuare un potenziale metodo analitico innovativo, rapido e a basso costo, basato sulla spettroscopia NIR associata a modelli statistici previsionali che, se ulteriormente perfezionato, potrebbe consentire di garantire la redditività del comparto cerealicolo, evitando drastici cambiamenti negli assetti aziendali e nei piani agronomici ed ottemperando alla normativa europea.

Lo screening del mais utilizzato nell'allevamento delle bovine utilizzate nelle produzioni D.O.P. (formaggio Montasio) e di quello prodotto mediante agricoltura biologica assicurerà un aumento del valore aggiunto dal punto di vista igienico sanitario e non solo organolettico di queste produzioni, con conseguente valorizzazione delle stesse.

Il perfezionamento di un sistema rapido di analisi che consenta sia all'agricoltore in campo che all'allevatore in stalla di avere una quantificazione in tempo reale delle tossine presenti nell'alimento permetterà da un lato una immediata valutazione delle caratteristiche qualitative e sanitarie del prodotto, in modo da individuare la più indicata destinazione d'uso del prodotto, dall'altro di assicurare una maggiore tutela nei confronti del consumatore.

In ultima analisi l'intero processo progettuale ha offerto al sistema agricolo regionale degli strumenti per conoscere e contenere la diffusione delle micotossine nelle derrate alimentari, migliorandone la qualità ed il valore commerciale.

## **5. CONTAMINAZIONE DA MICOTOSSINE NEGLI ALLEVAMENTI:IMPATTO ECONOMICO E ASPETTI GESTIONALI**

**Sandri M., Gaspardo B. e Cividino S.R.S.**

La redditività di un'azienda zootecnica deriva dalla capacità di individuare e mantenere un livello produttivo tale da contenere i costi di produzione, soprattutto in considerazione dell'instabilità del mercato delle materie prime e della produzione vendibile.

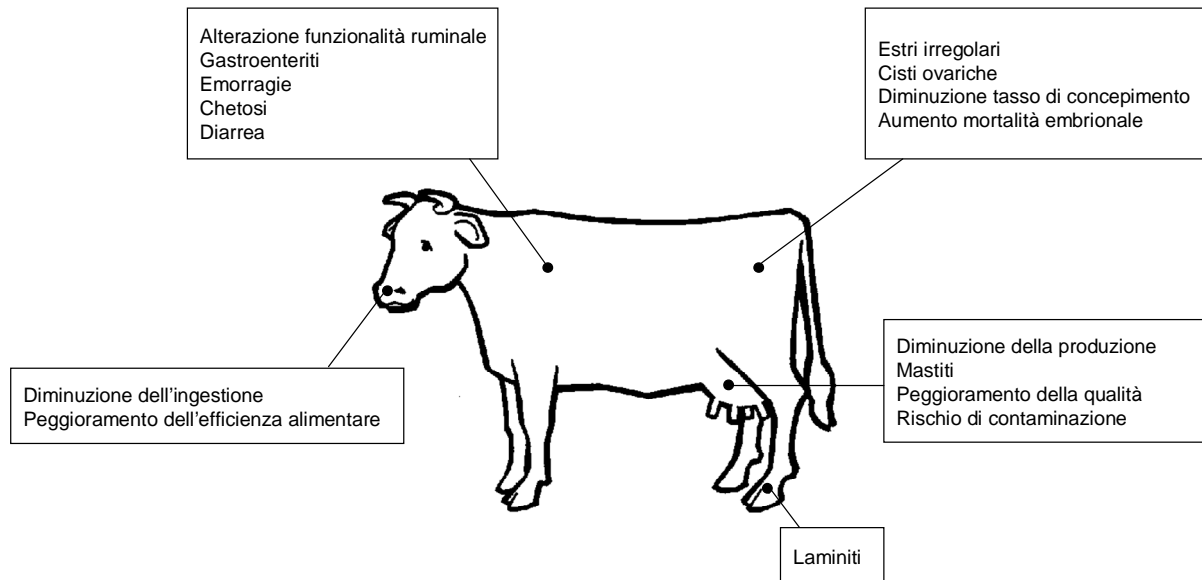
La gestione delle spese passa inevitabilmente attraverso quella della mandria, che se da un lato risulta avere caratteristiche ormai "standardizzate", dall'altro si confronta con animali in cui il potenziale produttivo è stato per decenni l'obiettivo primario della selezione, con inevitabili ripercussioni su altre caratteristiche. Questi animali rispetto a soggetti meno selezionati o a razze rustiche sono infatti di norma meno resistenti agli stress, siano essi di natura gestionale (cambiamento di gruppo), ambientale (clima, gerarchia), infettiva o nutrizionale (cambio di razione, formulazioni non ottimali). Ciò vuol dire che oltre ai danni diretti causati alla salute degli animali da una micotossicosi acuta, un'intossicazione cronica pur non manifestandosi con segni clinici evidenti può comportare perdite indirette in funzione del peggioramento delle produzioni e dell'alterazione della risposta immunitaria provocata.

La minor resistenza agli stress induce negli animali l'insorgenza, in maniera subdola e di difficile diagnosi, di differenti problematiche anche 2-3 mesi dopo l'inizio dell'utilizzo di alimenti contaminati (Özsoy et al., 2005) o in periodi delicati quali il pre e il post parto. Lo studio condotto da Özsoy et al., (2005) su circa 300 bovine ha individuato un'associazione tra la contaminazione della razione con a

aflatossina B1 (mediamente 12,2 ppb o  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e la diminuzione della produzione di latte, la comparsa di zoppie da laminiti sub cliniche e il peggioramento delle performance riproduttive, dovuto alla comparsa di cisti ovariche o infezioni uterine. Nello stesso studio è stato evidenziato inoltre come il latte dei soggetti colpiti da problemi podali o riproduttivi fosse significativamente più contaminato da aflatossina M1, nonostante anche nei soggetti apparentemente sani la contaminazione eccedesse i limiti legislativi (0,25 vs 0,1 ppb).

Questi sono solo alcuni degli effetti che una intossicazione da micotossine può provocare nelle bovine, altri esempi sono rappresentati in Figura 9.

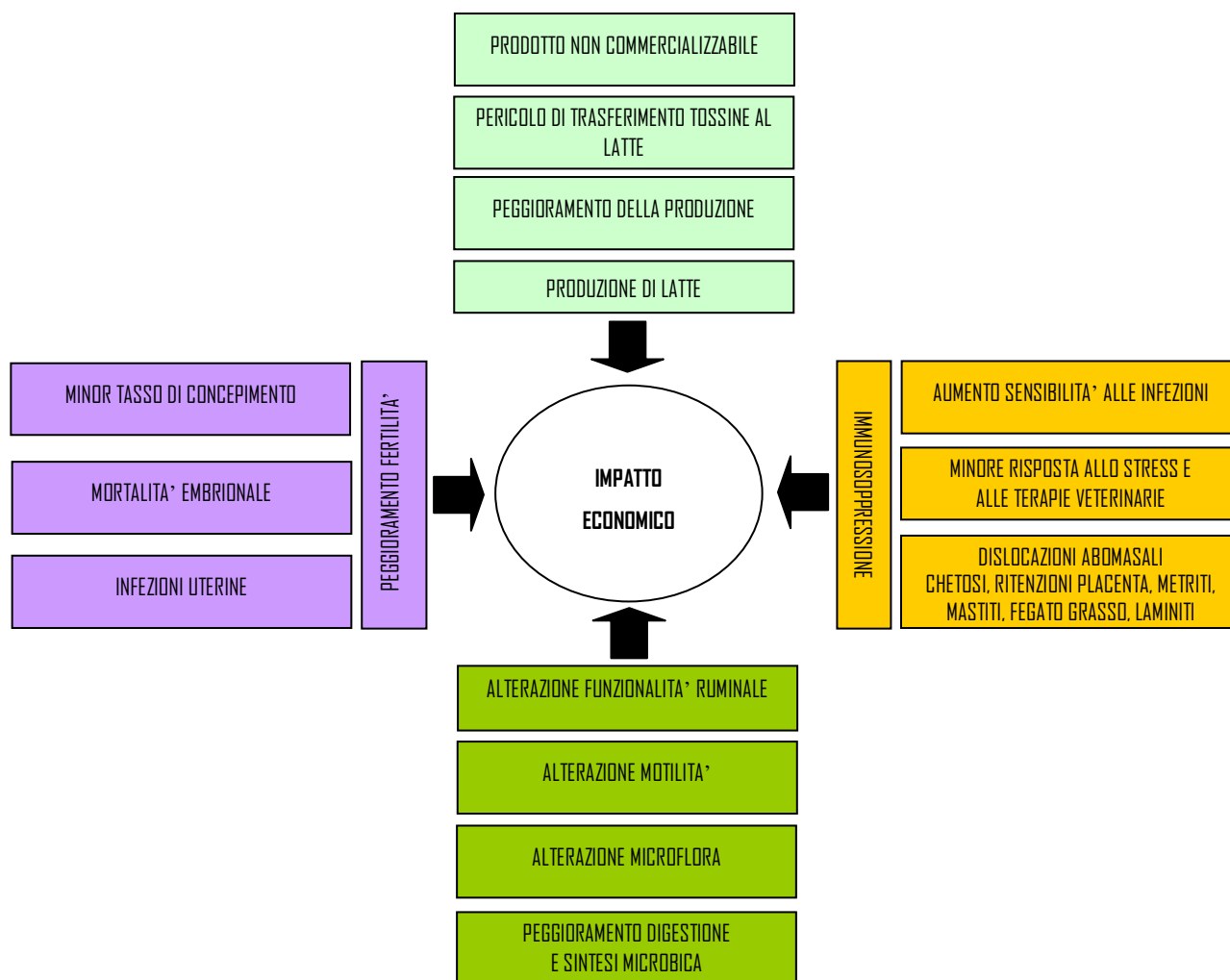
**Figura – 9: Effetti delle micotossine nelle bovina**



