

MICOTOSSINE E ALLEVAMENTO BOVINO

CONSIDERAZIONI

Gianfranco Piva

Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione (ISAN)

Attualmente sono note più di 300 micotossine e sono stati elencati parecchi generi di funghi - come *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Alternaria*, *Cladosporium* e *Rhizopus* - produttori di micotossine

La maggior parte delle ricerche sono però concentrate su alcune tossine, come aflatossine, ocratossina, tricoteceni, zearalenone e fumonisine.

Le micotossine possono causare vari effetti tossici: di tipo acuto, subacuto, teratogeno, mutageno, cancerogeno, ecc.; le micotossine evidenziano diversi tipi di tossicità in dipendenza della dose, dell'organo interessato, del sesso, dell'età e della specie.

Le micotossine sono metaboliti secondari, tossici per gli animali superiori, prodotti da muffe che colonizzano gli alimenti; il termine metabolita secondario significa che non si è in grado di attribuire loro alcun ruolo evidente nella crescita dell'organismo che le produce.

Queste tossine non costituiscono una classe chimica, ma hanno strutture fra loro molto diverse. Mentre il metabolismo primario è fondamentalmente lo stesso per tutti gli esseri viventi, quello secondario dipende dalla specie e talvolta dal ceppo fungino. Da ciò la grande diversità di molecole prodotte, anche se per famiglie di prodotti simili (es. aflatossine, tricoteceni, fumonisine, ecc.)

La formazione di micotossine è quindi strettamente connessa alla crescita fungina; senza crescita del fungo produttore, generalmente la produzione di tossine non avviene. Inoltre, la presenza di funghi tossigeni in un prodotto non indica automaticamente la presenza di micotossine, specialmente se non vi è crescita fungina. D'altra parte, le tossine possono persistere per lungo tempo dopo la crescita vegetativa e la morte del fungo.

Le muffe capaci di produrre micotossine sono contaminanti assai diffusi degli alimenti e dei prodotti agricoli; crescita e produzione di tossine possono avvenire sia in campo sia in magazzino. I principali fattori che consentono la tossinogenesi sono:

- Fattori intrinseci, legati al ceppo fungino.
 - Il potenziale tossigeno può variare tra i ceppi da 1 a 10^3 o 10^4 .
 - La specie fungina determina le classi di micotossine prodotte.
 - Il livello iniziale di contaminazione influenza la quantità di tossine sintetizzabili (più

muffe = maggior quantità potenziale di micotossine).

- Fattori estrinseci, costituiti dall'insieme delle condizioni ecologiche; questi fattori sono prima di tutto determinanti per lo sviluppo fungino, quindi di conseguenza per la produzione di micotossine.
- Fattori chimici, chimico-fisici, fisici, quali: umidità e acqua libera (a_w), temperatura, natura del substrato, composizione gassosa (atmosfera), danni meccanici alle cariossidi.
- Fattori biologici, quali insetti (sia come vettori di spore fungine che come agenti di lesioni alle cariossidi, favorendo l'insediamento delle muffe), la microflora (con risultante competizione tra le specie fungine), stress della pianta (siccità), resistenza del substrato (intesa sia come resistenza genetica che come integrità delle cariossidi).

All'interno d'una specie fungina, i ceppi che producono molta(e) tossina(e) hanno uno sviluppo confrontabile con quelli che ne producono poca(che) o non ne producono affatto, senza differenze significative di carattere morfologico. Ne consegue che l'analisi micologica basata sulla numerazione delle unità vitali e l'identificazione delle specie fungine non permette di quantificare il rischio tossico proprio di un prodotto alimentare; questo rischio non può che essere determinato con un'analisi chimico-fisica per le micotossine note o con dei test biologici di tossicità.

Per prevenire la contaminazione da micotossine delle derrate, bisogna impedire la crescita fungina. Per evitare lo sviluppo di funghi occorre prendere un insieme di misure che scaturiscono dalle leggi che regolano la vita delle muffe; i funghi hanno bisogno di acqua, ossigeno (minimo 1 - 2%), tempo e temperatura adeguata (variabile a seconda delle specie: le temperature elevate favoriscono gli *Aspergilli*, le basse i *Fusarium*).

Una delle caratteristiche comuni delle specie fungine delle derrate poco idratate è la loro grande capacità di sporulazione e di disseminazione. Il parametro cui prestare maggiore attenzione è senza dubbio l' a_w (oltretutto è più facile tenere sotto controllo l'umidità di una partita in un silo che la temperatura, a meno di disporre di sili refrigerati). Va tenuto presente che l'attività e il contenuto d'acqua non sono la stessa cosa: l' a_w (o umidità relativa all'equilibrio, che equivale ad $a_w \times 100$) esprime la parte attiva del contenuto di umidità, nei confronti dell'umidità totale, che comprende anche l'acqua legata. L'acqua contenuta in un alimento, in generale, sarà quindi legata in maniera più o meno intensa a seconda del tipo di substrato e della presenza in questo di gruppi idrofobi e idrofili.

La colonizzazione fungina degli alimenti si verifica più frequentemente di quella batterica a livelli di $a_w < 0,85$; questo non perché i funghi non possano crescere a tenori di a_w più elevati, ma piuttosto perché i batteri sono fortemente competitivi e diventano la microflora predominante a valori di a_w di 0,85-1,00 ed in particolare a valori $> 0,90-0,93$. Con a_w comprese tra 0,93 e 0,85 solo certi batteri possono ancora moltiplicarsi rapidamente (batteri lattici, cocchi) ed il processo d'alterazione microbiologica dovuto ai lieviti e alle muffe diviene predominante. Il valore di a_w minimo al quale è stata osservata crescita fungina è di 0,61; i generi più diffusi (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*) richiedono però valori superiori e le differenze di comportamento delle

specie fungine a seconda della disponibilità d'acqua hanno permesso la distinzione di specie igrofile, mesofile e xerofile. Non si conoscono specie tossigene in grado di crescere a valori di $a_w < 0,78$; sono stati determinati i valori minimi di a_w per la produzione di aflatossine e ocratossina; in genere, i valori minimi di a_w per la crescita sono risultati più bassi di quelli richiesti per la produzione delle rispettive micotossine.

La disponibilità d'acqua dipende da altri fattori ambientali: così l' a_w limite per la tossinogenesi è tanto più bassa quanto più la temperatura si avvicina a quella ottimale per una specie fungina; l' a_w più favorevole dipende dalla natura delle specie che coesistono sulla derrata.

La relazione tra a_w e umidità non è lineare e ogni tipo di derrata ha una sua propria curva di assorbimento; questo fatto spiega come il tenore in acqua corrispondente al valore di a_w da non superare (0,65 circa) per assicurare una buona conservazione, sia differente: 13-13,5% per i cereali e 7-8% per i semi oleosi.

