

GESTIONE DEL RISCHIO MICOTOSSINE NELLA PRODUZIONE SUINICOLA

Marco Poggiali

15/12/2011

GESTIONE DEL RISCHIO MICOTOSSINE

ANALISI

- Campionamento ed analisi di laboratorio

VALUTAZIONE

- Pool di micotossine ed effetti sugli animali.

AZIONE DI RISPOSTA

- Prevenzione e controllo nei mangimi completi

Le **MICOTOSSINE** sono metaboliti secondari, sostanze prodotte da funghi, specialmente da muffe saprofitiche che crescono sugli alimenti o sui mangimi. Non sono direttamente essenziali per la crescita, ed hanno effetti tossici per le cellule vegetali ed animali.

L'intestino è il primo sito di azione di queste sostanze, al pari delle **tossine batteriche**.

Tipo di tossina	Micotossine	Tossine batteriche
Tipo chimico	Molecole a basso peso	Sostanze proteiche
Azione tossica	Solitamente lenta	veloce
Sintomatologia	Non tipica	Tipici evidenti
Reazione immunitaria	Scarsa o nulla	Presente
Risposta a trattamenti sintomatici (antibiotici, FANS)	Nessuna o limitata	Presente e veloce

ANALISI

- Campionamento ed analisi di laboratorio

Direttiva 2005/38/CE del 06/06/2005

Relativa ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale del tenore di tossine di *Fusarium* nei prodotti alimentari

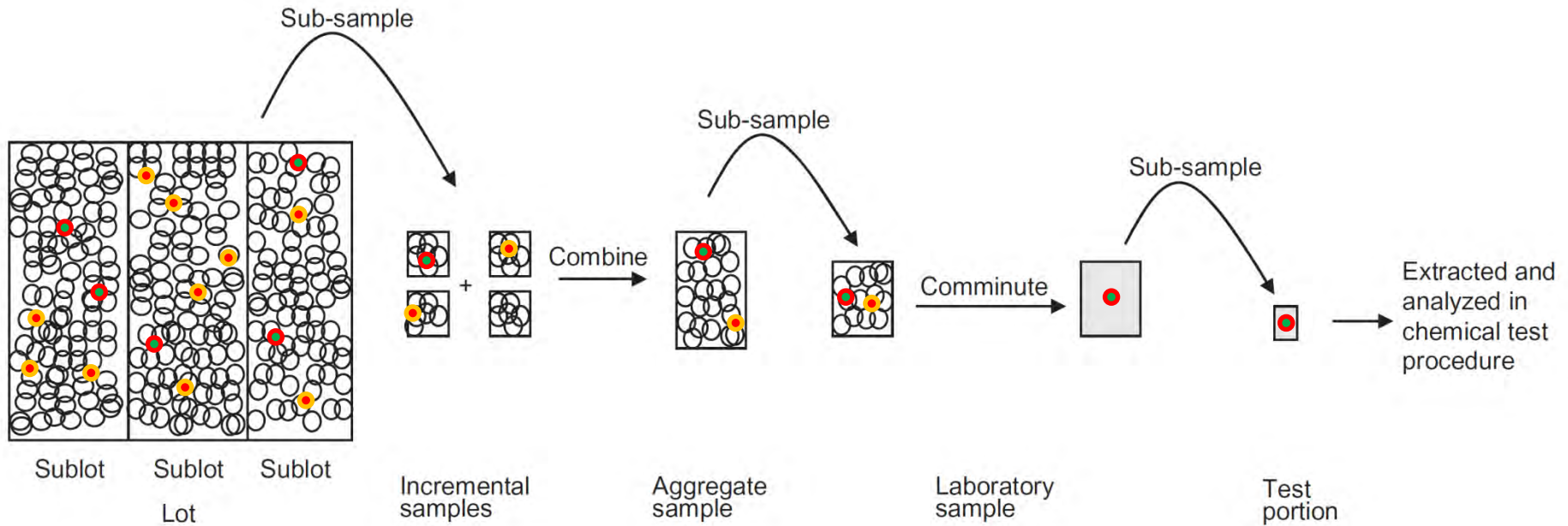
Regolamento n°401/2006 del 23/02/2006

Relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari.

Mais	Esempio di corretto campionamento in azienda a ciclo chiuso di 1.000 scrofe		21	100	10
Orzo			8	40	4
Soia f.e.			6	40	4
Cruscami			3	20	2
Campione elementare		100 g	TOT	40	200

ANALISI

- Campionamento ed analisi di laboratorio



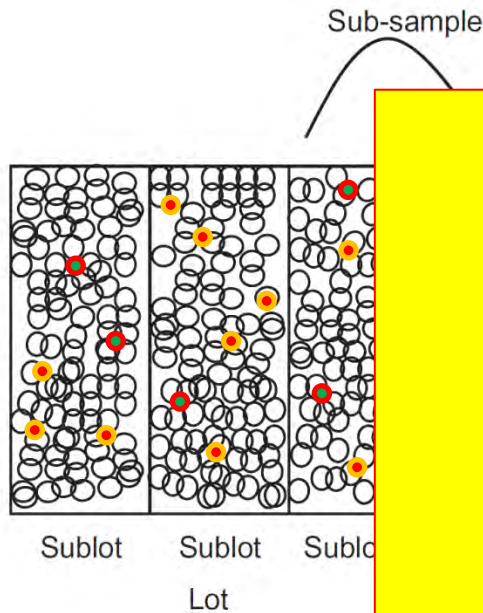
SV 75-80%

SPV 10-15%

AV 5-10%

ANALISI

- Campionamento ed analisi di laboratorio



1 ppb = 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$

1 kg in 1.000.000 ton

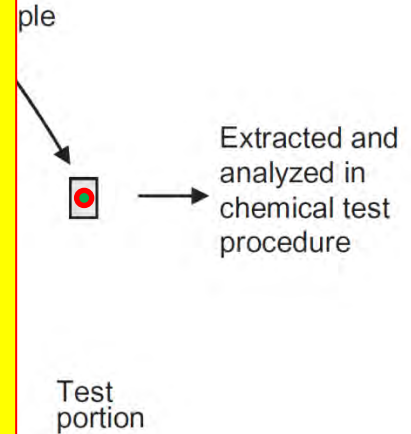
1 parte per 1.000.000.000

1 sec in 32 anni

1 granello di sabbia in 22 kg

1 chicco di mais in 3,5 vagoni

1 kg in 42.000 autotreni




SV 75-80%

SPV 10-15%

AV 5-10%

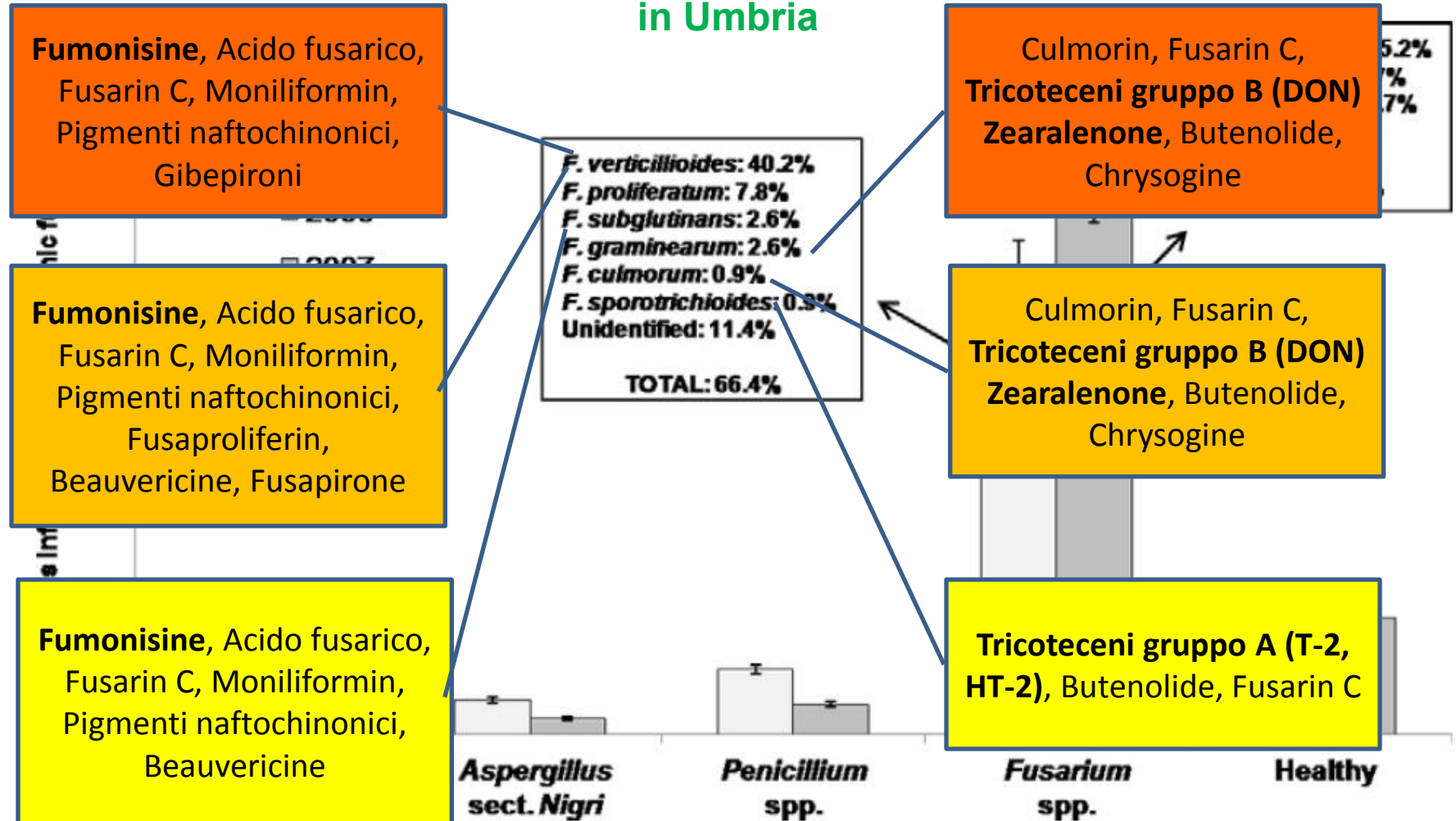
ANALISI

- Identificazione con PCR di funghi micotossigenici 

- Strumenti analitici di laboratorio standardizzati

- EN ISO 14718:1998 Materie prime per animali – determinazione del contenuto di **aflatossina B1** di materie prime miscelate – metodo utilizzante HPLC
- EN ISO 6651:2001 Determinazione semi-quantitativa di **aflatossina B1** – metodo TLC
- EN ISO 17375:2006 Materie prime per animali. Determinazione di **aflatossina B1**
- DIN EN 15792:2009 Materie prime per animali – Determinazione di **zearalenone** nei mangimi per animali – metodo HPLC con rilevazione a fluorescenza e colonna di purificazione per immunoaffinità
- BS EN 15791:2009 Alimenti. Determinazione del **deossinivalenolo** nei mangimi per animali. Metodo HPLC con colonna di purificazione per immunoaffinità

Presenza di differenti specie fungine micotossigeniche nei semi di granoturco in Umbria



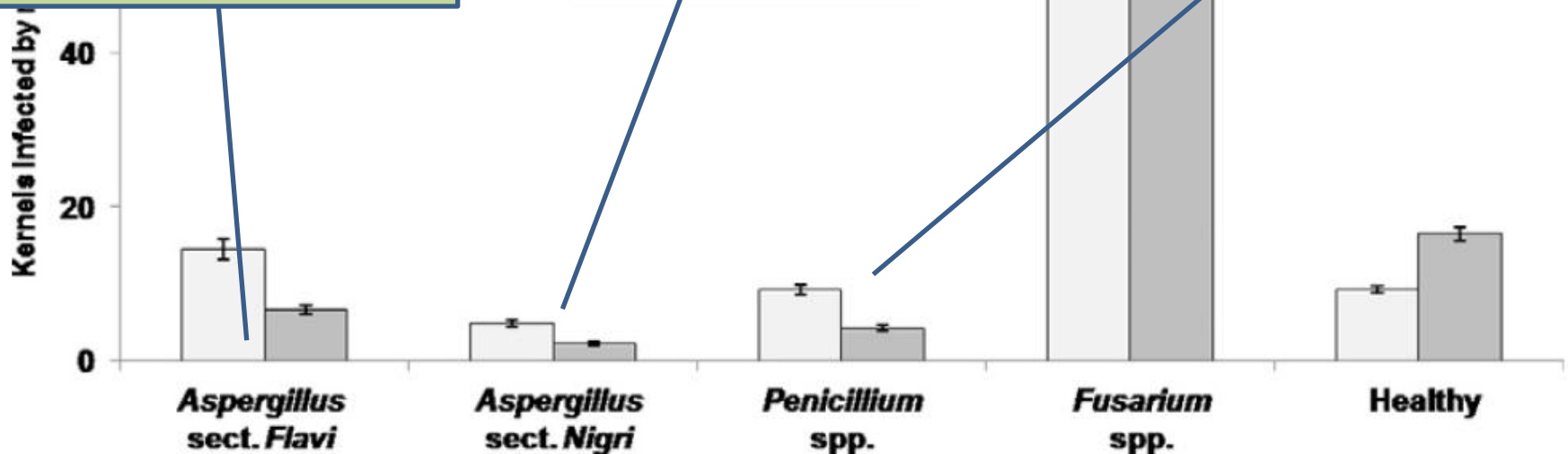
Presenza di differenti specie fungine micotossigeniche nei semi di granturco

Aflatossina B₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, Acido ciclopiazonico,, acido kojico, acido 3-nitropropionico, acido aspergilloso, gliotossina, verrucologen, fumitremorgin A & B, fumitossine, fumigaclavine, tryptoquivaline

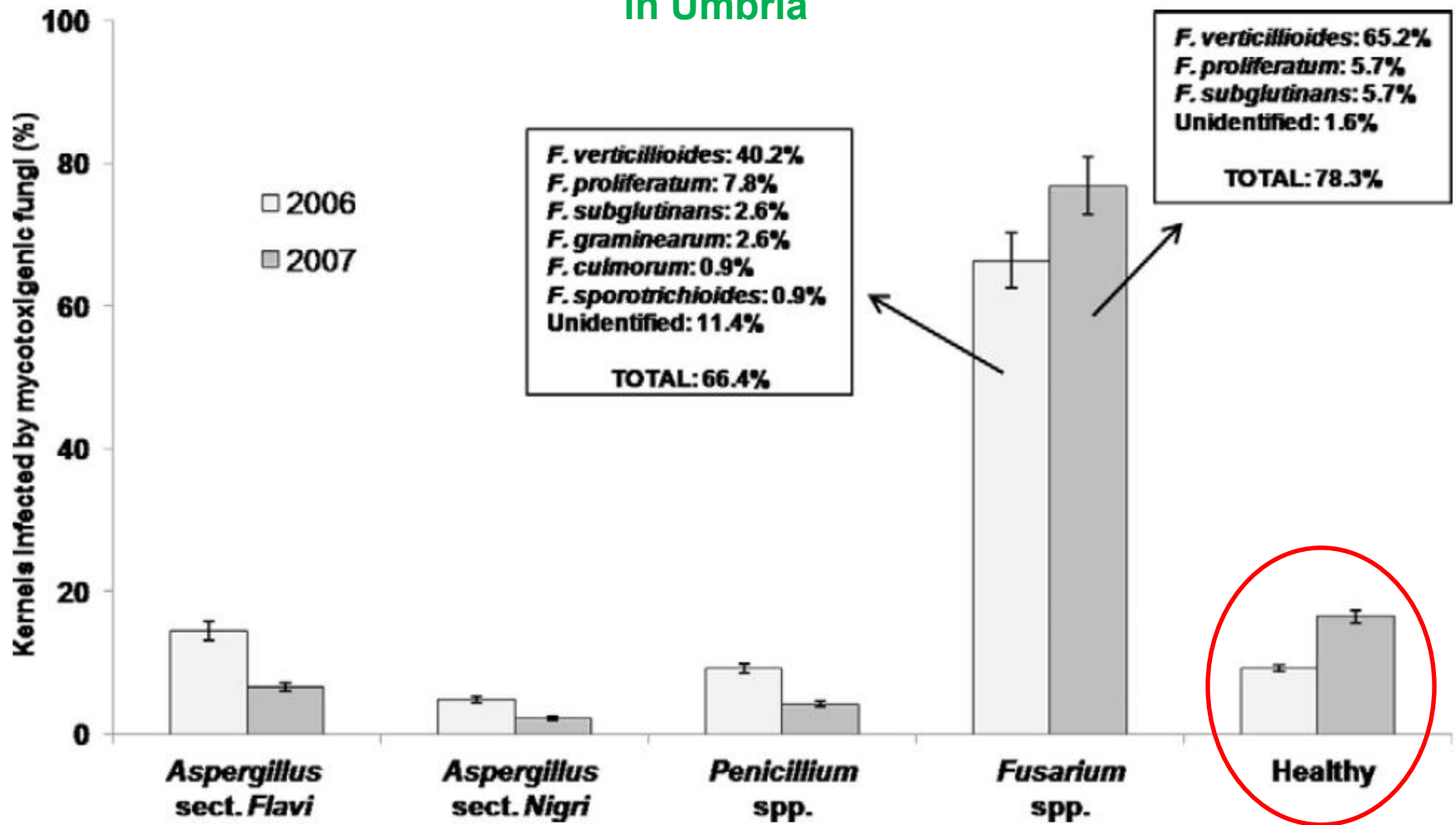
Ocratossina A, nafto-4-pironi, malformine

Ocratossina A, patulina, roquefortina C, citrinina, communesine, nafto-4-pironi, malformine

F. culmorum: 0.9%
F. sporotrichioides: 0.9%
 Unidentified: 11.4%
TOTAL: 66.4%



Presenza di differenti specie fungine micotossigeniche nei semi di granturco in Umbria



<i>Fusarium</i> species	Mycotoxins
<i>F. graminearum</i>	DON, 3- and 15-acetyl DON, NIV, DAS, ZON
<i>F. culmorum</i>	DON, 3-acetyl DON, NIV, T-2 toxin, HT-2 toxin, NEO, ZON
<i>F. crockwellense</i> (Synonym: <i>F. cerealis</i>)	NIV, FUS, ZON
<i>F. avenaceum</i>	NEO, FUS, ZON, MON
<i>F. subglutinans</i> (Synonym: <i>F. sacchari</i> var. <i>subglutinans</i>)	MON, BEA
<i>F. moniliforme</i> (Synonym: <i>F. verticillioides</i>)	Fumonisin B1, B2, B3; FU-C
<i>F. poae</i>	NIV, FUS, T-2 toxin, HT-2 toxin
<i>F. sporotrichioides</i>	T-2 toxin, HT-2 toxin, NEO
<i>F. tritinctum</i>	T-2 toxin, DAS, MON, ZON
<i>F. proliferatum</i>	Fumonisin B1, B2; FUS, MON, BEA
<i>F. equiseti</i>	T-2 toxin, HT-2 toxin, DAS, FUS, NEO, ZON
<i>F. oxysporum</i> (Synonym: <i>F. redolens</i>)	ZON, MON
<i>F. semisectum</i>	DAS, BEA



Metodo	Vantaggi	Svantaggi
ELISA	Semplice preparazione del campione	Reattività crociata con le micotossine correlate
Test di immuno-	Apparecchi poco costosi	Possibili risultati falsi positivi / negativi
nosorbenza	Analisi simultanea di più campioni	Richiede conferma con analisi LC
enzimatica	Adatto allo screening (indagine di massa)	Quantificazione critica vicina ai limiti normativi
	Valutazione visiva	Semi-quantitativa (valutazione visiva)
	Limitato uso di solventi organici	
HPLC	Buona sensibilità	Apparecchi costosi
Cromatografia	Buona selettività	Richiede personale specializzato
Liquida ad	Buona ripetibilità	
alta	Può essere automatizzata	
prestazione	Brevi tempi di esecuzione	

Metodo	Vantaggi	Svantaggi
TLC	Semplice, economico, rapido	Scarsa sensibilità (per alcune micotossine)
Cromatografia su strato sottile	Può essere usato per uno screening Analisi simultanea di micotossine multiple	Scarsa precisione Adegua separazione può richiedere analisi bidimensionale
	Sensibile per aflatossine e ocratossina A	Quantitativa solo quando usata con un densitometro
GC	Analisi simultanea di micotossine multiple	Apparecchi costosi. Richiede derivatizzazione. Risposta incerta
Gascromatografia	Buona sensibilità Può essere automatizzata Fornisce conferma (rilevatore MS) Brevi tempi di esecuzione	Richiede personale specializzato Curva di calibrazione non lineare Problemi di interferenza matrice Effetto di trascinamento del campione precedente Variazione nella riproducibilità e nella ripetibilità

Metodo	Vantaggi	Svantaggi
LC/MS	Analisi simultanea di micotossine multiple	Molto costosa
Cromatografia	Buona sensibilità (LC/MS/MS)	Richiede personale specializzato
Liquida / Spettrofotometria di massa	Fornisce conferma	La sensibilità si basa sulla tecnica di ionizzazione
	Non richiede derivatizzazione	Curva di calibrazione assistita della matrice (per analisi quantitativa)

ANALISI

- Costo delle analisi di laboratorio

Aflatossine (B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂)	ELISA	€ 21,52
Deossinivalenolo	LC-MS	€ 63,01
Fumonisine totali	ELISA	€ 24,85
Ocratossina A	ELISA	€ 24,33
Tossine T-2 e HT-2	ELISA	€ 28,83
Zearalenone	ELISA	€ 24,85
		€ 187,39

Aflatossine (B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂)	HPLC	35,60
Deossinivalenolo	LC-MS	63,01
Fumonisine (B1, B2)	LC-MS	45,11
Ocratossina A	HPLC	35,60
Tossine T-2 e HT-2	LC-MS/MS	72,42
Zearalenone	LC-MS	35,60
		€ 287,34

ANALISI

- Costo delle analisi di laboratorio

Aflatossina B ₁	LC-MS/MS	53,66
Aflatossina B ₂	LC-MS/MS	53,66
Aflatossina G ₁	LC-MS/MS	53,66
Aflatossina G ₂	LC-MS/MS	53,66
Deossinivalenolo (DON)	LC-MS/MS	72,05
Fumonisina B ₁	LC-MS/MS	72,01
Fumonisina B ₂	LC-MS/MS	72,16
Ocratossina A	LC-MS/MS	72,05
Tossina HT-2	LC-MS/MS	72,42
Tossina T-2	LC-MS/MS	72,42
Zearalanone	LC-MS/MS	106,05
		€ 753,80

ANALISI

- Categorie delle micotossine.