### **5.1 Influenza delle micotossicosi sui costi produttivi e sulla qualità del latte**

Attribuire un valore economico preciso a tutte le conseguenze che una micotossicosi può avere in un allevamento bovino da latte risulta praticamente impossibile, ma è opportuno ricordare che l' impatto economico risulta rilevante su numerosi aspetti della salute e della produttività della mandria (Figura 10).

**Figura – 10: Potenziali cause di perdite economiche imputabili a micotossicosi**



In Tabella 17 sono riportati i costi di produzione del latte con il dettaglio delle sole spese legate all'alimentazione e alla riproduzione (dati CRPA 2009). Nella stessa tabella sono poi stimati i costi aggiuntivi dovuti all'eventuale contaminazione degli alimenti da aflatossine e zearalenone.

La diminuzione dell'efficienza alimentare è stimata al 30%, dato utilizzato per calcolare l'aumento delle spese per l'alimentazione, mentre il peggioramento delle performance riproduttive è calcolato come aumento degli interventi fecondativi per gravidanza (da 2,5 a 3,5).

**Tabella 17 - Dettaglio di costi di produzione del latte (CRPA, 2009)**

	Assenza di	Contaminazione da	Contaminazione da
--	------------	-------------------	-------------------

Voce di costo	contaminazione		Zearalenone		Aflatossine	
	€	% sul totale	€	% sul totale	€	% sul totale
mangimi acquistati	13,36	25,71	17,4	29,2	17,4	14,0
foraggi acquistati	1,8	2,5	2,34	3,9	2,34	1,9
foraggi aziendali	1,7	3,2	2,21	3,7	2,21	1,8
veterinario + inseminazioni	2,4	4,6	3,4	5,6	2,4	1,9
contaminazione latte					53,5	43,1
costo bovina improduttiva 4d					12	9,7
<b>TOT mantenimento + riproduzione</b>	<b>19,3</b>	<b>36,0</b>	<b>25,3</b>	<b>42,5</b>	<b>89,8</b>	<b>72,4</b>
altri costi	34,2	64,0	34,2	57,5	34,2	27,6
<b>TOTALE</b>	<b>53,5</b>	<b>100</b>	<b>59,5</b>	<b>100</b>	<b>124,0</b>	<b>100</b>
<b>variazione %</b>				<b>+ 11,3</b>		<b>+ 131,9</b>

Per quanto riguarda gli alimenti contaminati da aflatossine e la composizione delle razioni per le bovine in produzione vale la pena di fare alcune ulteriori considerazioni di natura economica e gestionale.

Gli aspetti da considerare per rispettare i vincoli legislativi e prevenire la contaminazione del latte (posto che i mangimi acquistati dall'esterno siano conformi) sono:

- il possibile grado di contaminazione delle materie prime aziendali
- il possibile grado di contaminazione della razione finale (livelli di inclusione delle materie prime contaminate)
- il tasso di trasferimento al latte dell'AFB1 come AFM1

Come già accennato in precedenza il carry-over dell'aflatossina B1 nel latte è molto variabile in quanto influenzato da numerosi fattori. Nonostante ciò si possono fare delle ipotesi utilizzando come riferimento l'equazione proposta da Veldman et al. (1992), secondo cui la contaminazione del latte da AFM1 è stimabile come:

$$AFM1 \text{ (ng/kg di latte o ppt)} = 1,19 * AFB1 \text{ (}\mu\text{g ingeriti/capo/giorno)} + 1,9$$

Ne risulta che per rispettare il limite di 50 nanogrammi di AFM1 per chilogrammo di latte (ppt) l'ingestione complessiva giornaliera di tossina non dovrebbe eccedere i 40  $\mu\text{g}$  (vedi Tabella 18).

**Tabella 18 – Previsione di contaminazione del latte con AFM1 in funzione dell'ingestione di AFB1**

<b>µg AFB1 ingeriti/capo/giorno</b>	<b>ng AFM1 per kg di latte</b>
0	0
10	13,8
20	25,7
30	37,6
40	49,5
50	61,4

---

E' da sottolineare come questa equazione preveda un tasso di trasferimento di tossina dall'alimento al latte pari a circa lo 0,1%. Questo dato appare sottostimato se confrontato con molti altri citati precedentemente in letteratura, probabilmente perché si riferisce alla mandria nel suo insieme e quindi all'effetto di diluizione del latte di massa.

A scopo cautelativo sarebbe meglio quindi puntare a contaminazioni della razione e quindi ad ingestioni ben al di sotto dal limite di sicurezza individuato con questa previsione. Mantenersi entro questi limiti di ingestione implica una serie di considerazioni circa le disposizioni legislative e la gestione degli alimenti e delle razioni in azienda.

A titolo di esempio una razione completa per bovine con un livello di contaminazione da AFB1 pari a 4,5 µg/kg (ppb), al di sotto quindi del limite imposto, per non superare il limite di ingestione stimato per la sicurezza del latte non dovrebbe essere somministrata in quantità superiori agli 8,9 kg/giorno (40 µg giorno/4,5 µg per kg di alimento). Questa ipotesi non è chiaramente applicabile considerando le ingestioni delle bovine in lattazione, ma è utile per chiarire il concetto che il rispetto dei limiti di contaminazione della razione non rappresenta automaticamente la garanzia di un latte conforme alle disposizioni legislative.

E' utile fare un cenno anche sulla cinetica di trasferimento al latte dell'aflatossina B1, per avere uno strumento ulteriore in fase di diagnosi, oltre che per stimare le perdite economiche associate ad una eventuale contaminazione. La tossina AFM1 appare nel latte dopo sole 4 ore (Applebaum et al., 1982) dall'ingestione dell'alimento contaminato, a causa dell'efficienza di assorbimento ruminale dell'AFB1, in maniera fino ad un certo punto proporzionale al grado di contaminazione e scompare 3-4 giorni dopo la sospensione dell'ingestione (Applebaum et al., 1982).

## **5.2 Gestione degli alimenti contaminati e considerazioni generali**

Nel caso di materie prime contaminate le azioni possibili, per prevenire o contenere le tossicosi negli animali, il pericolo di contaminazione dei prodotti derivati e l'eliminazione dell'intera partita, sono la diluizione e l'aggiunta di sostanze sequestranti nella razione.

La diluizione, che prevede come passaggio iniziale consigliato l'analisi di entrambi gli alimenti

(quello contaminato e quello con cui si intende diluire), può essere applicata alla materia prima contaminata (diluizione diretta) e alla razione completa (diluizione indiretta).