Oltre alla pericolosità dovuta alla possibile produzione di micotossine, lo sviluppo delle muffe nelle derrate alimentari provoca conseguenze ben precise. Possono verificarsi:

- modificazione dell'aspetto;
- alterazione delle qualità organolettiche: *Penicillium cyclopium* conferisce un gusto di terra, il deossinivalenolo (vomitossina), prodotto da diverse specie di *Fusarium*, provoca fenomeni di rifiuto, soprattutto nella specie suina;
- alterazioni delle qualità tecnologiche: gli enzimi prodotti dai funghi idrolizzano i lipidi, l'amido, le proteine. La crescita fungina provoca fenomeni di impaccamento nei sili;
- riduzione quantitativa e soprattutto qualitativa del valore alimentare: produzione di calore, anidride carbonica, acqua; perdita di aminoacidi essenziali, vitamine, ecc..

Prove di laboratorio hanno evidenziato che le perdite di sostanza secca dovute allo sviluppo fungino (produzione CO_2), con conseguente riscaldamento della massa, possono raggiungere il 5%; la produzione d'acqua favorisce inoltre un'ulteriore crescita delle muffe. Alcune ricerche hanno dimostrato che, nel caso del mais, un prodotto fortemente contaminato subisce diminuzioni del tenore in energia, proteine e grassi del 5, 7 e 63% rispettivamente: la quota lipidica è infatti quella più soggetta ad attacco fungino;

- rischi di micosi e di allergie per gli animali, ma anche per gli operatori;
- rischi di micotossicosi da inalazione per gli animali e per gli operatori.

Qualità iniziale delle materie prime, controllo della temperatura, dell'umidità e dell'ambiente di conservazione, trattamenti fisici e chimici, pulizia dei sili e dei trasporti, sono la chiave del controllo dell'attività fungina. La contaminazione iniziale di derrate alimentari non sottoposte a sterilizzazione o pastorizzazione, da parte delle spore fungine, è inevitabile.

Dato che la produzione delle micotossine è legata alla crescita del fungo e che queste molecole persistono anche una volta terminata la crescita vegetativa e dopo la morte del fungo, si tratta di trovare modo di valutare la contaminazione con un indicatore che fornisca dati utili anche se il micelio è morto.

In via recente è stato proposto l'ergosterolo quale marcatore di crescita fungina.

L'ergosterolo è un costituente della parete cellulare di alcuni parassiti vegetali, in particolare di muffe e lieviti, mentre nelle piante superiori non è presente o lo è solo in tracce; alcuni autori hanno proposto la determinazione quantitativa dell'ergosterolo come misura della contaminazione fungina. La validità di questo marcatore è dovuta al fatto che tale sterolo è un costituente della membrana fungina e pertanto le funzioni vitali associate a questa sono ad esso legate. Essendo un metabolita primario e non secondario dei funghi, il rapporto con la crescita è immediato. Recentemente Maupetit e altri hanno stimato la concentrazione di ergosterolo in una serie di materie prime di impiego zootecnico, arrivando a proporre intervalli di valori per una quantità "corrente" e per una "dubbia".

I primi episodi di micotossicosi segnalati in Italia risalgono all'inizio degli anni '70 con il rilievo di una strana mortalità con tipiche lesioni epatiche in un allevamento di tacchini della Romagna. L'analogia con il caso inglese di circa 10 anni prima e la identificazione di aflatoxina B₁ nel magime a base di farina di estrazione di arachide, rese facile trovare la soluzione.

Per quanto riguarda i bovini, negli anni 1972-73 cominciano ad essere segnalati, soprattutto in allevamenti di vitelloni del nord Italia, una elevata percentuale di episodi di necrosi della coda. Controlli da noi eseguiti (Piana G., Piva G., 1975) hanno consentito di evidenziare nei gruppi di animali a maggiore incidenza della sindrome un allungamento del tempo di protrombina parziale (PTT). Il valore di PTT passa da valori compresi fra i 24 ed i 35 secondi in animali a bassa incidenza a valori compresi fra i 35 ed i 44 secondi in animali ad alta incidenza.

Anche la concentrazione in protrombina (fattore II) risulta modificata: negli animali affetti dalla necrosi il valore medio è pari a 15 contro un valore di 13,5 negli animali non affetti.

La variazione dei tempi di coagulazione è riconducibile soprattutto all'azione della tossina T-2.

La tossina T-2, prodotta da *Fusarium sporotrichioides* e *F. oxysporum*, è in grado di produrre sperimentalmente la sindrome della necrosi della coda a seguito di trattamento prolungato di vitelloni con il metabolita fungino. I *Fusarium* produttori si sviluppano molto bene sul mais e la tossina è stata ritenuta responsabile di tossicosi letali anche in bovine lattifere (Jacobson e coll., 1963).

In bovine alimentate con mais conservato umido con una concentrazione di 2 ppm di T-2, è stata segnalata una sindrome caratterizzata da diffuse emorragie, specie a livello del digerente (Ih-Chang e coll., 1972).

Effetto delle principali micotossine sui ruminanti

Pur essendo elevato il numero delle micotossine conosciute, la maggior parte delle ricerche sono però concentrate su alcune, quali aflatoxine, ocratossina, tricoteceni, zearalenoni e fumonisine.

Zearalenone

Lo zearalenone (ZEA), lattone dell'acido resorcilico, è una micotossina prodotta da diverse

specie di *Fusarium*; direttamente o per opera dei suoi metaboliti (alfa e beta zearalenolo) (Miles e coll., 1996) ha dimostrato di possedere una notevole attività estrogenica soprattutto nei monogastrici (Sundlof e Strickland, 1986) mentre molto limitate sono le segnalazioni di interferenze con il ciclo estrale nei ruminanti (Kellela e Ettala, 1984; Khamis e coll., 1986; Mirocha e coll., 1974; Roine e coll. 1971; Jagusch e coll., 1986).

Una modificazione della struttura della molecola a livello biologico è probabilmente la causa dell'aumento di affinità della molecola con i recettori degli estrogeni (Patterson, 1977; Blankenship e coll., 1982). L'attività estrogenica e l'interazione con il recettore rispecchiano quella dell'estradiolo (Katzenellenbogen e coll., 1979), anche se l'alfa-zearalenolo ha un'affinità di legame con il recettore dell'estrogeno pari al 10% rispetto a quella del 17 beta-estradiolo (Katzenellenbogen e coll., 1979) e 4 volte più efficace del beta-zearalenolo; lo ZEA possiede un'affinità pari a 1,8%. L'effetto negativo della tossina sul ciclo riproduttivo è particolarmente evidente nei suini e nelle scrofette in età puberale.

Sebbene l'effetto sui ruminanti sia meno manifesto che non nei suini, vacche da latte alimentate con una dieta contenente 25-100 ppm di ZEA hanno manifestato problemi di ridotta fertilità, riduzione della produzione di latte ed iperestrogenismo, mantenendo però invariati sia l'ovulazione che il ciclo estrale (Mirocha e coll., 1974). Si trattava comunque di contaminazioni molto elevate, raramente osservabili in condizioni pratiche.

Alimenti con contaminazioni inferiori, 385 - 1925 ppb, utilizzati in vacche da latte per un periodo di 7 giorni, non hanno modificato la produzione di latte, ne si è trovato ZEA o suoi metaboliti, nel latte, nelle urine, nel sangue e nei tessuti (Shreeve e coll. 1979).

