



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Immunologia, Immunopatologia Sperimentale  
e Comparata

CICLO XXII

IMMUNOVACCINAZIONE NEI CONFRONTI DI AFLA-  
TOSSINA B1 NEL SUINO:

Rilievi anatomoistopatologici in scrofe gravide vaccinate e  
successivamente esposte a mangime contaminato e nella  
loro prole

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. ATTILIO CORRADI

Tutor:

Chiar.ma Prof.ssa ANNA MARIA CANTONI

Dottoranda:

Elena Felloni

# INDICE

<b>Micotossine</b>	<b>3</b>
<b>Micotossine: Produzione e contaminazione</b>	<b>9</b>
<b>Aspergillus</b>	<b>17</b>
<b>Aspergillus Flavus</b>	<b>22</b>
<b>Aflatossina</b>	<b>29</b>
<b>Aflatossicosi</b>	<b>38</b>
<b>Aflatossicosi nel suino</b>	<b>43</b>
<b>Aflatossicosi umane</b>	<b>49</b>
<b>Legislazione</b>	<b>54</b>
<b>Progetto di ricerca</b>	<b>60</b>
<b>Materiali e metodi</b>	<b>62</b>
<b>Risultati e Discussione</b>	<b>68</b>
<b>Conclusioni</b>	<b>92</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>93</b>

# MICOTOSSINE

Il termine micotossina deriva dal greco Mykes e toxicon, che significano rispettivamente fungo e veleno, identifica metaboliti secondari di muffe a basso peso molecolare (generalmente al di sotto di 700Da). Questi possono contaminare alimenti utilizzati per l'alimentazione animale e umana tra cui un'ampia varietà di foraggi e cereali. I metaboliti secondari, a differenza di quelli primari che sono componenti essenziali della crescita fungina, possono essere prodotti durante la fase finale di crescita della muffa (CAST, 2003). Ciò può avvenire, in presenza di determinate condizioni di umidità e temperatura, nelle diverse fasi di coltivazione, raccolta, conservazione e lavorazione. Il metabolismo secondario è inoltre associato ai processi di sporulazione.

Tra le migliaia di specie di funghi note circa 100 di queste, che appartengono ai generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, producono micotossine (Barrett, 2000). Attualmente sono noti oltre 300 metaboliti fungini potenzialmente tossici per l'uomo e per gli animali (Atroshi et al 2002). I principali sono, il Deossinivalenolo (Don o Vomitotossina), lo Zearalenone, la Tossina T-2 e le Fumonisine che sono prodotte dal genere *Fusarium*, le Aflatossine e le Ocratossine che sono prodotte rispettivamente da *Aspergillus* e *Penicillium* (S. Bouhet et al., 2005).

Nella produzione di micotossine sono coinvolti diversi fattori classificati come intrinseci ed estrinseci. I primi sono quelli legati alla capacità stessa del ceppo di produrre micotossine, i secondi sono dati dalle condizioni, ambientali e non, che favoriscono lo sviluppo fungino (Pietri, 1998; Huwig et al., 2001).

## FATTORI INTRINSECI

I fattori intrinseci sono:

- ✓ potenziale tossigeno: ovvero la presenza di specie fungine potenzialmente tossigene che possono contaminare le derrate alimentari
  
- ✓ specie fungina: la produzione di micotossine è strettamente connessa alle specie tossigene, ma non solo, spesso all'interno della medesima specie sono riconosciuti ceppi più o meno tossigeni.
  
- ✓ livello iniziale di contaminazione: le micotossine possono essere presenti già in campo ed operazioni di raccolta e conservazione condotte in maniera scorretta o inadatta possono determinare la crescita fungina.

## FATTORI ESTRINSECI

I fattori estrinseci possono essere suddivisi in:

1. FATTORI FISICI
2. FATTORI CHIMICI
3. FATTORI BIOLOGICI

### I FATTORI FISICI SONO:

- ✓ Tensione di O<sub>2</sub>: Lo sviluppo della maggior parte dei funghi è favorito dalla presenza di ossigeno con una tensione di O<sub>2</sub> del 3% . Valori di CO<sub>2</sub> uguali o superiori a 0,2 % inibiscono completamente la crescita del micelio (Ceruti et al. 1993; Zaghini e Lambertini, 1995).
- ✓ Temperatura: La maggior parte delle muffe sono mesofile ossia germinano e crescono in un intervallo di temperatura compresa fra + 10 e + 40 °C, con crescita ottimale fra i 25 e i 30 °C (Gerola et al., 1986)
- ✓ Umidità o disponibilità di acqua libera: L'umidità del substrato è un fattore di fondamentale importanza per la crescita fungina. Viene espressa come attività dell'acqua (a<sub>w</sub>), che indica la

disponibilità dell'acqua per le reazioni chimiche e per la crescita del microrganismo. La maggior parte delle specie prolifera a valori di  $a_w$  da 0.80 ad 1 (Ominski et al, 1994).

- ✓ pH: la crescita di funghi è favorita da valori vicino alla neutralità o leggermente acidi; il range ottimale è compreso fra 5 e 7. La produzione di micotossine sembra maggiore a pH acidi. (O'Callghan, et al., 2006).
  
- ✓ Natura del substrato: La produzione di aflatossine è elevata se il fungo si sviluppa in presenza di glucosio, mannosio, fruttosio ed azoto in forma ammoniacale (Gerola et al., 1986).
  
- ✓ Danni meccanici alle cariossidi: I danni alle cariossidi costituiscono una via d'ingresso preferenziale per i funghi responsabili della produzione di micotossine.  

L'azione di grandine, insetti, uccelli e roditori può determinarne il danneggiamento e la rottura dei semi (Ceruti et al. 1993).
  
- ✓ Condizioni atmosferiche: Le micotossine vengono prodotte in particolari condizioni atmosferiche, ad esempio *flavus* è stato isolato a tutte le latitudini. Una maggior frequenza è stata evidenziata in quelle comprese fra 16° a 35° (che rappresentano principalmente climi tropicali, subtropicali e temperati umidi) e in climi desertici (Ominski et al, 1994).

## FATTORI BIOLOGICI:

- ✓ Presenza di altre specie fungine (azione competitiva): Le alterazioni determinate dall'infestazione di molteplici specie fungine possono comportare modificazioni fisico-chimiche del substrato. La presenza di più infestanti può determinare un effetto sinergico. Dal punto di vista quantitativo è stata dimostrata una correlazione positiva tra infestazione da parte delle piante e produzione di micotossine; ad esempio, nelle granelle di mais, è stata dimostrata una correlazione fra *A.flavus* e contenuto di AFB1 (Avantaggio e Visconti 2003).
  
- ✓ Presenza d'insetti (come infestanti o vettori di spore): Gli insetti fungono da vettori animali per le spore fungine, contribuendo a disseminare le spore. L'incidenza di infezione da parte di alcune specie micotossigene quali *flavus*, risulta essere significativamente più elevata nelle cariossidi danneggiate rispetto a quelle sane (Avantaggio e Visconti 2003).
  
- ✓ Stress della pianta: È nota una stretta relazione fra presenza di micotossine e stress, come ad esempio può accadere per carenza d'acqua, che la pianta può subire nel corso della vita (Bartolini, 2002).
  
- ✓ Resistenza del substrato: La resistenza del substrato indica la resistenza genetica e l'integrità della cariossida.

## FATTORI CHIMICI:

✓ l'utilizzo di fungicidi:

Un appropriato utilizzo dei pesticidi durante il processo di produzione può essere utile nella riduzione dell'infezione fungina o dell'infestazione da parte d'insetti. Fungicidi quali l'intraconazolo e l'amfotericina B si sono dimostrati efficaci nel controllo delle specie di *A.flavus* che producono aflatossine.



## Micotossine: Produzione e contaminazione

Il genotipo, la siccità, la tipologia di suolo, lo stress e l'attività degli insetti sono fattori importanti nel determinare la contaminazione da parte di micotossine prima della raccolta; (Bruns et al., 2003; S. Bouhet et al., 2005; J.M.Wagacha et al.,2008) la temperatura, l'umidità e l'aerazione sono fondamentali durante l'essiccamento e la conservazione (Wagacha J.M.et al.,2008). Infatti, qualora un raccolto che sia stato infettato nel campo venga conservato in modo non idoneo, la crescita fungina anziché arrestarsi continua.

Le micotossine sono mutageniche, cancerogene, embriotossiche, teratogene o possono avere effetti estrogenici sugli animali (Smith, J.E., et al 1995). A causa di queste loro proprietà tossiche e dell'alta stabilità ai trattamenti termici, quindi anche alla cottura, si ritrovano nella catena alimentare, costituendo così un problema di portata mondiale sia per la pericolosità nei confronti della salute umana e animale, sia per le derivanti ricadute economiche (WHO, 2006).

Le micotossicosi, intossicazioni acute o croniche causate dalle micotossine, possono interessare diversi processi cellulari ed avere un ampio spettro di effetti tossicologici. Infatti queste tossine sono in grado di colpire i sistemi riproduttivo, immunitario, ormonale nonché specifici organi bersaglio (Richard, 1991, Sharma 1993, CAST 2003, Kuiper-Goodman, 2004). Ciò si traduce in risposte soggettive e specie specifiche varie e complesse (Kuiper-Goodman, 2004).

Le sindromi cliniche causate dall'ingestione di moderate o alte dosi di micotossine sono ampiamente studiate e possono avere effetti minori quali crescita rallentata o ridotta capacità riproduttiva per giungere fino a mortalità (S. Bouhet et al., 2005).

I soggetti giovani sono più sensibili degli adulti alle diverse tossine, probabilmente a causa del loro peso corporeo, dell'alta attività metabolica, della bassa

attività di detossificazione, nonché dell'incompleto sviluppo di alcuni organi e tessuti quali il sistema nervoso centrale (WHO 1986, Sherif O. Sherif, 2009).

L'esposizione alle micotossine avviene prevalentemente per via alimentare, tramite l'ingestione di cibi direttamente contaminati, ad esempio i cereali, o prodotti animali quali le uova, il latte e la carne (Avantaggio e Visconti, 2003).

Sono stati altresì segnalati come vie di esposizione anche la via inalatoria ed il contatto diretto.

Fungo produttore	Cond. di sviluppo: - Temp. dell' aria - % Um. rel. aria - % Um. granella	Micotossina prodotta	Alimenti contaminati	Effetti clinici	Limiti di legge
<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Temp. 10-42°C Opt. 32°C Um. rel. aria 82% Um. granella 16-30%	Aflatossine B1(M1),B2, G1,G2	Mais, cereali, arachidi, semi di cotone, noci, soia, caffè, fichi, latte e derivati, uova.	- Tossiche per il fegato - Riduz. crescita e produzioni - Emorragie - Cancerogene - Genotossiche	Alimenti per l'uomo: - R.to 466/01/CE del 08-03-01 - R.to 2174/03/CE del 12-12-2003 - R.to 683/04/CE del 13/04/2004 Alimenti per animali: - Dir 29/1999/CE del 22-04-1999
<i>Aspergillus ochraceus</i> ; <i>Penicillium s.p.</i>	Temp. 5-35 °C Opt. 28°C Um. rel. aria >80% Um. granella 16-20%	Ocratossina A	Mais, cereali, arachidi, caffè, cacao, uva passita, uva, frutta secca, vino, spezie, formaggio, carne di maiale conservata.	- Tossiche per reni e fegato	Alimenti per l'uomo: - R.to 472/02/CE del 12-03-02 - R.to 683/04/CE del 13-04-2004 - R.to 123/05/CE del 26-01-2005
<i>Fusarium graminearum</i> ; <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium sporotrichoides</i>	Temp. 4-35°C Opt. 25°C Um. rel. aria 94% Um. gran. 20-21%	Deossivalenolo (DON) Nivalenolo (NIV) Zearalenone T2 - HT-2	Mais, cereali.	- Rifiuto del cibo - Vomito - Turbe riproduttive - Emorragie - Diarrea, - Crescita ridotta	*Limiti in fase di discussione
<i>Fusarium verticillioides</i> ( <i>moniliforme</i> ); <i>F. proliferatum</i>	Temp. 4-36°C Opt. 25°C Um. rel. aria 91% Um. granella 18-20%	Fumonisine	Mais, cereali.	Uomo: - sosp. cancro esofago  Animali - crescita stentata in generale - encefalopatia negli ecquina - edema nei suini	*Limiti in fase di discussione

**TABELLA 1:** Principali micotossine e materie prime contaminate (S. Bouhet et al., 2005; Dragoni I, Cantoni C, Vallone L, Papa A, consiglio diritti genetici, www.consigliodirittigenetici.org).

Il rischio di una contaminazione da parte delle micotossine può essere ridotto operando su tre diversi fronti:

1. Prevenzione dell'esposizione alle micotossine,
2. Decontaminazione,
3. Costante sorveglianza e monitoraggio delle muffe negli alimenti contaminati.

### Prevenzione

Premesso il necessario rispetto della normativa in materia, l'esposizione alle micotossine può essere evitato adottando diversi accorgimenti durante le fasi di produzione, raccolta, conservazione, trasporto, distribuzione e processamento dei prodotti.

Le pratiche agricole rivestono un ruolo fondamentale nella tutela nei confronti della contaminazione da micotossine sul campo; ad esempio una raccolta precoce riduce l'infezione fungina della coltura.

Un'adeguata essiccazione, ovvero realizzata rapidamente e ad umidità inferiore al 10% crea condizioni sfavorevoli per la crescita, la proliferazione fungina e per l'infestazione da parte d'insetti. Questi ultimi possono aumentare il contenuto d'umidità a causa della loro respirazione (Lanyasunya et al., 2005; Turner et al., 2005, Wagacha et al., 2008).

Uno studio condotto in Benin sulle aflatossine e sulle fumonisine ha dimostrato che la selezione, la spulatura, il lavaggio, la schiacciatura associata alla separazione della lopa dei chicchi di mais sono metodi efficaci nel ridurre la quantità di micotossine presenti (Fandohan et al., 2005).

Alcune misure base di sanificazione quali la rimozione e la distruzione dei detriti prima della raccolta dei cereali, così come la pulitura dei magazzini prima del loro stoccaggio si sono rivelate utili ai fini della riduzione dei livelli di aflatossina.

All'opposto altre metodologie quali la rotazione delle coltivazioni, il planting date, il management dell'irrigazione e della fertilizzazione hanno dimostrato una minor efficacia nella riduzione dell'accumulo di micotossine (Champeil et al., 2004; Munkvold, 2003).

### Decontaminazione

La decontaminazione del cibo può essere ottenuta avvalendosi di chemoprotettivi.

La chemoprotezione si ottiene grazie all'utilizzo di composti che stimolano i processi di detossificazione prevenendo così la formazione dell'eossido (Kensler et al. 1994; Hayes et al. 1998). La chemoprotezione nei confronti delle aflatossine è stata dimostrata per un ampio numero di sostanze tra queste l'Oltipraz e il Chlorophyllin. Hanno inoltre dimostrato effetto chemoprotettivo alcuni integratori dietetici. Tra questi vi sono i cavolini di Brussels ed il tè verde che incrementano i processi di detossificazione negli animali (Kensler et al., 2004) e/o prevengono la produzione di eossidi che causano danno cromosomico (Hayes et al., 1998).

L'oltipraz è in grado di inibire il metabolismo di AflatossinaB1 inibendo l'attività di alcuni enzimi citocromo P450 ed inducendo la glutatione-S-trasferasi (GST).

Gli alluminosilicati sono invece degli agenti adsorbenti, caratterizzati da una forte capacità di legarsi alle micotossine in modo stabile riducendone l'assorbimento nel tratto intestinale. Possono adsorbire AflatossinaB1 in modo da prevenirne l'assorbimento a livello gastrointestinale.

Saggi in vitro con alluminosilicati suggeriscono che vi sia un adsorbimento di micronutrienti minimo. L'utilizzo di tali agenti adsorbenti in mangimi contaminati è efficace nel prevenire aflatossicosi in tacchini, polli, agnelli, bovini, suini, pecore, ratti e topi (Chung et al. 1990; Phillips et al. 1995; Phillips et al. 2002). Tale approccio è diffuso negli allevamenti zootecnici.

Si stima inoltre che il 10% di tutte le derrate zootecniche sia costituito da alluminosilicati.

L'uso di Aflatossina marcata radioattivamente dimostra che l'aggiunta di argilla nella proporzione dello 0,5% del volume di mangime contaminato in polli riduce l'esposizione ad Aflatossina del 95% (Phillips et al. 1995).

Inoltre sono stati realizzati cereali geneticamente modificati contenenti alcuni geni per la resistenza nei confronti degli effetti fitotossici di certi trichoteceni e geni produttori di inibitori della crescita fungina.

#### Costante sorveglianza e monitoraggio delle muffe negli alimenti contaminati

Più di cento paesi al mondo, nell'intento di tutelare la salute umana e animale, si sono dotati di una specifica normativa per la regolamentazione e il monitoraggio delle muffe negli alimenti e nei mangimi. Di particolare importanza è la disciplina dettata dalla UE che verrà trattata analiticamente in un apposito capitolo (Wagacha et al., 2008).