Nel primo caso verrà calcolando il fattore di diluizione sulla base della contaminazione rilevata (Ci) e di quella finale desiderata (Cf) attraverso la formula:

$$\text{Fattore di diluizione \%} = (Cf/Ci)*100$$

*es.: se il livello di contaminazione della materia prima è di 18 ppb e si desidera abbassare la contaminazione a 15 ppb l'operazione da eseguire sarà  $(15\text{ ppb}/18\text{ ppb}) * 100 = 83\%$ . Ciò significa che dobbiamo eseguire una diluizione di 1:1,2 (18/15).*

*Nella pratica per ogni 100 kg di materia prima contaminata con 18ppb dovremo aggiungere 20 kg di materia prima non contaminata  $[100-(100*1,2)]$ .*

Nel secondo caso l'alimento contaminato o parte di esso verrà sostituito con un alimento non contaminato.

*Alcuni esempi pratici di diluizioni dirette e % di inclusione nella razione di materie prime per rispettare i criteri appena espressi sono illustrati in Figura 11. Gli esempi sono riferiti ad una contaminazione da AFB1 ma possono essere usati anche per le altre micotossine, modificando le contaminazioni iniziali e i limiti legislativi.*

Un'altra strategia per prevenire o trattare un'intossicazione da micotossine attraverso gli alimenti è l'uso di additivi quali chelanti o adsorbenti, che hanno lo scopo di limitare l'assorbimento delle tossine nel tratto gastrointestinale favorendone quindi l'eliminazione per via fecale.

L'efficacia di questa strategia dipende principalmente da:

- selettività dell'additivo nei confronti di una sola o di più micotossine
- affinità della sostanza a basse concentrazioni della tossina
- capacità dell'additivo di legare o adsorbire grandi quantità di tossina prima che essa sia assorbita dall'organismo
- volumi di inclusione dell'additivo necessari a garantirne l'efficacia
- stabilità della sostanza nei confronti del pH, di modo che il complesso additivo-tossina sia stabile lungo tutto il tratto gastrointestinale e possa essere escreto con le feci

Tra i chelanti inorganici maggiormente utilizzati troviamo:

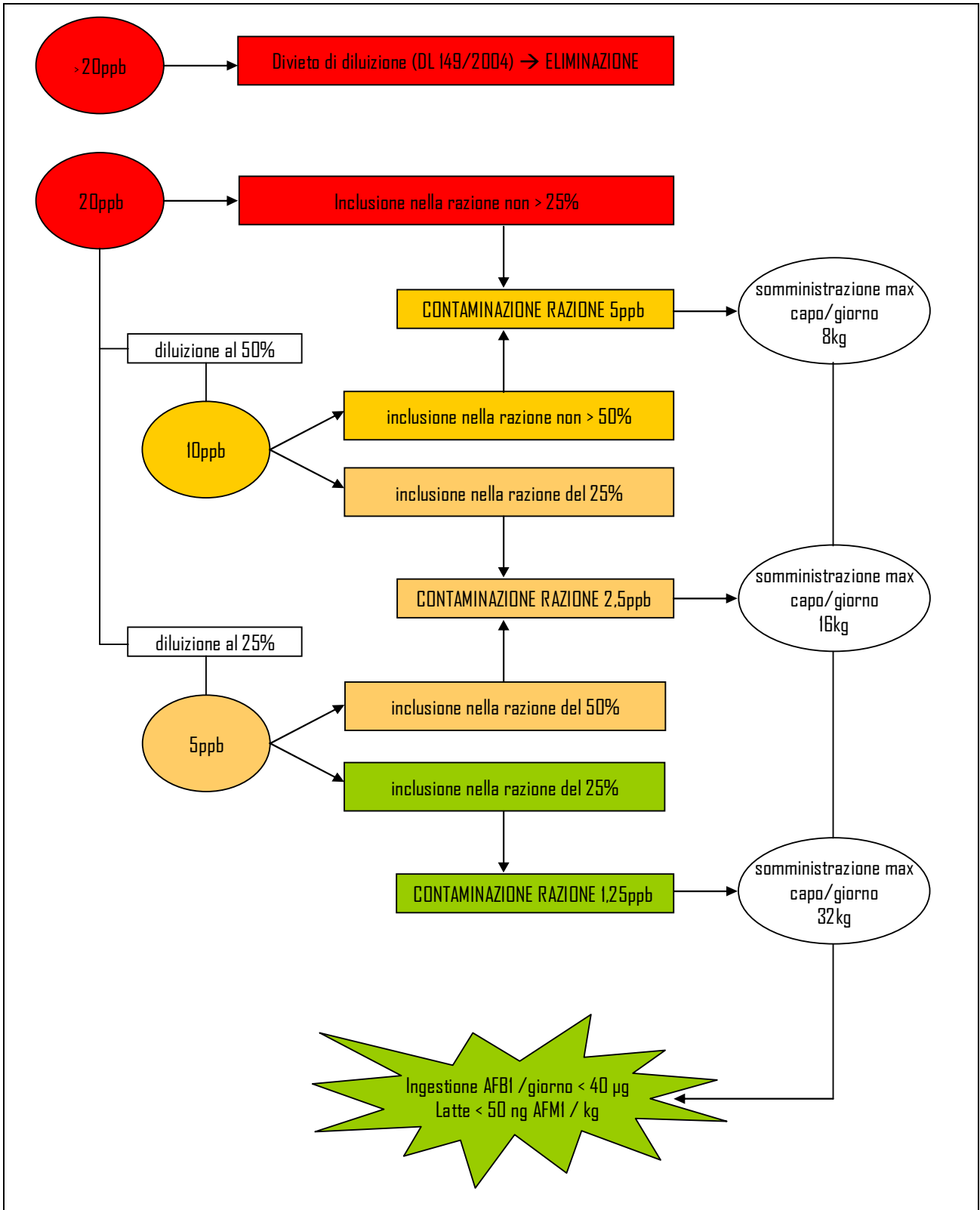
- le bentoniti (di calcio, di sodio) (Diaz et al., 1999)
- le zeoliti (Smith, 1980)
- gli alluminosilicati (es. HSCAS, hydrated sodium calcium aluminosilicates) (Diaz et al., 1999)
- le argille in genere

Tra gli adsorbenti organici i derivati della crescita dei lieviti (glucomannani) sembrano essere i più efficaci nei confronti dell'AFB1 e dello zearalenone (Diaz et al., 1999; [www.knowmycotoxins.com](http://www.knowmycotoxins.com)).

In generale ci sono alcune "buone pratiche" operative oltre alla gestione degli alimenti, che possono essere utili per individuare, gestire e trattare una micotossicosi in azienda:

1. Se si sospetta una micotossicosi in allevamento è utile effettuare una prima valutazione in base ad eventuali casi precedenti
2. In seguito all'attuazione di misure correttive è importante monitorare la risposta degli animali in termini di miglioramento della salute o delle produzioni, tenendo presente che nel caso di micotossicosi croniche il recupero può essere lento o anche non verificarsi
3. Sarebbe necessario in caso di conferma di intossicazione riformulare la razione tenendo presente che a causa del metabolismo fungino gli alimenti contaminati subiscono una perdita di contenuto energetico del 5-10% e che l'efficienza alimentare degli animali diminuisce del 20-30%
4. Va osservato comunque il livello di ingestione degli animali intossicati per individuare subito eventuali diminuzioni, in quanto gli alimenti contaminati sono generalmente meno appetibili.
5. Oltre ai chelanti o agli adsorbenti nella razione sarebbe opportuno aumentare in misura del 10-15% l'integrazione di vitamine (A,E) e minerali (Se, Cu, Mn)
6. Nei silos e nelle materie prime soggette a sviluppo di muffe può essere utile aggiungere un inibitore di crescita fungina quale propionato di sodio o calcio o acidi organici (acetico, propionico, sorbico, malico, lattico, citrico).