La somministrazione a manze di 250 mg di ZEA in forma pura per la durata di tre cicli estrali consecutivi, ha determinato una riduzione del tasso di concepimento del 28.7% rispetto agli animali non trattati, senza peraltro modificare la concentrazione plasmatica di progesterone (Weaver e coll., 1986). La contaminazione da ZEA ha inoltre indotto lo sviluppo anticipato delle mammelle in manze prepuberi (Bloomquist e coll., 1982).

Altre prove dimostrano che in vacche non gravide trattate con 500mg/capo/d di ZEA in forma pura e per 2 cicli estrali consecutivi, la concentrazione plasmatica di progesterone non viene alterata. Tali livelli di ingestione hanno indotto una tendenza alla diminuzione della dimensione del corpo luteo, anche se si conclude che lo ZEA non sembra influire negativamente sulla salute della vacca da latte (Weaver e coll., 1986a).

L'utilizzo di granella contaminata con zearalenone in vacche da latte, ha determinato il manifestarsi di fenomeni estrali anomali, della durata di 1 -2 settimane, con vaginiti e minor fertilità degli animali (Roine e coll., 1971), ridotti tassi di concepimento (Mirocha e coll., 1968) e aborti (Kallela e Ettala, 1984). Zhao e coll. (1987) attribuiscono alla presenza di ZEA e *Fusarium moniliforme* (10000 spore/g) in alimenti ammuffiti la causa principale di aborti già a 12-15 giorni di gravidanza.

La somministrazione di 30,46 ug di ZEA/capo/d a capre gravide di 50 giorni non ha avuto ripercussioni sulla salute animale, ma ha indotto un parto prematuro con una mortalità

prenatale del 25%. I parti prematuri sono saliti al 30% con dosaggi più elevati di ZEA (284 ug/capo/d) e la somministrazione di 1300 ug/capo/d ha determinato anoressia negli animali ed edemi vulvari (Zhao e coll., 1991).

La presenza di ZEA a dosaggi crescenti (0-1,5-3-6 e 12 mg/capo/d, per 10 giorni, dal 7° giorno del ciclo estrale) in diete per pecore ha determinato una riduzione lineare del tasso di ovulazione e della lunghezza del ciclo, con una fase estrale prolungata, senza però ripercussioni sul tasso di gravidanza e sulla mortalità embrionale (Smith e coll., 1990).

Va osservato che in condizioni pratiche di utilizzo, gli alimenti inquinati da ZEA rivelano spesso la presenza di più di una micotossina, o addirittura di metaboliti delle stesse. L'effetto potrebbe quindi derivare dall'azione sinergica di più micotossine che agendo, in alcuni casi, a livello epatico possono modificare la risposta di detossificazione nei confronti della singola micotossina.

Nel caso specifico dello zearalenone la trasformazione della tossina a zearalenolo (alfa e beta zearalenolo) può avvenire direttamente ad opera dei protozoi ruminanti (Kiesling e coll., 1984), mentre i batteri sembrano totalmente inerti alla presenza della tossina. Da prove *in vitro* condotte nel nostro Istituto risulta che l'attività microbica determina un abbattimento del 54% e 72%, rispettivamente a 4 ed 8 ore di incubazione, dello zearalenone iniziale. L'attività microbica di degradazione dello zearalenone sembra inoltre, almeno ad 8 ore di incubazione, ridotta con liquido ruminale prelevato 1,5 ore dopo il pasto (tabella 4). L'analisi del metabolita zearalenolo mette in evidenza come gran parte della quota della micotossina venga in realtà trasformata nella sua forma alcolica, con attività estrogenica maggiore rispetto allo zearalenone.

Per quanto riguarda effetti estrogenosimili non giustificati attenzione va posta alla presenza nella dieta di cumestrola da erba medica o di genestina/genesteina da soia.

Deossinivalenolo (DON)

Dai dati riportati dalla bibliografia risulta che la contaminazione degli alimenti con DON è frequentemente associata alla presenza di ZEA.

Spesso, la presenza di DON serve addirittura da indicatore dello stato di ammuffimento di un alimento e della presenza probabile di altre micotossine, anche più tossiche dello stesso DON. In particolare, la contaminazione del mais da parte di *Fusarium roseum* determina la presenza sia di ZEA che di DON.

Questo fatto ha contribuito a rendere praticamente impossibile l'attribuzione ad una tossina specifica degli effetti osservati sugli animali in condizioni normali di allevamento. Solo l'utilizzo della tossina in forma pura ha permesso di attribuire, soprattutto sui monogastrici, un effetto negativo del DON sull'ingestione degli alimenti, mentre la minima disponibilità di dati sui ruminanti non permette conclusioni in merito.

La presenza della microflora ruminale, rappresenta una prima barriera di difesa contro sostanze potenzialmente tossiche all'organismo superiore (Church, 1980). Risulta quindi spiegata la apparentemente bassa sensibilità dei ruminanti nei confronti del DON, anche a concentrazioni elevate, nella razione (Rohmer, 1983).

Il DON infatti viene rapidamente escreto (>95%) (Prelusky *e coll.*, 1986) nelle urine (Côté *e coll.*, 1986; Prelusky *e coll.*, 1987, Prelusky *e coll.*, 1984) e, nei ruminanti, viene per la maggior parte metabolizzato (Ping *e coll.*, 1992) a DOM-1 (King *e coll.*, 1984; Swanson *e coll.*, 1987; Westlake *e coll.* 1987) che presenta una tossicità inferiore rispetto alla tossina di origine (Swanson *e coll.*, 1987).

Parte del metabolita DOM-1 viene ritrovato saltuariamente nel latte, anche se il passaggio è molto ridotto, 0,0001% (< 4ng/mL) a seguito di una dose iniziale orale di 920 mg (Prelusky *e coll.*, 1984).

La tabella 5 evidenzia l'effetto di detossificazione esercitato (*in vitro*) dai microrganismi ruminali su alimenti contaminati da DON (king *e coll.*, 1984).

L'effetto detossificante sembra dipendere dalla concentrazione iniziale della micotossina, e risulta pari al 50% partendo da concentrazioni iniziali di 1000 ppm. L'azione detossificante dei microrganismi ruminali determina probabilmente la riduzione della citotossicità e dell'induzione del vomito da parte del DON osservata nei suini e non nei ruminanti (king *e coll.*, 1984).

La degradabilità della micotossina in ambiente ruminale non giustifica un utilizzo indiscriminato di alimenti contaminati nell'alimentazione dei ruminanti come scelta di ripiego rispetto all'uso nell'alimentazione dei suini.

Livelli di contaminazione di 6,4 ppm sulla sostanza secca nel concentrato hanno determinato una diminuzione, seppur leggera, dell'ingestione di sostanza secca in vacche in asciutta (Trenholm *e coll.*, 1985). Mentre in animali in lattazione, la presenza di 0,8 p.p.m, nei concentrati, ha determinato un calo di produzione di circa 2 kg/capo/giorno (Withlow e Hagler., 1987; Withlow *e coll.*, 1986).

Prove di campo di lungo periodo su vacche da latte non hanno però confermato l'effetto negativo sull'ingestione. Infatti, gli animali pur ricevendo dosi crescenti di DON (0,59- 42 e 104 mg/capo/d), non hanno evidenziato alcuna riduzione dell'ingestione e della produzione di latte (Charmley *e coll.*, 1993).