Rischio micotossine e coinvolgimento nella catena alimentare

- Accertamento

Micotossine di interesse per gli animali da reddito (EU SCAN, 2003)

Micotossine elencate nella Dir.32/2002 (D.Lgs n°149/2004)



1. Aflatossina B₁
2. Alcaloidi dell'Ergot

Micotossine elencate nella Racc. 576/2006



1. Deossinivalenolo
2. Zearalenone
3. Fumonisine B₁ e B₂
4. Tossina T-2
5. Tossina HT-2



con livelli massimi raccomandati

con livelli da definire

Gallo, 2010. Effetto dell'inclusione di assorbenti sulla quantificazione di AFB₁ nei mangimi per animali

Livelli AFB ₁	HC 15,33±1,18 ppm (AC) 13,81±1,05 ppm (MeOH)				LC 7,57±0,65 ppm (AC) 7,02±0,63 ppm (MeOH)			
	10 g/kg		20 g/kg		10 g/kg		20 g/kg	
Prodotto	AC	MeOH	AC	MeOH	AC	MeOH	AC	MeOH
Bentonite sodica	11,72±1,75	0,84±0,11	9,74±1,13	0,54±0,11	5,42±0,46	0,53±0,02	5,60±1,04	0,45±0,03
Bentonite calcica	12,56±0,12	1,65±0,05	11,50±1,13	0,95±0,52	7,58±0,63	1,94±0,31	7,15±0,55	1,37±0,06
Zeolite	11,96±1,43	2,86±0,12	12,59±1,07	2,79±0,29	7,56±0,64	2,43±0,32	6,72±0,34	2,48±0,11
Caolinite	12,83±0,53	3,14±0,13	12,54±0,37	3,59±1,18	6,50±1,75	2,27±0,09	6,27±0,30	2,07±0,09
YCWB	12,21±1,90	2,71±0,02	10,70±1,00	2,86±0,21	6,81±0,13	2,26±0,20	6,49±0,28	2,44±0,11
Carbone attivato	7,99±1,01	1,36±0,03	5,73±0,16	1,03±0,02	4,17±0,18	1,30±0,10	2,98±0,09	0,86±0,17
Bentonite magnesica	13,16±2,56	1,34±0,26	12,43±1,87	0,64±0,27	7,25±0,43	0,84±0,02	7,25±0,49	0,60±0,06
Fillosilicato	12,58±1,75	4,22±0,18	11,63±1,99	0,55±0,04	6,68±0,53	4,912±0,70	6,37±0,12	2,85±0,14
Montmorillonite calcica	11,53±1,66	1,05±0,14	13,59±1,94	0,84±0,13	7,41±0,63	0,83±0,04	5,58±0,14	0,60±0,08

Estrazione usando Acetone

Acetone Metanolo 12,0% recupero

Acetone Metanolo 22,8% recupero

Un effetto dose rilevazione di AFB₁ è più bassa alla dose maggiore di adsorbenti aggiunta (20 g/kg)

La capacità di estrazione di MeOH nei mangimi contenenti adsorbenti risulta significativamente più bassa rispetto all'AC, ed i valori sono molto più bassi dei valori di controllo



Presenza di differenti specie fungine micotossigeniche nei semi di granoturco in Umbria

Presenza di micotossine in due anni esaminati (percentuale di campioni positivi, contaminazione media, mediana ed intervallo di contaminazione)



Mycotoxins	Contaminated samples (%)		Average contamination ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		Median ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		Contamination range ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
	2006	2007	2006	2007	2006	2007	2006	2007
Fumonisin	96	94	4343	5727	1290	2555	100–25,730	n.d.-76,323
Zearalenone	30	100	2.3	8.9	n.d.	7.2	n.d.–83	2.96–27.3
Deoxynivalenol	100	89	1042	856	724	210	197–3980	n.d.-13,990
Aflatoxins	–	100	–	26.3	–	2.15	–	n.d.–820

n.d.: non detectable (<LOD value).

Livelli massimi ($\mu\text{g/kg}$) da Reg.1881/2006 Tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari

	AFB ₁	Afs TOTALI B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	AFM ₁	OTA	DON	ZON	FUMO
arachidi ed altri semi oleosi	8,00	15,00	-	-	-	-	-
cereali non trasformati	2,00	4,00	-	5,00	1.250,00	100,00	800,00
grano duro e avena non trasformati	2,00	4,00	-	5,00	1.750,00	100,00	800,00
prodotti derivati dai cereali	2,00	4,00	-	3,00	750,00	75,00	800,00
granoturco da trattare	5,00	10,00	-	5,00	1.750,00	350,00	4.000,00
prodotti derivati dal granoturco	5,00	10,00	-	5,00	750,00	100,00	1.000,00
riso da trattare	5,00	10,00	-	5,00	750,00	100,00	800,00
latte crudo	-	-	0,05	-	-	-	-

ANALISI

- Pool di micotossine ed effetti sugli animali.

Rischio micotossine e coinvolgimento nella catena alimentare

- Accertamento

Micotossine di interesse per gli animali da reddito (EU SCAN, 2003)

Altre micotossine potenzialmente indesiderabili

1. Moniliformina
2. Acido micofenolico
3. Acido ciclopiazonico
4. Patulina
5. Altri tricoteceni
 1. Diacetilscirpenolo DAS
 2. Monoacetilscipernolo MAS
 3. Nivalenolo NIV

VALUTAZIONE

- Pool di micotossine ed effetti sugli animali.

Rischio micotossine e coinvolgimento nella catena alimentare

- **Presenza di micotossine: la realtà della co-contaminazione**
 - Contaminazioni multiple, dovute a
 - Contemporanea presenza di muffe diverse.
 - Capacità di produrre diverse micotossine e loro metaboliti da parte dello stesso fungo in diverse condizioni di crescita.
 - Per i mangimi complementari e completi, la co-contaminazione dipende dalle micotossine presenti in ogni singola materia prima
- **Esposizione dietetica degli animali da reddito alle micotossine**
 - Composizione diversa delle diete nelle diverse specie e fasi di allevamento condizionano il rischio di assumere pool di micotossine diverse.

Distribuzione di Tricoteceni, ZON ed ergosterolo in un lotto frazionato di frumento

1. I semi contaminati con ZON, NIV, DON sono raggruppati in base ai loro attributi visivi



Semi sani e rinsecchiti

Tre categorie per i semi contaminati da *Fusarium*:

- ❖ Chicchi bianchi
- ❖ Chicchi rinsecchiti
- ❖ Chicchi rossi



Chicchi di frumento rinsecchiti, simili a gesso (contaminati da *Fusarium*)



Chicchi danneggiati da *Fusarium* con crescite bianco-rosate fibrose



Distribuzione di Tricoteceni, ZON ed ergosterolo in un lotto frazionato di frumento

2. I semi non contaminati da *Fusarium* sono raggruppati in base ai loro attributi visivi

Tre categorie per i semi non contaminati da *Fusarium*:

- ❖ Chicchi sani
- ❖ Chicchi a macchie nere (*Alternaria*, *Cladosporium*)
- ❖ Altri Chicchi



Distribuzione di Tricoteceni, ZON ed ergosterolo in un lotto frazionato di frumento

Contenuto di micotossine dei chicchi raggruppati^a

grouped kernels	percentage by mass of the total number of kernels, ^b % ± s	zearalenone content, µg/kg ± s	nivalenol content, mg/kg ± s	deoxynivalenol content, mg/kg ± s
red	1.1 ± 0.2	1952 ± 214	27.73 ± 4.16	4.39 ± 0.79
shrunken	3.1 ± 0.2	149 ± 16	1.31 ± 0.20	0.40 ± 0.07
white	2.3 ± 0.3	119 ± 13	3.33 ± 0.50	0.34 ± 0.06
black spotted	1.5 ± 0.2	67 ± 7	0.52 ± 0.08	0.25 ± 0.05
healthy	3.5 ± 0.3	9 ^c ± 1	0.29 ± 0.04	0.14 ^c ± 0.03
remaining	88.5 ± 0.5	46 ± 5	0.65 ± 0.10	0.06 ^c ± 0.01
unsorted ^d	100	77 ± 8	1.16 ± 0.17	0.16 ± 0.03

^a Data were corrected for recovery: zearalenone (88%), nivalenol (81%), deoxynivalenol (80%). *s* = standard deviation. ^b Mean of five calculations. ^c <LOQ (zearalenone, 17 µg/kg; deoxynivalenol, 0.157 mg/kg). ^d Random sample, taken directly from the wheat harvest lot.

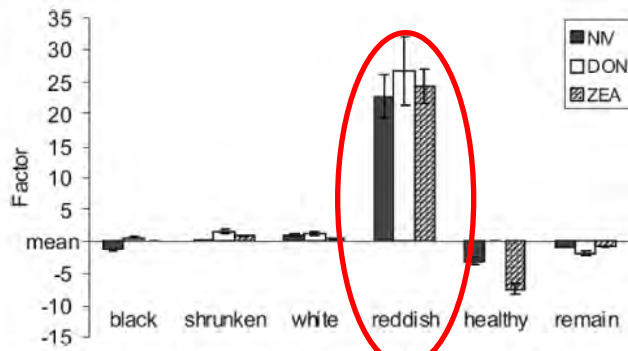


Figure 1. Increases or decreases (illustrated by factors) in the mycotoxin content of the kernel groups related to the mean value. The mean content of mycotoxins was determined by analyses of the unsorted kernel probe. The unsorted kernel probe was taken at random from the wheat harvest lot.

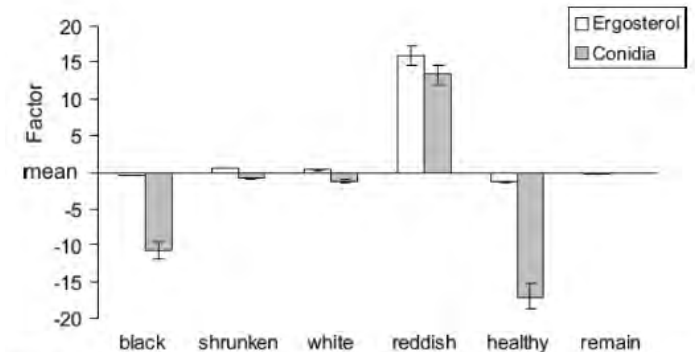
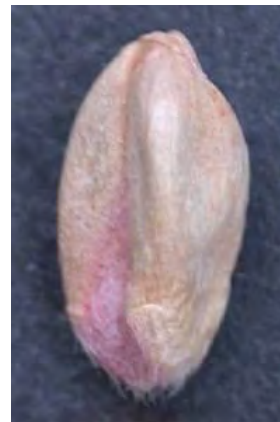


Figure 2. Increases or decreases (illustrated by factors) in the level of ergosterol and number of conidia in the kernel groups related to the mean value. An unsorted kernel probe was used to establish the mean ergosterol and conidia content.

VALUTAZIONE

- Dosaggi delle micotossine.

Tossicità delle micotossine per gli animali da reddito

- **Effetto tossico delle micotossine presenti a concentrazioni cliniche**
 - Patologie ben definite**
 - Nefropatia suina da Ocratossina A.
 - Leucoencefalomalacia equina da fumonisine
 - Aflatossicosi del pollame
- **Effetto tossico delle micotossine presenti a concentrazioni inferiori ai livelli regolamentati e/o a dosi subcliniche**
 - Carenza di studi scientifici specifici.
- **Effetto tossico delle combinazioni di micotossine**
 - Carenza di studi scientifici specifici.
 - Possibilità di effetti additivi, antagonisti o sinergici non conosciuta

FUMONISINE NEI VERRI

24 verri LW alimentati con diete contenenti 0,2 ppm (C) e 5, 10 e 15 ppm a partire dall'età di 8-9 settimane sino alla pubertà. Dopo 6 mesi raccolti campioni di seme da verri puberi.

- La contaminazione della dieta da FB₁ *non influenza i pesi relativi di testicoli ed epididimo, come pure il volume dei testicoli.*
- *Eccetto il volume dell'eiaculato e le anomalie morfologiche degli spermatozoi, tutte le caratteristiche del seme diminuirono in una maniera dose-dipendente statisticamente significativa.*

Table 3 *Seminal characteristics of pubertal boars fed varied levels of dietary FB₁*

Parameter	Control	Diet 1	Diet 2	Diet 3	±s.e.
	0.2 mg FB ₁	5 mg FB ₁	10 mg FB ₁	15 mg FB ₁	
Ejaculate volume (ml)	61.4	60.1	57.3	57.1	11.58
Gel weight (g)	18.33 ^a	11.29 ^{bc}	12.09 ^b	10.62 ^c	0.53
Mass activity ¹	+++	+++	++	+	—
Progressive motility (%)	81.67 ^a	70.00 ^{ab}	56.67 ^b	58.33 ^b	46.94
Sperm concentration (10 ⁹ /ml)	0.30 ^a	0.29 ^a	0.27 ^b	0.25 ^c	5.6 × 10 ⁻⁵
Live spermatozoa (%)	82.50 ^a	77.50 ^{ab}	68.33 ^b	64.17 ^b	54.68
Total sperm/ejaculate (10 ⁹)	18.12 ^a	17.66 ^a	15.35 ^b	14.33 ^b	1.34
Motile sperm/ejaculate (10 ⁹)	14.83 ^a	12.27 ^a	8.74 ^b	8.84 ^b	2.45
Morphological abnormalities (%)	6.56	6.06	6.34	5.63	0.39

FB₁ = fumonisin B₁.

^{a,b,c}Means in the same row with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

¹+++ very turbulent motion; ++ moderate wave motion; + absence of wave motion.

FUMONISINE NEI VERRI

24 verri LW alimentati con diete contenenti 0,2 ppm (C) e 5, 10 e 15 ppm a partire dall'età di da verri puberi.

I livelli di FB₁ nella dieta influenzano l'attività di massa del seme, che varia da movimento veramente turbolento nei controlli ad assenza di movimenti ad onda al dosaggio di 15 ppm

All'aumentare della dose di FB₁, la motilità progressiva dello sperma si riduce del 15 – 30%

Parameter	0.2 mg FB ₁	5 mg FB ₁	10 mg FB ₁	15 mg FB ₁	±s.e.
Ejaculate volume (ml)	61.4	60.1	57.3	57.1	11.58
Gel weight (g)	18.33 ^a	11.99 ^{bc}	12.09 ^b	10.62 ^c	0.53
Mass activity ¹	+++	+++	++	+	-
Progressive motility (%)	81.67 ^a	70.00 ^{ab}	56.67 ^b	58.33 ^b	46.94
Sperm concentration (10 ⁹ /ml)	0.30 ^a	0.29 ^a	0.27 ^b	0.25 ^c	5.6 × 10 ⁻³
Live spermatozoa (%)	82.50 ^a	77.50 ^{ab}	68.33 ^b	64.17 ^b	54.68
Total sperm/ejaculate (10 ⁹)	18.12 ^a	17.66 ^a	15.35 ^b	14.33 ^b	1.34
Motile sperm/ejaculate (10 ⁹)	14.83 ^a	12.27 ^a	8.74 ^b	8.84 ^b	2.45
Morphological abnormalities (%)	6.56	6.06	6.34	5.63	0.39

FB₁ = fumonisin B₁.

^{a,b,c}Means in the same row with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

¹+++ very turbulent motion; ++ moderate wave motion; + absence of wave motion.

- Raccomandazione di US FDA di 10 mg/kg di mangime è al di sopra del livello NOEL (livello senza effetto osservabile)
- Raccomandazione EU di 5 mg/kg di mangime è vicina al NOEL

e 5, 10 e 15 ppm a partire dall'età di

mp
ativ

il volume dei testicoli.

- Eccetto il volume dell'eiaculato e le anomalie morfologiche degli spermatozoi, *del seme diminuirono in una maniera dose-dipendente statistica*

All'aumentare della dose di FB₁, gli spermatozoi vivi si riducono del 17 – 22%

Table 3 Seminal characteristics of pubertal boars fed varied levels of dietary FB₁

Parameter	Control	Diet 1	Diet 2	Diet 3	±s.e.
	0.2 mg FB ₁	5 mg FB ₁	10 mg FB ₁	15 mg FB ₁	
Ejaculate volume (ml)	61.4	60.1	57.3	57.1	11.58
Gel weight (g)	18.33 ^a	11.29 ^{bc}	12.09 ^b	10.62 ^c	0.53
Mass activity ¹	+++	+++	++	+	—
Progressive motility (%)	81.67 ^a	70.00 ^{ab}	56.67 ^b	58.33 ^b	46.94
Sperm concentration (10 ⁹ /ml)	0.30 ^a	0.29 ^a	0.27 ^b	0.25 ^c	5.6 × 10 ⁻⁵
Live spermatozoa (%)	82.50 ^a	77.50 ^{ab}	68.33 ^b	64.17 ^b	54.68
Total sperm/ejaculate (10 ⁹)	18.12 ^a	17.66 ^a	15.35 ^b	14.33 ^b	1.34
Motile sperm/ejaculate (10 ⁹)	14.83 ^a	12.27 ^a	8.74 ^b	8.84 ^b	2.45
Morphological abnormalities (%)	6.56	6.06	6.34	5.63	0.39

FB₁ = fumonisin B₁.