**Figura 11: Aspetti da considerare nelle diluizioni delle materie prime contaminate da aflatossine**



## SCHEDE TECNICHE

<b>MICOTOSSINA</b>	<b>ZEARALENONE (ZEA)</b>
Principali funghi produttori	<i>F. graminearum, F. culmorum, F. equiseti</i>
Classe cancerogenicità (IARC)	3, limitata evidenza di cancerogenicità negli animali
Metaboliti principali	zearalanone, $\alpha$ e $\beta$ -zearalenolo, $\alpha$ e $\beta$ -zearalanolo
Bersaglio biologico principale	Somiglianza con gli estrogeni dell'organismo Competizione e legame con i recettori del 17 $\beta$ -estradiolo Interferenze con l'asse ipotalamo-ipofisi, con la fisiologia dell'apparato riproduttore e della ghiandola mammaria
Sintomi più importanti	Edema e tumefazione vulvare Sindrome iperestrogenica o estro permanente Pseudo gravidanza con sviluppo mammario Infertilità
<b>SENSIBILITÀ</b>	
suini	+ + + +
avicoli	+
equidi	+ + +
ruminanti	+ +

<b>MICOTOSSINA</b>	<b>TOSSINA T-2 (T-2) TRICOTECENE DI TIPO A</b>
Principali funghi produttori	<i>F. sporotrichioides, F. acuminatum</i>
Classe cancerogenicità (IARC)	3, limitata evidenza di cancerogenicità negli animali
Metaboliti principali	tossina HT-2
Bersaglio biologico principale	Inibizione della sintesi proteica a livello ribosomiale Inibizione della sintesi di DNA e RNA Compromissione sistema immunitario
Sintomi più importanti	Diminuzione dell'ingestione Peggioramento delle performance Lesioni e ulcere alle mucose di bocca e digerente
<b>SENSIBILITÀ</b>	
suini	+ + + +
avicoli	+ + + +
equidi	+
ruminanti	+ +

<b>MICOTOSSINA</b>	<b>DEOSSINIVALENOLO (DON) TRICOTECENE DI TIPO B</b>
Principali funghi produttori	<i>F. culmorum, F. graminearum</i>
Classe cancerogenicità (IARC)	3, inadeguata evidenza di cancerogenicità negli animali
Bersaglio biologico principale	Inibizione della sintesi proteica a livello ribosomiale Inibizione della sintesi di DNA e RNA Interferenza con i processi serotonergici e/o con l'attivazione dei recettori della serotonina (emesi) Compromissione sistema immunitario
Sintomi più importanti	Diminuzione dell'ingestione / vomito (emesi) Peggioramento dell'efficienza alimentare Peggioramento delle performance
<b>SENSIBILITÀ</b>	
suini	+ + + +
avicoli	+ +
equidi	+
ruminanti	+

<b>MICOTOSSINA</b>	<b>OCRATOSSINA (OTA)</b>
Principali funghi produttori	<i>A. ochraceus, A. niger, P. verrucosum</i>
Classe cancerogenicità (IARC)	2B, potenzialmente cancerogena
Metaboliti principali	OTA-α nei ruminanti adulti
Bersaglio biologico principale	Inibizione della sintesi proteica Danni al DNA, perossidazione dei lipidi e stress ossidativi Compromissione del sistema immunitario Degenerazione dei tubuli renali Danni a reni e fegato
Sintomi più importanti	Riduzione dell'ingestione e dell'accrescimento Riduzione dell'efficienza alimentare Polidipsia (eccessiva sete), poliuria (eccessiva produzione di urine) e ingrossamento dei reni
<b>SENSIBILITÀ</b>	
suini	+ + + +
avicoli	+ + + +
equidi	+ +
ruminanti	+

<b>MICOTOSSINA</b>	<b>AFLATOSSINE (AF)</b>
Principali funghi produttori	<i>A. flavus, A. parasiticus, A. nomius</i>
Classe cancerogenicità (IARC)	1, Genotossica, cancerogena, epato e nefrotossica
Metaboliti principali	epossidi (bioattivazione), metaboliti idrossilati (detossificazione), AFM1 (idrossilato tossico)
Bersaglio biologico principale	Danneggiamento e alterazione funzionalità del DNA (genotossicità e cancerogenicità) Compromissione sistema immunitario Fegato e reni
Sintomi più importanti	Ittero e emorragie generalizzate Riduzione dell'ingestione e delle performance Depressione Minor resistenza agli agenti infettivi
<b>SENSIBILITÀ</b>	
suini	+ + + +
avicoli	+ + +
equidi	+ + + +
ruminanti	+ +

## BIBLIOGRAFIA

- Abramson, D. (1998). Mycotoxin Formation and Environmental Factors. In: (Sinha, K.K., Bhatnagar, D.) *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*, Marcel Dekker, Inc, New York, pp 255-277.
- Adebajo, L.O., Bamgbelu, O.A., Olowu, R.A., (1994). Mould contamination and the influence of water activity and temperature on mycotoxin production by two *Aspergilli* in melon seeds. *Natruing*, 38, 209-217
- Akande, K.E., Abubakar, M.M., Adegbola, T.A., Bogoro, S.E., (2006). Nutritional and Health Implication of Mycotoxins in Animal Feeds: a Review. *Pakistan Journal of Nutrition* 5 (5), 398-403.
- Applebaum, R.S., Brackett, R.E., Wiseman, D.W., Marth, E.H., (1982). Responses of dairy cows to dietary aflatoxin: Feed intake and yield, toxin content, and quality of milk of cows treated with pure and impure aflatoxin. *J Dairy Sci* 65, 1503-1508.
- Battilani, P., Pietri, A., Barbano, C., Scandolaro, A., Bertuzzi, T., Marocco, A., 2008. Logistic regression modelling of cropping systems to predict fumonisin contamination in maize. *J. Agr. Food Chem.*, 56: 10433-10438.
- Battilani, P., Rossi, V., Scandolaro, A., Giorni, P., Bertuzzi, T., Formenti, S. and Pietri, A. *Ruolo delle fasi fenologiche sulla sintesi di micotossine in mais*. In Atti a cura di Miraglia M. e Brera C., Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e i Rischi Alimenta, 1° Congresso nazionale Le micotossine nella filiera agroalimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma, 29-30 novembre 2004.
- Battilani, P., Scandolaro, A., Barbano, C., Pietri, A., Bertuzzi, T., Marocco, A., Berardo, N., Vannozi, G.P., Baldini, M., Miele, S., Salera, E., Maggiore, T., 2005. Monitoraggio della contaminazione da micotossine in mais. *L'Informatore Agrario*, 61: 47-49.
- Berardo N., Pisacane V., Battimani P., Scandolaro A., Pietri A., Marocco A. (2005).- *J. Agric Food Chem.* 53, 8128-8134.
- Bergsjø B., Langseth, W., Nafstad, I., Jansen, J., Larsen, H., (1993). The effects of naturally deoxynivalenol-contaminated oats on clinical condition, blood parameters, performances and carcass composition of growing pigs. *Vet. Res. Commun.* 17, 283-294.
- Bermudez, A.J., Ledoux, D.R., Rottinghaus, G.E., (1995). Effects of *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B1 in ducklings. *Avian Dis.* 39, 879-886.
- Bertoncini, G., Amodeo, P., Verdeiro, A., (2002). Prevenire il rischio di aflatoxine nel latte. *L'Informatore Agrario*, 58 (10), 65-70.
- Bilgrami, K.S. and Choudhary, A.K. (1998). Mycotoxins in Preharvest Contamination of Agricultural Crops. In: (Sinha, K.K., Bhatnagar, D.) *Mycotoxins in Agricultural and Food Safety*,
- Birò, K., Barna-Vetrò, I., Pécsi, T., Szabò, E., Winkler, G., Fink-Gremmels, J., Solti, L., (2003). Evaluation of spermatological parameters in ochratoxin A-challenged boars. *Theriogenol.* 60, 199-207.
- Blandino, M., Reyneri, A., Gilardi, M., Piano, S., (2008). Condizioni di pre-stoccaggio del mais non essiccato e contaminazione da micotossine. *Tecnica Molitoria*, 4, 353-370.
- Boudra, H., Barnouin, J., Dragacci, S., Morgavi, D.P., (2007). Aflatoxin M1 and Ochratoxin A in Raw Bulk Milk from French Dairy Herds. *J Dairy Sci* 90 No. 7, 2007
- Broomhead, J.N., Ledoux, D.R., Bermudez, A.J., Rottinghaus, G.E., (2002). Chronic effects of fumonisin B1 in broilers and turkeys fed dietary treatment to market age. *Poult. Sci.* 81, 56-61.
- Caloni, F., Cortinovis, C., (2009) Effects of fusariotoxins in the equine species. *The Veterinary Journal*, article in press, doi:10.1016/j.tvjl.2009.09.020