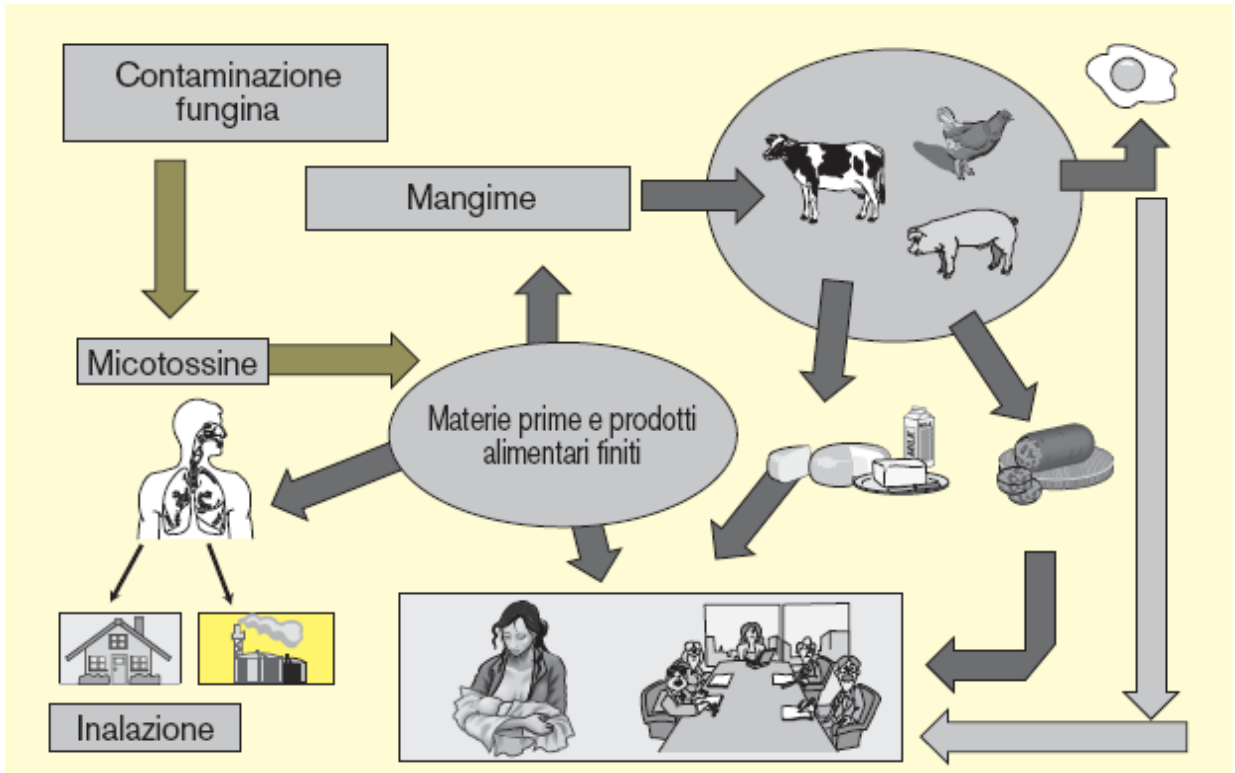


FIGURA 1: Contaminazione da micotossine (Miraglia, 2004)

**Nel 1993, l'Agencia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) ha classificato l'Aflatossina B1 (AFB1) e le miscele di Aflatossine come Cancerogeni del Gruppo 1 (IARC,2002) mentre le Fumonisine e l'Ocratossina A come possibili cancerogeni (Cancerogeni del Gruppo 2B) (IARC,1993 a,b).**



# ASPERGILLUS

Il genere *Aspergillus* appartiene al phylum Ascomycota, ordine Eurotiales, famiglia Trichocomaceae.

I membri del genere *Aspergillus* sono descritti come ubiquitari, sia per la distribuzione geografica sia per l'utilizzo di substrati (*A. flavus* si ritrova in tutti i tipi di cibo; *parasiticus* nelle arachidi, *pseudotamarii* nella soia, *bombycis* nei bachi da seta; *ochraceoroseus* nella soia, *australis* nella soia e nelle arachidi). Infatti *flavus* sembra essere capace di adattarsi ad una notevole varietà di climi, habitat e substrati, quali tessuti di mammiferi, granaglie conservate e il suolo (Klich et al., 1992). È stato isolato a tutte le latitudini con frequenza maggiore nei climi desertici e a latitudini comprese fra 16° a 35° che rappresentano principalmente climi tropicali, subtropicali e temperati umidi e, con un'attività d'acqua (umidità del suolo  $a_w$ ) compresa fra 0,6 e 0,9.

Sono state identificate 185 diverse specie di *Aspergillus*, diverse sia per caratteristiche morfologiche che per colore. Di queste 20 sono documentate come agenti di patologie umane (Krishnan S., et al, 2009).

I funghi del genere *Aspergillus* sono isolati principalmente come contaminanti alimentari ma possono essere benefici o dannosi a seconda delle diverse specie e dell'utilizzo che se ne fa. Nell'industria alcune specie sono utilizzate nella produzione di acidi organici ed enzimi, per l'espressione di proteine estranee o per la fermentazione del cibo. Le specie patogene sono le più pericolose non tanto per il processo d'infezione e di colonizzazione ma soprattutto perché in grado di produrre metaboliti secondari tossici. Alcune delle più importanti specie del genere *Aspergillus* sono: *fumigatus*, agente causale delle aspergillosi nell'uomo, *niger*, utilizzato per la produzione di acido citrico, *oryzae*, utilizzato per la produzione di saki e salsa di soia, *nidulans*, modello per la genetica fun-

gina, *terreus*, per applicazioni biotecnologiche, *flavus*, patogeno di animali, piante, insetti e produttore di Aflatossina (Scheidegger and Payne, 2003).

La diversità delle nicchie ecologiche occupate dai membri del genere *Aspergillus* sottogenere *flavi* e la capacità di alcune specie (*flavus*, *parasiticus*, *nomius*, *pseudotamarii*), di produrre aflatossina fanno sì che questo gruppo di funghi sia tra quelli maggiormente studiati ( Peterson, 1995; Tamura et al., 2000; Samson, 2003; Vaga et al., 2003).

La maggior parte di *Aspergillus* si propaga tramite spore asessuali chiamate conidi (*A. flavus* e *A. parasiticus*), alcune specie producono sia conidi che spore sessuali definite ascospore (*A. nidulans*). I conidi sono formati in complesse strutture specializzate chiamate conidiospore, mentre le ascospore all'interno di corpi fruttiferi sessuali sferici chiamati cleistotecii. I conidi nelle specie che sono patogeni opportunisti delle piante e degli animali servono come fonte principale dell'inoculo. La maggior parte delle specie asessuali, incluse *A. flavus* and *A. parasiticus*, formano delle strutture resistenti chiamati sclerozi. (Calvo A.M., 2002).

*A. parasiticus* e *A. flavus* producono entrambi aflatossina. *A. flavus* produce aflatossina B1 e B2 e acido ciclopiazonico (CPA), anche se alcuni ceppi sono stati identificati come produttori di aflatossina G1 e G2. *A. parasiticus* produce tutte e quattro le aflatossine sopra menzionate ma non CPA (Scheidegger and Payne, 2003).

<b>SPECIE</b>	<b>COLORE DELLA COLONIA</b>	<b>MORFOLOGIA</b>
A. fumigatus	Verde con un bordo bianco	Margini netti a superficie granulare, con abbondante produzione di spore pigmentate
A. niger	Bianco con punteggiatura nera (teste aspergillari) o colorazione pepe e sale	Margini irregolari, abbondante micelio aereo fioccoso
A. nidulans	Verde o giallo-verde	Margini irregolari, superficie fioccosa
A. flavus	Giallo	Margini netti, abbondante micelio aereo fioccoso
A. terreus	Marrone	Margini irregolari, micelio cotonoso

**TABELLA 2** : Caratteristiche macroscopiche dei principali Aspergilli di interesse medico (Aspergillusflavus.org)

<b>SPECIE</b>	<b>VESCICOLE</b>	<b>FIALIDI</b>	<b>CONIDIOFORI</b>
A. fumigatus	Clavate, fertili nei 2/3 distali	Serie unica	Lisci
A. niger	Sferiche, fertili su tutta la superficie	Serie unica o duplice	Lisci
A. nidulans	Emisferiche, fertili sui 2/3 distali	Serie duplice	Lisci
A. flavus	Piriformi o sferiche	Serie unica o duplice	Rugosi
A. terreus	Emisferiche	Serie duplice	Lisci

**TABELLA 3**: Caratteristiche microscopiche dei principali Aspergilli di interesse medico. (Aspergillusflavus.org)

# PRINCIPALI CEPPI DI *Aspergillus*

<i>A. flavus</i> Link (1809)	The main agent of acute and chronic invasive and granulomatous <i>Aspergillus</i> sinusitis. Agent of otitis, keratitis, pulmonary and systemic infections in immunocompromised patients, cutaneous aspergillosis and aspergillosis in other vertebrates.	Conidiophores are heavy walled, uncoloured, coarsely roughened, usually less than 1 mm in length. Vesicles are elongate when young, later becoming subglobose or globose, varying from 10 to 65 µm in diameter. Phialides are uniseriate or biseriata. The primary branches are up to 10 µm in length, and the secondary up to 5 µm in length. Conidia are typically globose to subglobose, conspicuously echinulate, varying from 3.5 to 4.5 µm diameter.
<i>A. oryzae</i> (Ahlburg) Cohn (1883)	A rare agent of paranasal sinusitis, meningitis, cerebritis, pulmonary infections, ABPA, otomycosis and scleritis. There is one report of involvement in a kidney infection in an albatross.	Conidiophores are up to 4–5 mm in length, colourless, with walls relatively thin, definitely roughened throughout all or most of their length. Vesicles are sub-spherical, stigmata covering the entire surface or the upper three-fourths, up to 75 µm diameter. Phialides are uniseriate and biseriata, covering the entire surface or the upper three-fourths of the vesicle. Conidia are (sub)spherical to ovoidal, 4.5–8(–10) × 4.5–7 µm, smooth-walled to roughened, greenish to brownish.
<i>A. subolivaceus</i> Raper & Fennel (1965)	No documented disease.	Conidiophores are variable in length from 300 to 1300 µm, walls uncoloured, definitely echinulate. Vesicles are subglobose to somewhat elongate, variable in diameter but usually 30–55 µm × 35–60 µm. Phialides are biseriata, primaries 6.5–20.0 × 4.5–7.5 µm, secondaries 7.0–10.0 × 3.3–4.0 µm. Conidia are elliptical and delicately roughened when first formed, becoming smooth or nearly so, predominantly elliptical and mostly 4.0–4.5 × 3.0–3.5 µm.
<i>A. thomii</i> Smith (1951)	No documented disease.	Conidiophores are uncoloured, conspicuously roughened or echinulate throughout their entire length, up to 1200–1500 µm long. Vesicles are globose to pyriform ranging from 20–50 µm in diameter. Phialides are typically biseriata, primaries 6–10 × 3.3–4.0 µm, secondaries and uniseriate stigmata 6–9 × 2.2–2.8 µm. Conidia are elliptical and hyaline when first formed, becoming subglobose, brownish yellow and definitely roughened at maturity, varying in diameter from 3.0 to 5.5 µm.
<i>A. terricola</i> var. <i>americana</i> Thom & Church (1921)	No documented disease.	Conidiophores are 300–600 µm in length by 6–8 µm in diameter, with walls appearing granulate, uncoloured. Vesicles are globose to subglobose, up to 25 µm in diameter, fertile over the upper two-thirds or three-fourths. Phialides are usually in one series, primaries when present 7.5–9.0 × 4.5–6.0 µm, secondaries 7–10 × 3.3–4.5 µm with tips often phialiform. Conidia are commonly ovate to nearly globose at maturity, mostly 4.5–5.5 × 3.8–5.0 µm, rugulose, brownish yellow.
<i>A. parasiticus</i> Speare (1912)	No documented disease.	Conidiophores are variable in length, mostly 300–700 µm long, with walls colourless, smooth or nearly so in some strains, in others smooth below and definitely roughened above. Vesicles are 20–35 µm in diameter. Phialides are in one series, 79 × 3.0–4.0 µm, colourless or in pale yellow-green shades. Conidia are globose, coarsely echinulate, 3.5–5.5 µm in diameter, bright yellow-green.
<i>A. sojae</i> Sakaguchi & Yamada (1944)	No documented disease.	Conidiophores are short with walls smooth but sometimes roughened. Vesicles are subglobose to clavate, 10–30 µm. Phialides are definitely uniseriate. Conidia are globose, prominently echinulate, usually 5–6 µm.
<i>A. toxiaris</i> Murakami (1971)	No documented disease.	Conidiophores are roughened, usually less than 1 mm in length. Vesicles are globose to subglobose, 30–40 µm. Phialides are definitely biseriata. Conidia are globose, prominently echinulate, usually 4–5 µm.
<i>A. caelatus</i> Hom (1997)	No documented disease.	Conidiophores are hyaline, finely roughened; length variable, mostly 200–800 µm. Vesicles are globose or subglobose, 15–38 µm in diameter, fertile over upper three-fourths. Phialides are 5.0–11.0 × 3.0–6.0 µm. Conidia are globose and thick-walled, with spore body 5.0–6.0 µm in diameter; ornamentation coarse, consisting of tubercles and short bars <1.5 µm high.
<i>A. pseudotamarii</i> Ito et al. (2001)	No documented disease.	Conidiophores are hyaline, finely roughened. Vesicles are globose to subglobose, 26–38 µm. Phialides are 4.5–6.1 × 3.1–4.5 µm. Conidia are globose to subglobose, echinulate; variable in diameter, 3.9–9.9 µm.
<i>A. coremiiformis</i> Bartoli & Maggi (1978)	No documented disease.	Conidiophores are simple or in coremia, straight, up to 1500 µm long by 20–45 µm wide, thick-walled, walls roughened to echinulate, rarely smooth. Vesicles are light to deep tawny, subglobose to elongate, fertile over almost the entire surface, 50–60 × 45–60 µm. In coremia, vesicles are obclavate and spatulate, 90–150 × 85–100 µm. Phialides are biseriata, each series composed of closely packed sterigmata, 15–18 × 4–4.5 µm. Conidia are yellowish in mass, very variable in shape, from globose to oval, oblong or cylindrical, more or less encrusted, mostly 6.9–9 µm.
<i>A. flavofurcatis</i> Batista & da Silva Maia (1955)	No documented disease.	Conidiophores are erect, usually 1–2 mm in height by 11–20 µm in diameter, uncoloured, delicately granular. Vesicles are flask-shaped to subglobose, mostly 20–40 µm, fertile over most of their surface in large head. Phialides are biseriata, mostly 10–14 × 6.5–8.0 µm, conspicuously flared and thickened. Conidia are subglobose to globose at maturity, mostly 6.0–8.0 µm, distinctively demonstrating an olive-brown to dark brown colour change.
<i>A. terricola</i> var. <i>indica</i> Mehrotra & Agnihotri (1962)	No documented disease.	Conidiophores are usually short and branched commonly 50–150 × 6.6–10.0 µm, colourless and usually smooth. Vesicles are globose to subglobose, those of smaller heads 9–12 µm in diameter and fertile over the upper half, in larger heads 20–34 µm in diameter and fertile over most of the surface. Phialides are mostly uniseriate, 8.4–9.8 × 5.0–7.0 µm. Conidia are globose, varying from 4.5 to 9.8 µm in diameter, brownish yellow and conspicuously echinulate at maturity.
<i>A. terricola</i> Marchal (1893)	No documented disease.	Conidiophores vary in length but reaching 0.5–1.0 mm, uncoloured, smooth or somewhat granulate. Vesicles are subglobose to hemispherical, mostly 20–45 µm. Phialides are uniseriate or biseriata, with both conditions often observed in the same head, 7–15 × 4.5–8.0 µm. Conidia are subglobose to globose at maturity, extremely variable in size, 4.5–9.0 µm, brownish yellow, coarsely echinulate.
<i>A. tamarii</i> Kita (1913)	Implicated in a case of eyelid infection.	Conidiophores are usually 1–2 mm in length, hyaline, usually roughened. Vesicles are spherical, 10–50 µm. Phialides are uniseriate and biseriata, covering the entire surface of the vesicle. Conidia are echinulate to tuberculate, subspherical, 5–8 µm.
<i>P. alliaecus</i> Thom & Church (1926)	One report of a chronic otitis externa after surgery.	Conidiophores are smooth-walled, up to 1.2 mm long, hyaline. Vesicles are spherical, occasionally somewhat elongate. Phialides are biseriata or uniseriate, covering at least the upper half of the vesicle. Conidia are ovoidal to subspherical, smooth walled, yellow, 2.5–4 × 2–3.5 µm.
<i>P. albertensis</i> Tewari (1985)	No documented disease.	Conidiophores are commonly up to 3500 × 17.6 µm, somewhat sinuous, generally smooth. Vesicles are up to 95 µm, globose to subglobose. Phialides and metulae present in all heads, wedge-shaped, non-septate, 4.6–23 × 2–7 µm, phialides 5.7–9.5 × 1.7–2.5 µm. Conidia are oval to subglobose, smooth 2.3–3.5 × 1.7–3.5 µm.
<i>A. lanosus</i> Kamal & Bhargava (1969)	No documented disease.	Conidiophores are commonly 1.5–3 mm, septate with smooth wall, sometimes with true branches. Vesicles are hemispherical to subglobose, 15–30 µm, often fertile over half to two-thirds of surface. Phialides are crowded, biseriata, primaries 8–12 × 3.3–4.4 µm, secondaries 6.5–8.8 × 2.2–2.3 µm. Conidia are smooth, globose to subglobose, 2.2–2.8 µm.
<i>A. robustus</i> Christensen & Raper (1978)	No documented disease.	Conidiophores are smooth to very slightly roughened, mostly 750–5000 × 10–21 µm. Vesicles are globose to somewhat elongate, thick-walled, fertile over the entire surface, mostly 40–70 µm. Phialides are 9.0–12.6 × 3.4–4.5 µm. Conidia are echinulate, thin-walled ellipsoidal, mostly 3.5–4.5 × 2.8–3.4 µm.
<i>A. leporis</i> States & Christensen (1966)	No documented disease.	Conidiophores are extremely variable, commonly 250–1100 µm, echinulate and uncoloured or pale yellow. Vesicles are thick-walled, fertile over three-fourths or more of the surface, globose to subglobose, mostly 20–50 µm. Phialides are biseriata, metulae 6.5–16 × 4.5–5 µm. Conidia are globose to subglobose, smooth to delicately roughened, mostly 3–3.5 µm.
<i>A. nomius</i> Kurtzman et al. (1987) ( <i>A. zhaoqingensis</i> )	No documented disease.	Conidiophores are uncoloured, echinulate; variable in length, mostly 300–1100 µm. Vesicles are globose to subglobose, 25–65 µm. Phialides are 3.8–6.5 × 7.6–11.3 µm. Conidia are globose to subglobose, echinulate; mostly 4.5–6.5 µm.