In agnelli alimentati con una dieta a base di frumento, l'ingestione di 15,6 mg di DON per kg di peso metabolico non ha modificato l'ingestione, l'incremento di peso o l'efficienza alimentare (Harvey *e coll.*, 1986).

Si nota quindi una notevole variabilità di risposta.

Questi risultati sono probabilmente spiegati dal fatto che il DON viene rapidamente metabolizzato nel rumine (King *e coll.*, 1984; Swanson *e coll.*, 1987; Westlake *e coll.* 1987) e che non esistono prove concrete che dimostrano un effetto tossico del DON o dei metaboliti sull'attività della microflora ruminale (Swanson *e coll.*, 1987). L'entità della metabolizzazione del DON potrebbe quindi dipendere dalle differenti condizioni alimentari che possono modificare in modo sostanziale la popolazione protozoaria del rumine, alla quale viene attribuita la maggiore azione di detossificazione.

La contaminazione da DON è piuttosto diffusa; infatti un'analisi condotta negli Stati Uniti su 300 miscele di granaglie e foraggi, ha evidenziato come il 51% dei campioni sia contaminato

da DON (in media 101 ppb) (Whitlow e Hagler, 1987; Whitlow e coll., 1986), percentuale che sale al 68% quando nella lista si comprendono anche i foraggi.

Spesso le micotossine vengono accusate di generare aromi sgradevoli nel latte (Nicholson, 1993). Dalla bibliografia non sembra emergere nessun effetto sugli aromi del latte a seguito di ingestione di alimenti contenenti DON (Charmley e coll., 1993).

Fumonisina

Le fumonisine rappresentano una classe di micotossine prodotte da ceppi di *Fusarium moniliforme* e *F. proliferatum*. Correntemente vengono riconosciuti 3 tipi di metaboliti: la fumonisina B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) e la B₃ (FB₃). Di queste, la FB₁ viene riconosciuta come tossica per gli animali (Harrison e coll., 1990; Kellerman e coll., 1990). Gli effetti clinici di tipo citotossico sono variabili tra le specie, e si manifestano principalmente a livello epatico; le concentrazioni ritenute tossiche nella razione variano da 25 a 150 ppb.

Quando presente a dosaggi inferiori al limite tollerabile si riscontrano diverse forme di intossicazione con complicazioni epatiche. Le sindromi da intossicazione da FB₁ comprendono la Leucoencefalomalacia equina (ELEM) (Kellerman e coll., 1990) e l'edema polmonare nei suini (Harrison e coll., 1990; Ross e coll., 1990; Osweiler e coll., 1992).

Queste manifestazioni tossiche sono state osservate anche nelle pecore (Kriek e coll., 1981), e quindi viene formulata l'ipotesi di una possibile tossicità per i ruminanti.

Dosaggi di fumonisina (FB₁ + FB₂ + FB₃) fino a 45,5 mg/kg di peso corporeo somministrate ad agnelli per 4 giorni consecutivi si sono dimostrati altamente tossici determinando la morte degli animali trattati entro 7 giorni dal trattamento e determinando, ai dosaggi più bassi, la diminuzione dell'ingestione e problemi a livello epatico e renale (11,1 - 22,2 e 45,5 mg/kg di peso corporeo) (Edrington e coll., 1995).

I bovini sembrano essere meno sensibili alla presenza della tossina negli alimenti; la somministrazione di 15, 31 e 148 ppb nella dieta per 31 giorni consecutivi a vitelli non ha infatti modificato in modo significativo l'ingestione degli alimenti e l'incremento ponderale (Osweiler e coll., 1993) e solo il trattamento a concentrazione più elevata ha provocato un temporaneo rifiuto dell'alimento da parte degli animali.

Su alcuni degli animali trattati sono state evidenziate alterazioni delle funzionalità epatiche ed in particolare (Cornelius, 1989): l'aspartato amino transferasi plasmatica, la gamma glutamil transpeptidasi, la lattato deidrogenasi, oltre alla bilirubina ed al colesterolo ematico, dopo 10 giorni di trattamento (Edrington e coll., 1993; Osweiler e coll., 1993).

Alterazioni simili sono state osservate anche nei suini alimentati con diete contaminate da fumonisina (Osweiler e coll., 1992) e confermano la citotossicità della micotossina. In particolare, la tossina interferisce nella sintesi degli sfingolipidi (Wang e coll., 1991) e quindi viene ritenuta responsabile della citotossicità epatica (Haschek e coll., 1992), degli effetti a livello del sistema nervoso centrale (Norred e coll., 1992) ed è in grado di minare la stabilità delle membrane plasmatiche e quindi favorire il rilascio del colesterolo (Osweiler e coll., 1993; Beasley e coll.,

1992). Il livello di colesterolo può quindi essere utilizzato come indicatore di un possibile danno epatico da fumonisina (Osweiler e coll., 1993). I sintomi in genere scompaiono circa 30 giorni dopo la sospensione dell'esposizione alla tossina.

Da un'indagine condotta dal nostro Istituto nel nord Italia, su aziende segnalate per problemi di fertilità che inducevano a sospettare la presenza di micotossine, soltanto 2 aziende hanno evidenziato la reale presenza di ZEA (375-752 ppm) nel mangime e/o insilati. In nessun caso è stata osservata la presenza di M₁ nel latte.

La performance riproduttiva risulta negativamente influenzata nelle aziende in cui gli animali ricevevano alimenti molto contaminati da micotossine. Va sottolineato che le capacità manageriali e l'organizzazione aziendale delle aziende in esame sono da considerarsi analoghe. In particolare, esiste un'evidente aumento della percentuale di animali che non vengono ingravidati all'atto fecondativo, con conseguente riduzione del tasso di concepimento.

Tossina T-2

La tossina T-2 fa parte di un gruppo di micossine prodotte da *Fusarium* denominate tricoteceni, tra i quali vanno segnalati anche DON, nivalenolo e diacetossiscirpenolo. La tossina T-2 viene metabolizzata nel ruminante ad acetil T-2 (meno tossica, ma più prontamente assorbita a livello intestinale), HT-2 ed acetil HT-2 (Munger e coll., 1987; Westlake e coll. 1987; Westlake e coll. 1987a).

I batteri ed i protozoi (più attivi ma anche più sensibili alla concentrazione della tossina) sono in grado di metabolizzare rapidamente la tossina T-2, evidenziando l'estrema importanza del ruminante come barriera per migliorare la resistenza dei ruminanti contro le micotossine naturalmente presenti negli alimenti (Westlake e coll., 1989).

Gli effetti della T-2 sono molto diversificati e generalmente interessano processi subcellulari quali il trasporto attraverso le membrane, la permeabilità delle stesse ed il metabolismo energetico.

Nelle vacche da latte la T-2 è stata associata a presenze di forme emorragiche intestinali, a gastro-enteriti che hanno determinato talvolta la morte degli animali (Petrie e coll., 1977) e a necrosi ischemiche alla coda (Martelli e coll., 1993).

In alcune nostre ricerche degli anni '72-75, erano state rilevate in vitelloni tipiche lesioni di necrosi della coda determinate da ingestione della tossina T-2 (Piana e Piva, 1975).