- Casteel, S.W., Turk, R.P., Cowart, R.P., Rottinghaus, G.E., (1993). Chronic toxicity of fumonisin in weanling pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 413-417.
- Cavret, S., Lecoer, S., (2006). Les fusariotoxicoses des animaux d'élevage. *Ann. Méd. Vét.* 150, 43-55.
- Chang, K., Kurtz, H.J., Mirocha, C.J., (1979). Effects of mycotoxin zearalenone on swine reproduction. *Am.J. Vet. Res.* 40, 1260-1267.
- Charmley, E., Trenholm, H.L., Thompson, B.K., Vudathala, D., Nicholson, J.W.G., Prelusky, D.B., Charmley, L. L., (1993). Influence of level of deoxynivalenol in the diet of dairy cows on feed intake, milk production and its composition. *J. Dairy Sci.* 76, 3580-3587.
- Chu, F.S., (1974), Studies in ochratoxin. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 2, 499.
- Chu, F.S., Noh, I., Chang, C.C., (1972). Structural requirements for ochratoxin intoxication. *Life Sci.*, 11, 503.
- Cohen, N.D., (2003). Duodenitis-Proximal Jejunitis in Horses. In: 8th Congress on Equine Medicine and Surgery, P. Chuit, A. Kuffer and S. Montavon (Eds.) Publisher: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA.
- Conkova, E., Laciakova, A., Kovac. G., Seidel, H., (2003). Fusarial toxins and their role in animal disease. *Vet. J.* 165, 214-220.
- Constable, P.D., Smith, G.W., Rottinghaus, G.E., Haschek, W.M., (2000). Ingestion of fumonisin B1 containing culture material decreases cardiac contractility and mechanical efficiency in swine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 162, 151-160.
- Coulombe, R.A.J., (1993). Biological action of mycotoxins. *J. Dairy Sci.* 76, 880-891.
- C.R.P.A Spa, (2009). Costi di produzione e di trasformazione del latte in Emilia Romagna. Opuscolo C.R.P.A. 2.59, n° 9/2009
- Cysewski S.J., Pier, A.C., Baetz, A.L., Cheville, N.F. (1982). Experimental equine aflatoxicosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 65: 3, 354-365.
- D'Mello, J.P.F., (2003). Mycotoxins in Cereal Grains, Nuts and Other Plant Products. In: D'Mello (Eds) Food safety. Contaminants and toxins. CABI Publishing, 65 – 90.
- D'Mello, J.P.F., Placinta, C.M., Macdonald, A.M.C., (1999). Fusarium mycotoxins: e review on global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology* 80, 183-205.
- Da Casto, M., Rolando, P., Nachtmann, C., Ceppa, L., Nebbia, C, (1995). Zearalenone mycotoxins in piglets suckling sows fed contaminated grain. *Vet. Human Toxicol.* 37, 359-361.
- Deacon, J.W. (2000). *Micologia moderna*. Calderini Edagricole. Bologna.
- Della Riccia G., Petracco M. (2003). NIR, Cordoba, Spagna.
- Diaz, D.E., Hagler, W.M. Jr., Hopkins, B.A., Eve, J.A., Whitlow, L.W., (1999). The potential for dietary sequestering agents to reduce the transmission of dietary aflatoxin to milk of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82(Suppl. 1):838
- Diekman, M.A., Green, M.L., (1992). Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *J. Anim. Sci.* 70, 1615-1627.
- Direttiva 2003/100/CE della Commissione del 31 ottobre 2003 che modifica l'allegato I della direttiva 2002/32/CE del Parlamento europeo e del Consiglio relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*, L285/33.
- Dowd, P.F. (1998). Involment of Arthropods in the Establishment of Mycotoxigenic Fungi Under Field Conditions. In: (Sinha, K.K., Bhatnagar, D.) *Mycotoxins in Agricultural and Food Safety*, Marcel

- Dekker, Inc, New York, pp. 307-350.
- Edds, G.T., Nair, K.P.C., Simpson, C.F., (1973). Effects of aflatoxin B1 on resistance in poultry against cecal coccidiosis and Marek's disease. *Amer. J. Vet. Res.* 34, 819-826.
- Edrington, T.S., Kampsholtzapple, C.A., Harvey, C.A., Kubena, R.B., Elissalde, M.H., Rottinghaus, G.E., (1995). Acute hepatic and renal toxicity in lambs dosed with fumonisin-containing culture material. *J. Anim. Sci.* 73, 508-515.
- Eriksen, G.S., Petterson, H., (2004). Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Anim. Feed Sci and Technol.* 114, 205-239.
- Fazekas, B., Bajmocy, E., Glavits, R., Fenyvesi, A., Tanyi, J., (1998). Fumonisin B1 contamination of maize and experimental acute fumonisin toxicosis in pigs. *J. Vet. Med. Series B* 45, 171-181.
- Ferrero, C., (1997). Effetti della raccolta e dei trattamenti post-raccolta sulla granella di mais. *L'Informatore Agrario*, 52 (7), 45-48.
- Flannigan, B., (1991). Mycotoxins. In: D'Mello, J.P.F., Duffus, C.M., Duffus, J.H., (Eds.), *Toxic substances in Crop Plants*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 226-257.
- Friend, D.W., Thompson, B.K., Trenholm, H.L., Boermans, H.J., Hartin, K.E., Panich, P.L., (1992). Toxicity of T-2 toxin and its interaction with deoxynivalenol when fed to young pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 72, 703-711.
- Garrett, W.N., Heitman, H., Booth, A.N., (1968). Aflatoxin toxicity in beef cattle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 127-188.
- Gaumy, J.L., Bailly, J.D., Benard, G., Guerre, P., (2001). Zearalenone: origine et effets chez les animaux d'élevage. *Rev. Med. Vet.* 152, 123-136.
- Gimeno, A., Quintanilla, J.A., (1983). Analytical and mycological study of a natural outbreak of zearalenone mycotoxicosis in horses. In: *Proceeding of the International Symposium of Mycotoxins*, Cairo, Egypt, pp. 387-392
- Gobbi, E., Firrao, G., Torelli, E., Rekab, D. and Locci, R.. Aerobiological assessment of potential fumonisin contamination of maize. XI Congresso SIPaV, 29 settembre-1 ottobre 2004, Milano.
- Goel, S., Schumacher, J., Lenz, S.D., Kempainen, B.W., (1996). Effects of *Fusarium moniliforme* isolates on tissue and serum sphingolipid concentrations in horses. *Vet. Human Toxicol.* 38, 265-270.
- Gromadzka, K., Waskiewicz, A., Chelkowski, J., Golinski, P., (2008). Zearalenone and its metabolites: occurrence, toxicity and guidelines. *World mycotoxin journal* 1(2), 209-220.
- Haouet, M.N. and Altissimi, M.S., (2003). Micotossine negli alimenti e micotossicosi umana ed animale. *Webzine Sanità Pubblica Veterinaria*.
- Harrison, L.R., Colvin, B.M., Greene, J.T., Newman L.E., Cole J.R.J., (1990). Pulmonary oedema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2, 217-221.
- Harvey, R.B., Edrington, T.S., Kubena, L.F., Elissalde, M., Camper, H.H., Rottinghaus, G.E., Turk, J.R., (1996). Effect of dietary fumonisin B1-containing culture material, deoxynivalenol-contaminated wheat, or their combination on growing barrows. *Am. J. Vet. Res.* 57, 1790-1794.
- Harvey, R.B., Edrington, T.S., Kubena, L.F., Elissalde, M., Corrier, D.E., Rottinghaus, G.E., (1995). Effect of aflatoxin and diacetoxyscirpenol in ewe lambs. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 325-330.
- Harvey, R.B., Huff, W.E., Kubena, L.F., Phillips, T.D., (1989). Evaluation of diets contaminated with aflatoxin and ochratoxin fed to growing pigs. *Am. J. Vet. Res.* 50(8), 1400-1405.