^{a,b,c}Means in the same row with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

¹+++ very turbulent motion; ++ moderate wave motion; + absence of wave motion.

ZEARALENONE NELLE SCROFETTE

- 12 scrofette di 3 mesi, 40 kg p.v., alimentate per 48 gg con
- 20 µg/kg p.v. (pari a circa 500 ppb nel mangime) oppure
- 40 µg/kg p.v. (pari a circa 1.000 ppb nel mangime)
- Una intossicazione clinica da ZON manifesta :
 - Arrossamento della vulva.
 - Estro prolungato, caduta dell'efficacia di copertura.
 - Più elevata incidenza di natimortalità.
- ZON è lo specifico ormone che regola la riproduzione sessuata nei funghi *Fusarium* (stadio sessuale *Gibberella*)
- In condizioni favorevoli lo ZON produce ben 150 metaboliti diversi.
- ZON ha struttura stabile, non degrada durante la conservazione, la macinazione a secco ed a umido, i processi ad elevate temperature.

ZEARALENONE NELLE SCROFETTE

- ZON e metaboliti hanno capacità di legame ed attivazione del recettore degli estrogeni di mammiferi ed uccelli, con conseguenti:
- Negli animali prepuberi, funzionalmente immaturi
 - Variazioni ipertrofiche dei tessuti uterini
 - Inibizione della attività ovarica
 - Variazioni nel comportamento riproduttivo degli animali
 - Caduta della produzione naturale di estrogeni
 - Modificazione del livello di espressione e di attività degli enzimi della via metabolica della steroidogenesi.
- NOAEL (no observable adverse effect levels) < 40 µg/kg p.v. negli animali sensibili
- ZON compete con i substrati endogeni della idrossisteroide-deidrogenasi, che lo trasforma in α-zearalenolo (4X affinità di ZON per recettori estrogenici) e β-zearalenolo

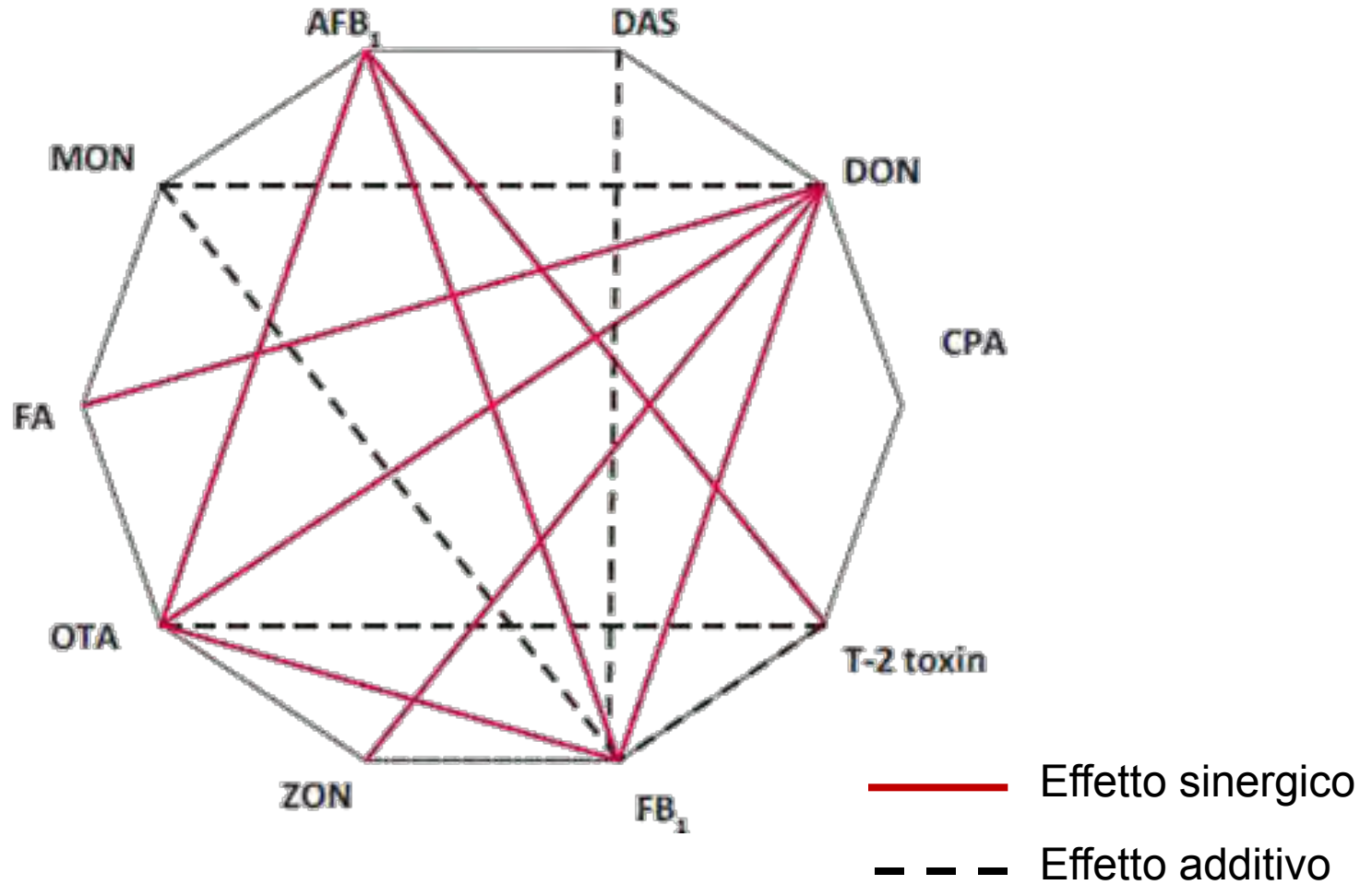
ZEARALENONE NELLE SCROFETTE

- ZON modula la steroidogenesi colpendo l'attività degli enzimi steroidogenici e di conseguenza la biotrasformazione dei composti endogeni ed esogeni. ZON può essere considerato un «distruttore endocrino».
- L'iperestrogenismo dovuto a bassi dosaggi per lungo tempo di ZON porta ad una fibrosi endometriale e ad una iperplasia endometriale atipica incontrollata.
- I dosaggi dello ZON pari al 50% e al 100% della NOAEL per un periodo di 48 giorni inducono iperestrogenismo sperimentale e stimolano la proliferazione di quasi tutti gli strati della parete uterina (eccetto la tunica muscolare), specialmente alla dose più bassa. Inoltre compare iperemia uterina, risultante in arrossamento e rigonfiamento.



VALUTAZIONE

- combinazione di micotossine nel suino.



VALUTAZIONE

- effetto tossico delle micotossine mascherate.

1. Le **Micotossine coniugate** o **mascherate** comparse per la prima volta all'attenzione a metà anni '80 per inspiegabili casi di micotossicosi con contaminazioni minime.
2. Rilevata presenza di forme coniugate delle micotossine, generate dal metabolismo della pianta infestata dalle muffe, ma non con i comuni metodi per le micotossine libere.
3. Questi derivati possono essere idrolizzati alle tossine precursore nel tratto digerente degli animali, o possono avere effetti tossici paragonabili a quelle delle micotossine libere.
4. Possono essere generate anche dalle tecnologie di trasformazione alimentare.
5. I derivati delle micotossine possono avere un comportamento chimico molto diverso dal proprio precursore, tra cui polarità e solubilità.

VALUTAZIONE

- effetto tossico delle micotossine mascherate.

6. Possono facilmente sfuggire all'analisi di routine, poiché la loro estrazione può essere difficile l'uso di solventi abituali. Potrebbero essere persi nel processo di clean-up oppure possono avere un diverso comportamento cromatografico o diverse proprietà spettroscopiche, che ostacolano la loro rilevazione.
8. Gli standard per queste sostanze non sono in genere reperibili in commercio, rendendo identificazione e quantificazione molto difficili.
9. Non sono regolamentate per legge, non esistono limiti di legge, creando un problema per i produttori di alimenti e per le agenzie di controllo.
10. Oggi la tossicità di questi composti è ancora largamente sconosciuta.
11. Le piante si proteggono da xenobiotici e residui in due modi principali:
 - Compartimentazione fisica, con separazione di questi composti in specifici organi, tessuti, organelli o spazio extra-plasmatico, dove possono incidere solo in minima parte il normale metabolismo della pianta.
 - Compartimentazione chimica, secondo la quale i gruppi reattivi funzionali delle micotossine sono ridotte o coniugate con altri elementi cellulari, dando origine a prodotti con tossicità inferiore.

FUMONISINE nascoste

5 metodi indipendenti

5 materie prime differenti

3 laboratori

1 materiale di riferimento unico = **3.036 ppb**

Table 2 Fumonisin quantification obtained by chosen methods

	Sum of FB ₁ , FB ₂ , and FB ₃ (µg/kg)									
	Method 1		Method 2		Method 3		Method 4		Method 5	
	Data (n=2)	RSD%	Data (n=2)	RSD%	Data (n=3)	RSD%	Data (n=2)	RSD%	Data (n=4)	RSD%
A	807	5.7–8.1	752	3.2–7.5	829	3.6–16.7	700	3.4–6.1	1,242	n.a.
B	1,226		810		824		400		326	
C	1,079		1,059		1,491		600		757	
D	496		389		539		1,400		91	
E	1,585		1,701		3,093		900		767	
Blank	n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.	
Reference material (3,036±746)	3,037		3,486		4,493		–		3,206	

I valori di FB trovati per ciascun campione sono molto diversi

RSD = Relative standard deviation

FUMONISINE nascoste

Table 3 Amount of extractable fumonisins, hidden fumonisins found in the extract, and total fumonisins found in the sample

Samples	Extractable fumonisins ^a (µg/kg)	Hidden fumonisins found in the extract ^b (µg/kg)	Residual hidden fumonisins ^c (µg/kg)	Total fumonisins ^d (µg/kg)
A	752 (37%)	280 (14%)	982 (49%)	2,014
B	810 (54%)	378 (25%)	324 (21%)	1,512
C	1,059 (68%)	413 (26%)	89 (6%)	1,561
D	389 (66%)	148 (25%)	54 (9%)	590
E	1,701 (55%)	780 (25%)	598 (20%)	3,079

^a Evaluated according to method 2 and expressed as the sum of FB₁, FB₂, and FB₃

^b Calculated as the difference between total FBs equivalents found in the extract and extractable FBs

^c Calculated as the difference between total FBs equivalents found in the extract and total FBs found in the sample

^d Evaluated according to method 2 and expressed as the sum of FB₁, FB₂, and FB₃ equivalents

- Tutti i campioni sono analizzati con il Metodo 1 (estrazione + LC-MS/MS) dopo estrazione mediante idrolisi
- Tutti i campioni hanno evidenziato presenza di fumonisine nascoste in concentrazione comparabile con le fumonisine estraibili



AZIONE DI RISPOSTA

- Prevenzione e controllo nei mangimi completi

Raccomandazione n°583 del 17/08/2006

Prevenzione e riduzione delle *Fusarium*-tossine in cereali e prodotti derivati.

Fattori di rischio nelle BPA (Buone Pratiche Agricole) :

- Rotazione delle colture
- Scelta della varietà/dell'ibrido
- Pianificazione delle colture
- Gestione del suolo e delle colture
- Raccolto
- Essiccazione
- Conservazione, stoccaggio
- Trasporto dal deposito al mangimificio

AZIONE DI RISPOSTA

- Prevenzione e controllo nei mangimi completi

Strategie di prevenzione : controllo dello sviluppo delle muffe

Coltivazione:

- Scelta delle varietà colturali
- Data di semina

Pre-raccolto:

- Appropriate tecniche di coltivazione
- Modelli predittivi
- [Prevenzione dell'attacco degli insetti](#)
- Tecniche di biocontrollo

Post-raccolto

- Immagazzinamento
- SeleZIONamento

Effetto dei trattamenti sulla evenienza di marciume apicale da Fusarium e contaminazione del mais da fumonisine nel Sud Italia



Effetto dei trattamenti sulla evenienza di marciume apicale da *Fusarium* e contaminazione del mais da fumonisine nel Sud Italia

Effect of agrochemical treatments on insect damage incidence (IDI) and severity (IDS), *Fusarium* ear rot (FER) incidence and severity, *Fusarium proliferatum* and *F. verticillioides* occurrence and fumonisin (FB) contamination on maize in 2005.

Maize hybrid	Treatment	IDI (%) ^a	IDS (%) ^b	FER incidence ^c	FER severity ^d	<i>F. proliferatum</i> / <i>F. verticillioides</i> isolated from kernels (%)		Fumonisin ($\mu\text{g g}^{-1}$) (FB ₁ + FB ₂ + FB ₃) ^e
						<i>F. proliferatum</i>	<i>F. verticillioides</i>	
NK Surtep	Tebuconazole + insecticide	10.0 bc ^f	2.8 bc ^f	0.0 b ^f	0.0 b ^f	12.0 bc ^f	3.0 c ^f	0.0 c ^f
	Tetraconazole + insecticide	6.7 bc	2.2 bc	0.0 b	0.0 b	13.5 bc	1.0 c	0.0 c
	Prochloraz/cyproconazole + insecticide	11.7 b	3.5 bc	0.0 b	0.0 b	9.5 c	2.0 c	0.0 c
	Insecticide alone	16.7 ab	4.1 b	78.3 a	17.6 a	22.5 b	16.0 b	28.2 b
	Untreated control	21.7 a	7.5 a	65.0 a	11.9 a	44.0 a	26.5 a	68.2 a
NK Cisco	Tebuconazole + insecticide	6.7 c	2.3 bc	0.0 d	0.0 d	57.0 ab	0.0 b	1.3 b
	Tetraconazole + insecticide	10.0 b	2.5 bc	25.0 b	4.5 b	4.0 c	0.5 a	7.6 b
	Prochloraz/cyproconazole + insecticide	8.3 bc	2.9 bc	13.3 bc	1.9 bc	24.5 bc	11.5 a	0.2 b
	Insecticide alone	11.7 ab	3.5 b	75.0 a	16.2 a	81.5 a	9.0 a	44.1 a
	Untreated control	20.0 a	5.3 a	68.3 a	17.9 a	73.0 a	16.5 a	26.5 a
NK Stella	Tebuconazole + insecticide	10.0 b	2.3 bc	18.3 b	2.6 b	25.5 ab	9.5 a	8.0 b
	Tetraconazole + insecticide	13.3 b	3.0 b	0.0 c	0.0 c	37.0 ab	10.0 a	0.5 c
	Prochloraz/cyproconazole + insecticide	11.7 b	2.9 b	18.3 b	3.6 b	40.0 a	15.0 a	1.7 c
	Insecticide alone	11.7 b	3.0 b	65.0 a	12.9 a	37.5 a	10.0 a	37.7 a
	Untreated control	25.0 a	7.1 a	75.0 a	16.2 a	20.5 b	9.0 a	52.1 a

^a The insect damage incidence (IDI) (%) was calculated as the percentage of ears per plot with injuries due to larvae insect activity on fifty ears per plot.

^b Insect damage severity (IDS) (%) based on a 1–7 insect damage severity rating scale used for the estimation of the percentage of kernels damaged due the larvae as follows: 1=0%, 2=1–3%, 3=4–10%, 4=11–25%, 5=26–50%, 6=51–75%, and 7 > 75% of kernels with visible injuries.

^c *Fusarium* ear rot (FER) incidence (%) was calculated as the percentage of ears per plot with visible symptoms of the disease on fifty ears per plot.

^d *Fusarium* ear rot (FER) severity (IMcK) based on a 1–7 class disease severity rating scale used for the estimation of the percentage of kernels visibly damaged or discolored as follows: 1=0%, 2=1–3%, 3=4–10%, 4=11–25%, 5=26–50%, 6=51–75%, and 7 > 75% of kernels with visible symptoms of infection such as rot and mycelia growth.

^e Kernel fumonisin contamination (sum of FB₁, FB₂ and FB₃), expressed as μg of mycotoxins per gram of kernels.

^f Means in each column and for each maize hybrid, followed by the same letter, are not significantly different at a probability level of 0.05 according to Tukey's test. The reported IDI, IDS and FER incidence and severity, means were transformed into Bliss angular values before their use in statistical analysis.

Effetto dei trattamenti sulla evenienza di marciume apicale da *Fusarium* e contaminazione del mais da fumonisine nel Sud Italia



Effect of agrochemical treatments on Insect damage incidence (IDI) and severity (IDS), Fusarium ear rot (FER) incidence and severity, *Fusarium proliferatum* and *F. verticillioides* occurrence and fumonisin (FB) contamination on maize in 2006.

Maize hybrid	Treatment	IDI (%) ^a	IDS (%) ^b	FER incidence ^c	FER severity ^d	<i>F. proliferatum</i> / <i>F. verticillioides</i> isolated from kernels (%)		Fumonisin (µg g ⁻¹) (FB ₁ + FB ₂ + FB ₃) ^e
						<i>F. proliferatum</i>	<i>F. verticillioides</i>	
NK Surtep	Tebuconazole + insecticide	5.0 cd ^f	2.2 b ^f	32.1 ab ^f	5.3 ab ^f	4.3 a ^f	2.3 a ^f	4.8 b ^f
	Tetraconazole + insecticide	8.3 bc	2.7 b	23.3 b	3.6 bc	23.3 a	22.7 a	5.3 b
	Prochloraz/cyproconazole + insecticide	3.3 cd	1.1 bc	11.7 c	3.1 bc	7.0 a	3.3 a	0.9 c
	Insecticide alone	11.7 ab	3.1 b	28.3 ab	5.0 ab	19.0 a	13.3 a	8.5 a
	Untreated control	18.3 a	5.1 a	30.6 ab	5.4 ab	24.7 a	15.7 a	7.9 a
NK Cisko	Tebuconazole + insecticide	8.3 b	2.3 bc	24.0 b	3.4 cd	4.3 a	0.3 b	1.7 e
	Tetraconazole + insecticide	6.7 b	2.1 bc	11.7 c	1.6 d	20.7 a	15.3 ab	8.8 c
	Prochloraz/cyproconazole + insecticide	8.3 b	2.9 b	20.0 b	3.1 d	6.0 a	3.3 ab	3.8 d
	Insecticide alone	8.3 b	3.1 b	41.7 a	9.0 ab	53.0 a	24.0 a	11.5 b
	Untreated control	20.0 a	7.5 a	65.0 a	11.9 a	23.3 a	9.3 ab	19.8 a
NK Stella	Tebuconazole + insecticide	6.7 b	2.6 b	20.0 b	2.9 d	56.7 a	13.3 a	0.2 c
	Tetraconazole + insecticide	5.0 bc	2.0 bc	25.0 b	3.8 cd	33.4 a	14.3 a	0.9 c
	Prochloraz/cyproconazole + insecticide	8.3 b	2.6 b	25.0 b	4.5 cd	12.3 a	9.0 a	5.6 b
	Insecticide alone	8.3 b	2.4 b	30.0 ab	9.2 ab	46.7 a	17.0 a	7.2 b
	Untreated control	20.0 a	6.1 a	65.6 a	15.2 a	36.3 a	13.0 a	11.9 a

^a The insect damage incidence (IDI) (%) was calculated as the percentage of ears per plot with injuries due to larvae insect activity on fifty ears per plot.

^b Insect damage severity (IDS) (%) based on a 1–7 insect damage severity rating scale used for the estimation of the percentage of kernels damaged due the larvae as follows: 1 = 0%, 2 = 1–3%, 3 = 4–10%, 4 = 11–25%, 5 = 26–50%, 6 = 51–75%, and 7 > 75% of kernels with visible injuries.

^c Fusarium ear rot (FER) incidence (%) was calculated as the percentage of ears per plot with visible symptoms of the disease on fifty ears per plot.

^d Fusarium ear rot (FER) severity (IMcK) based on a 1–7 class disease severity rating scale used for the estimation of the percentage of kernels visibly damaged or discolored as follows: 1 = 0%, 2 = 1–3%, 3 = 4–10%, 4 = 11–25%, 5 = 26–50%, 6 = 51–75%, and 7 > 75% of kernels with visible symptoms of infection such as rot and mycelia growth.