Species	Disease	Microscopic features
<i>A. avenaceus</i> Smith (1943)	No documented disease.	<b>Conidiophores</b> are commonly 1-2 mm, colourless, smooth in fluid mounts, but appearing finely roughened when examined dry. <b>Vesicles</b> are globose or slightly flattened, thick-walled, mostly 75-100 µm. <b>Phialides</b> are biserial, primary 20-30 µm, secondary 8-13 x 3-4 µm. <b>Conidia</b> are ellipsoid, smooth, mostly 4.0-5.0 µm.
<i>A. bombycis</i> Peterson et al. (2001)	No documented disease.	<b>Conidiophores</b> are smooth-walled; 300-500 x 10-20 µm. <b>Vesicles</b> are globose, 30-50 µm, fertile over entire surface. <b>Phialides</b> are 3-4 x 8 µm, flask-shaped, metulike cylindrical 4-5 x 10-12 µm. <b>Conidia</b> are roughened, globose to subglobose, (3.5)-4-7-(8.5) µm in diameter.
<i>A. qizastoyi</i> Li et al. (1998)	One report of a maxillary aspergilloma.	<b>Conidiophores</b> are 100-320(-500) µm long, straight to sinuous, roughened, septate, swollen in the upper part. <b>Vesicles</b> are flask-shaped, 9-17 µm in diameter, fertile over the upper half or three-fourths; often proliferating. <b>Phialides</b> are uniseriate, 7-12 x 2-4 µm. <b>Conidia</b> are hyaline, globose to ovoid, 5-6.5(-7) µm in diameter, smooth.
<i>A. beijingsis</i> Li et al. (1998)	One report of a maxillary aspergilloma.	<b>Conidiophores</b> are 100-550 µm long, 4-5.5 µm in diameter, septate, thick-walled, smooth. <b>Vesicles</b> are clavate, sometimes flask-shaped, 7-11(-14) µm in diameter, fertile over the upper half. <b>Phialides</b> are 10-19 x 4-5 µm. <b>Conidia</b> are globose to subglobose, 3.5-6.5 x 3.5-5.5 µm, micro-vernucose.

TABELLA 4: principali ceppi di aspergillus e loro caratteristiche (M.T. Hedayati, 2007)

## ***Aspergillus Flavus***

Come già detto *A. flavus* è stato isolato a tutte le latitudini ma con frequenza maggiore nei climi desertici e a latitudini comprese fra 16° e 35°, che rappresentano climi tropicali, subtropicali e temperati umidi. La crescita ottimale si ha a temperature comprese fra i 36°C ed i 38 °C. (Scheidegger, Payne,2003).

L'umidità e la concentrazione di ossigeno sono fattori importanti per la crescita di *flavus*; queste muffe possono crescere a valori compresi fra 13 e 18 RM e con una attività d'acqua ( $a_w$ ) maggiore di 0.73.

Valori di CO<sub>2</sub> superiori a 20% e una concentrazione di O<sub>2</sub> inferiore a 10% inibiscono la crescita fungina mentre valori di O<sub>2</sub> inferiori all'1% possono inibire completamente la crescita fungina.

Un altro fattore importante nella crescita di *flavus* è lo sbilanciamento delle fertilizzazioni con N, associato con stress da siccità (Jones, 1981; Santin, 2005).

*Flavus* si presenta come una muffa dall'aspetto vellutato, gialla-verde o marrone con il lato inferiore dorato rosso-marrone.

È capace di adattarsi ad una notevole varietà di climi, habitat e substrati, quali ad esempio tessuti di mammiferi, granaglie conservate, suolo (Klich et al., 1992). È noto per la sua aggressività sui raccolti, in particolare nei confronti di grano, semi di cotone, noccioline, noci, semi conservati e nelle granaglie in generale.

*A.flavus* sembra trascorrere la maggior parte della sua vita crescendo come saprofita al suolo. Componenti vegetali contaminate quali parti interne delle cariossidi, pannocchie e foglie possono rimanere sul terreno come detriti e favorire la sopravvivenza del fungo fino alla stagione successiva quando si possono formare i conidi, e quindi produrre l'inoculo primario per il successivo ciclo d' infezione ( Smart et al., 1990; Payne, 1998; Scheidegger and Payne,2003).

I miceli fungini sono la struttura predominante ritrovata al suolo, possono essere formati anche gli sclerozi che contribuiscono alla sopravvivenza a lungo termine del fungo. Gli sclerozi possono poi germinare e produrre ife o conidi (spore asexuali) che possono essere disperse nel suolo e nell'aria (Scheidegger and Payne,2003).



FIGURA 2: *A.flavus*(Ehso.com)



FIGURA 3: testa conidiale di *A. flavus* (Brera,2009, M.T.Hedayati, 2007)



FIGURA 4 e 5: contaminazione di mais e pistacchi da parte di *A.flavus* (Aspergillusflavus.org)

Le ife sono settate, ialine e diramano ad angoli di 45°. La formazione delle conidiospore inizia dalle ife di supporto e terminano in vescicole all'apice. Le conidiospore (più di 800  $\mu\text{m}$  di lunghezza e 15-20  $\mu\text{m}$  larghezza) sono rugose, incolori e la vescicola (20-45 $\mu\text{m}$ ) è globosa con dei prolungamenti radiali. Le fia-

lidi possono essere uniseriate e attaccate direttamente alle vescicole o biseriate e attaccate alla vescicola grazie ad una cellula chiamata metula ( $8 \times 5 \mu\text{m}$ ). Le teste dei conidi sono tipicamente radiate,  $400 \text{ nm}$  in diametro, si spaccano a formare delle colonne staccate. I conidi sono di  $2\text{-}5 \mu\text{m}$ , sono disposte in una catena radiale sopra la parte finale distale delle fialidi (Krishnan S., et al, 2009).

Strutture microscopiche chiamate sclerozi possono essere identificate in *flavus* e sono di importanza fondamentale per la loro identificazione. In base alle caratteristiche degli sclerozi *flavus* può essere suddiviso in due classi fenotipiche: il ceppo S che produce numerosi piccoli sclerozi (diametro medio inferiore a  $400 \mu\text{m}$ ); il ceppo L produce sclerozi più grandi ma in quantità minore (Cotty, 1989).

All'interno del ceppo S il ceppo SB, che produce aflatosina B e G.



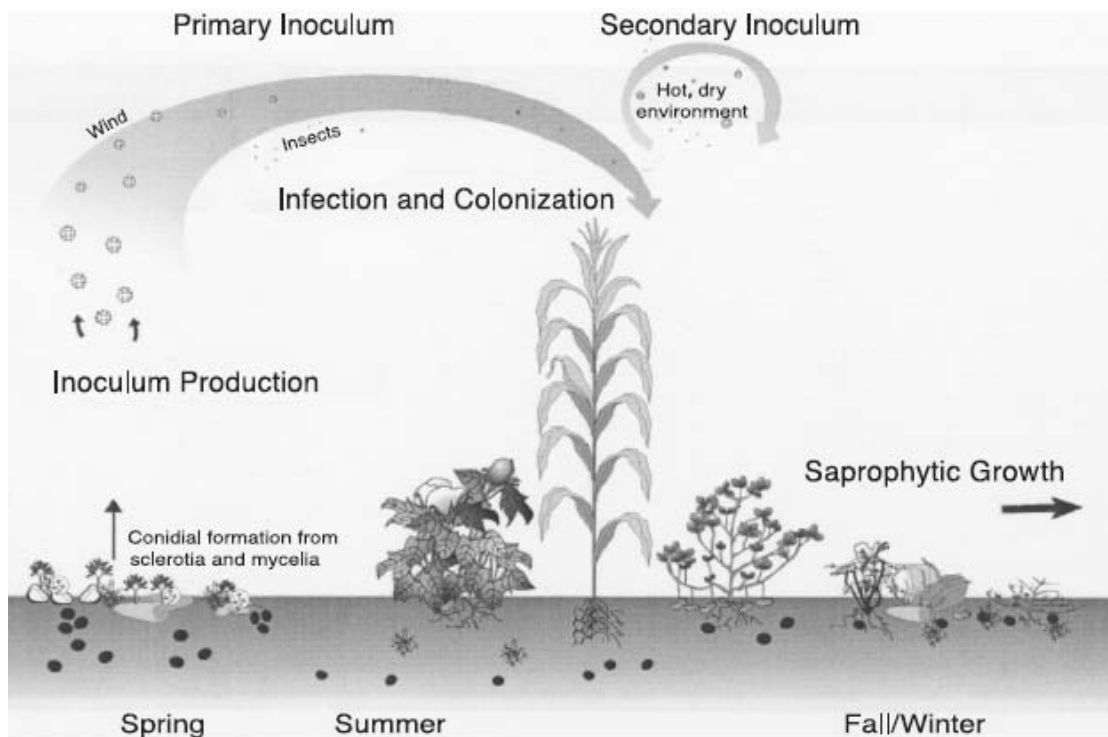
<b>Caratteristiche</b>	<b><i>A. flavus</i></b>
Sclerozi nei tessuti	Presenti
Produzione di tossine	Aflatossina produzione nei tessuti
Crescita delle ife	Crescita relativamente lenta
Infezioni polmoni	Poco comune, forme allergiche non riportate
Infezione occhi	Più comune in Sudan, India, Sri Lanka, Arabia Saudita
Infezioni cutanee	Primarie
Emboli	Riportati
Sistema immunitario	Casi riportati di immunocompetenza

**TABELLA 5:** Caratteristiche morfologiche ed epidemiologiche di *A. flavus* (*Aspergillusflavus.org*)

La via principale d'infezione nell'uomo è l'inalazione di spore fungine. La dimensione delle spore di *A. flavus*, maggiori rispetto a *fumigatus* (25µm di diametro rispetto ai 23 µm di *A. fumigatus*) favoriscono il loro deposito nelle alte vie respiratorie, determinando così sinusiti ed infezioni cutanee (Morrow, 1980). *Flavus* infatti è l'agente causale di un ampio spettro di patologie umane che possono variare da reazioni d'ipersensibilità ad infezioni invasive associate ad angioinvasione; dopo *fumigatus* è la seconda causa di aspergillosi umane invasive e non (Denning, 1998; Morgan et al., 2005).

Nei cereali, ed in particolare nel grano, l'infezione primaria è stata ampiamente descritta. Questa, poiché il fungo non possiede una fase sessuale, anche se recentemente è stata suggerita una fase sessuale (Horn B.W, et al, 2009), avviene grazie alla disseminazione e germinazione dei conidi, trasportati dal vento e dagli insetti. Il fungo colonizza la barba del granturco, cresce fino a rag-

giungere le cariossidi dove può infettare anche le cariossidi che si stanno sviluppando (Widstrom, 1996). Il modo esatto d'entrata del fungo non è noto, probabilmente invade le cellule a parete sottile nelle giunzioni fra le brattee e le rachille, nelle pannocchie all'interno delle spighe (Payne, 1998; Smart et al., 1990). Lo stress da siccità e le ferite causate dagli insetti possono determinare la rottura dei chicchi favorendo così una più facile penetrazione da parte delle ife fungine (Scheidegger, Payne, 2003). Una volta che *flavus* ha infettato i tessuti, se questi sono impropriamente conservati, continua a crescere e a produrre aflatoossina.



**FIGURA 6.** Possibile meccanismo di infezione prima della raccolta di noccioline, cotone e grano da parte di *A. flavus*. (Scheidegger and Payne, 2003)

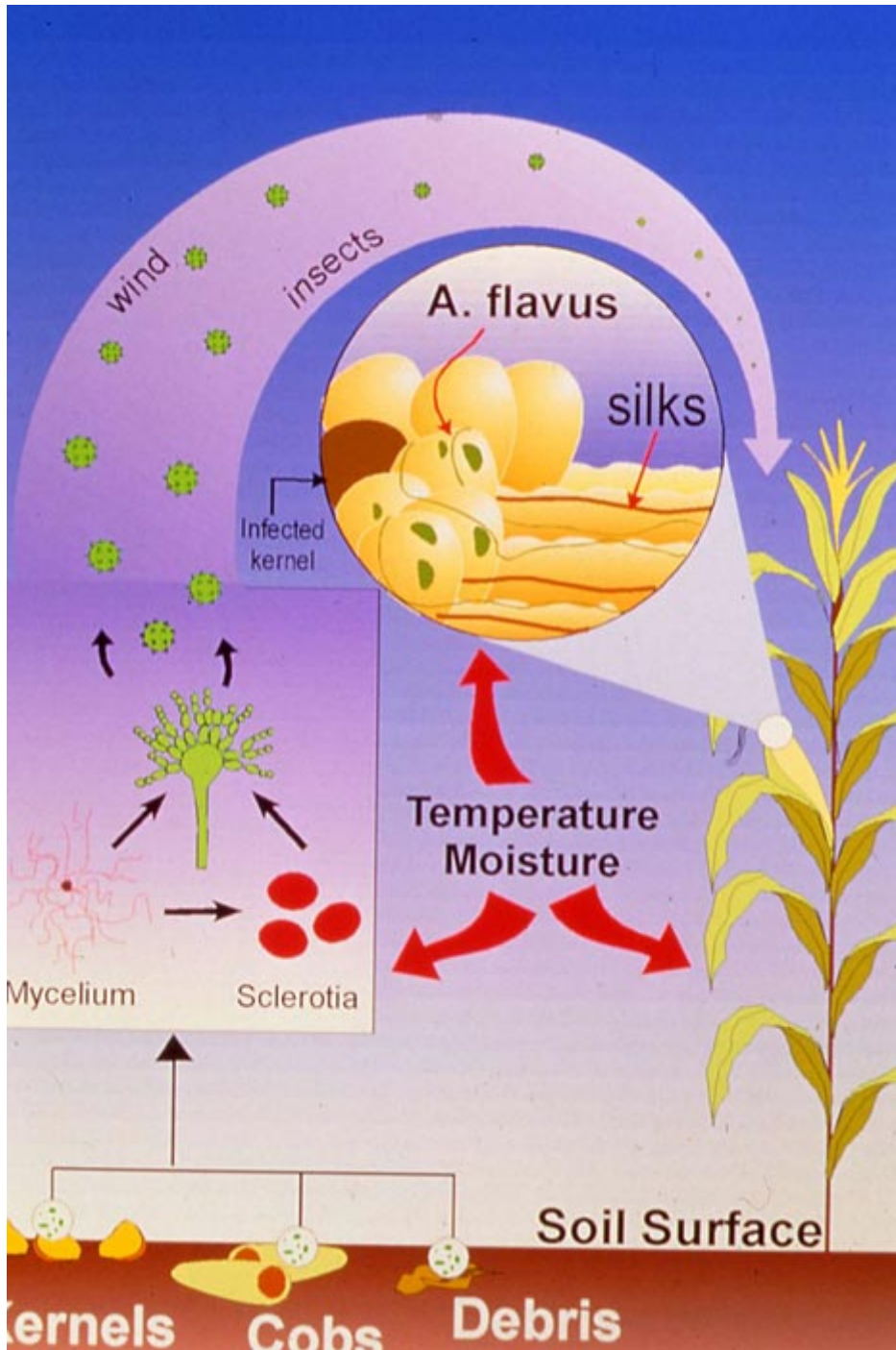


FIGURA 7: tratta da aspergillusflavus.org

Per ridurre la contaminazione, la raccolta deve avvenire a contenuti di umidità comprese fra i 25.5 e 20.0%, l'essiccazione deve essere artificiale, entro le 48

ore dalla raccolta e ad una percentuale di umidità inferiore a 15.5 % (CAST, 2003; Santin, 2005).