- Harvey, R.B., Kubena, L.F., Corrier, D.E., Witzel, D.A., Phillips, T.D., Heidelbaugh, N.D., (1986). Effects of deoxynivalenol in a wheat ration fed to growing lambs. *Am. J. Vet. Res.* 47, 1630-1632.
- Harvey, R.B., Kubena, L.F., Elissalde, M., Rottinghaus, G.E., Corrier, D.E., (1994). Administration of ochratoxin A and T-2 toxin to growing swine. *Am. J. Vet. Res.* 55, 1757-1761.
- Harvey, R.B., Kubena, L.F., Rottinghaus, G.E., Turk, J.R., Casper, H.H., Buckley S.A., (1997). Moniliformin from *Fusarium fujikuroi* culture material and deoxynivalenol from naturally contaminated wheat incorporated into diets of broiler chicks. *Avian Dis.*41, 957-963.
- Hasso, S.A.,(2003). Non-fatal aflatoxicosis in Arabian horses in Iraq. *Veterinary Record*, 657-658.
- Haouet, M.N. and Altissimi, M.S., (2003). Micotossine negli alimenti e micotossicosi umana ed animale. *Webzine Sanità Pubblica Veterinaria*.
- Helferich, W.G., Garrett, W.N., Hsieh, D.P.H., Baldwin, R.L., (1986). Feedlot performance and tissue residues of cattle consuming diets containing aflatoxins. *J Anim Sci* 62, 691-696.
- Huff, W.E., Wyatt, R.D., Hamilton, P.B., (1975). Nephrotoxicity of Dietary Ochratoxin A in Broiler Chickens. *Applied Microbiology* 30, 48-51.
- Hussein, S.H., Brasel, J.M., (2001). Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167, 101-134.
- Huszenicza, G., Fekete, S., Szigeti, G., Kulcsar, M., Fébel, H., Kellems, R.O., Nagy, P., Cseh, S., Veresgyhazt,, T., Hullar, I., (2000). Ovarian consequences of low dose peroral fusarium (T-2) toxin in ewe and heifer model. *Theriogenology* 53, 1631-1639.
- International Agency for Research on Cancer, (2010). Agents Classified by the *IARC Monographs*, Volumes 1–100
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), (1996). *Toxigenic Fungi: Aspergillus*. In: *Microorganisms in Foods. 5. Characteristics of Food Pathogens*. Academic Press, London, 347-381.
- Ingalls, J. R., (1996). Influence of deoxynivalenol on feed consumption by dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 60, 297-300.
- Javed, T., Bennet, G.A., Richard, J.L., Dombrink-Kurtzman, M.A., Cote, L.M., Buck, W.B., (1993). Mortality in broiler chicks on feed amended with *Fusarium proliferatum* culture material or with purified fumonisin B1 or moniliformin. *Mycopathologia* 123, 171-184.
- Jewers, K., (1990). Mycotoxins and their effects on poultry production. *Option Méditerranéennes*, Ser A n° 7.
- Johnson, P.J., Casteel, S.W., Messer, N.T., (1997). Effect of feeding deoxynivalenol (vomitoxin)-contaminated barley to horses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 9, 219–221.
- Jones, F.T., Genter, M.B., Hagler, W.M., Hansen, J.A., Mowrey, B.A., Poore, M.H., Whitlow, L.W., (1994). Understanding and coping with effects of mycotoxins in livestock feed and forage. *North Carolina Cooperative Extension Service*, 1-14.
- Juhasz, J., Nagy, P., Huszenicza, G., Szigeti, G., Reiczigel, J., Kulesar, M., (1997). Long term exposure to T-2 Fusarium mycotoxin fails to alter luteal function, follicular activity and embryo recovery in mares. *Equine Veterinary Journal* 25, 17–21.
- Juhasz, J., Nagy, P., Kulesar, M., Szigeti, G., Reiczigel, J., Huszenicza, G., (2001). Effect of low-dose zearalenone exposure on luteal function, follicular activity and uterine oedema in cycling mares. *Acta Veterinaria Hungarica* 49, 211–222.
- Kabak, B., Dobson, A.D. and Var, I. (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 46: 593-619.

- Kiessling, K.H., Pettersson, H., Sandholm, K., Olsen M., (1984). Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 1070–1073.
- King, R.R., McQueen, R.E., Levesque, D., Greenhalgh, R., (1984). Transformation of deoxynivalenol (vomitoxin) by rumen microorganism. *J. Agric. Food Chem.* 32, 1181.
- Koehler, P.E., Beuchat, L.R., Chinnan, M.S., (1985). Influence of temperature and water activity on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in cowpea seeds and meal. *J. Food Prot.*, 48, 1040-1043
- Kordic, B., Pribicevic, S., Muntanola-Cvetkovic, M., Nikolic, P., Nikolic, B., (1992). Experimental study of the effects of known quantities of zearalenone on swine reproduction. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 11, 53-55.
- Kozakiewicz, Z., Smith, D., (1994). Physiology of *Aspergillus*. In: Smith, J.E. (Ed.), *Aspergillus*. Plenum Press, New York, 23-40.
- Kramer, J. (1990). Alimenti, microbiologia e igiene. Organizzazione Editoriale Medico Farmaceutica (OEMF) spa, Milano.
- Kubena, L.F., Edrington, T.S., Harvey, R.B., Buckley, S.A., Phillips, T.D., Rottinghaus, G.E., Caspers, H.H., (1997a). Individual and combined effects of fumonisin B1 present in *Fusarium moniliforme* culture material and T-2 toxin or deoxynivalenon in broiler chicks. *Poult. Sci.* 76, 1239-1247.
- Kubena, L.F., Edrington, T.S., Harvey, R.B., Phillips, T.D., Sarr, A.B., Rottinghaus, G.E., (1997b). Individual and combined effects of fumonisin B1 *Fusarium moniliforme* culture material and diacetoxyscirpenol or ochratoxin A in turkey poult. *Poult. Sci.* 76, 256-264.
- Kubena, L.F., Edrington, T.S., Kamps-Holtapple, C., Harvey, R.B., Elissalde, M.H., Rottinghaus, G.E., (1995). Influence of fumonisin B1 present in *Fusarium moniliforme* culture material, and T-2 toxin on turkey poult. *Poult. Sci.* 74, 306-313.
- Kubena, L.F., Harvey, R.B., Huff, W.E., Corrier, D.E., Philips, T.D., Rottinghaus, G.E. (1989b). Influence of ochratoxin A and T-2 toxin singly and in combination on broiler chickens. *Poult. Sci.* 68(7):867-72.
- Kubena, L.F., Huff, W.E., Harvey, R.B., Phillips, T.D., Rottinghaus, G.E. (1989a). Individual and combined toxicity of deoxynivalenol and T-2 toxin in broiler chicks. *Poult. Sci.* 68(5):622-6.
- Ledoux, D.R., Broomhead, J.N., Bermudez, A.J., Rottinghaus, G.E., (2003). Individual and combined effects of the *Fusarium* mycotoxins fumonisin B1 and moniliformin in broiler chicks. *Avian Dis.* 47, 1368-1375.
- Logrieco, A., Mule, G., Moretti, A. and Bottalico, A. (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize with maize ear rot in Europe. *Eur J Plant Pathol*, 108: 597-609.
- Maiorano, A., Reyneri, A., Maffioli, G. and Ramponi, C. (2007). Stima del "rischio fumonisine" nella granella di mais. *L'Informatore Agrario*, 7: 52-57.
- Malagutti, L., Zannotti, M., Scampini, A., Sciaraffia, F., (2005). Effects of ochratoxin A on heavy pig production. *Anim. Res.* 54, 179-184.
- Mann, D.D., Buening, G.M., Hook, B., Osweiler, G.D., (1983). Effects of T-2 mycotoxin on bovine serum proteins. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 44, 1757-1759.
- Marquardt, R.R., Frohlich A.A., (1992). A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J. Anim. Sci.* 70, 3968-3988.
- Matta, A. (1996). Fondamenti di patologia vegetale. Patron Editore, Bologna.
- Minervini, F., La calandra, G.M., Filannino, A., Garbetta, A., Nicassio, M., Dell'Aquila, M.E., Visconti, A., (2010). Toxic effects induced by mycotoxin fumonisin B1 on equine spermatozoa: assessment of viability, sperm chromatin structure stability, ROS production and motility. *Toxicology in Vitro*,