^e Kernel fumonisin contamination (sum of FB₁, FB₂ and FB₃), expressed as µg of mycotoxins per gram of kernels.

^f Means in each column and for each maize hybrid, followed by the same letter, are not significantly different at a probability level of 0.05 according to Tukey's test. The reported FER incidence and severity, IDI and IDS means were transformed into Bliss angular values before their use in statistical analysis.

AZIONE DI RISPOSTA

- Prevenzione e controllo nei mangimi completi

Strategie di controllo : riduzione della contaminazione da micotossine nelle materie prime

Post-raccolto

Selezione

Pulizia

Aflatossine ridotte nel mais del 71-92%

Fumonisine ridotte nel mais del 26-69%

Deossinivalenolo ridotto nel frumento del 5-19%

Macinazione

Ridistribuzione delle micotossine con concentrazione in frazioni della molitura (germe e crusca)

Processi termici

Cottura ordinaria, frittura, cottura al forno, torrefazione possono ridurre la concentrazione, ma non praticabili per le materie prime per mangimi

Abbattimento del tenore di AFB₁ nella granella di mais : sperimentazione di un processo meccanico a basso costo

Limite massimo ammesso = 20 ppb per tutte le materie prime per mangimi

> 20 ppb destinato a distruzione

data	silos	campione	granella prima della vagliatura (ppb)	granella dopo la vagliatura (ppb)	differenza ▲	spezzato (ppb)	differenza ▲
4/11/2003	10	1	23,00	1,90	-91,74%	n.r.	n.r.
4/11/2003	10	2	12,00	1,00	-91,67%	n.r.	n.r.
4/11/2003	10	3	17,00	6,70	-60,59%	n.r.	n.r.
4/11/2003	10	4	15,00	3,00	-80,00%	n.r.	n.r.
4/11/2003	10	5	22,00	6,00	-72,73%	n.r.	n.r.
		media	17,80	3,78	-78,76%	n.r.	n.r.
10/11/2003	5	1	5,50	3,40	-38,18%	16,00	190,91%
10/11/2003	5	2	4,60	2,10	-54,35%	18,00	291,30%
10/11/2003	5	3	13,40	5,80	-56,72%	11,80	-11,94%
10/11/2003	5	4	4,60	1,90	-58,70%	13,20	186,96%
10/11/2003	5	5	4,90	2,80	-42,86%	5,10	4,08%
10/11/2003	5	6	7,10	3,30	-53,52%	64,00	801,41%
10/11/2003	5	7	6,40	2,30	-64,06%	12,60	96,88%
10/11/2003	5	8	5,80	3,10	-46,55%	21,10	263,79%
10/11/2003	5	9	7,90	3,30	-58,23%	20,50	159,49%
10/11/2003	5	10	4,60	1,60	-65,22%	8,30	80,43%
10/11/2003	5	11	6,30	2,20	-65,08%	6,02	-4,44%
10/11/2003	5	12	7,11	3,01	-57,67%	10,20	43,46%
10/11/2003	5	13	8,10	2,84	-65,93%	17,55	170,96%
		media	6,48	2,84	-56,13%	17,55	170,96%

Distribuzione di Aflatossine e Zearalenone nelle frazioni della lavorazione del mais

Tabella 1 e 2. Livelli medi e fattori di distribuzione di AFB₁, AFB₂ e ZON nel processo industriale di macinatura a secco del mais

Mais convenzionale	aflatoxin B ₁		aflatoxin B ₂		zearalenone	
	material	$\mu\text{g/kg} \pm \text{SD}$	distribution factor (%)	$\mu\text{g/kg} \pm \text{SD}$	$\mu\text{g/kg} \pm \text{SD}$	distribution factor (%)
corn grain	0.93 ± 0.02	100	0.15 ± 0.01	89.6 ± 0.1	100	
germ	3.15 ± 0.26	339	0.28 ± 0.04	214.4 ± 1.3	239	
bran	5.06 ± 0.14	544	0.67 ± 0.01	271.5 ± 6.5	303	
coarse grit	0.51 ± 0.03	55	<LOQ	13.3 ± 0.8	15	
fine grit	0.21 ± 0.01	23	<LOQ	13.4 ± 0.1	15	
flour	0.20 ± 0.01	22	<LOQ	10.4 ± 0.1	12	
corn meal for feeds	3.28 ± 0.08	353	0.35 ± 0.01	314.5 ± 1.3	351	
polenta (paiolo)	<LOQ ^a		<LOQ ^b	<LOQ ^c		
polenta (pressure cooker)	<LOQ		<LOQ	<LOQ		

Mais biologico	aflatoxin B ₁		aflatoxin B ₂	aflatoxin G ₁	zearalenone	
	material	mean ± SD ($\mu\text{g/kg}$)	distribution factor (%)	mean ± SD ($\mu\text{g/kg}$)	mean ± SD ($\mu\text{g/kg}$)	distribution factor (%)
corn grain	2.83 ± 0.01	100	<LOQ ^b	0.38 ± 0.01	9.8 ± 0.7	100
germ	10.58 ± 0.18	374	0.67 ± 0.01	0.36 ± 0.01	30.8 ± 1.5	314
bran	25.78 ± 3.11	911	1.96 ± 0.01	1.85 ± 0.15	39.5 ± 1.8	403
coarse grit	1.42 ± 0.01	50	<LOQ	<LOQ ^c	<LOQ ^d	
fine grit	0.81 ± 0.01	29	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
flour	0.69 ± 0.01	24	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
corn meal for feeds	21.21 ± 1.84	750	0.87 ± 0.01	0.91 ± 0.01	41.6 ± 0.6	424
polenta (paiolo)	<LOQ ^a		<LOQ	<LOQ	<LOQ	
polenta (pressure cooker)	0.16 ± 0.01	6	<LOQ	<LOQ	<LOQ	

^aLOQ = 0.15 $\mu\text{g/kg}$. ^bLOQ = 0.15 $\mu\text{g/kg}$. ^cLOQ = 0.15 $\mu\text{g/kg}$. ^dLOQ = 9.0 $\mu\text{g/kg}$.



AZIONE DI RISPOSTA

- Prevenzione e controllo nei mangimi completi

Strategie di controllo : riduzione della contaminazione da micotossine nelle materie prime

Processo di fiocatura

- Aflatossine ridotte del 64-67% con cottura dei fiocchi con e senza zuccheri
- Ocratossine ridotte durante la fiocatura
- Fumonisine ridotte del 30-40%

Estrusione a 70-170°C per 2-5 min

- Fumonisine ridotte del 30%
- Aflatossine ridotte del 50-80%
- Zearalenone ridotto del 65-77%

AZIONE DI RISPOSTA

- Diminuire la biodisponibilità delle micotossine mediante assorbimento e o detossificazione

Reg. n°386/2009 modifica del Reg. n°1831/2003 nuovo gruppo funzionale di additivi per mangimi

«m) **sostanze per la riduzione della contaminazione dei mangimi dalle micotossine**: sostanze che possano inibire o ridurre l'assorbimento delle micotossine, promuoverne l'escrezione o modificarne la modalità di agire.»

A oggi, nell'ultima Edizione 131 del 12/12/2011 del Registro degli Additivi, alla lettera m) degli additivi tecnologici 1) non è presente alcun additivo registrato.

AZIONE DI RISPOSTA

- Diminuire la biodisponibilità delle micotossine mediante assorbimento e o detossificazione

In dipendenza del loro modo d'azione,
questi additivi per mangimi possono agire

- Riducendo la biodisponibilità delle micotossine ([agenti assorbenti](#)).
- Degradando o trasformando le micotossine in metaboliti meno tossici o del tutto inerti ([agenti biotrasformanti](#)).

AZIONE DI RISPOSTA

- Diminuire la biodisponibilità delle micotossine mediante assorbimento e o detossificazione

Gli **agenti sequestranti** e/o **leganti le micotossine** riducono l'assorbimento delle micotossine e la successiva distribuzione col sangue agli organi bersaglio, e riducono gli effetti delle stesse nel lume intestinale.

Gli **assorbenti** sono efficaci solo se creano con le micotossine un complesso stabile in tutto il tratto digestivo che permetta di espellere le micotossine legate con le feci.

L'efficacia differisce considerevolmente dipendendo dalle caratteristiche chimico-fisiche sia dell'assorbente che delle micotossine.

L'effetto è dose-dipendente

Non devono essere tossici

LEGANTI MINERALI E VEGETALI

Non tossici (??)

I Leganti Minerali hanno alto potere di assorbimento per metalli pesanti

Dir. N°32/2002 sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali

- **Arsenico**

materie prime per mangimi	2 ppm
calcio carbonato	15 ppm
fosfati e alghe marine calcaree	10 ppm
ossido di zinco	100 ppm
mangimi completi	2 ppm
mangimi complementari	4 ppm
mangimi minerali	12 ppm

LEGANTI MINERALI E VEGETALI

Dir. N°32/2002 sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali

- **Piombo**

Materie prime per mangimi	10 ppm
Fosfati ed alghe marine calcaree	15 ppm
Calcio carbonato	20 ppm
Ossido di zinco	400 ppm
Lieviti	5 ppm
Additivi leganti	30 ppm
Clinoptilolite di origine vulcanica	60 ppm
Premiscele	200 ppm
Mangimi completi	5 ppm
Mangimi complementari	10 ppm
Mangimi minerali	15 ppm

LEGANTI MINERALI E VEGETALI

Dir. N°32/2002 sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali

- **Cadmio**

Materie prime vegetali	1 ppm
Fosfati	10 ppm
Ossido di zinco	30 ppm
Additivi leganti	2 ppm
Premiscele	15 ppm
Mangimi completi	1 ppm
Mangimi complementari	0,5 ppm
Mangimi minerali	5 ppm



AZIONE DI RISPOSTA

- agenti sequestranti

Gli agenti assorbenti le micotossine sono composti ad alto peso molecolare, solitamente a struttura cristallina tridimensionale, che catturano le tossine sulla superficie esterna o negli spazi interlaminari.

- **Alluminosilicati**
 1. **Bentonite-montmorillonite** (E558), del gruppo dei fillosilicati
 2. **Zeoliti** (clinoptilolite di origine vulcanica E567, clinoptilolite di origine sedimentaria E568), alluminosilicati idrati di cationi alcalini (Na^+ , Ca^{++} , K^+)
 3. **HSCAS** – alluminosilicati idrati di Ca e Na (Calcio alluminosilicato sintetico E552, Sodio alluminosilicato sintetico E554)
- **Altri silicati**
 1. **Terra di diatomea** (E551c)
- **Carbone attivato** (7.1.3.1)
- **Pareti cellulari di lievito** (12.1.5)

PARETI CELLULARI DI LIEVITI

TABLE 1. Major components of *S. cerevisiae* cell walls

Component (degree of polymerization)	Mean molecular mass (kDa)	% of wall mass	Relative molar ratio
β 1,3 glucan (1,500)	240	50	1.0
β 1,6 glucan (150)	24	10	2
Mannoprotein	100–200	40	1.2–2.4
Chitin (120)	25	1–3	0.1–0.3

GLUCANI

β -1,3-glucani formano una rete fibrosa nello strato interno della parete. Sono per la maggior parte a conformazione ad elica

β -1,6-glucani sono polisaccaridi altamente ramificati, che legano i componenti di ogni modulo insieme

CHITINA, polisaccaride della N-acetil-D-glucos-2-ammina, legate con legame **β -1,4** (lo stesso del glucosio che forma la cellulosa)

PARETI CELLULARI DI LIEVITI

MANNANOPROTEINE

Le **mannanoproteine** della parete del lievito sono polipeptidi altamente glicosilati.

MANNANOLIGOSACCARIDI (MOS)

Si estraggono dalla parete cellulare del lievito.

Hanno una dimostrata capacità di promotore di crescita per l'effetto prebiotico del mannano.

Non è dimostrata la capacità di legame alle micotossine da parte di questa componente.

L'attività di legame di alcune micotossine (ZON) è associata alla organizzazione reticolare dei β -D-glucani e alla distribuzione tra β -(1,3)-D-glucani e β -(1,6)-D-glucani gioca una maggior ruolo nell'efficacia.

L'interazione chimica è più di tipo «assorbimento» che di «legame covalente»

L'affinità di assorbimento è diversa tra parete cellulare intera e parete cellulare processata.

La presenza di chitina che fascia le strutture della parete cellulare limita l'accesso delle micotossine ai siti di assorbimento dei β -D-glucani.

PARETI CELLULARI DI LIEVITI

- 30 prodotti contenuti prodotti derivati dalle pareti cellulari dei lieviti in esame.
- Test di assorbimento a pH 3 (tampono citrato) e pH 6,5 (tampono fosfato) e in vero succo gastrico di suino (pH = 5), con 0,2 mg/l AFB₁ e 0,5 mg/l ZON, 0,2% (w/v) di sequestrante.

Percentuale di assorbimento calcolata dividendo la differenza delle concentrazioni nella soluzione di riferimento senza sequestrante (massima concentrazione) e nella soluzione in esame dopo assorbimento per la concentrazione nella soluzione di riferimento e moltiplicando per 100.

- Test di chemisorbimento a pH 6,5 (tampono fosfato) con 0,2 mg/l AFB₁ e 0,5 mg/l ZON, 0,5% (w/v) di sequestrante.

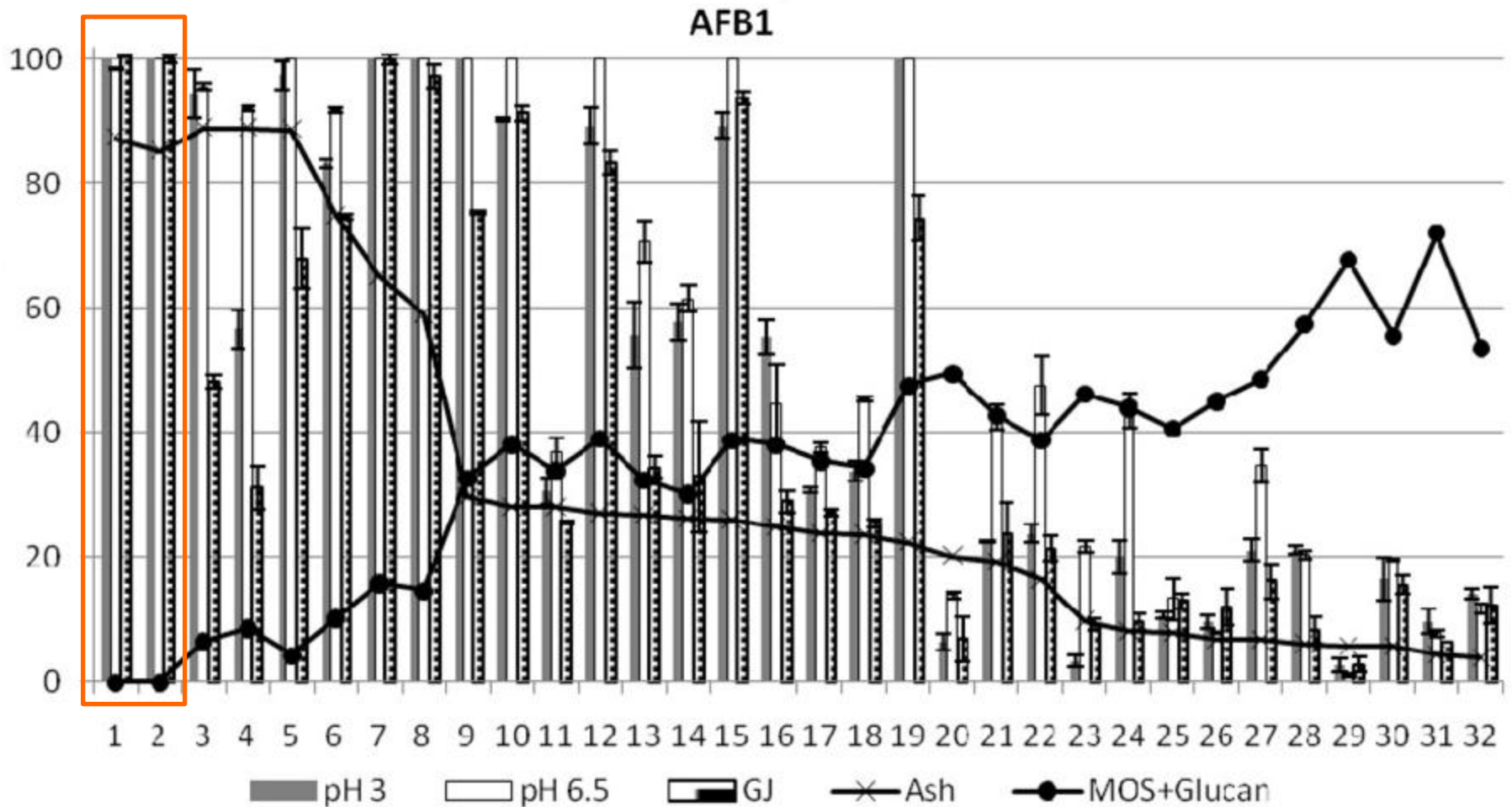
Indice di chemisorbimento (C_α) calcolato dividendo la differenza delle tossine assorbite il test di assorbimento e le tossine disassorbite durante le fasi di disassorbimento per la quantità totale delle tossine usate nella prova di assorbimento. La percentuale è stata determinata dividendo la quantità di tossina disassorbita per la quantità di tossina originariamente assorbita e moltiplicando per 100.