Circa lo 0,2% della T-2 e metaboliti derivati vengono ritrovati nel latte (Yoshizawa e coll., 1982).

Anche le performances produttive e riproduttive risultano influenzate dalla presenza della T-2 nella razione, con sintomi quali anoressia, rifiuto dell'alimento, diarrea, 30% di diminuzione della produzione di latte, completo arresto del ciclo estrale a sole 24-48 ore dalla somministrazione della tossina (Kegl e Vanyi, 1991) con regressione dei sintomi alla sospensione dell'ingestione di tossina.

Concentrazioni nella dieta di 0,64 ppm per 20 giorni hanno determinato la morte degli animali con presenza di sangue nelle feci, enteriti e ulcere a livello ruminale ed abomasale (Pier e coll., 1980).

Nei vitelli la somministrazione di T-2 determina l'abbassamento del livello di immunoglobuline plasmatiche, di neutrofili e dosaggi pari a 3 mg/kg peso di T-2 possono risultare mortali.

L'aggiunta di tossina T-2 in ragione di 0,3 e 0,9mg/capo/giorno per 9 giorni consecutivi in diete a diverso rapporto foraggi/concentrati, ha determinato un'alterazione del ciclo ovarico in pecore ed un significativo ritardo nell'ovulazione in manze sincronizzate con PG₂₇ (Huszenicza e Fekete, 1995).

In entrambi i casi è stata osservata una diminuzione significativa della concentrazione plasmatica di progesterone. Gli autori concludono che l'abbinamento della presenza della tossina T-2 in diete con alti livelli di concentrati può influire negativamente sulla ovulazione o sulla funzionalità del corpo luteo.

Nell'eziologia della micotossicosi da tricoteceni, la risposta individuale sembra importante e la perdita di appetito frequentemente osservata sembra dovuta ad una inibizione della sintesi delle proteine epatiche a seguito dell'azione delle tossine stesse o dei metaboliti assorbiti nel tratto gastro-intestinale. Questo comporterebbe l'aumento della concentrazione ematica di amminoacidi e verosimilmente l'aumento della concentrazione di triptofano a livello cerebrale. Di conseguenza, l'aumentata sintesi di serotonina a partire dal triptofano sarebbe responsabile dei fenomeni di letargia osservati in animali che ingerivano alimenti contaminati da T-2 (Smith, 1992).

Ocratossina

L'ocratossina A (OA) viene prodotta da due specie di funghi, *Penicillium verrucosum* e *Aspergillus alutaceus*. L'importanza assegnata in questi ultimi anni all'OA deriva dal fatto che può influire negativamente sulla performance degli animali (monogastrici), ma anche avere ripercussioni negative sugli esseri umani (nefropatia endemica balcanica). La tossina viene assorbita passivamente nell'intestino ed attivamente a livello renale. Nei monogastrici esercita la tossicità a livello renale (Krogh, 1987).

L'intossicazione da OA è rara nei ruminanti in quanto la tossina viene idrolizzata nel rumine ad una forma meno tossica (Sreemannarayana e coll., 1988; Kuiper-Goodman e Scott, 1989; Xiao e coll., 1991; Xiao e coll., 1991a).

Le prove *in vitro*, dimostrano come l'idrolisi avvenga esclusivamente per opera dei protozoi ruminanti; essa sembra influenzata dalle condizioni di attività della microflora; infatti l'attività di degradazione è ridotta ad un terzo se l'inoculo ruminale viene prelevato 1.5-2 ore dopo la somministrazione della dieta (Kiesling e coll., 1984).

Non risulta chiaro se ciò sia dovuto all'interferenza delle particelle alimentari o alla diminuzione della presenza di protozoi nel liquido ruminale, come osservato da Michalowski e Muszynski (1978). Segnalazioni di presenza di ocratossina A nel latte (eventi rari) sono state

ricondotte od alla inalazioni di polveri di alimenti con presenza di elevate quantità di ocratossina A od a diete ad effetto fortemente defaunante con conseguente riduzione dell'azione di degradazione da parte dei protozoi

Aflatossine

Le AF sono un gruppo di micotossine prodotte da ceppi di *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, con struttura chimica tra loro assai simile. Le AF che vengono riscontrate negli alimenti di origine vegetale sono quattro: B₁, B₂, G₁, G₂; le B sono prodotte sia da *A. flavus* che da *A. parasiticus*, mentre le G sono prodotte solo dal secondo.

Nella maggior parte dei casi, l'AFB₁ è quella presente in maggior quantità e sulla quale è stato focalizzato l'interesse dei ricercatori per via della sua elevata tossicità acuta e cronica e per l'attività cancerogena che esplica sugli animali, oltre che per i potenziali effetti sull'uomo. Le AF hanno un gruppo bifuranico che assicura una grande rigidità ad una estremità della molecola, che perciò presenta una struttura praticamente piana, permettendo delle interazioni specifiche con certi costituenti cellulari, in particolare il DNA; inoltre, la B₁ e la G₁ possiedono un doppio legame all'estremità del gruppo furanico, che può essere ossidato dalle ossidasi microsomiali, con trasformazione delle interazioni in veri e propri legami covalenti.

Gli alimenti che contengono AF con maggior frequenza sono: farina di arachide, mais e sottoprodotti, panelli di cocco, cotone e derivati; ma va ricordato che una cattiva conservazione può far comparire le AF anche in prodotti non considerati a rischio. Le AF provocano il cancro del fegato e a volte anche del rene, in tutte le specie animali studiate; l'AFB₁ è l'epatocancerogeno, attivo *per os*, più potente che si conosca.

I risultati in merito alla presunta capacità dei microrganismi ruminanti di degradare l'AFB₁ sono contrastanti. Kiessling *e coll.* (1984), utilizzando liquido ruminale ovino e bovino, non hanno dimostrato la metabolizzazione dell'AFB₁ al metabolita M₁ da parte dei microrganismi ruminanti, e hanno riscontrato l'incapacità dei microrganismi ruminanti di abbattere la concentrazione della tossina *in vitro*.

Per contro esistono lavori che supportano la totale degradazione della tossina *in vitro* ed *in vivo* ad opera dei microrganismi ruminanti (Engel e Hagemester, 1978).

Prove *in vitro* di Westlake *e coll.* (1989) hanno evidenziato una degradazione ruminale inferiore al 10% quando la l'AFB₁ era presente a una concentrazione pari a 1 - 10 ng/litro di liquido ruminale.

E' indubbio in ogni caso che le aflatossine esercitino una specifica tossicità nei riguardi dei microrganismi ruminanti.

In generale, livelli di 300-700 ppb vengono considerati tossici per le vacche da latte (CAST, 1989), mentre i vitelli sono già sensibili alla presenza 20 ppb di AF nella dieta (Whitlow e Hagler, 1992).

L'AFB₁ viene metabolizzata dal citocromo microsomiale P-450 epatico ed extra epatico a metaboliti secondari, alcuni dei quali presentano un'attività tossica inferiore alla tossina di

partenza.