- article in press.
- Mirocha, C. J., Harrison, J., Nichols, A. A., McClintock, M., (1968). Detection of a fungal estrogen (F-2) in hay associated with infertility in dairy cattle. *Appl. Microbiol.* 16,797.
- Mirocha, C. J., Weaver, G., Gustafsson, B., Chi, M., Pathre, S.V., Robison, T.S., Bates, F. (1978). Pharmacological and toxicological studies on zearalenone in food producing animals. Quarterly Report 11, Food and Drug Administration, Washington, DC.
- Muller, H.M., Lerch, C., Muller, K., Eggert, W., (1998). Kinetic profiles of ochratoxin A and ochratoxin alpha during in vitro incubation in buffered forestomach and abomasal contents from cows. *Nat. Toxins* 6 251–258.
- Neiger, R.D., Johnson, T.J., Hurley, D.J., Higgins, K.F., Rottinghaus, G.E., Stahr, H., (1994). The short term effect of low concentration of dietary aflatoxin and T-2 toxin on mallard ducklings. *Avian Dis.* 4, 738-743.
- Northolt, M.D., van Egmond, H.P., Paulsch, W.E., (1977). Differences on *Aspergillus flavus* strains in growth and aflatoxin B<sub>1</sub> production in relation to water activity and temperature. *J. Food Prot.* 40, 778-781.
- Oliveira C.A., Kobashigawa, E., Reis, T.A., Mestieri, L., Albuquerque, R., Correa, B., (2000). Aflatoxin B<sub>1</sub> residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin. *Food Addit. Contam.* 17(6), 459-462.
- Osweller, G.D., Kehrl, M.E., Stabel, J.R., Thurston, J.R., Ross, P.F., Wilson, T.M., (1993). Effects of fumonisin-contaminated corn screening on growth and health of feeder calves. *J Anim Sci* 71, 459-466.
- Overnes, G., Matre, T., Sivertsen, T., Larsen, H.J.S., Langseth, W., Reitan, L.J., Jansen, J.H., (1997). Effects of diets with graded levels of naturally deoxynivalenol-contaminated oats on immune response in growing pigs. *J. Vet. Med. Series A* 44, 539-550.
- Özsoy, S., Altunatmaz, K., Horoz, H., Kabikci, G.V., (2005). The Relationship between Lameness, Fertility and Aflatoxin in a Dairy Cattle Herd. *Turk J Vet Anim Sci* 29, 981-986.
- Pettersson H., Aberg L. (2003). *Food Control* 14, 229-232.
- Pier, A.C., Richard, J.L., Cysewski, S.J., (1980). Implication of mycotoxins in animal disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 176, 719-724.
- Pietri, A., Bernuzzi T., Pallaroni, L., Piva, G., (2004). Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in Northern Italy. *Food Additives and Contaminants* vol. 21, 5, 479-487.
- Pitet, A., (1998). Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an updated review. *Rev Med Vet.* 149(6), 479-492.
- Pitt, J.I., Christian, J.H.B., (1968). Water relation of xerophilic fungi isolated from prunes. *Appl. Microbiol.* 16, 1853-1858.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., (1997). *Aspergillus* and related teleomorphs. In: Pitt, J.I., Hocking, A.D. (Eds.), *Fungi and Food Spoilage*, Academic Press, London, 339-416
- Pitt, J.I., Miscamble, B.F., (1995). Water relation of *Aspergillus flavus* and closely related species. *J. Food Prot.* 58, 86-90
- Pitt, J.I., Basilico, J.C., Abarca, M.L. and Lopez, C. (2000) Mycotoxins and toxigenic fungi. *Med Mycol* 38, 41–46.
- Piva, G., Battilani, P. and Pietri, A. Micotossine, un tema globale. In Atti a cura di Miraglia M. e Brera C., Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e i Rischi Alimentari, 1° Congresso nazionale Le micotossine nella filiera agroalimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma, 29-30 novembre 2004

- Placinta, C.M., D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., (1999). A review of worldwilde contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 78, 21-37.
- Prathapkumar, S.H., Rao, V.S., Paramkishan, R.J., Bhat, R.V., (1997). Disease outbreak in laying hens arising from the consumption of fumonisin-contaminated food. *Br. Poult. Sci.* 38, 475-479.
- Prelusky, D.B., Trenholm, H.L., Hamilton, R.M.G., Miller, J.D., (1987). Transmission of [14C] deoxynivalenol to eggs following oral administration to laying hens. *J. Agric. Food Chem.* 35, 182-186.
- Raccomandazione della Commissione del 17 agosto 2006 sulla presenza di deossinivalenolo, zearalenone, ocratossina A, tossine T-2 e HT-2 e fumonisine in prodotti destinati all'alimentazione degli animali. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*, L 285/33 (2006/576/CE).
- Rafai, P., Bata, A., Vanyi, A., Papp, Z., Brydl, E., Jakab, L., Tuboly, S., Tury, E., (1995b). Effect of various levels of T-2 toxin on the clinica status, performance and metabolism of growing pigs. *Vet. Rec.* 136, 485-489.
- Rafai, P., Tuboly, S., Bata, A., Tilly, P., Vanyi, A., Papp, Z., Jakab, L., Tury, E., (1995a). Effect of various levels of T-2 toxin in the immune system of growing pigs. *Vet. Rec.* 136, 511-514.
- Ray A.C., Abbitt B., Cotter S.R., Murphy M.J., Reagor J.C., Robinson R.M., West J.E., Whitford H.W. (1986). Bovine abortion and death associated with consumption of aflatoxin-contaminated peanuts. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 188, 1187-1188.
- Regolamento (CE) N. 1126/2007 della Commissione del 28 settembre 2007 che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari per quanto riguarda le *Fusarium*-tossine nel granoturco e nei prodotti a base di granoturco. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*, L 255/14.
- Regolamento (CE) N. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*, L 364/5.
- Regolamento (UE) N. 165/2010 della Commissione del 26 febbraio 2010 recante modifica, per quanto riguarda le aflatossine, del regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*, L 50/8.
- Reports on Task 3.2.10. Collection of occurrence data of *Fusarium* Toxins in Food and assessment of dietary intake by the population of EU member States. Aprile 2003 Collection of occurence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States.
- Reyneri A. and Blandino M. (2003). Control of mycotoxicosis in corn: 7 years of research on crop techniques and postharvest treatments. The Second World Mycotoxin Forum.
- Ribelin, W.E., Fukushima, K., Still, P.E., (1978). The Toxicity of Ochratoxin to Ruminants. *Can. J. comp. Med.* 42, 172-176.
- Richard, J. L., Meerdink, G., Maragos, C. M., Tumbleson, M., Bordson, G., Rice, L. G., Ross, P. F., (1996). Absence of detectable fumonisins in the milk of cows fed *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg culture material. *Mycopathologia* 133 (2), 123-126.
- Richard, J.L., Cysewski, S.J., Pier, A.C., Booth, G.D., (1978). Comparison of effects of dietary T-2 toxin on growth, immunogenic organs, antibody formation, and pathologic changes in turkeys and chickens. *Am. J. Vet. Res.* 39, 1674-1679.
- Richard, J.L., Pier, A.C., Stubblefield, R.D., Shotwell, O.L., Lyon, R.L., Cutlip, R.C., (1983). Effect of feeding corn naturally contaminated with aflatoxin on feed efficiency, on physiologic, on immunologic, and pathologic changes, and on tissue residues in steers. *Am. J. Vet. Res.* 44, 1294-1299.
- Robinson, T. S., Mirocha, C. J., Kurtz, H. J., Behrens, J. C., Chi, M. S., Weaver, G. A., Nystrom, S.