- Comparati con bentonite e HSCAS di riferimento

PARETI CELLULARI DI LIEVITI

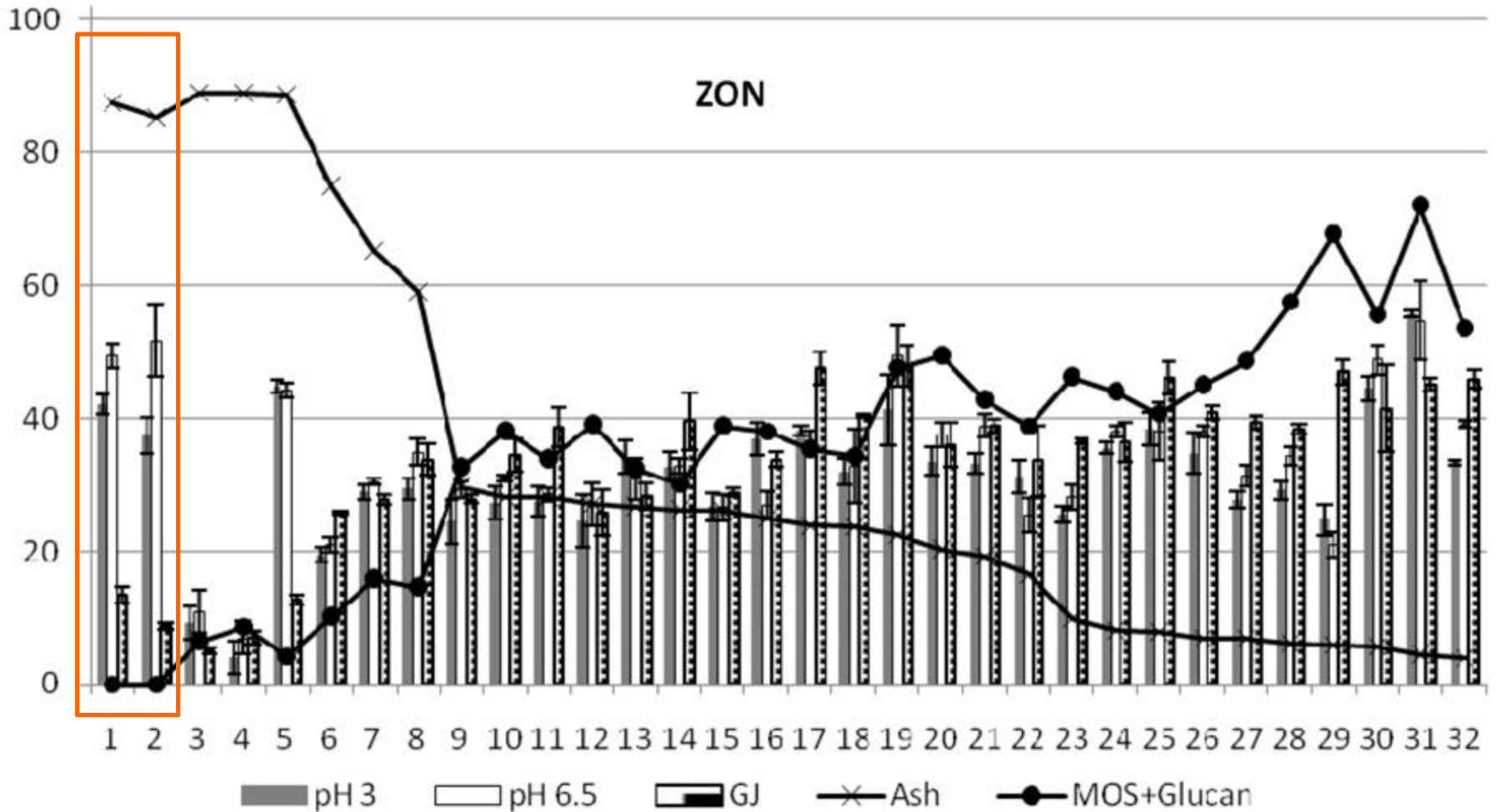
30 prodotti commerciali	Ceneri	β -glucani	MOS	β -glucani + MOS
<ul style="list-style-type: none"> Lieviti puri, Prodotti della parete cellulare del lievito senza sequestranti inorganici aggiunti 	< 10%	25-70	0,8-27,5%	41-71%
<ul style="list-style-type: none"> Miscele di prodotti della parete cellulare del lievito (30-50%) e di agenti leganti inorganici 	10-30%	19,7-30,5%	9-25,3%	30,1-49,5%
<ul style="list-style-type: none"> Miscele di agenti leganti inorganici e prodotti della parete cellulare del lievito (0-16%) 	> 30%	2,8-10%	1,4-6,1%	4,2-16,1%

PARETI CELLULARI DI LIEVITI

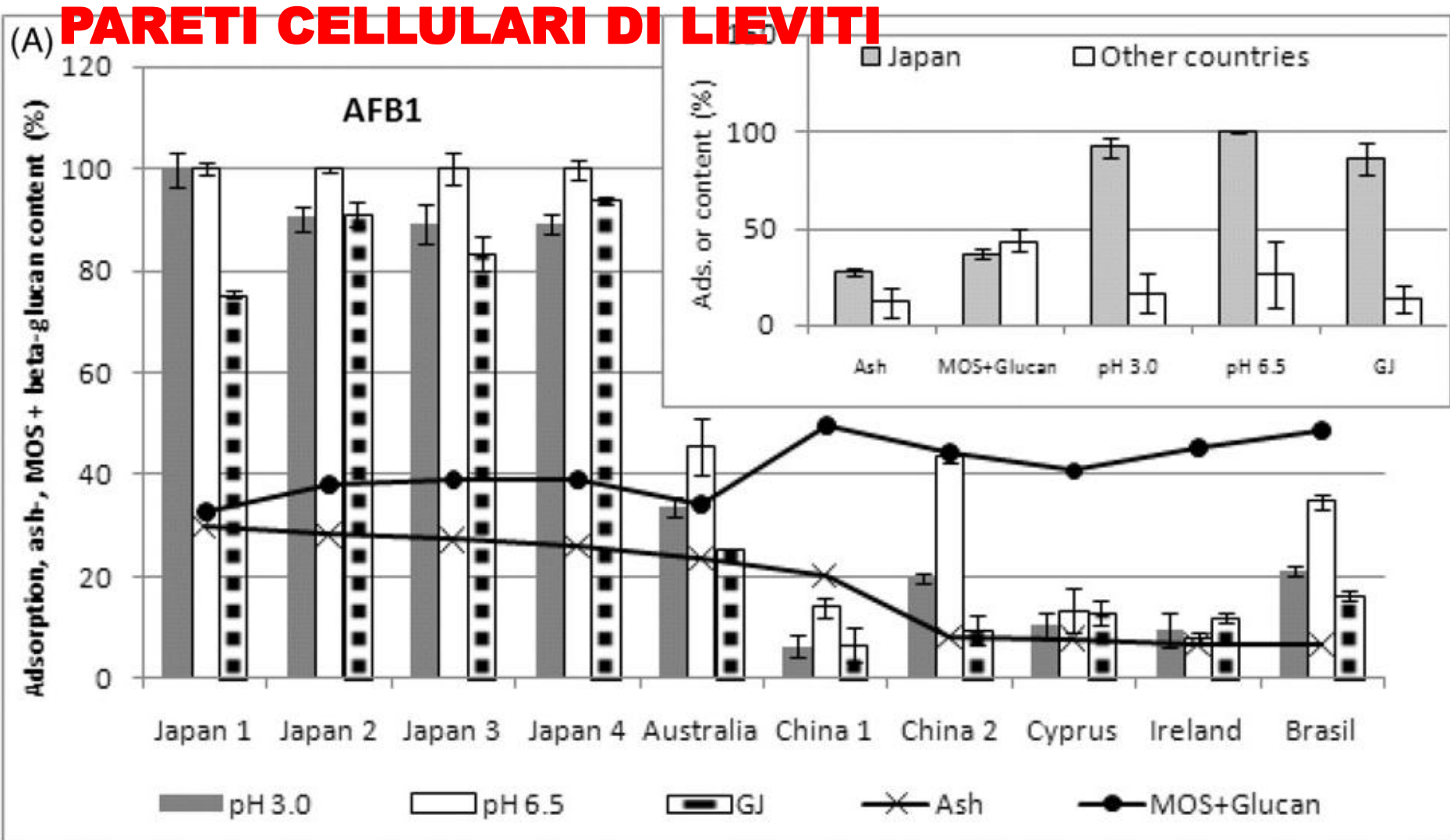


Efficienza di assorbimento, contenuto di ceneri, beta-glucani e MOS di 32 prodotti per AFB₁

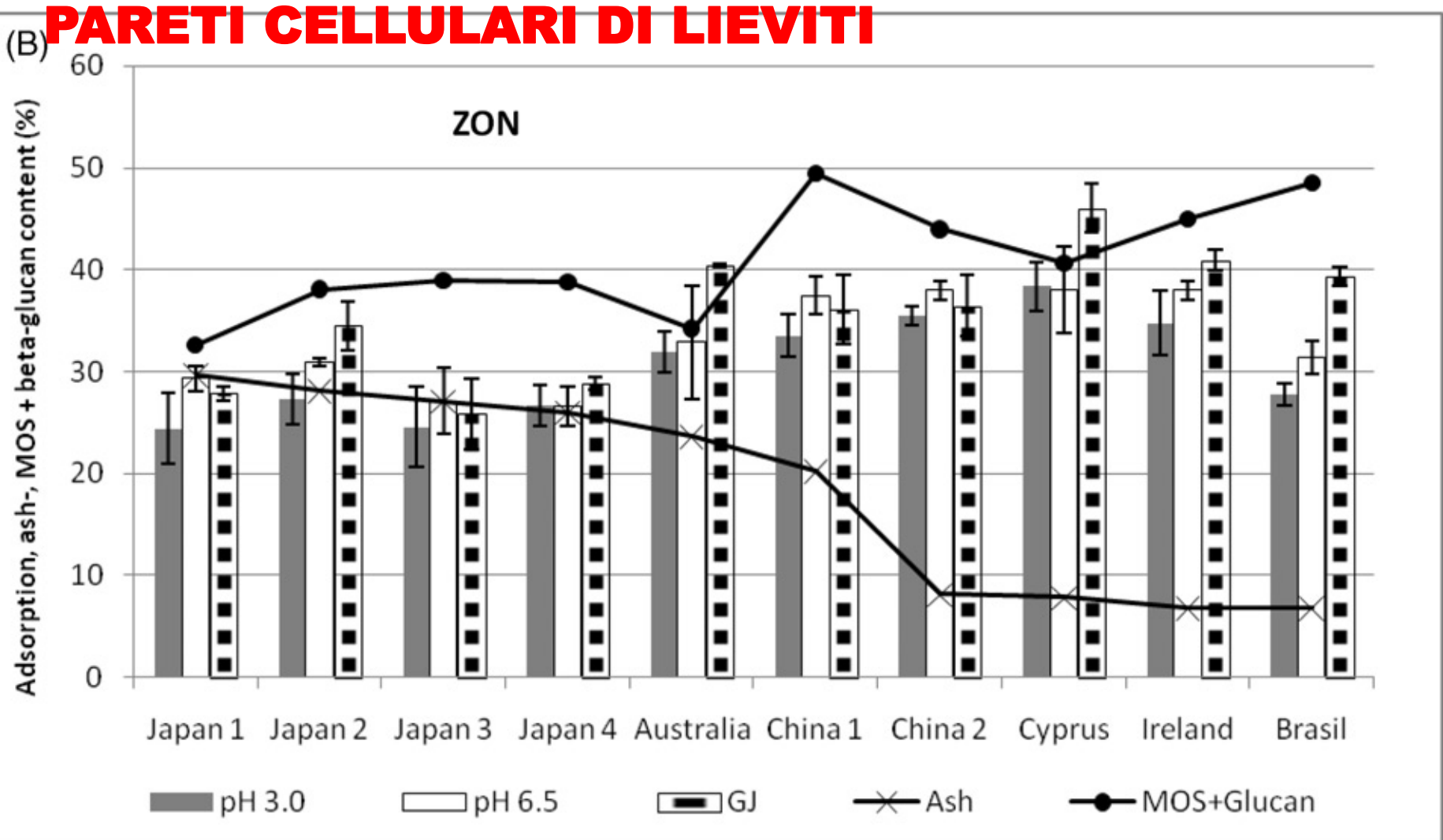
PARETI CELLULARI DI LIEVITI



Efficienza di assorbimento, contenuto di ceneri, beta-glucani e MOS di 32 prodotti per ZON

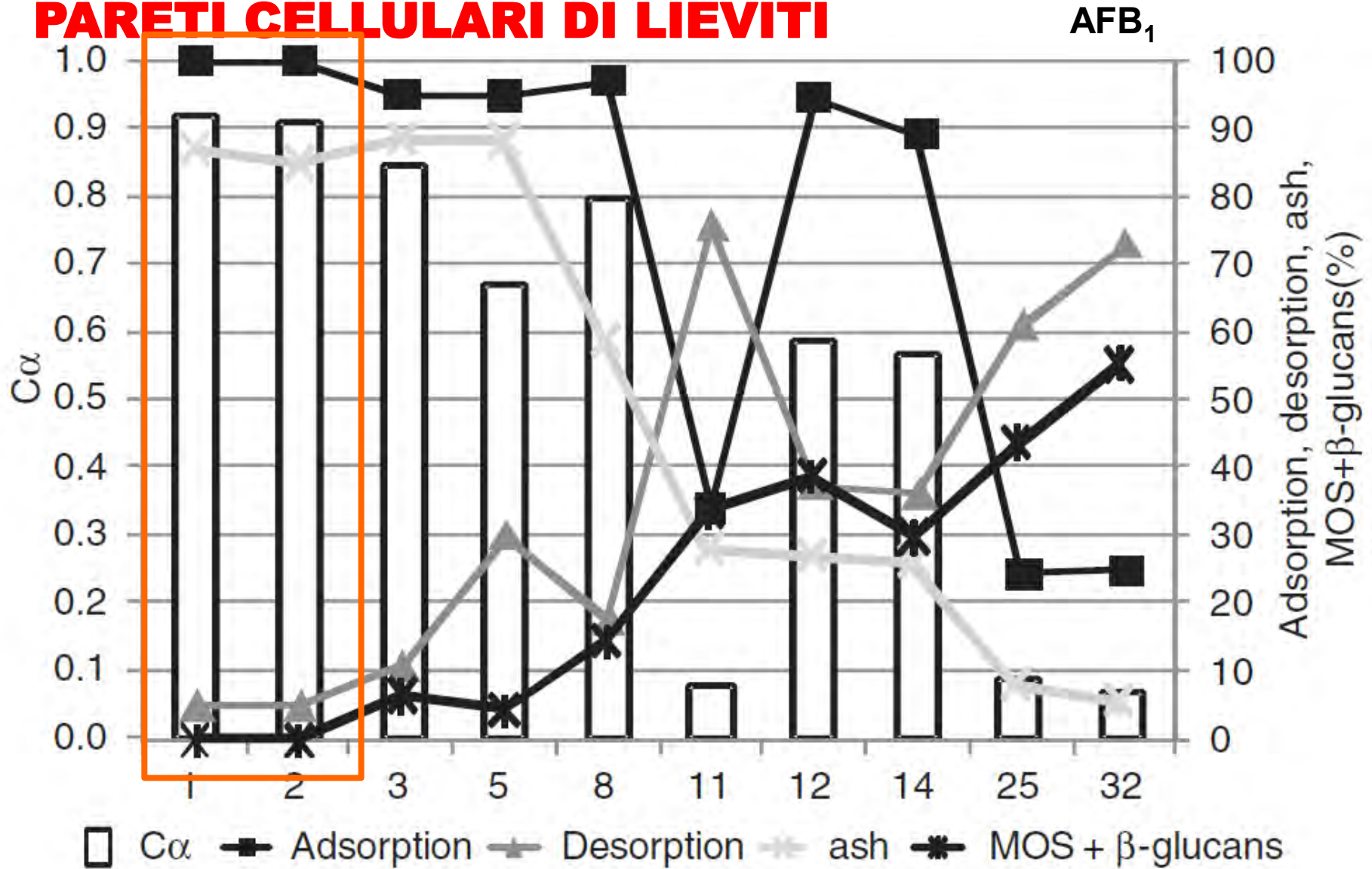


Variabilità di 10 differenti lotti di prodotto commerciale tra diversi paesi per AFB₁



Variabilità di 10 differenti lotti di prodotto commerciale tra diversi paesi per ZON

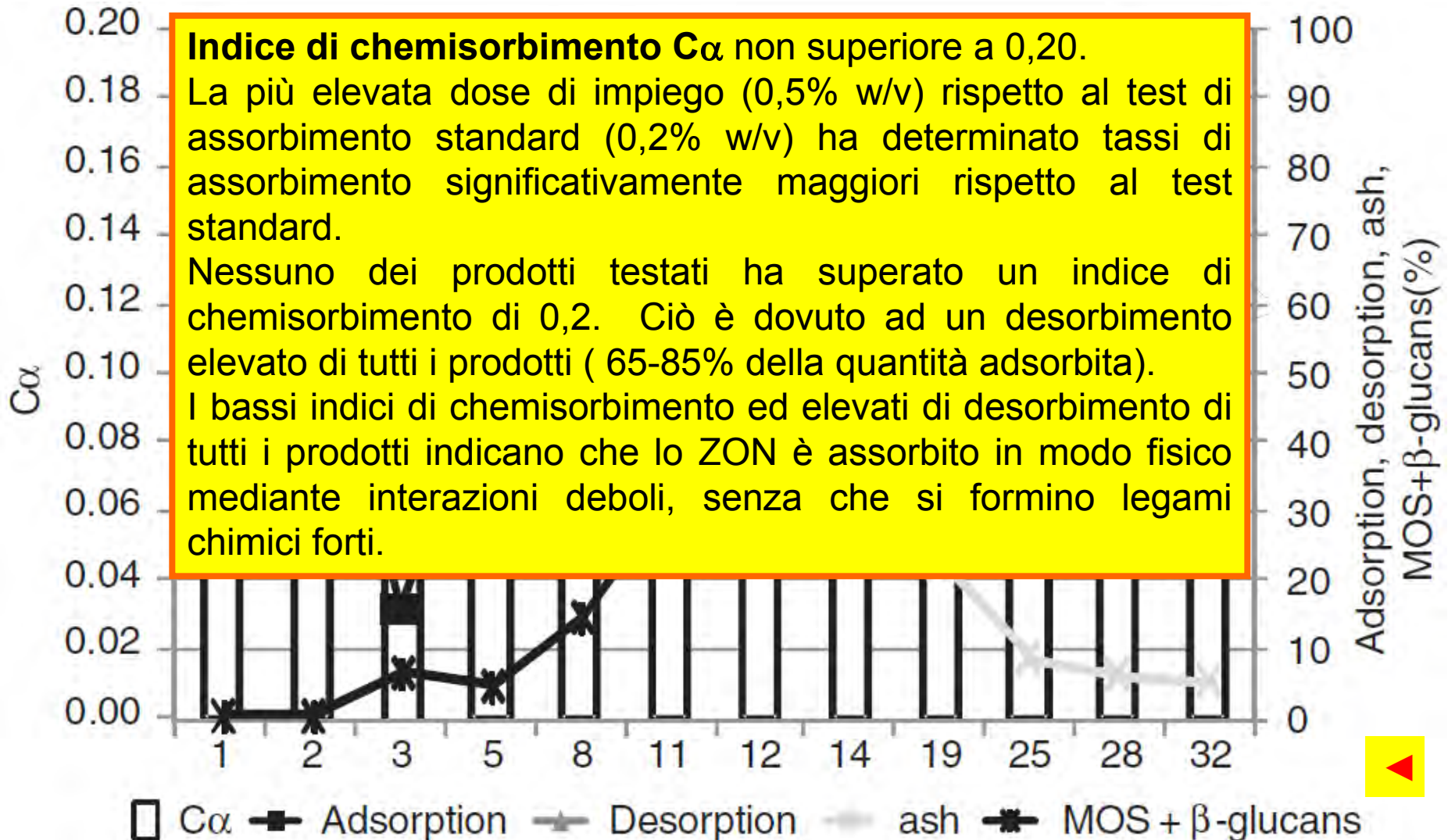
PARETI CELLULARI DI LIEVITI



PARETI CELLULARI DI LIEVITI

ZON

Indice di chemisorbimento C_{α} non superiore a 0,20.
 La più elevata dose di impiego (0,5% w/v) rispetto al test di assorbimento standard (0,2% w/v) ha determinato tassi di assorbimento significativamente maggiori rispetto al test standard.
 Nessuno dei prodotti testati ha superato un indice di chemisorbimento di 0,2. Ciò è dovuto ad un desorbimento elevato di tutti i prodotti (65-85% della quantità adsorbita).
 I bassi indici di chemisorbimento ed elevati di desorbimento di tutti i prodotti indicano che lo ZON è assorbito in modo fisico mediante interazioni deboli, senza che si formino legami chimici forti.



AZIONE DI RISPOSTA

- Diminuire la biodisponibilità delle micotossine mediante assorbimento

Modalità di valutazione dell'efficacia delle sostanze assorbenti:

- **Test di assorbimento *in vitro* in succo gastrico**
Le prove in matrice complessa (enzimi, e altre sostanze) evidenziano di solito assorbimento inferiore delle micotossine rispetto ai dati dei test in soluzioni acquose
- **Test di assorbimento isotermico**
Eseguiti con diverse combinazioni di concentrazioni di sequestrante e di micotossine, per definire una isoterma di sequestro e una capacità massima di sequestro
- **Test di assorbimento *in vivo***
 1. Aflatossine (avicoli, vacche da latte)

AZIONE DI RISPOSTA

- Criteri per la scelta degli assorbenti

Modalità di valutazione dell'efficacia di sostanze assorbenti:

- **Test di assorbimento *in vitro* convenzionali**
 1. a pH acido (3, tampone citrato)
 2. a pH neutro (6,5 tampone fosfato)

Eseguiti con concentrazioni medie di sequestrante e micotossine
- **Test di assorbimento *in vitro* intensificati**
 1. a diversi pH

Eseguiti con concentrazioni basse di sequestrante e alte di micotossine
- **Test di chemiassorbimento *in vitro***
 1. a diversi pH

Eseguiti con concentrazioni alte di sequestrante e di micotossine



AZIONE DI RISPOSTA

• Agenti biotrasformanti

- **Batteri**

- ✓ **Batteri gram-positivi**

1. ***Eubacterium BBSH 797***, isolato dalla popolazione cellulosolitica del ruminante del bovino.