La metabolizzazione della tossina, e principalmente l'attività di detossificazione e la sensibilità alla tossicità della stessa, sembrano essere legate alla specie animale interessata. La tossicità, acuta o cronica, dipende inoltre dalla quantità di tossina ingerita e dal tempo di esposizione. Bovini, suini e volatili sono gli animali maggiormente sensibili all'aflatossina B₁ ed i sintomi, osservati già ad 1 o 2 giorni dall'esposizione, comprendono diminuzione dell'ingestione e ridotta velocità di accrescimento (Coulomb, 1993).

Contaminazioni di 0,2 ppm sono già in grado di diminuire la crescita giornaliera in bovini e, come risulta dalle esperienze di Guthrie e Bedell (1979) e Bodine e Mertens (1983), la somministrazione a vacche da latte di una dieta contaminata da aflatossine (120 ppb/s.s) per un periodo prolungato determina una riduzione dell'attività ruminale, dell'efficienza alimentare e riproduttiva ed una minor produzione di latte.

Da prove *in vitro* ed *in vivo* risulta che l'aflatossina B₁ è in grado di alterare la funzionalità ruminale (Mertens, 1977), la proteolisi e la motilità ruminale (Dvorak e coll., 1977; Cook e coll., 1986).

L'organo più colpito risulta il fegato, dove si osservano alterazioni con necrosi emorragiche, infiltrazioni di grasso e proliferazione dei dotti biliari (Coulomb, 1993), ma vengono interessati anche i reni, e si osserva una diminuzione della resistenza dei tessuti, un ritardo dei tempi di coagulazione ematica ed una predisposizione alle lesioni cutanee. L'intossicazione risulta nella maggior parte dei casi di tipo cronico, e quindi non facilmente evidenziabile nell'allevamento, ma con ripercussioni non trascurabili dal punto di vista economico.

Entrambe le forme di intossicazioni, cronica ed acuta, hanno ripercussioni negative sul sistema immunitario (Pier e McLoughlin, 1985; Pier, 1986; Pier, 1991), principalmente influenzando le risposte immunitarie cellule-mediate, inibendo la capacità di difesa dell'organismo da malattie fungine, batteriche, virali e parassitarie (Pier e coll., 1979).

L'immunodepressione, e quindi l'aumentata probabilità di insorgenza di malattie condizionate, moltiplicano la sintomatologia legata all'assunzione di aflatossine.

La molteplicità dei sintomi osservati comprende: anoressia, perdita di peso, opacità della cornea, forme di diarrea intermittenti, diminuzione della produzione di latte, minor peso alla nascita dei vitelli, mastiti, metriti, disordini respiratori, aborti, prolapsi uterini, danni epatici, ipercolesterolemia, aumento della bilirubina ematica, del G.O.T., della lattato deidrogenasi, della fosfatasi alcalina e diminuzione del livello ematico di vitamina A.

L'effetto sulla riproduzione non sembra essere diretto e, da quanto appena riportato, è piuttosto un'azione indiretta attraverso altri sistemi fisiologici.

In questi ultimi anni sono stati pubblicati molti dati sui rischi connessi con la presenza di AF negli alimenti, basati sia su prove su animali da laboratorio, sia su studi epidemiologici di incidenza di cancro al fegato e ingestione di AF in paesi o in zone con elevata mortalità per questa malattia. Numerosi paesi hanno imposto limiti per il livello di AF negli alimenti per animali e per l'uomo.

Generalmente viene accettato che il rischio teorico connesso con la presenza negli

alimenti di una sostanza ad azione cancerogena debba essere non superiore a $1:10^5$ - 10^6 .

Alcuni Paesi hanno imposto limiti per i livelli di micotossine negli alimenti in base a questi criteri, mentre altri hanno fissato dei limiti in base alla considerazione (non scientifica) che l'esposizione ad una potenziale sostanza cancerogena per l'uomo, che non possa essere totalmente evitata, debba essere limitata al livello più basso possibile (limiti prossimi a quelli del metodo di analisi).

La maggior parte dei paesi ha fissato limiti tra i 5 e i 20 ug/kg (tabella 8). Per l'Italia, l'AF è soprattutto un problema connesso con l'importazione di derrate da paesi a clima caldo e umido, mentre la contaminazione dei prodotti locali è poco frequente e a livelli piuttosto contenuti sia per motivi climatici che per le migliori tecniche agronomiche, di raccolta e di conservazione dei prodotti stessi.

Parecchi sottoprodotti importati, utilizzati in alimentazione animale, sono frequentemente contaminati di AF; la popolazione può quindi essere indirettamente esposta all'AF per il consumo di latte, carne e uova ottenuti da animali che hanno ingerito prodotti contaminati. Durante il processo digestivo, l'AF viene in parte assorbita e trasportata al fegato, dove viene metabolizzata, dando origine a diversi idrossi-derivati che finiscono nel circolo sanguigno e vengono poi eliminati tramite l'urina e la bile (o il latte).

Diverse ricerche condotte su specie di interesse zootecnico, hanno consentito di stabilire il rapporto tra concentrazione di AFB₁ nella dieta e livello di AFB₁ o dei metaboliti presenti nei tessuti. La quantità rilevabile nei tessuti è quasi sempre trascurabile, tranne che per l'AFM₁ nel latte. L'AFM₁ ("milk toxin") è stato il primo metabolita della B₁ ad essere identificato. Tutti i mammiferi che ingeriscono AFB₁, ne eliminano una quota come AFM₁ nel latte; nel caso della vacca da latte, la quota eliminata è generalmente dell'1-3% di quella ingerita. Vi è tuttavia una elevata variabilità, dovuta sia a fattori individuali che allo stadio di lattazione. Il carry-over di un singolo animale è 3,3-3,5 volte maggiore ad inizio lattazione che a lattazione avanzata ed è linearmente correlato con il livello produttivo: per una produzione di 20 e di 46 kg/die è all'incirca del 2 e del 5,7%, rispettivamente, con elevata variabilità individuale; una quota importante di questa differenza può essere spiegata dalla differente produzione di latte, ma vi è anche un contributo dovuto alla più elevata concentrazione di AFM₁ nel latte ad inizio lattazione. L'ipotesi che vi sia una permeabilità passiva (variabile da un animale all'altro) dal sangue alle cellule alveolari della ghiandola mammaria, dipendente dalla concentrazione dell'AFM₁, può spiegare la dipendenza del carry-over dal livello produttivo. Questa ipotesi è suffragata dal fatto che vacche da latte con infezione della mammella da stafilococchi hanno una elevata escrezione di AFM₁ e che le infezioni aumentano la permeabilità degli alveoli; una elevata permeabilità all'inizio della lattazione potrebbe anche essere la ragione dell'alto livello di AFM₁ rilevabile nel latte prodotto da vacche tra le 2 e le 4 settimane di lattazione.