- D., (1979). Transmission of T- 2 Toxin into Bovine and Porcine Milk. *J Dairy Sci* 62, 637-641.
- Rosiles, M.R., Bautistav, J., Fuentes, O., Ross, F., (1998), *An Outbreak of Equine Leukoencephalomalacia at Oaxaca, Mexico, Associated with Fumonisin B1*. *J. Vet. Med. A* 45, 299-302.
- Ross, P.F., Ledet, A.E., Owens, D.L., Rice, L.G., Nelson, H.A., Osweiler, G.D., Wilson, T.M.,(1993). Experimental equine leukoencephalomalacia, toxic hepatitis, and encephalopathy caused by corn naturally contaminated with fumonisins. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 69-74.
- Rotter, B.A., Prelusky, D.B., Fortin, A., Miller, J.D., Savard, M.E., (1997). Impact of pure fumonisin B1 on various metabolic parameters and carcass quality of growing-finishing swine-preliminary findings. *Can. J. Anim. Sci.*, 77, 465-470.
- Rotter, B.A., Thompson, B.K., Prelusky, D.B., Trenholm, H.L., Stewart, B., Miller, J.D., Savard, M.E., (1996). Response of growing swine to dietary exposure to pure fumonisin B1 during an eight-week period: growth and clinical parameters. *Nat. Toxins* 4, 42-50
- Schumacher, J., Mullen, J., Shelby, R., Lenz, S., Ruffin, D.C., Kemppainen, B.W. (1995). An investigation of the role of *Fusarium moniliforme* in duodenitis/proximal jejunitis of horses. *Vet Hum Toxicol.* 37(1), 39-45.
- Shreeve, B. J., Patterson, D.S., Roberts, A., (1979). The carry-over of aflatoxin, ochratoxin and zearalenone from naturally contaminated feed to tissues, urine and milk of dairy cows. *Food Cosmet. Toxicol.* 16,151.
- Sieber, R., Blanc, B., (1978). Zur Ausscheidung von Aflatoxin M1 in die Milch und dessen Vorkommen in Milch und Milchprodukten – eine Literaturübersicht. *Mitt Geb Lebensm Hyg.* 69, 477–491.
- Sklan, D., Shelly, M., Makovski, B., Geyra, A., Klipper, E., Friedman, A., (2003). The effect of chronic feeding of diacetoxystyrene and T-2 toxin on performance, health, small intestinal physiology and antibody production in turkey poults. *Br. Poult. Sci.* 44, 46-52.
- Smith, G.W., Constable, P.D., Bacon, C.W., Meredith, F.I., Haschek, W.M., (1996a). Cardiovascular effects of fumonisin in swine. *Fund. Appl. Toxicol.*, 31, 169-172.
- Smith, G.W., Constable, P.D., Smith, A.R., Bacon, C.W., Meredith, F.I., Wollenberg, G.K., Haschek, W.M., (1996b). Effect of fumonisin-containing culture material on pulmonary clearance in swine. *Am. J. Vet. Res.* 57, 1233-1238.
- Smith, J.E., Solomons, G.L., Lewis, C.W., Anderson, J.G., (1994). Mycotoxins in human nutrition and health. European Commission Directorate-General XII for scientific research and development, Agro-Industrial research division
- Smith, T. K., (1980). Influence of dietary fibres, protein and zeolite on zearalenone toxicosis in rats and swine. *J Anim Sci* 50:278-285.
- Snidaro, M. and Paliotti, P. (2002). Rinnovare la tecnica di coltivazione del mais per rinnovare la qualità della granello. *Notiziario ERSA*, 1 febbraio: 15-17.
- Snidaro, M., Barbini, G., Signor, M. (2006). Monitoraggio, sperimentazione e disciplinare di produzione per un mais di qualità in Friuli Venezia Giulia. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Rapporti ISTISAN 07/37.
- Spotti, M., Caloni, F., Fracchiolla, L., Pompa, G., Vigo, D., Maffeo, G., (2001). Fumonisin B1 carry-over into milk in the isolated perfused bovine udder. *Vet Hum Toxicol* 43(2), 109-11.
- Straw, B.E. and Taylor, D.J.. *Diseases of swine*. Wiley-Blackwell eds. (2006), p. 920.
- Sundlof, S.F., Strickland, C., (1986). Zearalenone and zeranone: Potential residue problems in livestock. *Vet. Hum. Toxicol.*, 28, 242-250.
- Swanson, S.P., Rood, H.D., Beherens, J.C., Sanders, P.E., (1987). Preparation and characterization of

- the deepoxy trichothecenes: deepoxy HT-2, deepoxyT-2 triol, deepoxyT-2 tetraol, deepoxy 15-monoacetoxy-scirpenol, and deepoxy scirpentriol. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2821.
- Torelli, E., Bianchi, G., Saccardo, F., Locci, R. and Firrao, G.. Mycotoxin contamination in maize: occurrence, risk factor and proximal imaging analysis. X International Fusarium workshop and Fusarium genomica workshop. Alghero, Sardinia (Italy), August 30-September 2, 2008.
- Towers, N.R., Sprosen, J.M., (1993). Zearalenone-induced infertility in sheep and cattle in New Zealand. *N. Z.Vet. J.* 41, 223-224.
- Trenholm H.L., Hamilton, P.B., Friend, D.W., Thompson, B.K., Hartin, K.E., (1984). Feeding trials with vomitoxin (deoxynivalenol)-contaminated wheat: effects on swine, poultry, and dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 185, 527-531.
- Trenholm, H.L., Thompson, B.K., Hartin, K.E., Greenhalgh, R., McAllister, A.J., (1985). Ingestion of Vomitoxin (Deoxynivalenol)-Contaminated Wheat by Nonlactating Dairy Cows. *J Dairy Sci* 68, 1000-1005.
- Uhlinger, C., (1991). Clinical and epidemiologic features of an epizootic of equine leukoencephalomalacia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 198, 126-128.
- Van Eijkeren, J.C.H., Bakker, M.I., Zeilmaker, M.J., (2006). A simply steady-state model for carry-over of aflatoxins from feed to cow's milk. *Food additives and contaminants* 23(8), 833-838.
- Vanyi, A., Bata, A., Kovacs, F., (1994). Effects of T-2 toxin treatment on egg yield and hatchability in geese. *Acta Vet. Hung.* 42, 79-85.
- Vanyi, A., Glavits, R., Gajdacs, E., Sandor, G., Kovacs, F., (1991). Changes induced in newborn piglets by the trichothecene toxin T-2. *Acta Vet. Hung.* 39, 29-37.
- Veldman, A., Meijs, J.A.C., Borggreve, G.J., Heeres-Van Der Tol, J.J., (1992). Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. *Anim Prod.* 55, 163-168.
- Warfield, C.Y. and Gilchrist, D.G. (1999). Influence of kernel age on fumonisin B1 Production in maize by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol*, 65: 2853-2856.
- Weaver, G.A, Kurtz, H.J., Mirocha, C.J., Bates, F.Y., Behrens, J.C., Robinson, T.S., Swanson, S.P., (1980). The Failure of Purified T-2 Mycotoxin to Produce Hemorrhaging in Dairy Cattle. *Can. vet. J.* 21, 210-213.
- Weaver, G.A., Kurtz, H.J., Behrens, J.C., Robinson, T.S., Seguin, B.E., Bates, F.Y., Mirocha, C.J., (1986b). Effect of zearalenone on the fertility of virgin dairy heifers. *Am. J. Vet. Res.*, 1986b, 47, 1395-1397.
- Weaver, G.A., Kurtz, H.J., Behrens, J.C., Robison, T.S., Seguin, B.E., Bates, F.Y., Mirocha, C.J., (1986a). Effect of zearalenone on dairy cows. *Am J Vet Res.* 47(8), 1826-8.
- Wheeler, K.A., Hurdman, B.F., Pitt, J.I., (1991). Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *Int. J. Food Microbiol.* 12, 141-150.
- Windels, H.F., DiCostanzo, A., Goodrich, R.D., (1995). Effect of deoxynivalenol from barley on performance and health of large-frame crossbred steers. *MN Cattle Feeders Rep.* B-417
- Yiannikouris, A., Jouany J.P., (2002). Mycotoxins in feeds and their fate in animals :a review. *Anim. Res.*, 51, 81-99.
- Yoshizawa, T., Mirocha, c.J., Behrens, J.C. & Swanson, S.P. (1981) Metabolic fate of T-2 toxin in a lactating cow. *Food Cosmet. Toxicol.*, 19,31-39),
- Young, L.G., King, G.J., (1986). Low concentration of zearalenone in diets of mature gilts. *J. Anim. Sci.* 63, 1191-1196.
- Young, L.G., Mcgirr, L., Valli, V.E., Lumsden, J.H., Lun, A., (1983). Vomitoxin in corn fed to young

pigs. J. Anim. Sci. 57, 655-664.

Zeyner, A., Fischer, U., Lindner, A., (2002). Distinct weight loss and elevated hepatic enzymes in horses caused by straw contaminated with deoxynivalenol (case report). In: Proceedings of the Joint Nutrition Symposium, Antwerp, Belgium, p.72.

Zomborszky, M.K., Vetesi, F., Repa, I., Horn, P., Kovacs, F., (1997). Effects of toxins produced by *Fusarium moniliforme* on pigs. I. Definition of tolerance limit values in weaned piglets. Magy. Allartov. Lap. 119, 759-762.