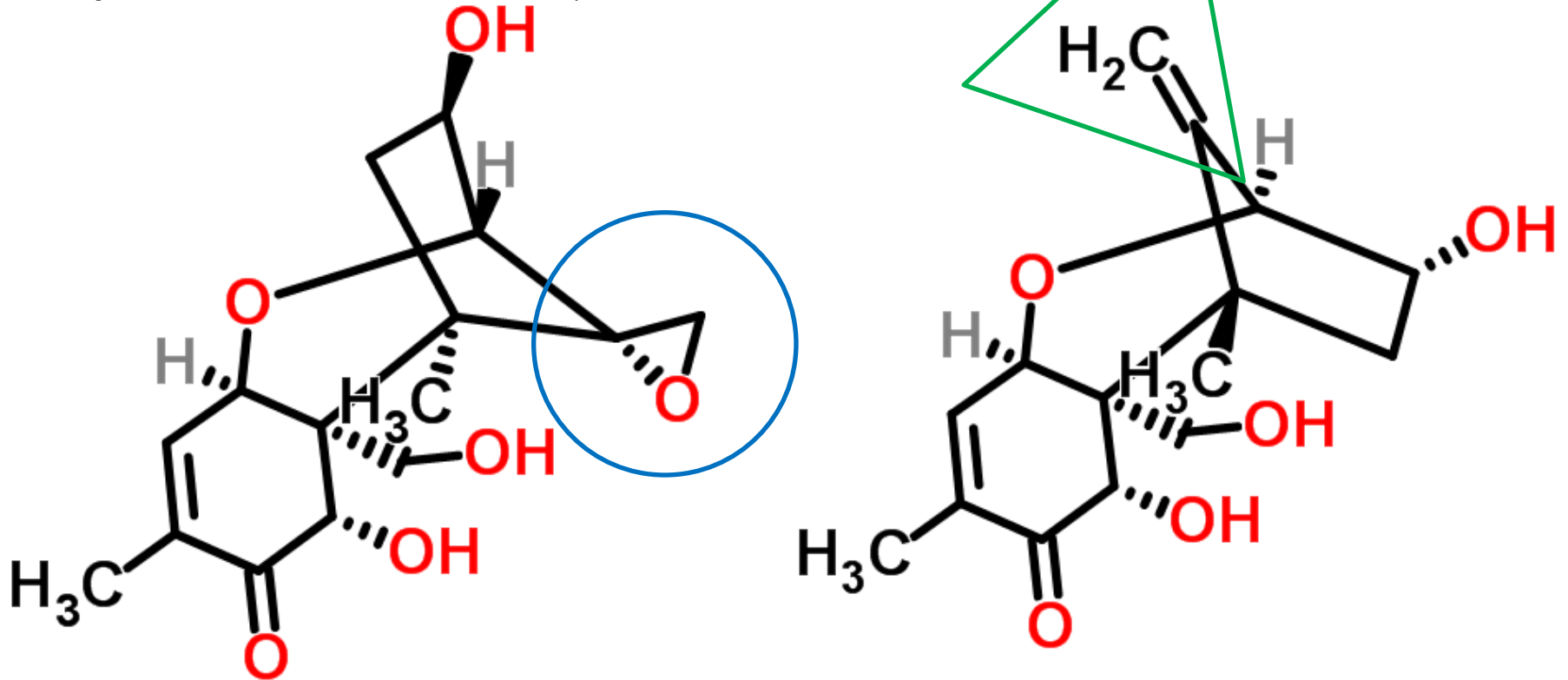
Trasforma il DON in DOM-1, metabolita 500 volte meno tossico dell'originale. L'enzima *de-epossidasi* agisce anche sugli altri tricoteceni, in quanto modifica l'anello 12,13-epossidico, comune a tutti i 170 tricoteceni noti. Già adottato industrialmente

2. ***Bacillus LS100***, isolato da intestino di pollo, trasforma il DON in DOM-1.

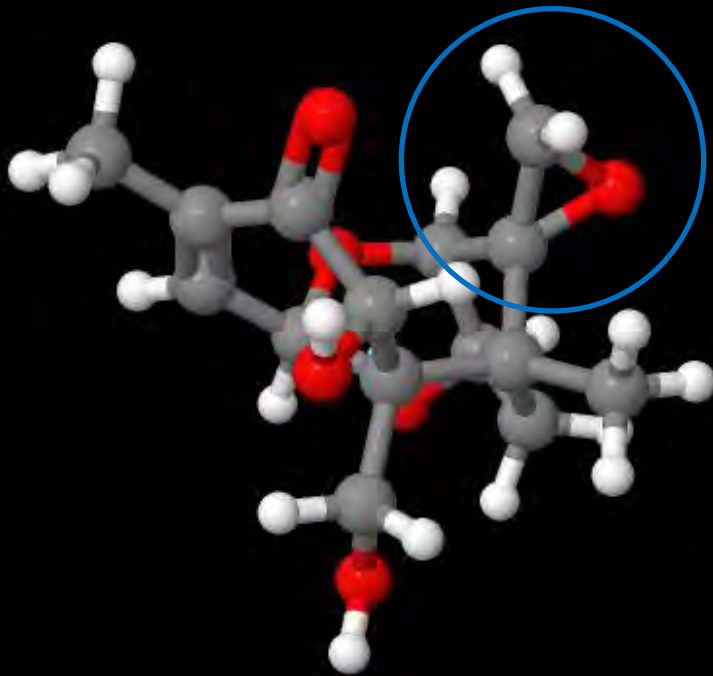
Solo a livello di ricerca (2011)

TRICOTECENI BIOTRASFORMAZIONE

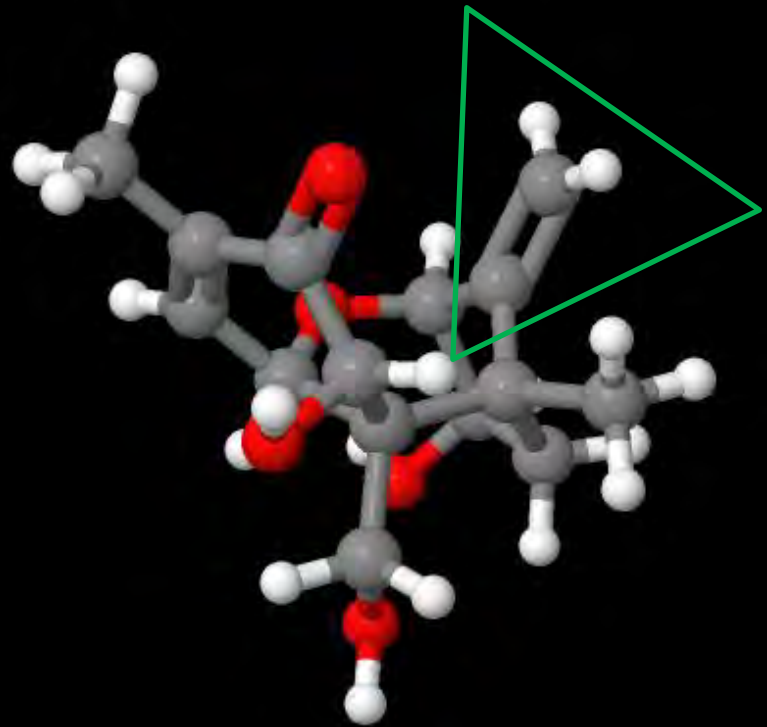
Basandosi sulla riconosciuta resistenza dei ruminanti ai tricoteceni, Binder *et al.*, (2000) furono i primi ad isolare un ceppo batterico puro dal fluido di un rumine bovino, *Eubacterium* BBSH 797. Le epossidasi di questi microrganismi furono in grado di biotrasformare il gruppo epossido dei tricoteceni (cioè **DON**, deossinivalenolo,) in un diene, convertendo in questo modo tali molecole in metaboliti non tossici (cioè **deepossi-deossinivalenolo**, **DOM-1**).



TRICOTECENI BIOTRASFORMAZIONE



Jmol



Jmol

AZIONE DI RISPOSTA

- Agenti biotrasformanti

- Batteri

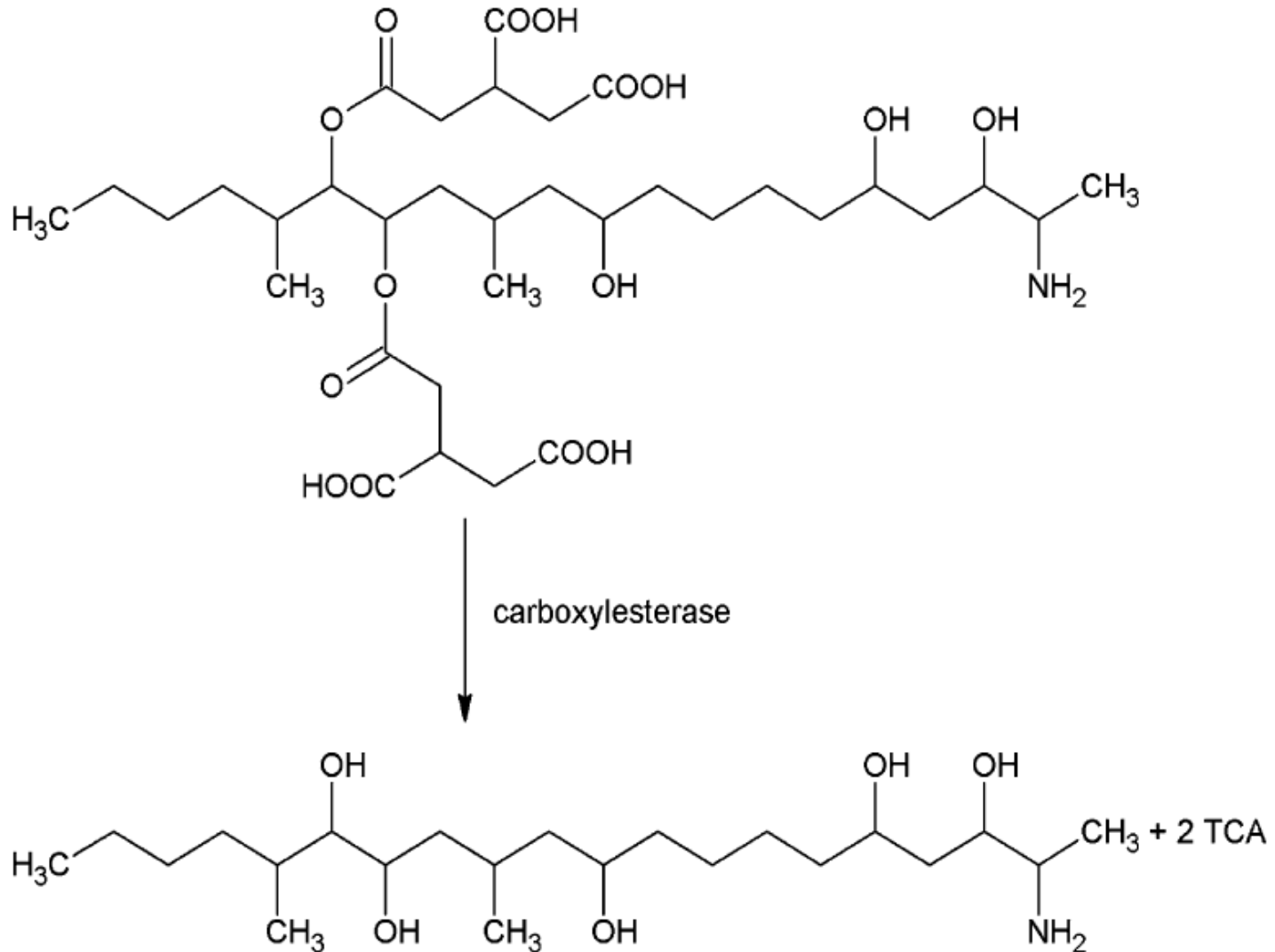
- ✓ Batteri gram-positivi

- 3. [Sphingopyxis sp. MTA144](#)

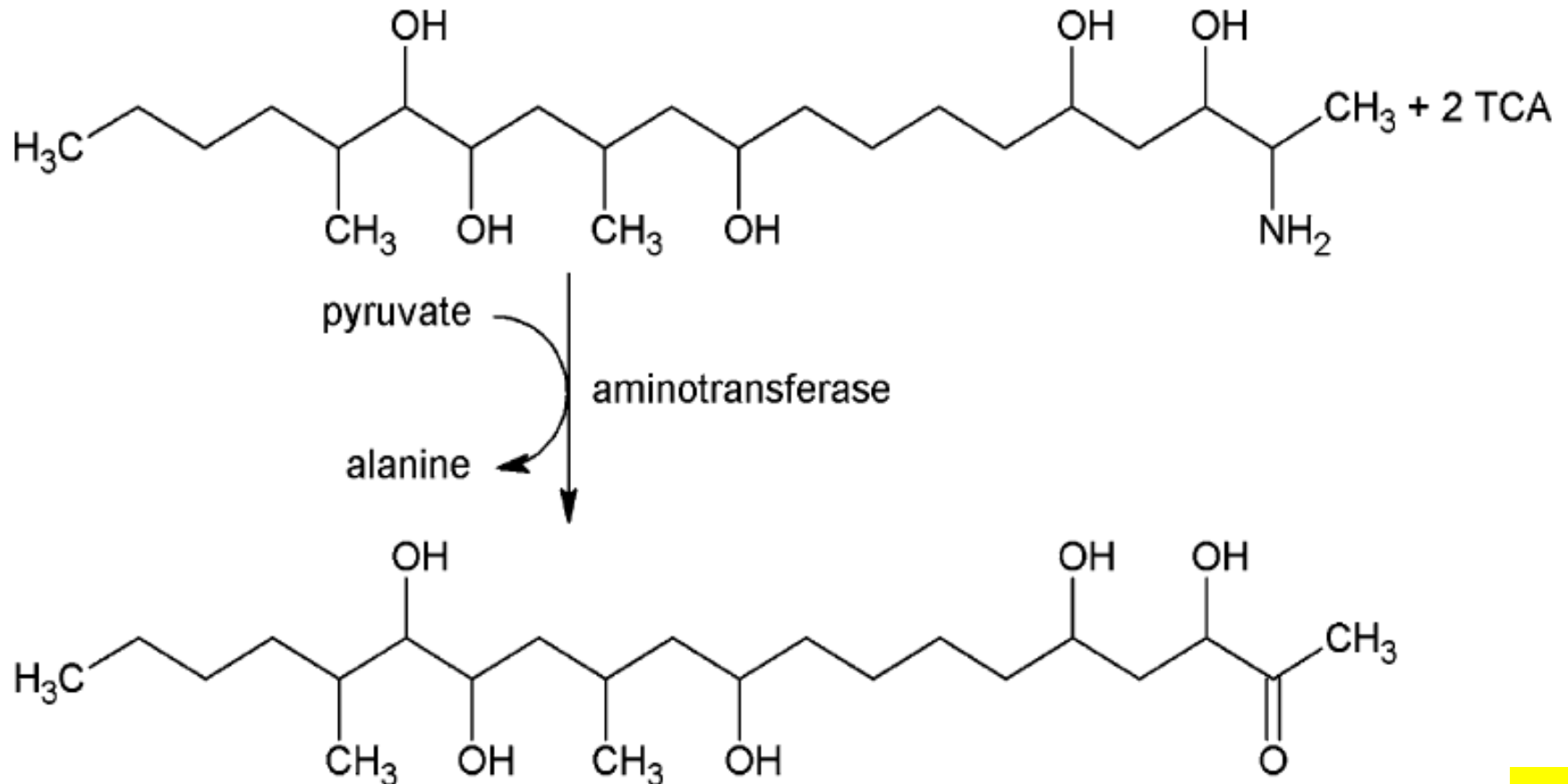
Una *carbossilipasi di tipo B* catalizza la deesterificazione della Fumosina B₁ a FB₁ idrolizzata. Una *aminotrasferasi* deamina la FB₁ idrolizzata in presenza di piruvato e piridossal-fosfato. Questa detossificazione avviene specialmente in condizioni di limitata disponibilità di ossigeno, come nei foraggi insilati e nel tratto intestinale degli animali.

Solo a livello di ricerca (2011)

Via metabolica proposta per la degradazione della FB1 da *Sphingopyxis* sp.MTA144



Via metabolica proposta per la degradazione della FB1 da *Sphingopyxis* sp.MTA144



AZIONE DI RISPOSTA

- Agenti biotrasformanti

- **Lieviti**

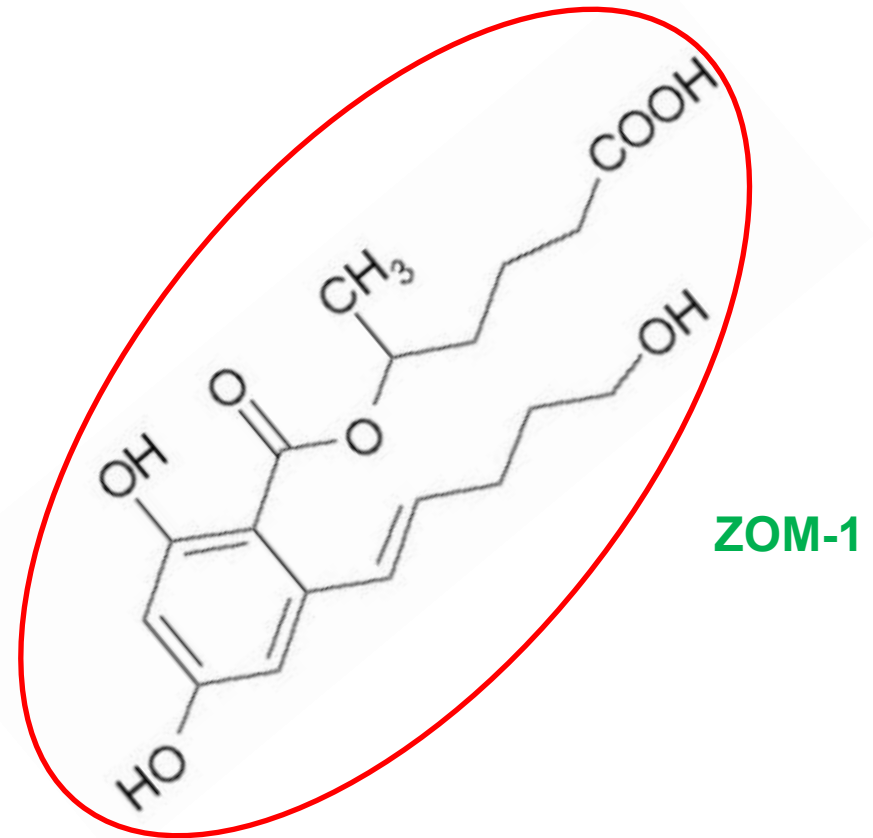
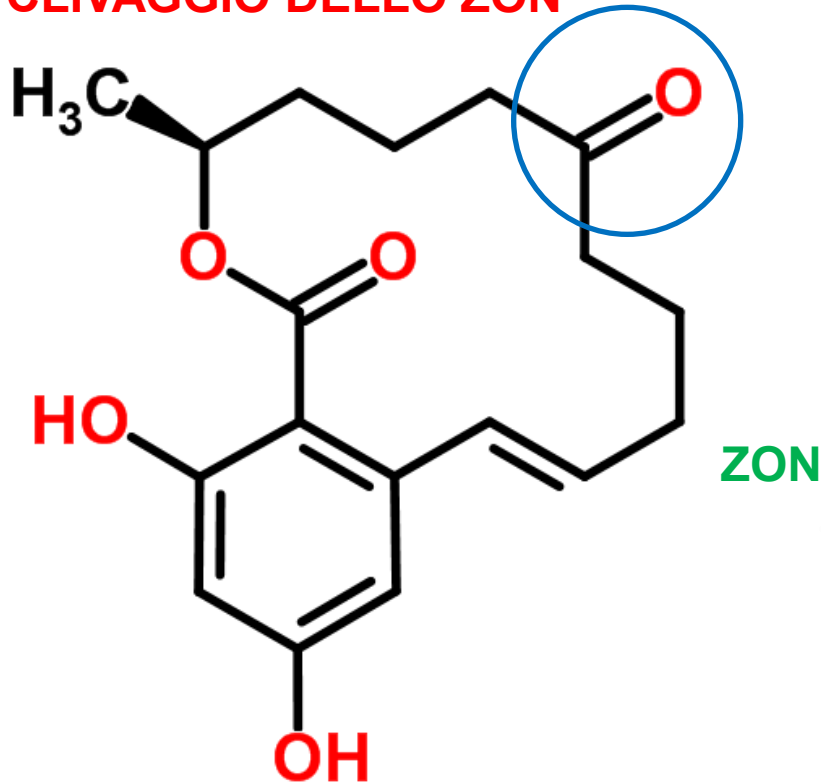
- ✓ [Trichosporon mycotoxinivorans](#)

isolato dall'intestino crasso della termite *Mastotermes darwiniensis*

Trasforma lo ZON in ZOM-1, metabolita inerte nei confronti del recettore degli estrogeni, clivando l'anello lattonico, comune allo ZON e a tutti i suoi 150 metaboliti.