# AFLATOSSINA

Le aflatossine sono state isolate per la prima volta nel 1961 in farine di arachidi e noci brasiliane durante ricerche su una patologia epizootica chiamata "Turkey X" che causò la morte di oltre 100.000 tacchini in Inghilterra (Blount, W.P. 1961).

Queste sostanze sono derivati difuranocumarinici prodotti principalmente da sei specie di *Aspergillus: flavus, parasiticus, nomius*, (una specie strettamente correlata a *flavus* ma che produce sclerozi piccoli e a forma di proiettili, *flavus* invece produce sclerozi larghi e sferici) *bombici, pseudotamarii e tamari* (Goto *et al.*, 1996; Ito *et al.*, 2001; Varga *et al.*, 2003; Bennett and Klich., 2003,).

I due ceppi produttori più importanti sono *A. flavus*, e *A. parasiticus*; *flavus* è ubiquitario, preferisce le parti aeree delle piante (foglie e fiori) e produce aflatossina B; *A. parasiticus* si adatta maggiormente al suolo, ha una distribuzione più limitata e produce aflatossina B e G (EFSA, 2007).

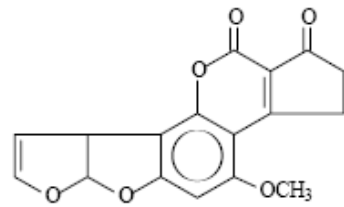
In natura esistono 4 tipi principali di aflatossina strutturalmente correlate: B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1) e G2 (AFG2). Tale nomenclatura è basata sulla loro fluorescenza quando esposte alla luce ultravioletta B = fluorescenza blu, G= fluorescenza gialla-verde (Krishnan, 2009).

Di queste l'aflatossina B1 è la più tossica e cancerogena (Eaton eand Groopman, 1994).

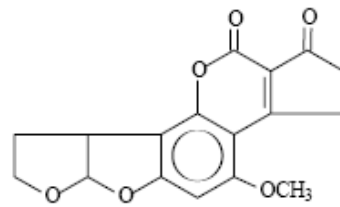
L'idrolizzazione dell'aflatossina B1 nell'uomo e negli animali determina la formazione di aflatossina M1, principale prodotto metabolico, che si ritrova nel latte o negli alimenti da esso derivati (EFSA, 2007).

Le aflatossine sono composti lievemente solubili in soluzioni acquose, solubili in solventi organici moderatamente polari e insolubili in solventi non polari. Sono instabili quando sono esposte ad agenti ossidanti, luce ultravioletta o soluzioni con pH inferiore a 3 e superiore a 10. Non vengono distrutte in condizioni

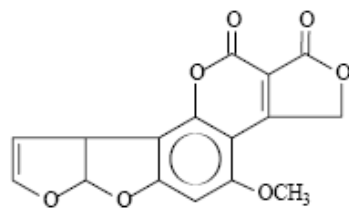
normali di cottura, mentre vengono completamente distrutte se trattate con de-coloranti o in autoclave in presenza di ammonio.



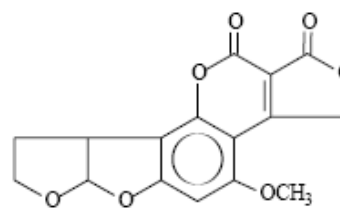
B<sub>1</sub>: C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O Mol. wt: 312.3



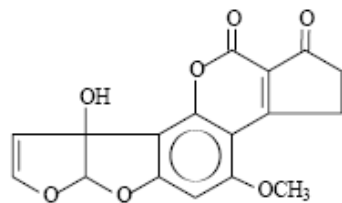
B<sub>2</sub>: C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub> Mol. wt: 314.3



G<sub>1</sub>: C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub> Mol. wt: 328.3



G<sub>2</sub>: C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub> Mol. wt: 330.3



M<sub>1</sub>: C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub> Mol. wt: 328.3

**FIGURA 7:** struttura chimica delle principali aflatossine (IARC,2002)

I fattori che determinano la produzione di aflatossina, come già citato, sono: fattori fisici quali temperatura compresa fra i 25°C e i 30 °C e umidità superiore a valori di 0.85 a<sub>w</sub>, con valore ottimale di 0.99 a<sub>w</sub>. Giorni et al. (2007) hanno dimostrato che per i ceppi italiani di *flavus* la temperatura ottimale di crescita è di 25°C; (Somapundo et al., 2007).

Un'ampia varietà di alimenti può essere contaminata da aflatossine, che si ritrovano prevalentemente in noci, arachidi, mandorle, fichi e frutta secca in genere, nelle spezie, oli vegetali crudi, semi di cacao, mais, riso, cereali, semi di cotone e coproa (polpa di noce di cocco essicata).

I livelli maggiori di aflatossina sono prodotti quando il fungo invade gli embrioni dei semi, in cui gli zuccheri semplici (glucosio e saccarosio) sono presenti in quantità elevata se confrontati con le altre parti del seme in cui sono predominanti i carboidrati.

La biosintesi dell'aflatossina è lunga e complessa, coinvolge approssimativamente 25 enzimi codificati da parte di altrettanti geni che si trovano in una regione di 70 Kb sul cromosoma 3 (Yu et al., 2004, Carbone et al., 2007). L'aflatossina è stato uno dei primi metaboliti secondari fungini in cui si è dimostrato che i geni coinvolti nella biosintesi sono raggruppati in un cluster.

Le reazioni di biosintesi e i diversi componenti sono stati determinati grazie all'utilizzo di mutanti nella biosintesi, inibitori metabolici e precursori isotopi- o radioisotopi-marcati ottenendo così l'accumulo dei diversi componenti nei diversi passaggi (Trail et al., 1995).

Per la sintesi dell'aflatossina ovvero la conversione dell'Acetil CoA nei suoi prodotti finali AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, sono necessarie 18 reazioni e più di 10 molecole di NADPH. È pertanto un processo estremamente costoso in termini energetici. Esperimenti di microarray hanno dimostrato che la biosintesi dell'aflatossina è sempre associata all'espressione del gene *af/R* che codifica per una sequenza specifica zinc-finger DNA-binding che è richiesta per l'attivazione trascrizionale della maggior parte, se non di tutti, i geni strutturali dell'aflatossina. *af/R* si lega alla sequenza palindromica 5'-TCGN<sub>5</sub>CGA-3' nella regione del promotore di 11 geni strutturali del cluster AF (Georgiana et al., 2009).

In condizioni di stress (20°C/0.99aw) la maggior parte dei geni del cluster viene indotta corrispondendo al fenotipo produzione di aflatossina (Schmidt-Heydt et al., 2009).



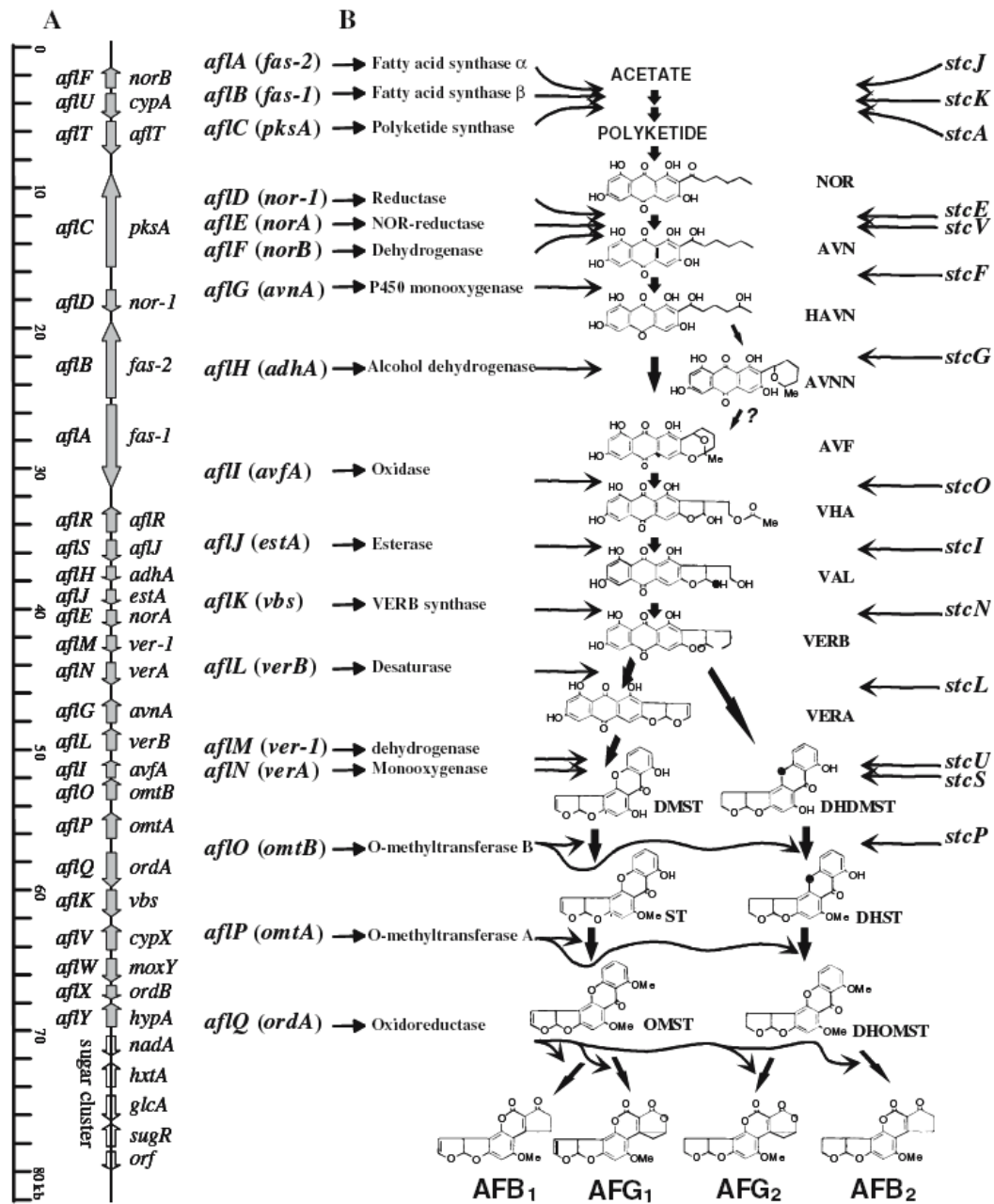


Figure 1. The gene cluster responsible for aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. (A) Clustered genes (arrows indicate the direction of gene transcription) and (B) the aflatoxin biosynthetic pathway. The ST biosynthetic pathway genes in *A. nidulans* are indicated at the right of panel B. Arrows in panel B connect the genes to the proteins they encode. Abbreviations: NOR, norsolorinic acid; AVN, averantin; HAVN, 5'-hydroxy-averantin; OAVN, oxoaverantin; AVNN, averufanin; AVF, averufin; VHA, versiconal hemiacetal acetate; VAL, versiconal; VERB, versicolorin B; VERA, versicolorin A; DMST, demethylsterigmatocystin; DHDMST, dihydrodemethylsterigmatocystin; ST, sterigmatocystin; DHST, dihydrosterigmatocystin; OMST, O-methylsterigmatocystin; DHOMST, dihydro-O-methylsterigmatocystin; AFB<sub>1</sub>, aflatoxin B<sub>1</sub>; AFB<sub>2</sub>, aflatoxin B<sub>2</sub>; AFG<sub>1</sub>, aflatoxin G<sub>1</sub>; and AFG<sub>2</sub>, aflatoxin G<sub>2</sub> [7].

Figura 8: Biosintesi dell'aflatossina (Bhatnagar, 2006)

L'attività metabolica delle aflatossine è determinata principalmente dalla presenza di un doppio legame alla posizione 8,9 della molecola che permette la

bioattivazione all'8,9-epossido reattivo, il quale si lega covalentemente al DNA con la formazione di un addotto voluminoso. Quest'addotto se non riparato può causare una mutazione sito specifica che viene riscontrata in tumori umani (Yabe K. et al., 2004).

Il metabolismo dell'aflatossina è specie specifico, estremamente diverso non solo fra le varie specie ma anche fra i singoli individui.

A causa del basso peso molecolare e delle sue proprietà lipofile il probabile meccanismo di assorbimento dell'aflatossina è la diffusione passiva; viene assorbita prevalentemente a livello intestinale e passa al torrente circolatorio dove si lega alle albumine (Yiannikouris and Jouany, 2002).

L'assorbimento nel tratto gastrointestinale è un processo estremamente rapido, l'aflatossina raggiunge il fegato attraverso il sistema portale e viene metabolizzata da parte delle mono-ossigenasi citocromo P450 (CYP)-dipendenti in reazioni che comportano l'incorporazione di un atomo o molecola di ossigeno nel substrato determinando un ulteriore incremento nella polarità che facilita i successivi processi metabolici e l'escrezione.

Solo l' AFB1, AFG1 e AFM1 possono essere bioattivate da CYPs (EFSA, 2007).

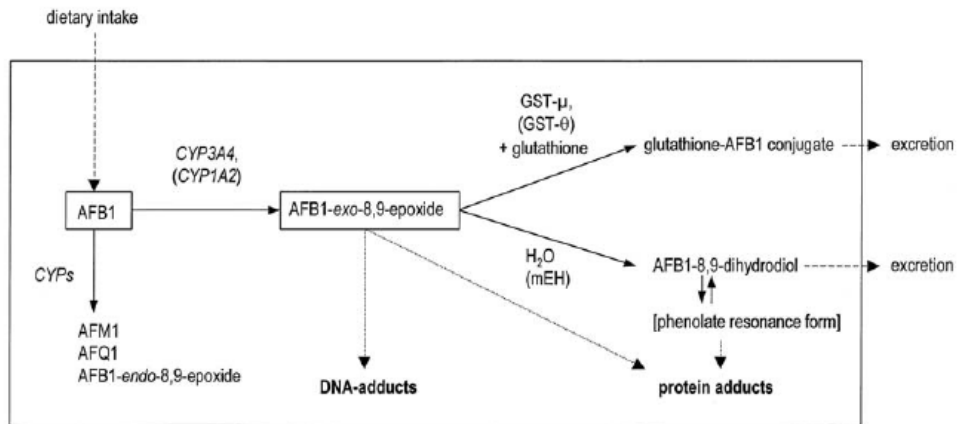
Esistono quattro vie metaboliche dell'AFB1: O-dealchilazione ad AFP1, la chetoriduzione a AFL, l'epossidazione a AFB1-8,9-epossido (altamente tossico, mutagenico e cancerogeno), e l'idrossilazione a AFM1 (altamente tossica), AFP1, AFQ1 o AFB2a (tutti relativamente non tossici) (Wu et al., 2009).

Le reazioni principali tuttavia sono l'idrossilazione, l'ossidazione e la demetilazione.