Nonostante l'elevata variabilità individuale, è tuttavia possibile predire il livello di AFM₁ del latte dall'ingestione di AFB₁ della mandria:

$$\text{AFM}_1(\text{ng/kg di latte}) = 1,19 \times (\text{ug di AFB}_1 \text{ ingeriti/vacca/die}) + 1,9 \quad (r=0,93)$$

Da questa equazione si può dedurre che l'ingestione media di AFB₁ deve essere inferiore a 40 ug/capo/giorno se si vuole produrre latte con una concentrazione di AFM₁ inferiore a 50 ng/kg, livello massimo ammesso dalla vigente legislazione Ue recepita anche dall'Italia. Per il latte destinato all'infanzia, o meglio per tutti gli alimenti destinati all'infanzia, il livello massimo di AFM₁ viene indicato inferiore ai 10 ng/kg (10 ppt) (Circolare n 10 Ist. Superiore della Sanità - 9 giugno 1999 G.U. n. 135 dell'11 giugno 1999). Alcune aziende del settore lattiero caseario che lavorano latte alimentare e che tengono costantemente controllato il livello di AFM₁ del latte consegnato dagli allevatori, sollecitano valori attorno ai 20 ng/kg e segnalano rischi di contaminazione ed interventi, quando questi valori sono superati.

L'AFM₁, che ha una struttura simile a quella della B₁, ha evidenziato una tossicità acuta paragonabile a quella della molecola da cui deriva, mentre la cancerogenicità epatica (verificata sulla trota e sul ratto) è all'incirca del 2-10% rispetto alla B₁. La presenza di questa molecola nel latte desta qualche preoccupazione, perché riguarda un alimento di largo consumo e indispensabile per l'infanzia.

L'AFM₁ è legata alla frazione proteica del latte, per cui è presente nei formaggi e in altri latticini prodotti con latte contaminato.

Parecchi paesi hanno fissato limiti massimi consentiti per l'AFM₁ : in genere, questi limiti sono di 50-100 ng/litro di latte; limiti così bassi, introdotti prima dalla Svizzera e poi da altri paesi, vengono giustificati con la considerazione che la dose giornaliera tale da produrre un rischio di 1:10⁶ è dell'ordine di 1-10 ng/soggetto: pertanto, la concentrazione accettabile di AFM₁ nel latte deve essere inferiore ad alcune decine di ng/litro. Per limitare il livello di AFM₁ nel latte, in tutti i paesi della Comunità Europea è stato fissato un limite di 5 ppb di AFB₁ per gli alimenti destinati alle bovine in lattazione.

N.B. Nel caso delle bufale nel latte accanto ad AFM₁ viene eliminata anche AFB₁.

Prevenzione della contaminazione e inattivazione delle micotossine

Prevenzione

La soluzione ottimale al problema della contaminazione da micotossine è evidentemente la prevenzione, con l'adozione di misure tali da impedire la crescita delle muffe e la formazione delle tossine. L'attacco e la crescita fungini in campo prima del raccolto possono essere evitati in qualche misura mediante appropriate tecniche agronomiche, che includono:

- scelta della varietà adatta per la località;
- appropriata coltivazione del terreno e rotazione delle colture;
- fertilizzazione bilanciata;
- semina non eccessivamente intensiva;
- raccolta al momento opportuno (in condizioni meteorologiche instabili la raccolta precoce

- con granella ad umidità superiore al 30% è da preferire);
- adozione di misure atte a minimizzare l'attacco di insetti.

Al momento, non vi sono fungicidi disponibili che siano attivi contro i *Fusarium*; se un trattamento con fungicidi viene effettuato in campo, i funghi competitivi con i *Fusarium* sono soppressi, cosa che aumenta il rischio di produzione di micotossine. L'ulteriore selezione di piante resistenti ai *Fusarium* e ad altri generi potrà in un prossimo futuro limitare la contaminazione in campo.

La prevenzione della produzione di micotossine dopo il raccolto sulle granaglie conservate, nelle materie prime e nei mangimi, costituisce una azione essenziale per limitare i danni negli allevamenti. La rapida essiccazione del prodotto dopo la mietitura fino ad umidità commerciale, costituisce un passaggio fondamentale. Buone pratiche di gestione delle materie prime e dei mangimi (quali sistematica pulizia delle linee di trasporto e delle coclee; conservazione nei silos a valori di umidità sicuri; ispezione dei prodotti per evidenziare aumenti di temperatura, presenza di insetti e zone umide) potranno limitare la possibilità di sviluppo fungino.

Le granaglie conservate non costituiscono un sistema statico, ma dinamico e possono essere contaminate sia esternamente che internamente da funghi ed insetti. Queste interrelazioni sono influenzate da fattori climatici come temperatura e umidità, dalla località, dal tipo di silo e dalle modalità di trasporto. L'umidità dipende principalmente dal tenore in acqua al raccolto, dall'essiccazione, dall'aerazione e mescolamento delle granaglie prima o durante lo stoccaggio, così come dalla respirazione di insetti e microrganismi. Bisogna prestare molta attenzione alle migrazioni di umidità all'interno del silo per effetto di correnti convettive dovute a differenze di temperatura tra la zona vicina alle pareti e quella più interna o tra le pareti opposte per la differente esposizione solare.

Inattivazione

Metodi fisici

I metodi fisici comprendono la pulizia e il lavaggio, la separazione dei semi contaminati da quelli sani e il trattamento con calore. Il successo di queste tecniche dipende dal livello iniziale di contaminazione e dalla distribuzione delle micotossine nei semi.

Vari metodi di pulizia, basati su tecnologie comuni, hanno ridotto la concentrazione di DON fino al 40%. Il livello di decontaminazione sembra correlato alla distribuzione di DON nei semi e alla percentuale di DON presente nei semi raggrinziti, più leggeri e fortemente infettati. In prove da noi condotte su granella di mais, la setacciatura con un vaglio da 5 mm ha ridotto la contaminazione da ZEA e FMB₁ del 70%.

Tecniche di lavaggio dei cereali con acqua o con soluzioni di bicarbonato possono ridurre la contaminazione da ZEA e DON anche dell'80%; tuttavia, il lavaggio può essere effettuato solo se il cereale è destinato alla macinazione ad umido o alla produzione di alcol, dato che i costi aggiuntivi di essiccazione sono considerevoli. Le stesse considerazioni valgono anche per quelle tecniche che separano le cariossidi contaminate dalle sane sfruttando la differenza di densità e

quindi il galleggiamento delle prime in soluzioni concentrate di zuccheri o di sale.

La sensibilità al calore dipende dal tipo di micotossina, dalla temperatura, dalla durata del trattamento termico e dall'umidità del substrato. In generale, le micotossine sono sostanze piuttosto stabili al calore. Il trattamento a microonde ha evidenziato una parziale efficacia detossificante su mais contaminato da DON; il trattamento di frumento contaminato mediante calore prodotto da un bruciatore a gas, ha ridotto del 50% il livello di DON.

Metodi chimici

Numerose sostanze chimiche sono state testate per la loro capacità di decontaminare derrate contaminate da micotossine: molte di queste hanno tuttavia prodotto effetti modesti.

Gli agenti chimici che hanno evidenziato una certa efficacia contro le micotossine comprendono: l'idrossido di calcio e la metilamina nei confronti di diacetossiscirpenolo, tossina T-2 e ZEA presenti in farina di mais; il bisolfito di sodio nei confronti del DON e dell'AFB₁; gas come ozono, cloro e ammoniaca nei confronti del DON; la formaldeide e l'idrossido di sodio nei confronti dello ZEA. L'ammoniaca si è dimostrata efficace anche nei confronti di OA e AFB₁: essa può ridurre il livello di AF fino al 99% in materie prime contaminate. Trattamenti con ammoniaca sono consentiti a livello commerciale in diversi stati degli U.S.A. e in Francia.