Già adottato industrialmente

CLIVAGGIO DELLO ZON



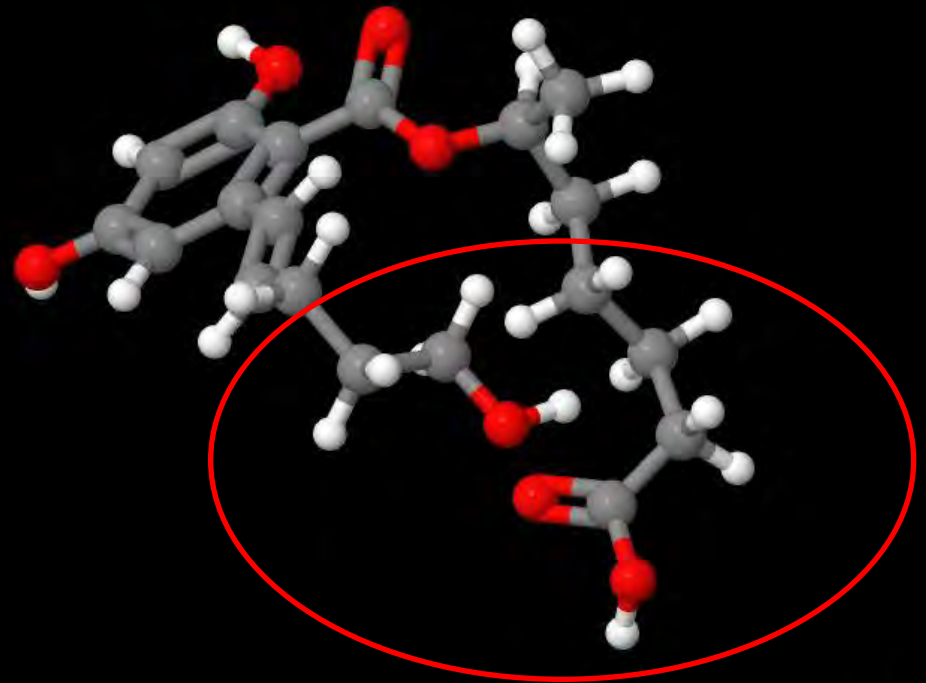
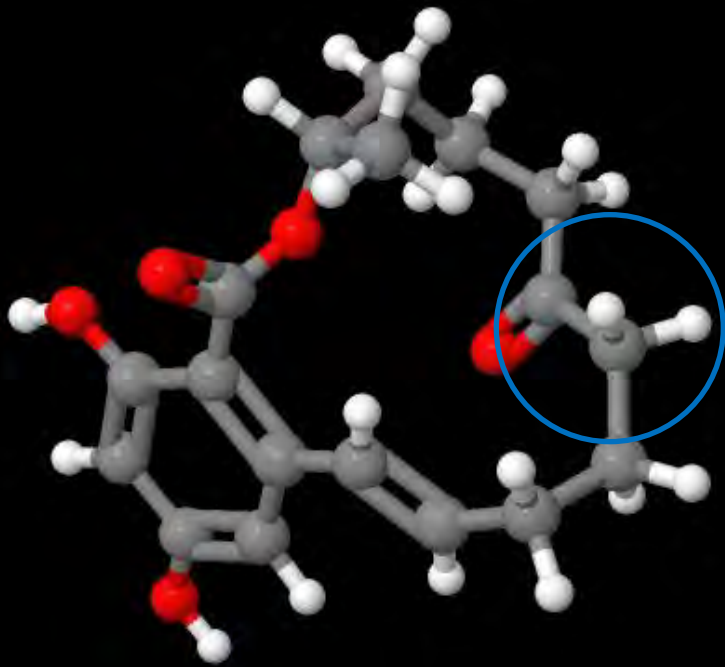
ZOM-1 = (5S)-5-({2,4-dihydroxy-6-[(1E)-5-hydroxypent-1-en-1-yl]benzoyl}oxy)hexanoic acid. La struttura di ZOM-1 è caratterizzata dall'apertura dell'anello macrociclico dello ZON al gruppo chetonico al C6'

CLIVAGGIO DELLO ZON



ZON

ZOM-1



GESTIONE DEL RISCHIO MICOTOSSINE

ANALISI

- COME, QUALI, QUANTE, QUANDO FARLE???

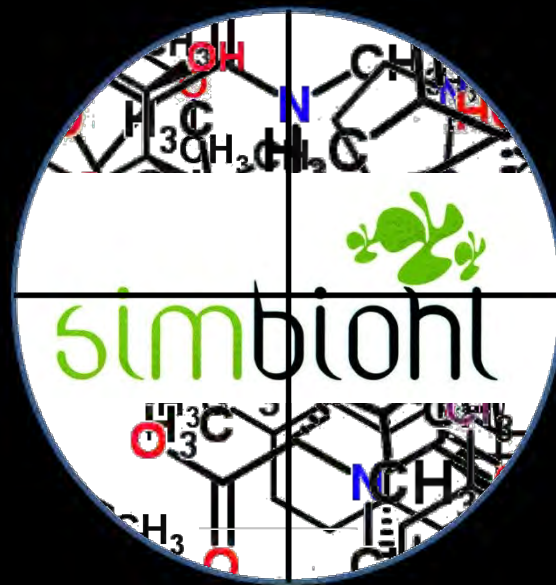
VALUTAZIONE

- SONO PRESENTI!!!

AZIONE DI RISPOSTA

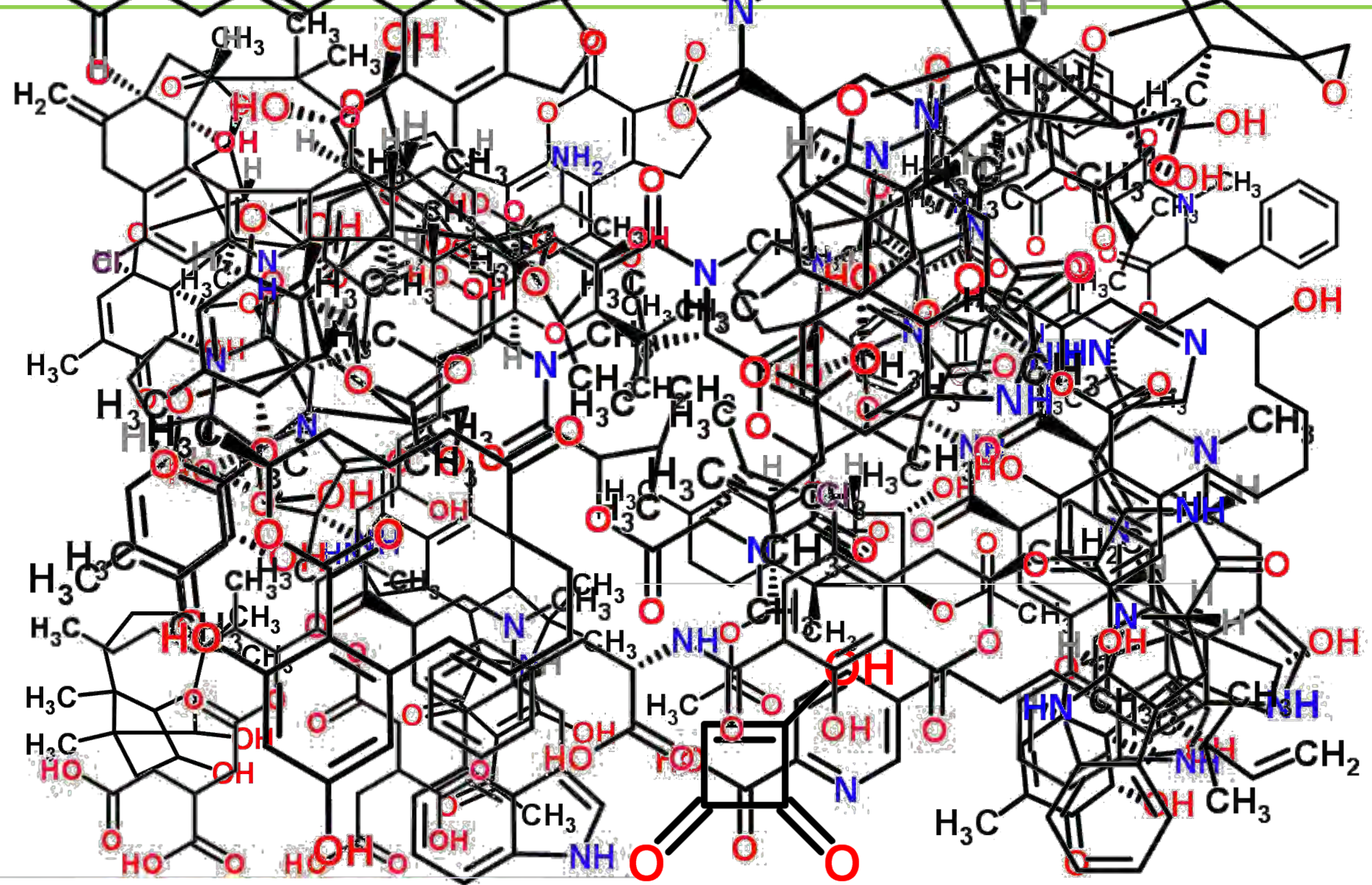
- NECESSARIA UNA PROFILASSI A TUTTI I LIVELLI

Grazie per l'attenzione



simbiont ^{CH₃}

Biomim®





MICOTOSSINE NEL SUINO

RACCOMANDAZIONI BIOMIN

Livelli di rischio	Basso (ppb)	Medio (ppb)	Alto (ppb)	Metodi di controllo
B-Tricoteceni (DON, AcDON, NIV, FusX)	< 250	250 – 1.000	> 1.000	biotrasformazione
A-Tricoteceni (Tossina T-2 e HT-2, DAS)	< 150	150 - 400	> 400	biotrasformazione
Zearalenone [scrofe, suinetti]	< 50	50 - 250	> 250	biotrasformazione
Zearalenone [magroni, grassi]	< 100	100- 250	> 250	biotrasformazione
Ocratossina A	< 80	80 - 500	> 500	captazione
Fumonisine	< 2.000	2.000 – 5.000	> 5.000	captazione
Aflatossina B ₁	< 50	50 -200	> 200	captazione
Ergot alcaloidi (diidroergosina) [scrofe, suinetti]	< 500	500 – 3.000	> 3.000	captazione
Ergot alcaloidi (diidroergosina) [magroni, grassi]	< 2.000	3.000 – 8.000	> 8.000	captazione

MICOTOSSINE NEL SUINO BIOMIN

Livelli di rischio delle micotossine	Basso (ppb)	Medio (ppb)	Alto (ppb)
B-Tricoteceni (DON, AcDON, NIV, FusX)	< 250	250 – 1.000	> 1.000
A-Tricoteceni (Tossina T-2 e HT-2, DAS)	< 150	150 - 400	> 400
Zearalenone [scrofe, suinetti]	< 50	50 - 250	> 250
Zearalenone [magroni, grassi]	< 100	100- 250	> 250
Ocratossina A	< 80	80 - 500	> 500
Aflatossina B ₁	< 50	50 -200	> 200
Fumonisine	< 2.000	2.000 – 5.000	> 5.000
Ergot alcaloidi (diidroergosina) [scrofe, suinetti]	< 500	500 – 3.000	> 3.000
Ergot alcaloidi (diidroergosina) [magroni, grassi]	< 2.000	3.000 – 8.000	> 8.000

D.Lgs n°149-2004 [Dir. 2002/32/CE, relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali, limiti massimi ammessi]

AFLATOSSINA B₁	mg/kg	µg/kg
Tutte le materie prime per mangimi	0,02 ppm	20 ppb
Mangimi completi per suini e pollame (salvo animali giovani)	0,02 ppm	20 ppb
Mangimi complementari per suini e pollame (salvo animali giovani)	0,02 ppm	20 ppb
SEGALE CORNUTA (<i>Claviceps purpurea</i>)		
Tutti i mangimi contenenti cereali non macinati	1.000 ppm	1.000.000 ppb

Racc. 2006/576/UE, sulla presenza di DON, ZEA, OTA, Tossine T-2 e HT-2 e fumonisine in prodotti destinati all'alimentazione degli animali

DEOSSINIVALENOLO (DON, Vomitossina)	mg/kg	µg/kg
Materie prime per mangimi		
- Cereali e prodotti a base di cereali fatta eccezione per sottoprodotti del granoturco	8 ppm	8.000 ppb
- Sottoprodotti del granoturco	12 ppm	12.000 ppb
Mangimi complementari e completi per suini,	0,9 ppm	900 ppb

Racc. 2006/576/UE, sulla presenza di DON, ZEA, OTA, Tossine T-2 e HT-2 e fumonisine in prodotti destinati all'alimentazione degli animali

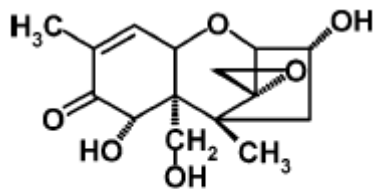
ZEARALENONE (ZON)		
Materie prime per mangimi		
- Cereali e prodotti a base di cereali fatta eccezione per sottoprodotti del granturco	2 ppm	2.000 ppb
- Sottoprodotti del granturco	3 ppm	3.000 ppb
Mangimi complementari e completi per suinetti e scrofette	0,1	100
Mangimi complementari e completi per scrofe e suini da ingrasso	0,25	250
OCRATOSSINA A (OTA)		
- Cereali e prodotti a base di cereali	0,25 ppm	250 ppb
- Mangimi complementari e completi per suini	0,05 ppm	50 ppb
FUMONISINE B₁ + B₂ (FB₁ + FB₂)		
Materie prime per mangimi		
- Granturco e prodotti derivati	60 ppm	60.000 ppb
Mangimi complementari e completi per:		
- suini, equini (Equidi), conigli e animali da compagnia	5 ppm	5.000 ppb

Micotossine mascherate o coniugate

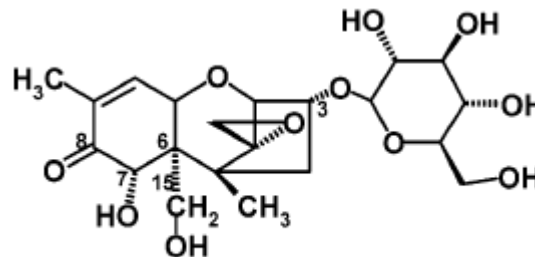
Micotossina	Tipo di mascherazione	Nome coniugato
In campo nella pianta infestata		
Zearalenone ZON	Glucoside coniugato	zearalenone-4-glucoside (Z4G)
Zearalenone ZON	degradazione	α -ZOL, β -ZOL
Deossinivalenolo	Glucoside coniugato	DON-3-glucoside , Deoxynivalenol-3-O- β -glucopyranoside (D3G), deoxynivalenol-15- β -D-glucopyranoside (DON- 15 -glucoside).
Ocratossina A	degradazione	ochratoxin α (OT α)
Ocratossina A	degradazione	(4S)-4-hydroxyochratoxin A, (4R)-4-hydroxyochratoxin A
Ocratossina A	Glucoside coniugato	b-glucoside di (4S)-4-hydroxyochratoxin A, (4R)-4-hydroxyochratoxin A

Micotossine mascherate o coniugate

Micotossina	Tipo di mascherazione	Nome coniugato
Durante i processi di lavorazione dei cereali		
Fumonisine	Decomposizione termica e/o legame con proteine, zuccheri o altri composti nella matrice dell'alimento	Coniugati della fumonisinina con proteina, zuccheri
Fumonisine	Trattamento termico con zuccheri riducenti (Reazione di Maillard) e successiva ossidazione	N-(Carboxymethyl) fumonisin B1

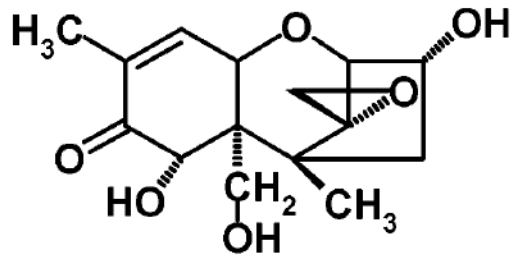


DON, MW: 296 amu

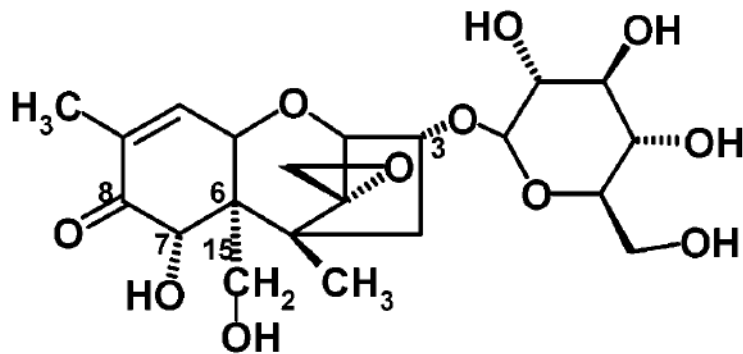


DON-3-glucoside, MW: 458 amu

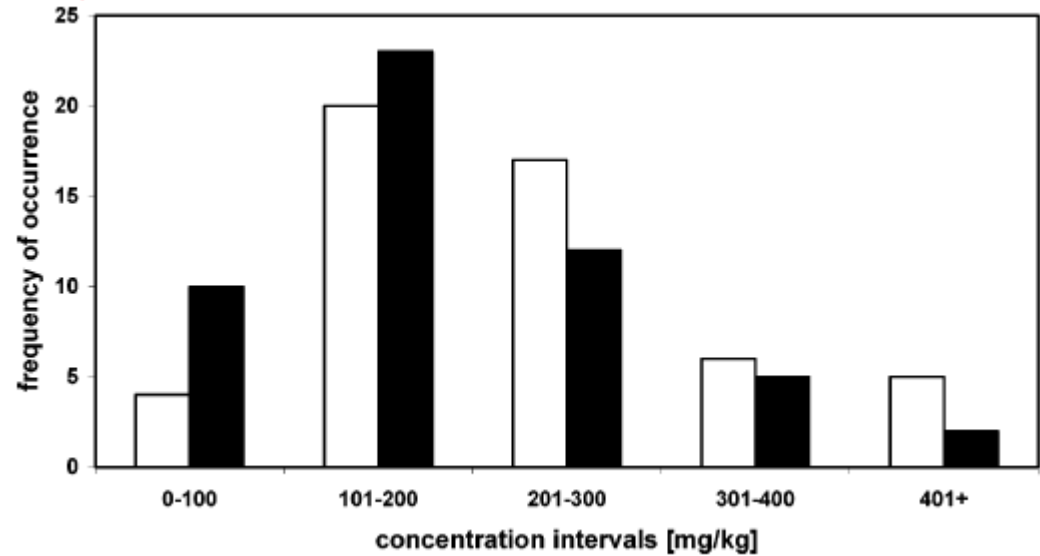
Micotossine mascherate o coniugate



DON, MW: 296 amu



DON-3-glucoside, MW: 458 amu

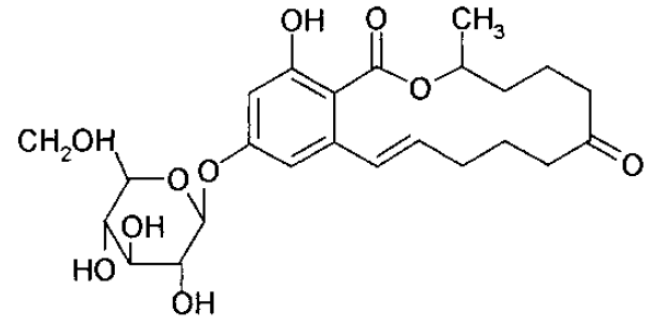


Frequenza di differenti intervalli di concentrazione di DON (barre bianche) e DON-3-glucoside (barre nere) in campioni di frumento trattati per DON. Il numero totale dei campioni è di 52.