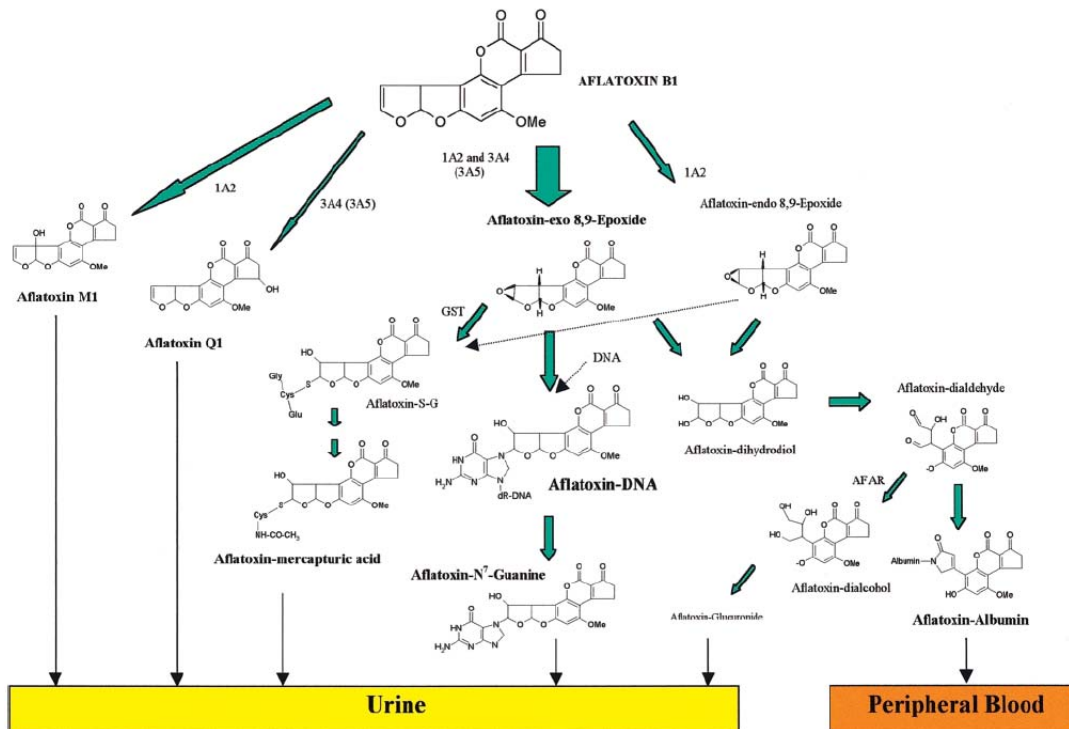
Numerosi studi in vivo sono stati eseguiti per studiare il metabolismo dell'aflatossina. In uno di questi, eseguito da Roebuck and Wogan (1977) si è potuto osservare che AFL è il principale metabolita di AFB1 nel fegato delle anatre, mentre nelle scimmie e negli umani viene convertito ad AFQ1 e AFP1.

La maggior parte dei metaboliti possono essere successivamente trasformati in altro metabolita, ad esempio AFQ1 può essere trasformato in AFH1 nel fegato.

AFM1, AFQ1 e AFP1, essendo escreti nell'urina e nella bile sono ottimi indicatori dell'esposizione all'aflatossina (Groopman et al., 1985).



**Figura 9:** rappresentazione schematica del metabolismo dell'AFB1 che sottolinea la formazione del prodotto critico AFB1-exo-8,9-epossido, il suo addotto col DNA e con le proteine e i principali metaboliti urinari. (Tiemersma et al., 2001).



**Figura 10:** vie principali del metabolismo dell'aflatossina B1 (Wild and Turner)

L'eossido 8,9 può essere in forma endo o exo, la forma exo è la più importante perché si lega prevalentemente all'atomo N<sup>7</sup> di guanina nel DNA, all'RNA e alle proteine. Il primo DNA-addotto formato a partire da 8,9-eossido è 8-9-dihydro-8-(N7-guanyl)-9-hydroxy-AFB1 (AFB1-N7-Gua) che può essere convertito in un sito apurinico (AP) oppure, in condizione di alcalinità, l'anello imidazolo di AFB1-N7-Gua può essere aperto e formare AFB1-formamidopyrimidine (AFB1-FAPY), più stabile biologicamente e chimicamente. AFB1-N7-Gua conferisce proprietà mutageniche in tutti i sistemi biologici valutati, la mutazione osservata più frequentemente è una GC→TA (frequenza di circa 74%) transversione (Smela et al., 2002; Wild et al., 2002). Tuttavia si sono osservate anche mutazioni G→C (1-3%) e G→A(13-18%) (Wild et al., 2002). Molti campioni di carcinoma epatocellulare di persone che vivono in aree dove HBV è endemico presentano una mutazione hotspot G>T alla terza posizione nel codone 249 del gene di P53 (Bedard and Massey, 2006; Smela et al., 2001).

I meccanismi di riparazione dei danni al DNA indotti dall'AFB1 non sono completamente chiariti. La riparazione per escisione dei nucleotidi (NER) gioca un ruolo fondamentale in E.Coli e nelle cellule umane. Tuttavia cellule umane deficitive di NER riparano ancora una considerevole quantità di lesioni AFB1-DNA. L'excisione di basi e la riparazione sia a livello della ricombinazione che della post-replicazione sono state suggerite come possibili meccanismi per rimuovere danni al DNA (Bedard and Massey, 2006).

Le forme reattive exo e endo-eossido sono detossificate da numerose vie metaboliche. La principale è la via della glutatione transferasi che riduce la forma exo e endo-eossido a coniugati exo e endo-eossido-GSH. (Yannikouris, A. and Jouany, J. P. 2002). Il coniugato AFB1-GSH, formato grazie all'azione catalitica di una famiglia di isoenzimi, glutatione S-transferasi, è considerato un prodotto di detossificazione e viene escreto nell'urina e nella bile. È interessante osservare che l'attività del GST è più alta di un fattore di 3-5 nelle specie animali resistenti alla cancerogenicità dell'aflatossina (es.topo) rispetto

alle specie animali suscettibili (es. ratti). L'uomo ha un'attività GST più bassa rispetto ai topi ed ai ratti, ciò suggerisce che gli umani sono meno capaci di detossificare l'aflatossina-8,9-epossido (Krishnan, et al; 2009).

Gli epossidi exo e endo possono andare incontro ad una rapida idrolisi non enzimatica ad AFB<sub>1</sub>-8,9-diidrodiolo, che successivamente subisce una lenta apertura dell'anello a ione dialdeide fenolato (Johnson et al., 1996,1997b).

L'AFB<sub>1</sub>-8,9-dihidrodiolo, ha proprietà tossiche, è instabile e subisce dei riarrangiamenti base-catalysed a dialdeide reagendo con proteine, come le albumine, ma non con il DNA.

La formazione di macromolecole addotti di AFB<sub>1</sub> dipendono dall'equilibrio tra la percentuale di produzione di AFB<sub>1</sub>-8,9-epossido, la presenza di altri metaboliti ossidativi e la percentuale di detossificazione dell'epossido stesso. L'idrolisi dell'AFB<sub>1</sub> 8,9-epossido avviene spontaneamente.

Le aflatossine si possono anche legare alle proteine, quali ad esempio le albumine; formando basi di Schiff con gruppi amminici primari quali le lisine. Questi addotti ritrovati nel siero e nell'urina, insieme ai metaboliti, sono biomarkers dell'esposizione all'aflatossina in studi epidemiologici (EFSA, 2007).

L' AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub> dialdeidi non si legano al DNA ma formano basi di Schiff con gruppi amminici primari es lisina, per formare addotti proteici quali Aflatossina-albumina (AF-alb) (Sabbioni e Wild,1991).

# AFLATOSSICOSI

Le aflatossine sono epatotossiche, cancerogene, teratogene, e mutagene (Miller and Wilson, 1994), tra queste la B1 è quella considerata maggiormente pericolosa. L'azione cancerogena e citotossica di AFB<sub>1</sub> è dovuta ai suoi epossiderivati, per l'effetto inibitorio della sintesi del DNA, con conseguente blocco della sintesi proteica, alterazione della crescita e della moltiplicazione cellulare.

La sensibilità all'AFB<sub>1</sub> è specie specifica, tuttavia dipende dall'età, dalla dose, dalla durata dell'esposizione e dallo stato nutrizionale.

Quasi tutti i vertebrati sono sensibili all'azione tossica dell'aflatossina B1 (Cassani et al., 2006).

Gli animali monogastrici sono generalmente più sensibili rispetto ai poligastrici.

I pesci d'acqua dolce, ed in particolare la trota, sono in assoluto le specie animali più sensibili. A questi seguono volatili, anatre, tacchini, polli, conigli, ratti, cani e suini. I ruminanti sono generalmente meno sensibili rispetto ai non ruminanti, in quanto l'AFB<sub>1</sub> viene detossificata dalla flora batterica ruminale in aflatossicolo.

Somministrando AFB<sub>1</sub> marcata con <sup>14</sup>C in ruminanti, galline ovaiole e polli (Sawhney et al., 1973, Harland e Cardeihac, 1975) e sopprimendo gli animali dopo 120 ore, si è potuto osservare che il fegato è l'organo contenente la quantità maggiore di aflatossina marcata, seguito dai muscoli, dai reni, dal cuore, dai polmoni e dalla milza. AFB<sub>1</sub> marcata è stata riscontrata anche ad alte concentrazioni in campioni di latte, urine e feci (Helferich W.G., et al 1986).

Nei suini il bioaccumulo di AFB<sub>1</sub> è stato dimostrato da Miller grazie all'HPLC. Campioni di fegato, rene e muscolo di animali alimentati con dosi di aflatossina di 1,2mg/kg di peso corporeo per 10 settimane, sono stati raccolti dopo 12, 24 e 72 ore dall'ingestione. Dopo 12 ore la presenza di aflatossina si poteva anco-

ra riscontrare nel fegato e nei reni ma non nei muscoli; dopo 24 ore solo nei muscoli e non negli altri organi per scomparire completamente a 72 ore.

Si può concludere che la completa rimozione delle aflatossine e dei suoi derivati dagli organi e dai tessuti si ha dopo 72 ore dalla somministrazione (Miller et al., 1982).

Gli effetti dell'aflatossina negli animali possono essere classificati come:

- aflatossicosi acuta
- aflatossicosi cronica

L'aflatossicosi acuta, comune negli animali d'allevamento, è causata dall'ingestione di abbondanti dosi di aflatossina. L'organo bersaglio principale è il fegato in cui si osservano steatosi, emorragie che portano alla necrosi. Ciò è dovuto principalmente ai metaboliti dell'aflatossina che reagiscono con le diverse proteine cellulari portando all'inibizione del metabolismo dei carboidrati, dei lipidi e della sintesi proteica. Oltre al decremento della funzionalità epatica si osserva una diminuita funzionalità del complemento, incremento del tempo di coagulazione, aumentata fragilità capillare, pigmenti di sangue nell'urina, mucose itteriche ed emorragie.

Dal punto di vista anatomo-patologico si osservano congestione ed emorragia epatica, (Yiannikouris e Jouany, 2002), necrosi periportale, proliferazione dei dotti biliari e iperplasia delle cellule ovali (Leeson et al., 1995). A livello renale e cardiaco accumulo di acidi grassi.

In animali da laboratorio l'AFB1 determina aplasia timica, ridotta funzionalità e quantità dei linfociti, soppressione dell'attività fagocitaria e del complemento (Williams et al., 2004).

Molti studi condotti in polli, suini e ratti dimostrano che l'esposizione all'aflatossina determina la soppressione della risposta immunitaria cellulo-mediata (EFSA, 2007). Le azioni immunotossiche si possono riassumere in un processo di immunodepressione che coinvolge sia la risposta immunitaria cellulare che quella umorale, con accelerazione involutiva del timo, perdita di timociti corticali, di linfociti TCD4, limitazione nella risposta cellulo-mediata, riduzione dell'attività motoria e fagocitaria di monociti e di granulociti, indebolimento della funzione del complemento (C4), minor produzione di  $\gamma$ -interferone, di IL-2 e di IgG e IgA ma non di IgM, decremento della risposta linfoproliferativa a fitogeni e scarsa efficienza nella produzione di anioni superossido dopo stimolazione dei monociti (Cabassi et al., 2006, Williams et al., 2004; Pier 1986; Reddy et al. 1987; Richard et al. 1978).

Studi epidemiologici, clinici e sperimentali hanno evidenziato che l'esposizione a dosi elevate di aflatossina può causare tossicità acuta e morte entro poche ore o giorni, a causa delle gravi lesioni epatiche (Yiannikouris e Jouany, 2002).

L'esposizione a dosi basse o moderate di aflatossina per lungo tempo determina avvelenamento cronico da aflatossina e gli effetti sono riconducibili a danni epatici, immunosoppressione e cancerogenità (Groopmann et al., 1999).

Il segno più evidente di aflatossicosi cronica è la ridotta percentuale di crescita degli animali giovani, anoressia, ittero, depressione, perdita di peso, riniti, infezioni gastrointestinali, emorragie, ascite ed edema polmonare, rigonfiamento della cistifellea, proliferazione dei dotti biliari e lesioni renali, rilascio degli enzimi aspartato-aminotransferasi (AST), gamma-glutamilttransferasi (GGT) e alcalino-fosfatasi (ALP) nel sangue.



In uccelli, trote, maiali e pecore l'esposizione a lungo termine a concentrazioni relativamente basse di AF determina fibrosi epatica ed epatocarcinomi (Ottinger et al. 2000).

Studi condotti in polli, maiali e ratti, mostrano anche una diminuzione della risposta immunitaria cellulo-mediata (Pier et al. 1985b; Silvotti, Cabassi et al. 1997), involuzione della borsa di Fabrizio, soppressione della linfoblastogenesi (Dietert et al. 1985; Giambone et al. 1978), una rapida diminuzione del numero di CD4 splenici (T helper) e produzione di interleuchina 2 (IL-2) (Hatori et al. 1991).

L'intossicazione cronica è più frequente in natura rispetto a quella acuta.

La trota in assoluto è la specie più sensibile all'azione cancerogena, infatti la somministrazione di 0.004 ppm provoca lesioni cancerose a livello epatico in 5 giorni.

I ruminanti, come già detto, sono in grado di sopportare elevati livelli di AF rispetto ai monogastrici, probabilmente grazie ad una maggiore efficacia dei sistemi di detossificazione GSH-dipendenti e alla parziale demolizione di AF da parte della flora ruminale; tuttavia, nel caso di dosaggi elevati o di bassi dosaggi assunti per lunghi periodi, possono comparire sintomi aspecifici. I sintomi segnalati nel caso di aflatossicosi nelle bovine sono: calo della produzione di latte, ridotta ingestione di alimento, alterazione della funzionalità ruminale, sintomi gastroenterici, lesioni epatiche, patologie podali, pelo opaco (Cook *et al.* 1986; Diekman *et al.* 1992) e riduzione delle difese immunitarie degli animali con conseguente minore resistenza nei confronti degli agenti patogeni e quindi maggior facilità nello sviluppare infezioni quali mastiti e metriti (Pier *et al.* 1985a; Pier *et al.* 1986; Pier 1992).

Nei ruminanti, la frazione di AFB1 assorbita viene metabolizzata nel fegato, trasformandosi prevalentemente in AFM1 che entra nella circolazione sistemica o, coniugata ad acido glucuronico, viene successivamente escreta con la bile. L'AFM1 circolante può essere escreta attraverso i reni o comparire nel latte. La

percentuale di passaggio (carry-over) dell'AFB1 che si ritrova nel latte è stata stimata in percentuali variabili dallo 0,3% al 6,2%; i valori più frequenti sono 1-3%, con una notevole variabilità individuale influenzata giorno per giorno, da un prelievo di latte all'altro, dallo stato della lattazione (ad inizio lattazione il carry-over può essere 3,5 volte superiore rispetto a quello di animali a fine lattazione) e dallo stato sanitario della mammella (in presenza di mastite la percentuale di carry-over aumenta) (Van Egmond, 1989).

Prove sperimentali hanno verificato che nel bovino, in seguito a somministrazione unica di AFB1 nella razione, l'escrezione di AFM1 nel latte inizia circa 12 ore dopo, raggiunge il massimo dopo circa 24-36 ore, successivamente inizia a decrescere fino ad azzerarsi dopo circa 4 giorni. L'ovino mostra una capacità di degradare l'AFB1 superiore rispetto al bovino: il carry-over appare più basso (0,11%) e l'escrezione di AFM1 nel latte si azzerava in 3 giorni (96 ore dopo somministrazione unica di una dose elevata di AFB1) (Pietri,2003).

La dose letale media di AFB1 in animali può differenziarsi anche di due ordini di grandezza; specie sensibili, come i conigli e le anatre, presentano una bassa dose letale media (0,3 mg/kg), mentre polli (18 mg/kg) e ratti sono caratterizzati da una maggiore tolleranza (EFSA, 2007).

<b>SPECIE</b>	<b>DL50 espresso in mg/Kg per os per una singola somministrazione</b>
Coniglio	0,3
Trota	0,3
Anatroccolo	0,35
Gatto	0,55
Tacchino	0,4-0,6
Cane	0,5-1
Suini appena svezzati	0,62
Pulcino	1-1,5
Gallina ovaioia	0,2-1
Ratto	5-8

**Tabella 6:** DL50 in diverse specie (Pompa, 1994)

## Aflatossicosi nel suino

La sintomatologia acuta non è molto frequente nel suino e la sua gravità è legata alla durata dell'esposizione e all'età dell'animale. L'assorbimento e la cinetica dell'escrezione dell'aflatossina è simile alle altre specie. Luthy et al. (1980), esaminando l'assorbimento e la percentuale di escrezione dell'AFB<sub>1</sub> a seguito della somministrazione orale di AFB<sub>1</sub> marcata con <sup>14</sup>C, hanno dimostrato che l'aflatossina viene completamente metabolizzata. L'escrezione fecale ammonta al 58% della dose dopo 9 giorni, la parte recuperata nell'urina risulta inferiore al 15% della dose ingerita. La radioattività nei tessuti è principalmente a livello del fegato e, in parte minore, dei reni (Trucksess *et al.* 1982). Negli animali alimentati con cibi contaminati fino alla macellazione l'AFB<sub>1</sub> si ritrova nei tessuti. In particolare, AFB<sub>1</sub> e AFM<sub>1</sub> nel fegato, AFM<sub>1</sub> nel rene e solo piccole tracce di AFB<sub>1</sub> nei muscoli.