In ricerche da noi condotte (Santi e coll., 1982) su farina di arachide contaminata da AF, abbiamo dimostrato l'efficacia del trattamento con urea+ureasi: mescolando infatti la farina con urea e ureasi e aumentando il tenore di umidità, con la conservazione in ambiente confinato si ha la liberazione di ammoniaca nella farina e conseguente detossificazione.

Di particolare interesse sono i trattamenti chimici su prodotti contaminati da AF e destinati all'alimentazione di vacche in lattazione: è infatti essenziale ridurre al minimo l'escrezione di AFM₁ nel latte. In una prova da noi effettuata (Piva e coll., 1985), una farina di arachide contaminata da AF (401 ppb di AFB₁) è stata portata al 17% di umidità e trattata con idrossido di calcio (4%) e paraformaldeide (0,5%) in autoclave a 2 atm. per 20 min. In seguito al trattamento, il livello di contaminazione è sceso a 29,5 ppb (-92,6%). La farina contaminata e quella trattata sono state utilizzate per la preparazione di 2 mangimi, con livelli di AFB₁ di 160 e 11,8 ppb rispettivamente, che sono stati somministrati a vacche in lattazione; la percentuale di escrezione di AFM₁ nel latte è risultata la stessa nelle due prove, ma quando gli animali ricevevano il mangime contenente arachide decontaminata, il livello di AFM₁ nel latte prodotto era 10-15 volte inferiore, rispetto a quello degli animali che ricevevano il mangime con arachide non trattata.

Metodi biologici

Un metodo alternativo alla decontaminazione fisica o chimica delle granaglie contaminate da micotossine è quello di minimizzare l'effetto delle tossine nell'animale modificando la sua dieta (Trenholm e coll., 1996). Questi metodi comprendono il miglioramento del valore nutrizionale della dieta, l'aggiunta di aromatizzanti o di sostanze chimiche che influenzano il metabolismo o il destino della micotossina nel corpo dell'animale, il trattamento della derrata contaminata con un

inoculo microbico, la somministrazione di anticorpi monoclonali specifici per una data tossina, l'insilamento e l'aggiunta di agenti leganti alla dieta, per ridurre l'assorbimento della tossina nel tratto gastrointestinale.

Le sostanze chimiche utilizzate per alterare il metabolismo dell'aflatossina comprendono il BHA, il BHT, l'etossichina e l'oltipraz; queste sostanze riducono il livello di addotti dell'AF con il DNA nel fegato del 60-90%. Anche il fenobarbital ha evidenziato una elevata protezione contro gli effetti letali dell'AF nelle specie avicole, probabilmente perché favorisce il metabolismo ossidativo del citocromo P450 nei confronti della tossina.

Uno degli approcci più interessanti per ridurre il rischio di micotossicosi o per limitare la diminuzione di performances negli animali e il passaggio di metaboliti tossici nel latte e nelle carni, è l'uso di argille negli alimenti contaminati. Test *in vitro*, condotti anche da noi, hanno evidenziato che vari materiali adsorbenti classificabili come allumina, silice, zeoliti o alluminosilicati, sono in grado di legare l'AF in soluzione.

Alcuni ricercatori (Harvey e coll., 1991) hanno effettuato una prova aggiungendo un alluminosilicato idrato di calcio e sodio (HSCAS) ad un mangime per vacche da latte (200 ppb di AFB₁), ottenendo una significativa riduzione del "carry-over", cioè del passaggio di AFB₁ ingerita come AFM₁ nel latte.

Noi stessi (Piva e coll., 1995), abbiamo ottenuto una apprezzabile riduzione del "carry-over" dell'AF (-26%) mescolando ad un mangime contaminato (11,4 ppb di AFB₁) il 2% di una sepiolite; il risultato è da considerarsi notevole, se si considera che le vacche ingerivano solamente 46 ug di AFB₁/capo/d, pari a 1,5 ug/kg di razione - livello simile a quello di molte situazioni reali - e che la sepiolite rappresentava solo lo 0,27% della razione stessa. In via recente con un particolare tipo di sepiolite (Piva et al 2002, dati in corso di pubblicazione) è stato possibile evidenziare, *in vivo*, un effetto di riduzione del carry-over superiore al 60%.

Un numero elevato di agenti leganti ha però mostrato effetti limitati su molte micotossine diverse dalle aflatossine.

Il carbone attivo viene prodotto da legno, vegetali o altro materiale organico; è utilizzato soprattutto per chiarificare, deodorare, decolorare e filtrare. E' stato osservato in alcune sperimentazioni che il carbone attivo può ridurre l'assorbimento di OA (Rotter e coll., 1989) e prevenire la tossicosi da tossina T-2 nei ratti (Bratich e coll., 1990). In ricerche a cui abbiamo partecipato (Galvano e coll., 1996, 1997), alcuni carboni attivi si sono dimostrati efficaci adsorbenti *in vitro* dell'AF e di altre micotossine.

In una prova condotta su vacche da latte (Galvano e coll., 1996), l'aggiunta del 2% di un carbone attivo ad un mangime contaminato da AFB₁ ha ridotto il "carry-over" nel latte del 45%; anche in questo caso l'ingestione era di soli 55 ug di AFB₁/capo/d.

L'impiego di carboni attivi può quindi risultare interessante, anche se al momento il loro costo è piuttosto elevato. In generale, le sostanze adsorbenti possono costituire una soluzione parzialmente efficace soprattutto nei confronti delle aflatossine; altre tossine, per la loro bassa polarità, sono in generale adsorbite con maggiore difficoltà da queste sostanze. Nè va trascurato

il rischio tutt'altro che remoto che i prodotti adsorbenti possano trattenere e rendere indisponibili per l'assorbimento nutrienti quali minerali, vitamine e aminoacidi.

Di notevole interesse è anche l'impiego di enzimi specifici in grado di degradare quelle micotossine che presentano nella loro struttura gruppi funzionali attaccabili; esempi di questo tipo sono le epossidasi e le lattinasi, in grado rispettivamente di eliminare il gruppo epossido presente in tutti i tricoteceni e il gruppo lattone (con apertura dell'anello) presente negli zearalenoni.

Conclusioni

I bovini risultano pertanto relativamente sensibili alle micotossine. Gli effetti indotti possono essere più labili e meno evidenti rispetto ad altre specie, soprattutto nei casi di contaminazioni non elevate. Il ruminante è una barriera abbastanza efficace, ma non certo assoluta. Inoltre, la maggior durata della carriera produttiva può favorire fenomeni accumulativi non trascurabili.

Risultano di particolare interesse e in continua evoluzione le ricerche che mirano a sviluppare metodi biologici sempre più efficaci; la speranza è quella di poter disporre in un prossimo futuro di strumenti nuovi per limitare al massimo gli effetti negativi che le micotossine esercitano sull'allevamento bovino. Nel frattempo, molto resta ancora da fare nel settore della prevenzione, che coinvolge inevitabilmente tutta la filiera produttiva.