Il rapporto DON-3-glucosidi/DON varia da 0,04 a 0,29

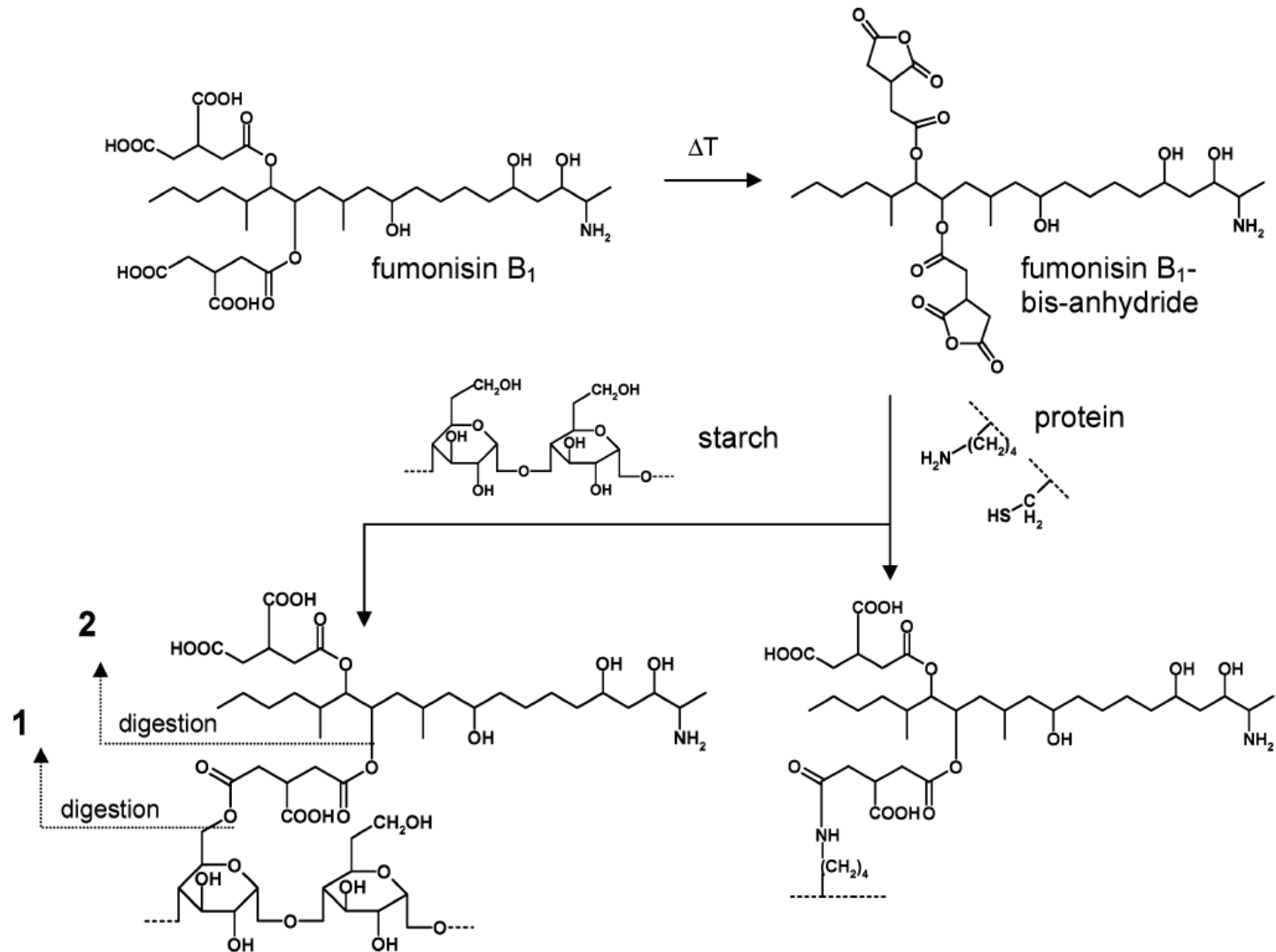
Zearalenone-4- β -D-glucupiranoside, una tossina mascherata

1. È un metabolita che si forma assieme allo ZON
2. Non viene rilevato con la metodica usuale per la ricerca di ZON mediante LC-MS
3. **Zearalenone-4- β -D-glucupiranoside** è stato determinato con livelli di 17-104 ppb nel 42% di campioni di frumento contaminati da 11-860 ppb di ZON.
4. **Zearalenone-4- β -D-glucupiranoside** può essere facilmente idrolizzato a ZON durante il processo digestivo, sviluppando una micotossicosi.
5. La somministrazione di **Zearalenone-4- β -D-glucupiranoside** al suino alla dose di 395 ppb per 14 gg porta ad eliminazione di ZON e α -ZOL nelle feci e nelle urine

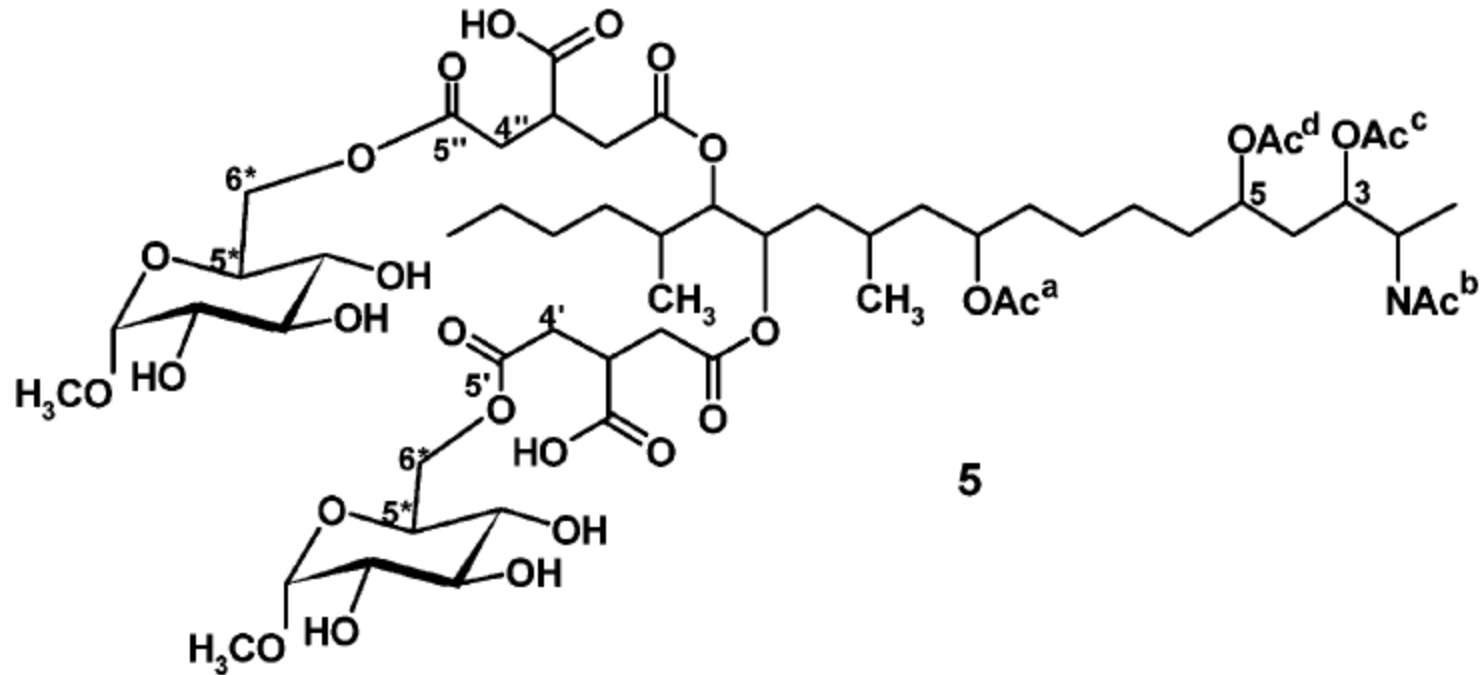


Fumonisin B₁ legata

Legame ipotizzato di FB₁ a proteine e amido durante il riscaldamento e suo rilascio nel tratto gastro-intestinale.



Fumonisina B₁ legata



Struttura del composto 5 isolato risultante dal riscaldamento di FB₁ acetilata o di FB₁ acetilata bis-anidride con metil- α - β -D-glupiranoside. La molecola dimostra i legami della FB₁ tramite la catene laterali TCA (acido tricarballylico) ai saccaridi durante il trattamento termico



mascherato

Deossinivalenolo (DON) è prodotto da *Fusareum graminearum* e *F. culmorum*, responsabili della fusariosi della spiga di frumento ed orzo.

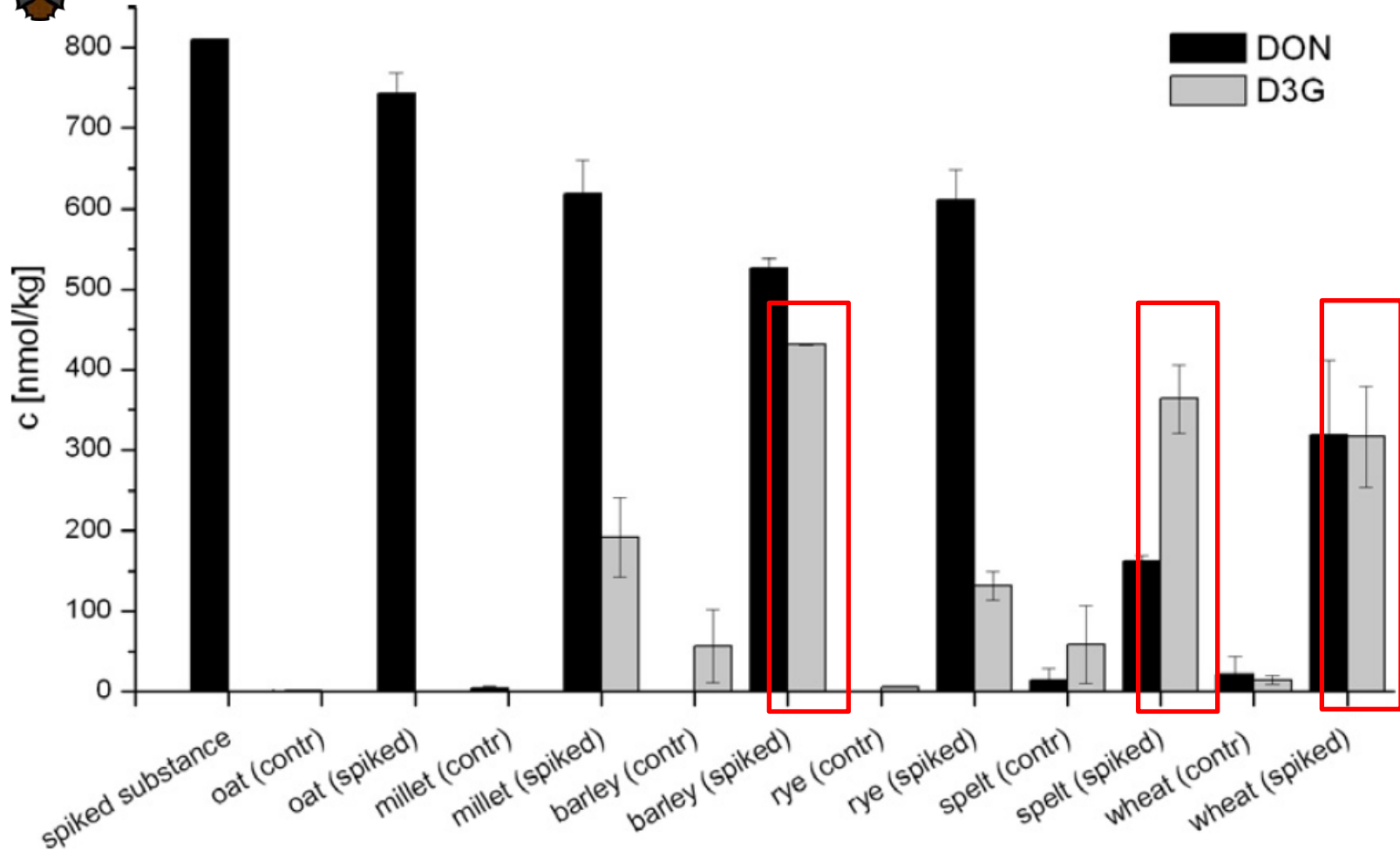
In aggiunta a **DON** libero, sono importanti

- **3-acetildeossinivalenolo (3-AcDON)**
- **15-acetildeossinivalenolo (15-Ac-DON)**
- **DON- β -D-glucopiranoside (D3G)** (fino al 50% del contenuto totale di DON)
- FAO/WHO (2010) ha stabilito per l'uomo una **dose giornaliera massima tollerabile provvisoria (PMTDI)** per DON ed i suoi derivati acetilati (3-acDON e 15-acDON). La tossicità dei derivati acetilati è pari a quella del DON libero. Non ci sono dati sufficienti per introdurre il D3G nel gruppo PMTDI, anche se è stato dimostrato che il D3G viene idrolizzato nell'intestino, rendendo biodisponibile il DON.
- Bertiller *et al*, 2011 – **D3G** non viene degradato nello stomaco, resiste alla β -glucosidasi citosolica (uomo), ma viene idrolizzato, liberando DON, da batteri lattici come *Enterococcus mundtii*, *Lactobacillus plantarum*. Pertanto deve essere considerato una "micotossina mascherata".



mascherato

6 tipi di cereali sono stati fatti germinare in acqua contenente una quantità precisa di DON (in 5 gg).



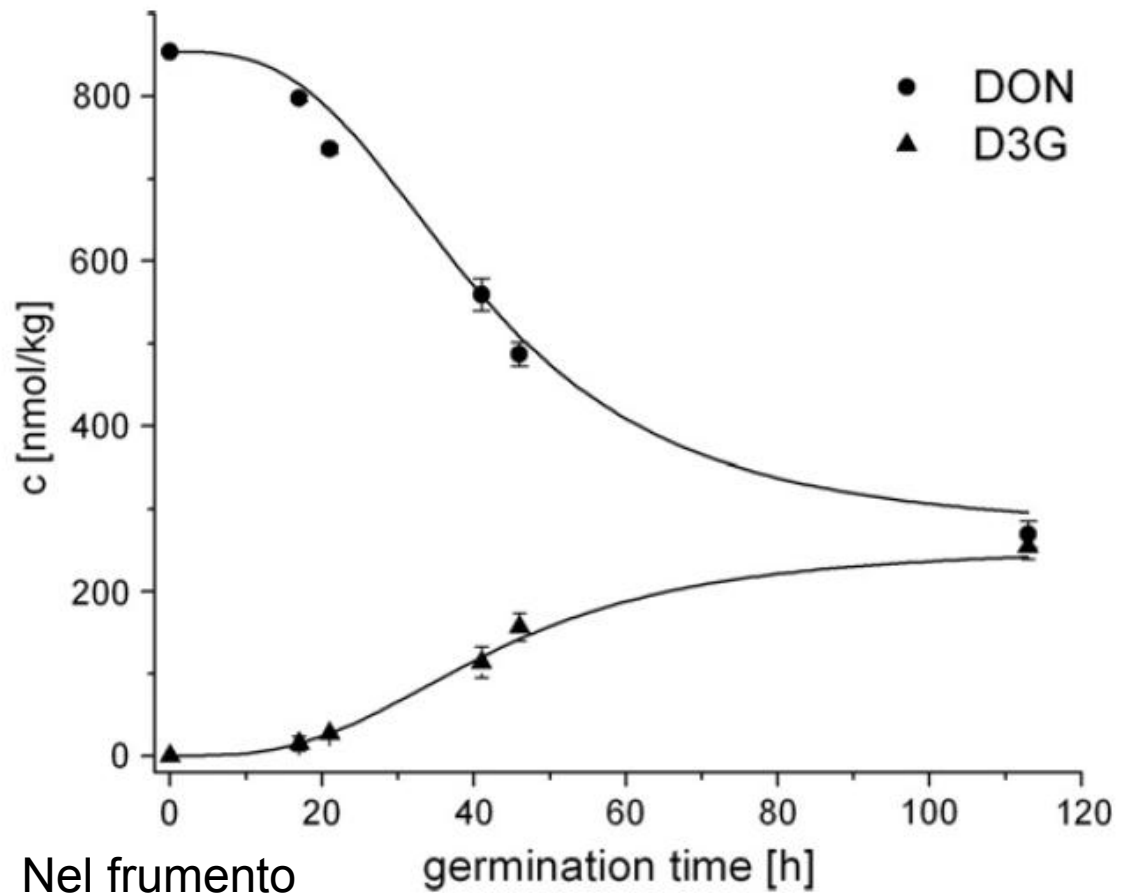


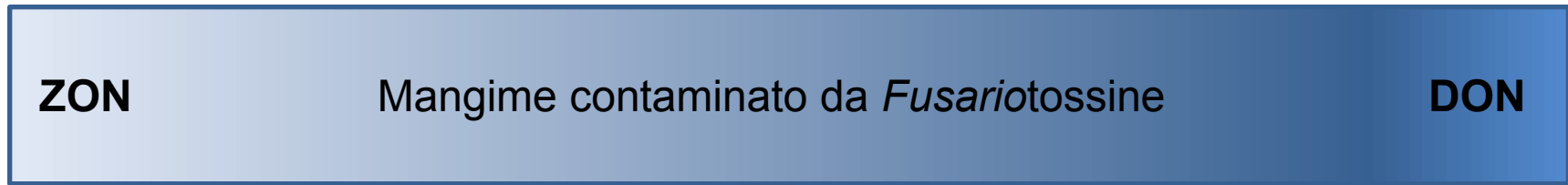
mascherato

Molar recovery of the initial DON content the germinated grains calculated as the sum DON and D3G.

Grain type	Recovery [%]
Oats	91.7
Millet	99.5
Barley	111.2
Rye	91.1
Spelt	56.0
Wheat	73.9

6 tipi di cereali sono stati fatti germinare in acqua contenente una quantità precisa di DON (in 5 gg).





Assunzione volontaria di alimento

Tossine e nutrienti disponibili a livello metabolico

- Sintesi proteica
 - Sistema immunitario
 - Alterazioni a fegato e milza
 - Maturazione oociti
 - Sintesi steroidi
 - Alterazioni uterine
 - Sviluppo uterino
- Effetti Metabolici**