Se gli animali, precedentemente alimentati con mangime contaminato, sono sottoposti ad una dieta priva di AF nelle 24 ore prima della macellazione non si ritrovano più AF nei muscoli (Trucksess *et al.* 1982).

I sintomi più comuni associati all'intossicazione acuta o subacuta sono anoressia, depressione, rifiuto del cibo, riduzione del peso corporeo, ittero e alterazione della coagulabilità del sangue (Zaghini A., 2005).

Le lesioni principali osservate sono simili a quelle presentate dalle altre specie animali ossia danno epatico ed emorragie. Il fegato è l'organo più colpito: a livello macroscopico si presenta di colore nocciola chiaro con emorragie centrolobulari e perilobulari, necrosi prevalentemente centrolobulare, vacuolizzazione degli epatociti e degenerazione grassa, aumento di volume degli epatociti e dei loro nuclei, fibrosi, iperplasia dei dotti biliari, accumulo di pigmento biliare negli epatociti. Se l'intossicazione progredisce il fegato assume un colore gial-

lastro e sviluppa fibrosi. Nella sottomucosa intestinale si osservano emorragie petecchiali. (Harvey et al., 1988, Harvey et al., 1989).

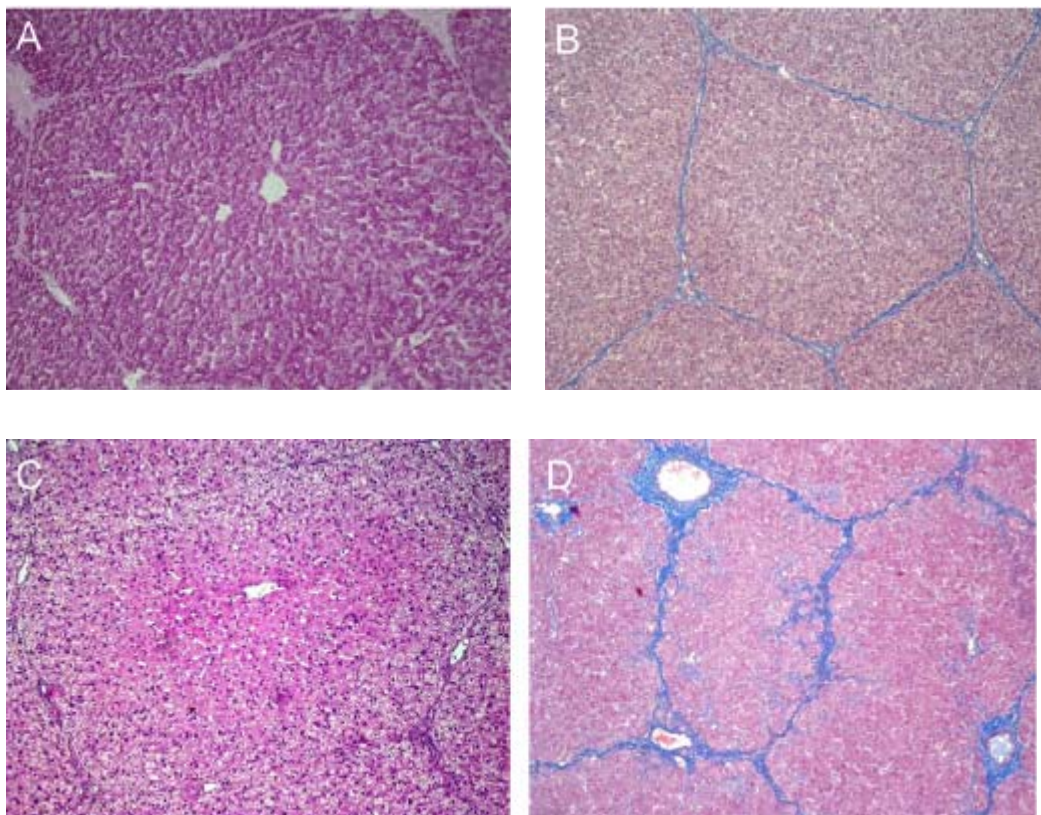
Nel rene si osserva steatosi e macrocariosi delle cellule epiteliali dei tubuli contorti distali.

A basse dosi, AFB<sub>1</sub> non sembra avere effetti sui globuli rossi e sui linfociti né provocare alterazioni delle proteine ematiche (albumina).

A dosi elevate (280 ppb), tende ad alterare la performance del suino, con riduzione del peso del 17% ed incremento della gamma-globulinemia (Marin *et al.* 2002) e diminuzione delle risposte immunitarie soprattutto linfociti e macrofagi (Miller *et al.* 1981; Silvotti, Cabassi *et al.* 1997). In studi effettuati su suini svezzati di 6-7 kg, la somministrazione orale di AFB<sub>1</sub>, determina epatomegalia, congestione e raramente emorragie petecchiali; negli animali sopravvissuti oltre le 24 ore si sono riscontrate ascite ed idrotorace. La cistifellea è risultata edematosa e la mucosa presenta emorragie petecchiali. A livello microscopico nel fegato si sono osservate necrosi centrolobulari, steatosi ed emorragie. Nei casi subacuti la necrosi degli epatociti è meno pronunciata e si osserva proliferazione dei dotti biliari. Dopo 28 giorni di esposizione a 385 o 867 µg AFB<sub>1</sub>/Kg di mangime suinetti di 3 settimane presentavano un basso ma non significativo decremento dell'aumento del peso corporeo rispetto ai suinetti controllo (rispettivamente 90 % e 82%). I suinetti esposti a 1807 µg di AFB<sub>1</sub>/Kg di mangime, sempre di 3 settimane, hanno mostrato un aumento del peso corporeo significativamente inferiore (53% del controllo). All'esame autoptico negli animali controllo e in quelli esposti a 385 µg AFB<sub>1</sub>/Kg di mangime il fegato si presentava di colore rosso scuro. Il fegato di un suinetto esposto a 867 µg di AFB<sub>1</sub>/Kg di mangime all'esame macroscopico presentava una colorazione variegata. Il fegato di due suinetti esposti a 1807 µg di AFB<sub>1</sub>/Kg di mangime mostrava una colorazione variegata e in altri tre animali fenomeni degenerativi con una colorazione giallastra del parenchima epatico e un pronunciato pattern lobulare.

All'analisi istologica i fegati degli animali controllo e tre di quelli esposti a 385 µg AFB<sub>1</sub>/Kg di alimento non evidenziavano aumento del connettivo interstiziale

ma presentavano una maggior quantità di glicogeno (figura 11 A e B). In due animali esposti a 385 µg di AFB1/Kg di mangime, in tutti quelli esposti a 867 µg AFB1/Kg di alimento e in due esposti a 1807 µg di AFB1/Kg di mangime gli epatociti si presentavano rigonfi, con macrocariosi e vacuolizzazione delle cellule macrofagiche fisse del parenchima epatico (figura 11 C). In tre animali alimentati con 1807 µg di AFB1/Kg di mangime la tricromica di Masson evidenzia fibrosi soprattutto a livello di spazi periportali (figura 11, D) (Meissonnier G.M., 2007).



**Figura 11:** (A) Fegato suinetto controllo, evidente sovraccarico di glicogeno, (Pas 10X); (B) Fegato suino esposto a 385 µg AFB1/Kg mangime, il tessuto connettivo perilobulare appare nella norma, (tricromica di Masson 10X) (C): fegato di un suinetto esposto a 867 µg AFB1 /Kg di mangime: nelle zone periferiche del lobulo si osservano epatociti rigonfi con rarefazione del citoplasma (EE 10X). (D): fegato di un suinetto esposto a 1807 µg AFB1/Kg di mangime, fibrosi della zona periportale e aumento del connettivo interstiziale (EE 10X) (Meissonnier G.M., 2007)

In suinetti all'ingrasso nati da scrofe allevate in condizioni di aflatossicosi cronica da AFB1 e AFG1, realizzata mediante contaminazione dei mangimi nei periodi di gestazione e lattazione, si sono osservate una minore velocità di cre-

scita e un minore accrescimento ponderale. Si è osservata anche una diminuzione delle prestazioni produttive, più marcata a seguito di somministrazione contemporanea di AFB1 e AFG1 (Bonomi et al. 1997).

In suinetti lattanti (circa 10 kg di peso) esposti a 140 ppb e 20 ppb di AFB1 per 4 settimane, la funzione immunitaria umorale e cellulare è risultata alterata, con riduzione della risposta immunitaria primaria e secondaria (Marin et al. 2002). Gli effetti immusoppressivi di AFB1 si sono mostrati trasferibili attraverso la placenta suina arrivando ad interessare il feto (Pier et al. 1985b).

E' stata osservata una diminuzione dell'incremento ponderale "dose-dipendente" in suinetti esposti a 140 e 280 ppb di AF (Marin et al. 2002; Shane 1994).

Bonomi et al. non hanno evidenziato comparsa di alterazioni cliniche in scrofe alimentate per 60 giorni dal parto, con mangime contaminato da aflatossine B1 e G1 a dosaggi complessivi di 650 e 800 ppb, ma la tossicosi ha influenzato negativamente le prestazioni produttive degli animali, diminuendo l'incremento ponderale, il consumo di alimento, il numero di suinetti vivi rispetto a quelli nati morti ed il peso alla nascita. I suinetti nati da scrofe trattate manifestavano alterazioni a livello epatico, renale e gastroenterico, con aumento del tasso di mortalità rispetto ai controlli (Bonomi, 1999).

Ricerche condotte su scrofe gravide intossicate con AFB1 e AFG1 singolarmente impiegate (800ppb) o in associazione (400ppb AFB1 e 400ppb AFG1), hanno evidenziato alterazioni nei parametri immunitari. Nei suinetti nati da scrofe intossicate da AFB1 si sono evidenziate deficienze di Zn plasmatico (Moccheggiani et al., 1998). In indagini sperimentali condotte su scrofe gravide per valutare la risposta immunitaria cellulo-mediata in corso di supplementazione di vitamina A e E ad un mangime contaminato da 300 ppb di AFB1, somministrato durante la gravidanza e la lattazione le scrofe intossicate, senza somministrazione vitaminica, presentavano un andamento decrescente dei linfociti T helper, con un incremento della risposta al protrarsi dell'intossicazione, fenomeni di degenerazione vacuolare nel fegato, aumento del connettivo peri-

lobulare, una moderata deplezione dei linfociti nei noduli linfatici splenici e linfonodali. In suinetti nati da scrofe intossicate con aflatossine con e senza supplementazione di vitamine A ed E in gravidanza e lattazione, non si sono osservate differenze significative nella risposta immunitaria, durante le prime settimane d'intossicazione. Con il protrarsi dell'intossicazione si sono rilevati quadri di significativa riduzione numerica e percentuale dei linfociti T CD4 e CD8, CD21 e CD $\gamma$  $\delta$ , dato dall'assunzione crescente di aflatossina M1 e M2, mediante il latte materno contaminato, senza trarre alcun beneficio dalla supplementazione vitaminica materna (Luppi, et al., 2002).

Le aflatossine diminuiscono anche la resistenza alle patologie batteriche, fungine, virali e parassitarie nei suini, interferendo col sistema immunitario umorale e cellulo-mediato. In aggiunta le vaccinazioni nei confronti di diversi agenti patogeni sono meno efficienti nei suini esposti alle aflatossine (Diekman et al., 1992).

L'apparato respiratorio del suino mostra una sensibilità spiccata nei confronti di AFB1 e, in uno studio condotto in vitro, è stata dimostrata una maggior capacità della mucosa olfattiva e respiratoria di bioattivare AFB1, rispetto al fegato (Larsson et al. 1996).

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

**Tabella 7:** Sintomi clinici da Aflatossicosi nel suino (Osweiler, 1999)



## Aflatossicosi umane

La comparsa di aflatossicosi umane è stata recentemente osservata nelle zone quali il Kenia e l'Africa dell'est, dove la contaminazione e la successiva ingestione di cibo contaminato è elevata (Horn B.W, et al, 2009).

In queste zone più del 50% dei carcinomi epatocellulari (HCC) sono caratterizzati da una specifica mutazione puntiforme AGG a AGT (arg→ser) nel codone 249<sup>ser</sup> del gene soppressore tumorale TP53 (codon 249<sup>ser</sup> mutation) (E-FSA,2007; Wild C.P., 2009;). È stato suggerito che il cibo altamente contaminato con la micotossina AFB1, potente tossina epatica, cancerogena e mutagena in prove sperimentali, può essere una concausa del carcinoma (Denisenko et al., 1999).

Numerosi studi condotti in Asia e Africa, in cui si sono utilizzati dei biomarkers (metaboliti dell'aflatossina nell'urina, addotti aflatossina-albumina nel sangue o mutazioni del codone 249<sup>ser</sup>) hanno dimostrato una stretta correlazione AFB1 e HCC.

Numerosi studi, come riportato in tabella, mostrano una correlazione positiva fra l'esposizione all'aflatossina e la proporzione di HCC con la mutazione 249<sup>ser</sup>.

In aree geografiche dove l'esposizione all'aflatossina è alta, ad esempio in Cina, la mutazione 249<sup>ser</sup> è stata osservata in più del 50% dei casi di HCC; in regioni in cui l'esposizione è bassa è del 10%, mentre in regioni geografiche dove l'esposizione è estremamente bassa (Europa e Nord America) è inferiore all'1% (Wild et al, 2009; Chen T, 2009).

Region	HCC cases	No. of TP53 codon	Per cent 249 <sup>Arg</sup> →Ser	Reference
China				
Beijing	9	0	0	Fujimoto <i>et al.</i> (1994)
Guanxi	50	18	36	Stern <i>et al.</i> (2001)
Jiang-Su North	15	1	7	Shimuzu <i>et al.</i> (1999)
Jiang-Su South	16	9	56	Shimuzu <i>et al.</i> (1999)
Qidong	81	43	53	Scorsone <i>et al.</i> (1992); Li,D. <i>et al.</i> (1993); Fujimoto <i>et al.</i> (1994)
Shanghai	40	6	12	Buetow <i>et al.</i> (1992); Li,D. <i>et al.</i> (1993); Wong <i>et al.</i> (2000)
Tongan	21	7	33	Yang <i>et al.</i> (1997)
Xian	45	1	2	Buetow <i>et al.</i> (1992)
Hong Kong	56	5	9	Ng <i>et al.</i> (1994a,b); Wong <i>et al.</i> (2000)
Other Asian				
Taiwan	15	0	0	Oda <i>et al.</i> (1992); Hosono <i>et al.</i> (1993)
Japan	463	4	<1	Murakami <i>et al.</i> (1991); Buetow <i>et al.</i> (1992); Oda <i>et al.</i> (1992); Hayashi <i>et al.</i> (1993); Konishi <i>et al.</i> (1993); Nishida <i>et al.</i> (1993); Nose <i>et al.</i> (1993); Tanaka <i>et al.</i> (1993); Teramoto <i>et al.</i> (1994); Hsieh <i>et al.</i> (1995); Wong <i>et al.</i> (2000)
Indonesia	4	1	25	Oda <i>et al.</i> (1992)
Korea	41	0	0	Oda <i>et al.</i> (1992); Park,Y.M. <i>et al.</i> (1996)
Singapore	44	0	0	Shi <i>et al.</i> (1995)
India	21	2	10	Katiyar <i>et al.</i> (2000)
Africa				
Southern Africa	22	4	18	Bressac <i>et al.</i> (1991); Ozturk <i>et al.</i> (1991)
Senegal	15	10	67	Coursaget <i>et al.</i> (1993)
Mozambique	15	8	53	Ozturk <i>et al.</i> (1991)
Europe				
UK	189	1?	<1	Challen <i>et al.</i> (1992); Vautier <i>et al.</i> (1999)
France	100	2	2	Laurent-Puig <i>et al.</i> (2001)
Germany	33	0	0	Kress <i>et al.</i> (1992); Kubicka <i>et al.</i> (1995)
Italy	20	0	0	Bourdon <i>et al.</i> (1995)
Spain	70	0	0	Boix-Ferrero <i>et al.</i> (1999)
America				
USA	48	0	0	Buetow <i>et al.</i> (1992); DeBenedetti <i>et al.</i> (1995); Kazachkov <i>et al.</i> (1996); Wong <i>et al.</i> (2000)
Mexico	16	3	19	Soini <i>et al.</i> (1996)

**Tabella 8:** Correlazione fra HCC e mutazione 249<sup>ser</sup> (Wild and Turner)

Studi sperimentali hanno evidenziato che a differenza di HCC umano, nelle anatre e nei ratti, non si osserva la mutazione G→T nel codone 249. I due limiti principali di questo confronto sono le differenze della sequenza del DNA nelle diverse specie e il numero molto limitato di tumori analizzati. Nelle anatre, ad esempio, nessuna mutazione si può osservare al codone 249, tuttavia se vi fosse, sarebbe una mutazione silente (Wild and Turner, 2009).

**Table II.** *p53* mutations in animal tumors at codon 249 or equivalent

Species	Nucleotide sequence comparison <sup>a</sup>			Prevalence of codon 249 mutation	Reference
	248	249	250		
Human	CGG	AGG	CCC	See Table I	
Monkey	CGC	AGG	CCC	0/4	Fujimoto <i>et al.</i> (1992)
Rat hyperplastic nodules	CGC	CGG	CCC	0/6	Hulla <i>et al.</i> (1993)
Rat focal lesions and tumours				1/17	Lee <i>et al.</i> (1998)
Woodchuck	CGA	CGG	CCC	0/8	Rivkina <i>et al.</i> (1996)
Ground squirrel	CGC	CGG	CCC	0/7	Rivkina <i>et al.</i> (1994)
Duck	CGT	CGC	CCA	0/15	Duflot <i>et al.</i> (1994)
Tree shrew	CGG	CGC	CCC	0/5	Park,U.S. <i>et al.</i> (2000)
Mouse	CGC	CGA	CCC		

<sup>a</sup>The *p53* gene codon numbering refers to the human *p53* gene equivalent.

**Tabella 9:** mutazioni corrispondenti alla mutazione 249<sup>ser</sup> (Wild and Turner)

In molti paesi in via di sviluppo le epidemie da HBV e HCV possono interessare circa il 20% della popolazione. Studi epidemiologici indicano che l'aflatossina B1 riveste un ruolo sinergico con il virus dell'epatite B nella formazione di molti carcinomi epatocellulari.

La carcinogenicità della tossina è mediata in parte dalle proprietà mutageniche dei suoi addotti AFB1-DNA. L'esposizione a HBV da solo, senza altri fattori di rischio, incrementa la possibilità di sviluppare HCC (carcinoma epatocellulare); per individui positivi a HBV e ad alto rischio di esposizione all'aflatossina la probabilità di sviluppare HCC è maggiore. Alcuni studi testimoniano che persone che vivono in aree in cui la potenziale esposizione ad AFB1 è alta la possibilità di sviluppare HCC è di 3 volte maggiore rispetto a persone che non si trovano nella stessa condizione (Groopman 1994; Henry et al. 2002).

In alcune aree geografiche dove la contaminazione da AF e infezione con HBV si manifestano insieme, gli epatomi risultano la forma prevalente di cancro, tanto che in Qidong (Cina) il 10% di tutte le morti di adulti risulta riferibile a HCC (Wang et al. 1996). Un fattore significativo determinante la maggiore tossicità di AF in pazienti HBV positivi è dato dal fatto che l'infezione virale riduce la capacità individuale di detossificare AF (Allen et al. 1992). L'infezione cronica HBV da è considerata generalmente insufficiente a determinare la mutazione 249<sup>ser</sup>.

Le prove di immunosoppressione in vivo da parte di AF nell'uomo sono limitate ed incerte. Gli studi disponibili di esposizione umana si basano generalmente

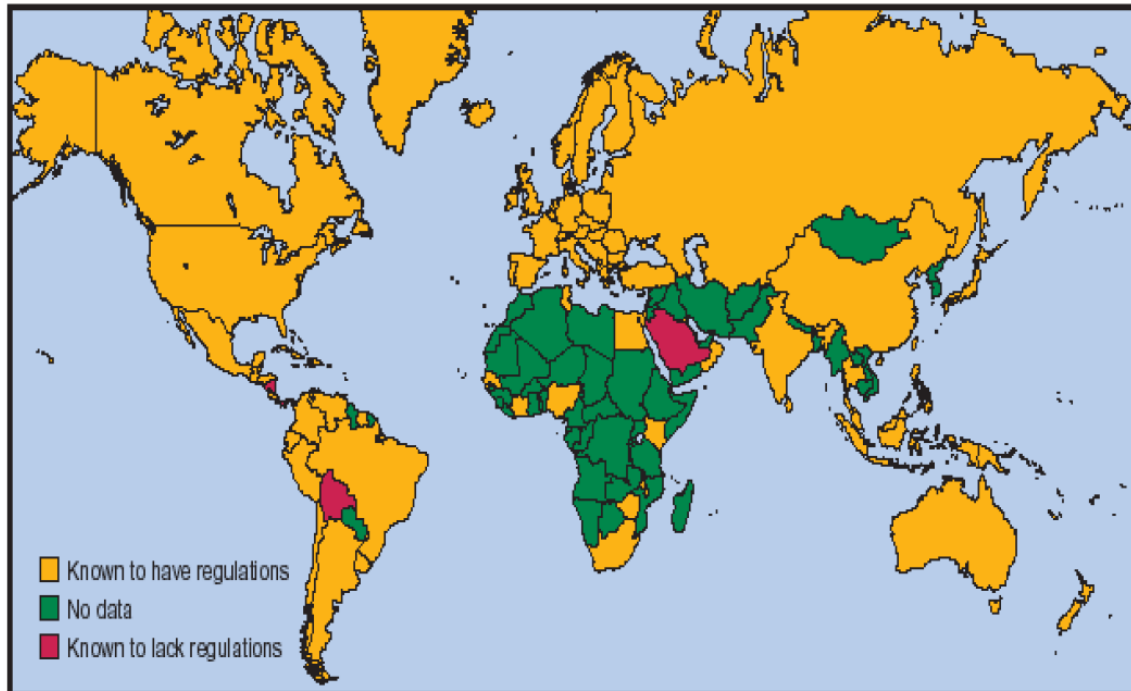
sulla determinazione della concentrazione di addotti AFB<sub>1</sub>-albumina, riflesso di un'esposizione a lungo termine. In relazione alla tossicologia di AF e al recupero dei processi cellulari entro pochi giorni dall'esposizione, tali addotti possono non essere rappresentativi dell'esposizione per variazioni di funzioni immunitarie (Roebuck et al. 1994). Nel 93% di bambini del Gambia sono state osservate alterazioni dell'immunità in funzione di addotti AFB<sub>1</sub>-albumina, la cui concentrazione risultava significativamente influenzata dal mese di campionamento. In un'analisi multivariata, le IgAs sono risultate significativamente ridotte in bambini con concentrazioni determinabili di addotti AFB<sub>1</sub>-albumina rispetto a quelli con concentrazioni indeterminabili (Turner et al. 2003). In un precedente studio, sempre in Gambia, non è stata osservata alcuna evidente relazione tra concentrazione di AF-albumina e risposte anticorpale o linfoproliferativa in vitro nei confronti di malaria (Allen et al. 1992). Tuttavia, utilizzando il modello topo-*Plasmodium berghei*, è stato dimostrato che AF diminuisce la morbilità, a causa di un suo effetto diretto sul parassita (Young et al. 1988). Diverse componenti e funzioni del sistema immunitario cellulo-mediato risultano significativamente depressi in abitanti Ganesi con concentrazioni di AF-albumina al di sopra della media (0,80 pmol/ mg) per la popolazione, rispetto a controlli al di sotto della media (Williams et al. 2004).

L' AFB<sub>1</sub> può danneggiare l'integrità delle membrane cellulari grazie alla stimolazione dei fosfolipidi A<sub>2</sub> e perossidazione nelle cellule. Shen ed i suoi collaboratori hanno anche dimostrato che l' AFB<sub>1</sub> può indurre la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), la perossidazione lipidica e l'ossidazione del DNA, in vivo ed in vitro (Costa S., et al., 2006)

L'aflatossina attraversa la placenta e gli addotti sono stati identificati nel cordone ombelicale dei bambini appena nati in Gambia. In questo contesto è interessante notare che CYP3A7 è il principale citocromo P450 nel fegato fetale umano. Nel Regno Unito, si è osservato che negli eroinomani l' Aflatossina B1 contenuta nell'eroina iniettata intravena bypassa i meccanismi di detossificazione del fegato, risultando nell'esposizione sistemica diretta. Campioni di urina di eroinomani del Regno Unito e dell'Olanda hanno rivelato una proporzione

maggiore di campioni contaminati con aflatossine B1,B2,M1 e M2 e aflatossicolo (20%) rispetto a quelli di volontari adulti sani (2%). In particolare l'aflatossina B1 è stata trovata a concentrazioni più basse nel gruppo di volontari sani. (Peraica, M., 1999).

# LEGISLAZIONE



**Figura12:** Paesi in cui è nota una regolamentazione delle micotossine nel cibo (gialli), in cui non si conosce se esiste una regolamentazione (verde), paesi in cui non esiste una regolamentazione (rossi) (FAO, 1997)

Le micotossine sono un problema di portata mondiale, l'Unione Europea si è dotata di una specifica legislazione per regolamentare la presenza di micotossine negli alimenti.

A partire dal 1 gennaio 1999, sono stati fissati livelli massimi di Aflatossina negli alimenti, stabiliti nell'Annex, Section 2 della Commission Regulation (EC) No 1881/2006 del 16 dicembre 2006 (EFSA, 2007).

Le regolamentazioni per l'aflatossina nei diversi Paesi sono spesso dettagliate e specifiche per molte derrate alimentari; per quanto riguarda l'AFB1, i livelli accettati, nel cibo, a livello mondiale sono compresi in un range da 1 a 20  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  (tabella 10).

Nel 2003 il limite massimo in vigore in Europa era di 2 µg/Kg, in continenti quali l'Africa, Asia/Oceania, America Latina era 5 µg/Kg. In altre aree geografiche, si veda ad esempio gli Stati Uniti ed il Canada, non erano previsti limiti massimi separati per AFB1.

Sono stati fissati anche i livelli massimi per la presenza totale di più tipi di aflatossina, B1,B2,G1,G2 nelle arachidi, noci, frutta secca, diverse specie di spezie e cereali, inclusi grano saraceno e prodotti o ingredienti per il consumo umano.

Per quanto riguarda la somma delle aflatossine B1,B2,G1 e G2, i livelli accettati a livello mondiale sono compresi fra valori di 0 e 35 µg/Kg (tabella 11).

Poiché l'AFB1 viene metabolizzata in AFM1 negli animali che hanno consumato alimenti contaminati il Regolamento CE n. 466/2001 ha fissato un limite massimo ammissibile per l'aflatossina M1 nel latte paria a 0,05 microgrammi/litro (o kg) (per latte crudo, latte destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte e latte alimentare trattato termicamente). Nei derivati del latte il tenore massimo e' quello indicato (0,05 microgrammi/kg) negli alimenti per la prima infanzia, la Circolare del Ministero della Sanità del 09/06/1999 - pubblicata sulla GU 135/1999 - indica un valore limite per l'aflatossina M1 pari a 0,01 microgrammi/kg (tabella 9).

La UE ha imposto dei limiti precisi anche negli alimenti animali (Direttiva 2002/32/CE del 7 maggio 2002) (tabella 12).

## LIMITE AFLATOSSINE NEI PRODOTTI CHE INTERESSANO I CEREALI

MATRICE ALIMENTARE	AFB1 (µG/KG)	AFBTOT (µG/KG)	AFM1 (µG/KG)
Cereali non lavorati (compreso riso e grano saraceno)			
Cereali e relativi prodotti della lavorazione destinati al consumo umano diretto o all'impiego come ingrediente di derrate alimentari	2,0 (a)	4,0 (a)	
Cereali (compreso grano saraceno, Fagopirum sp) destinato alla cernita o ad altri trattamenti fisici prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di derrate alimentari	2,0 (a)	4,0 (a)	
Granoturco da essere sottoposto a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di derrate alimentari	5,0 (a)	10,0 (a)	
Alimenti per l'infanzia e alimenti dietetici speciali (compreso il latte)	0,10 (b)	0,1 (c)	0,1 (c), 0,025 (b)
Latte (latte crudo, latte destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte e latte trattato termicamente)			0,05 (a)

**Tabella 10:** limite aflatoSSine nei prodotti che interessano i cereali. (Regolamenti europei a= Reg. (CE) N.2174/2003 del 12 dicembre 2003; b= Reg. (CE) N.683/2004 della commissione el 13 aprile 2004; d= G.U. n.135 del 11-06-1999 Circolare 9 giugno 1999, n.10.



Prodotto	Tenore massimo di aflatossina (µg/kg)			Metodo di campionamento	Criteri di prestazione per i metodi di analisi
	B1	(B1 + B2 + G1 + G2)	M1		
2.1. AFLATOSSINE					
2.1.1. Arachidi, frutta a guscio e frutta secca					
2.1.1.1. Arachidi, frutta a guscio e frutta secca e relativi prodotti di lavorazione destinati al consumo umano diretto, ovvero all'utilizzazione quali ingredienti per la produzione di derrate alimentari	2,0 <sup>(6)</sup>	4,0 <sup>(6)</sup>	—	Direttiva 98/53/CE della Commissione <sup>(7)</sup>	Direttiva 98/53/CE
2.1.1.2. Arachidi da sottoporre a cernita o ad altri trattamenti fisici prima del consumo umano o dell'impiego come ingrediente di derrate alimentari	8,0 <sup>(6)</sup>	15,0 <sup>(6)</sup>	—	Direttiva 98/53/CE	Direttiva 98/53/CE
2.1.1.3. Frutta a guscio e frutta secca da sottoporre a cernita o ad altri trattamenti fisici prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di derrate alimentari	5,0 <sup>(6)</sup>	10,0 <sup>(6)</sup>	—	Direttiva 98/53/CE	Direttiva 98/53/CE
2.1.2. Cereali (ivi compreso grano saraceno, <i>Fagopyrum</i> sp)					
2.1.2.1. Cereali (ivi compreso grano saraceno, <i>Fagopyrum</i> sp) e relativi prodotti della lavorazione destinati al consumo umano diretto o all'impiego come ingrediente di derrate alimentari	2,0	4,0	—	Direttiva 98/53/CE	Direttiva 98/53/CE
2.1.2.2. Cereali (ivi compreso grano saraceno, <i>Fagopyrum</i> sp) destinato alla cernita o ad altri trattamenti fisici prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di derrate alimentari	2,0	4,0	—	Direttiva 98/53/CE	Direttiva 98/53/CE
2.1.2.3. Granoturco da essere sottoposto a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di derrate alimentari	5,0	10,0	—	Direttiva 98/53/CE	Direttiva 98/53/CE

2.1.3.	Latte [latte crudo, latte destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte e latte trattato termicamente conforme alla definizione della direttiva 92/46/CE del Consiglio <sup>(6)</sup> , modificata da ultimo dal regolamento (CE) n. 806/2003 <sup>(11)</sup> ]	—	—	0,05	Direttiva 98/53/CE	Diret 98/53/CE
2.1.4.	Le seguenti specie di spezie: — <i>Capsicum spp.</i> (frutti secchi dello stesso, interi o macinati, compresi peperoncini, peperoncini in polvere, pepe di Caienna e paprica) — <i>Piper spp.</i> (frutti dello stesso, compreso pepe bianco e pepe nero) — <i>Myristica fragrans</i> (noce moscata) — <i>Zingiber officinale</i> (zenzero) — <i>Curcuma longa</i> (curcuma)	5,0	10,0	—	Direttiva 98/53/CE <sup>(7)</sup>	Diret 98/53/CE

<sup>(6)</sup> I limiti massimi si applicano alla parte commestibile delle arachidi, della frutta a guscio o della frutta secca. Se i frutti a vengono analizzati per intero, il contenuto di aflatossine va calcolato supponendo che tutta la contaminazione sia contenuta nella parte commestibile.

<sup>(7)</sup> GU L 201 del 17.7.1998, pag. 93.

<sup>(10)</sup> GU L 268 del 14.9.1992, pag. 1.

<sup>(11)</sup> GU L 122 del 16.5.2003, pag. 1.»

**Tabella11:** legislazione in materia di Aflatossina (gazzetta ufficiale dell'Unione Europea, regolamento (CE) N. 2174/2009 della Commissione del 12 dicembre 2003 che modifica il regolamento (CE) n. 466/2001 per quanto concerne le aflatossine)

## LIMITE AFB1 NELLE MATRICI ALIMENTARI DESTINATE ALL'ALIMENTAZIONE ANIMALE

<b>MATRICE</b>	<b>AFB1 (µG/KG)</b>
Materie prime per mangimi: arachidi, coproa, palmisti, semi di cotone, babassu, granoturco e loro derivati	20,0
Altre	50,0
Mangimi completi per bovini, ovini e caprini ad eccezione di:	50,0
animali da latte	5,0
vitelli e agnelli	10,0
Mangimi completi per suini e pollame (salvo animali giovani)	20,0
Altri mangimi completi	10,0
Mangimi complementari per bovini, ovini e caprini, ad eccezione di quelli per animali da latte, vitelli e agnelli	50,0
Mangimi complementari per suini e pollame (salvo animali giovani)	30,0
Altri mangimi complementari	5,0

**Tabella 12:** Limite AFB1 nelle matrici alimentari destinate all'alimentazione animale (D.M. 23 dicembre 2002, n.317-Gazzetta Ufficiale n. 155 del 07-07-2003)

## PROGETTO DI RICERCA

**Rilievi anatomoistopatologici in scrofe gravide, vaccinate con un vaccino anti AFB1 e alimentate con un mangime contaminato da aflatossina B1 e nella loro prole indirettamente esposta alla aflatossicosi.**

Il problema delle contaminazioni da micotossine negli alimenti di impiego zootecnico, connesso talora anche all'importazione di derrate da paesi a clima caldo e umido e degli eventuali residui nei prodotti di origine animale, viene studiato da vari anni senza che sia stata trovata una soluzione definitiva. Gli aspetti più preoccupanti di sicurezza alimentare sono legati all'ingestione diretta, attraverso il consumo di derrate contaminate, o indiretta, attraverso il consumo di prodotti carnei, di metaboliti di alcune specie di *Penicillium* e *Fusarium*, fra cui aflatossine e fumonisine. L'aflatossina B1 è l'epatocancerogeno attivo per os più potente che si conosca; durante il processo digestivo l'aflatossina viene in parte assorbita e trasportata al fegato, dove è metabolizzata, dando origine a diversi idrossi-derivati che vanno in circolo e che sono poi eliminati tramite le urine, la bile e il latte.

L'Aflatossina B1 possiede un ampio spettro d'azione e può esplicare effetti lesivi di varia natura negli animali da laboratorio (cancerogenesi, mutagenesi, teratogenesi, alterazioni del sistema immunitario, etc.), mentre nell'uomo e negli animali in produzione zootecnica (suino, pollo, cavallo) sono descritti soprattutto quadri epatotossici e nefropatici. Tra gli animali in produzione zootecnica, anche il suino manifesta sensibilità all'intossicazione da aflatossina B1, presentando, oltre al danno epatico e renale, lesioni anche ad altri parenchimi. Un numero crescente di studi ha permesso di provare come l'intossicazione con aflatossina B1 interferisca a vario livello sull'efficienza della risposta immunitaria del topo, ratto e pollo nonché nel suino.

Le strategie finora adottate per contenere gli effetti negativi da micotossine, una volta che sono state ingerite, si sono basate sul sequestro di tali composti

a livello di lume intestinale in modo da prevenirne l'assorbimento o sugli effetti protettivi di alcune molecole antiossidanti sugli organi bersaglio, principalmente rene e fegato, una volta che l'assorbimento è avvenuto. Tuttavia nessuna delle strategie in uso ha dimostrato univoci effetti nel contrastare la problematica. La pratica della vaccinazione risulta essere invece un approccio del tutto nuovo e ancora inesplorato, e come tale necessita di studi che ci si propone di affrontare con il presente progetto

Il presente studio si è proposto di formulare un vaccino AFB1 e di valutarne l'eventuale effetto protettivo acquisito nei confronti di AFB1 in scrofe gravide immunizzate con costrutti in grado di indurre Ab sierici, in comparazione a scrofe di controllo, mediante loro alimentazione con mangime contaminato con quantità note di AFB1 e rilievo della micotossina (AFB1 e AFM1) con saggi specifici nel colostro e nel latte. Si sono valutate le possibili alterazioni morfo-strutturali a livello di organi target dell'aflatossina B1 sia nelle **scrofe immunizzate con un vaccino AFB1-BSA** (AFB1 coniugato alla BSA) e poi alimentate con un mangime naturalmente contaminato da 500ppb/kg di aflatossina B1 durante l'ultimo periodo di gravidanza e durante l'allattamento sia nella loro **prole, indirettamente esposta alla tossicosi, comparativamente a scrofe e suinetti di controllo.**

## **MATERIALI E METODI**

Il protocollo sperimentale, approvato dal Comitato etico, ha previsto l'impiego di 4 scrofe primipare e gravide da almeno 40 giorni, appartenenti alla stessa linea genetica (Ibridi commerciali), stabulate presso l'Istituto Zooprofilattico di Brescia e tenute nelle stesse condizioni ambientali e di alimentazione.

Due scrofe (contrassegnate con i numeri 18D e 5611) sono state immunizzate con quattro inoculi di AFB1-BSA (Sigma, A6655), mentre le restanti due (5D e 5661) sono state immunizzate solo con BSA e considerate come **gruppo controllo**. Ad ognuno degli animali immunizzati sono state iniettate i.m. quattro dosi (giorno 0, 14, 28 e 42) costituite da 500 µg di immunogeno addizionati di adiuvante di Freund completo (primo inoculo) o incompleto (3 inoculi successivi), in un volume finale di 1 ml in PBS pH 7.4. Prima, durante e al termine del periodo di immunizzazione, sono stati eseguiti prelievi di sangue al fine di verificare la presenza nei sieri di anticorpi specifici per AFB1.

### **Aflatossina B1 coniugata a proteine carrier**

Al fine di valutare la potenzialità di immunogeni mimetici ricombinanti e genici nell'approccio vaccinale e di monitoraggio sierologico nei confronti di AF, sono stati utilizzati immunogeni convenzionali costituiti da AFB1 coniugata a proteine carrier.

L'immunogeno convenzionale è costituito da AFB1 coniugata ad albumina sierica bovina (AFB1-BSA) (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo).

Al termine del protocollo di vaccinazione le scrofe hanno ricevuto, per il restante periodo di gravidanza e sino alla fine della lattazione un'alimentazione ad libitum con mangime naturalmente contaminato da 500ppb di AFB1 e sono state seguite quotidianamente sotto l'aspetto clinico e comportamentale.

Le scrofe 5D (Controllo) e 5611 (Vaccinata) hanno partorito il 3 e 4 agosto, mentre le scrofe 18D (Vaccinata) e 5661 (Controllo) in data 7 e 8 agosto.

Dopo tre giorni dal parto, da ogni scrofa sono stati scelti casualmente 5 suinetti (è stata applicata una marca auricolare per l'identificazione) dai quali sono stati prelevati campioni di sangue al 3°, al 28° e al 50° giorno di vita.

### **Saggi immunoenzimatici diretti per la valutazione di Ab specifici nei confronti di AFB1 nel siero**

(I saggi immunoenzimatici per la valutazione di Ab specifici nei confronti di AFB1 sono stati effettuati presso il Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio Sezione di Microbiologia Università degli Studi di Parma)

I pozzetti di piastre microtiter sono stati adsorbiti con 50 µl di siero diluiti 1:50 in tampone carbonato pH 9,6, incubando una notte a 4°C in camera umida. Dopo 3 lavaggi con PBS1X contenente 0,05% Tween, saturati con 100 µl di PBS 1X contenente 1% gelatina per 90' ed ulteriori 3 lavaggi, ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 50 µl di una soluzione di AFB1 coniugata a perossidasi (AFB1-HRP, Abraxis) diluita 1:2 in PBS pH 7,4. Dopo 60' a 37°C in camera umida, AFB1-HRP legata è stata rilevata aggiungendo 50 µl di una soluzione di cromogeno (TMB, Sigma Aldrich) e substrato (0,02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La reazione è stata bloccata dopo 30', aggiungendo 25 µl di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N e l'assorbanza è stata letta a 650 e 450 nm in un lettore per micropiastre (Multiskan Ascent, Lab-systems).

Protocollo sperimentale di immunizzazione delle scrofe

<b>4 scrofe gravide: immunizzazione intramuscolo (1ml)</b>	
(ciascun inoculo)	
<b>2 scrofe gravi- de</b>	<b>0.5 ml AFB1-BSA + 0.5 ml adiuvante di Freund</b> completo per la prima immunizzazione, incompleto per le successive (Vaccinate, V)
<b>2 scrofe gravi- de</b>	<b>0.5 ml BSA + 0.5 ml adiuvante di Freund</b> completo per la prima immunizzazione, incompleto per le successive (Controllo, C)
<b>9 giugno-T0</b>	Prelievo di campioni di sangue (siero) (10-20 ml)
	1° inoculo: 2 scrofe immunizzate con AFB1-BSA (V)- 2 scrofe immunizzate con BSA (C)
<b>23 giugno-T1</b>	Prelievo di campioni di sangue (siero) (10-20 ml)
	2° inoculo: 2 scrofe con 2V (vaccinate)- 2 scrofe con 2C (controllo)
<b>7 luglio-T2</b>	Prelievo di campioni di sangue (siero) (10-20 ml)
	3° inoculo: 2 scrofe con 3V (vaccinate)- 2 scrofe con 3C (controllo)
<b>21 luglio-T3</b>	Prelievo di campioni di sangue (siero) (10-20 ml)
	4° inoculo: 2 scrofe con 4V (vaccinate)- 2 scrofe con 4C (controllo)
<b>28 luglio-T4</b>	Prelievo di sangue (siero) su tutte le scrofe (10-20 ml)



**Al termine del protocollo vaccinale è iniziata la somministrazione del mangime contaminato da AFB1 per tutte le scrofe, sia vaccinate con AFB1-BSA sia trattate solo con BSA, fino al parto e poi fino al termine dell'allattamento.**

Il mangime, naturalmente contaminato da AFB1, è stato fornito dall'Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza diretto dal Prof. Piva Gianfranco.

**Dopo il parto** su tutte le scrofe sono stati effettuati i prelievi di colostro e di latte al 10°, 17°, 24° giorno dopo il parto per valutare la presenza di residui di AFM1 o di anticorpi (tabella 30).

#### **Determinazione della concentrazione di AFB1 e AFM1 nei campioni di latte**

(Le determinazioni della concentrazione di AFB1 e AM1 nei campioni di latte di scrofa sono state effettuate presso l'Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza diretto dal Prof. Piva Gianfranco)

L'estrazione di AF dai campioni di latte è stata condotta secondo la tecnica dell'immunoaffinità (Bertuzzi, 2003).

50 ml di latte scremato (ottenuto mediante centrifugazione a 7000 rpm, 10', 4°C) sono stati filtrati in carta da filtro Schleiche & Schuell 585 ½. Successivamente, 20 ml di latte filtrato sono stati trasferiti in colonna di immunoaffinità (Aflatoxin Easy-extract, Rhone Diagnostics) precedentemente lavata con 20 ml di PBS pH 7.4. Dopo aver lavato la colonna con 5 ml di acqua, le tossine legate alla colonna sono state eluite con 2,5 ml di metanolo. L'estratto è stato essiccato in flusso di azoto, ridissolto in 1 ml di una soluzione aceto nitrile:acqua (25:75) e filtrato (Millipore Corporation; HV 0.45 mm) prima dell'analisi HPLC, effettuata in un cromatografo LC Perkin Elmer (Perkin Elmer), collegato ad una pompa LC-200 e a un rivelatore a fluorescenza Jasco FP-1520 (Jasco). Il sistema e l'acquisizione dei dati sono stati controllati dal software Jasco Borwin

Chromatography PC. AFM1 è stata separata in colonna C18 a fase inversa Li-Cospher 100 column (Merck; 5 mm particle size, 12534 mm i.d.) a temperatura ambiente, con fase mobile acqua: acetonitrile (75:25) e flusso 1 ml/min. Il rivelatore a fluorescenza è stato impostato a una lunghezza d'onda di eccitazione 365 nm e 440 nm di emissione. La concentrazione della soluzione di AFM1 standard è stata verificata secondo il metodo AOAC 970.44, conservando la soluzione a -20°C quando non utilizzata. (Bertuzzi, 2003)

Al termine del periodo di lattazione le scrofe e dieci suinetti (5 figli delle scrofe vaccinate e 5 figli delle scrofe controllo) sono stati sacrificati. I restanti suinetti sono stati sacrificati a distanza di 30 giorni.

<b>Animali sperimentali - Suinetti</b>	
<b>Gruppo A</b>	5 suinetti figli delle scrofe vaccinate e 5 figli delle scrofe controllo sacrificati al 28° giorno di vita
<b>Gruppo B</b>	5 suinetti figli delle scrofe vaccinate e 5 figli delle scrofe controllo sacrificati dopo 30 giorni di svezzamento

I suinetti sono stati seguiti per la valutazione dei parametri clinici alla nascita, durante l'allattamento e lo svezzamento.

**Da ogni suinetto: prelievi di sangue al 3° 28° e 50° giorno di vita per la valutazione di parametri immunitari e biochimici (PBMC, plasma e siero).**

Sul sangue prelevato (sia dalle scrofe sia dai suinetti) sono state effettuate valutazioni ematologiche ed immunofenotipiche delle principali sottopopolazioni linfocitarie T (CD4, CD8, CD $\gamma\delta$ , CD3), mediante analisi citofluorimetrica, seguendo metodiche già sperimentate in altre ricerche.

## INDAGINI ANATOMOISTOPATOLOGICHE

Le scrofe e dieci suinetti sono stati sacrificati al termine del periodo di lattazione (28 giorni di vita) mediante Tanax® (**gruppo A**), mentre i restanti suinetti sono stati sacrificati dopo 30 giorni di svezzamento e durante questo periodo sono stati alimentati utilizzando un mangime commerciale non contaminato da aflatossine (**gruppo B**).

**Tutti gli animali sperimentali (scrofe e suinetti)** sono stati sottoposti ad esami necroscopici prelevando campioni di timo, milza, rene, fegato, pancreas, cuore, surrene, linfonodi bronchiali e meseraici, tiroide, encefalo, polmone, intestino (tenue e crasso), nonché parti di altri organi o tessuti eventualmente lesi.

I campioni tissutali sono stati fissati in formalina tamponata (Bioptica) al 4% per 24- 48 ore, tagliati in sezioni di 3-4 mm di spessore, disidratati in inclusore sottovuoto (Medita), inclusi in paraffina (con centralina di inclusione Medita), sezionati al microtomo (Leyca) in sezioni istologiche di 5 micron di spessore e colorati con la colorazione di base dell'istologia ematossilina-eosina, con la tricromica di Masson, per evidenziare sia in ambito epatico sia a livello renale fenomeni di fibrosi, e la PAS reazione, per evidenziare la presenza di glicogeno a livello epatico e per valutare le modificazioni morfostrutturali del parenchima renale.

Campioni di timo, di linfonodi bronchiali e meseraici, di duodeno, digiuno e crasso sono stati congelati in isopentano preraffreddato in azoto liquido, per allestire sezioni criostatiche ed effettuare colorazioni immunoistochimiche atte a fenotipizzare le popolazioni linfocitarie.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Durante le prove sperimentali non sono stati rilevati segni di sofferenza clinica o anomalie comportamentali tra le due scrofe vaccinate e le due di controllo, come pure nell'ambito della rispettiva prole.

All'esame necroscopico delle scrofe immunizzate con il vaccino AFB1-BSA non si sono osservate lesioni macroscopicamente evidenti, in comparazione alle scrofe vaccinate solo con l'adiuvante BSA.

Anche nei suinetti non si sono osservate rilevanti modificazioni macroscopiche a livello degli organi indagati eccetto in due suinetti del gruppo A in cui si sono osservati quadri di onfalite e peritonite fibrino-purulenta (non sono stati inseriti nelle valutazioni ematologiche e anatomoistopatologiche).

In questo lavoro abbiamo posto particolare attenzione agli organi considerati nel suino maggiormente sensibili all'azione tossica dell'aflatossina B1 e quindi abbiamo sottoposto ad indagini istopatologiche il fegato, il rene, il timo, i linfonodi (bronchiali e meseraici) e la milza.

I fenomeni lesivi sono stati classificati utilizzando uno score che prendeva in considerazione l'estensione e la gravità delle lesioni a livello di fegato (vedi tabella n.13,15,16,17), rene (tabella n.14,18,19,20.), timo (tabella n. 25,26,27,28), linfonodi (tabella n.29,30,31,32) e milza (tabella n.21,22,23,24).

Score lesioni istologiche:

(-) = assenza di lesioni;

(+/-) = lesioni rare

(+) = lesioni lievi a carattere focale

(++)= lesioni moderate a carattere focale

(+++)= lesioni gravi e diffuse

Dalle indagini immunosierologiche (figura n.68 ) non si è evidenziata la presenza significativa di anticorpi specifici nei confronti di AFB1; è venuto quindi a mancare l'effetto protettivo che doveva essere acquisito mediante la vaccinazione; **tutti gli animali sperimentali**, le scrofe vaccinate e le scrofe di controllo con la loro prole, sono stati esposti, con l'assunzione di un mangime contaminato, all'azione lesiva dell'aflatossina B1 anche se presente nelle quantità massime consentite dalla Direttiva CEE 2002/32/CE (0,005mg/Kg di alimento).

Nelle tabelle abbiamo comunque differenziato con la sigla **(V) le scrofe vaccinate e la loro prole** e con la sigla **(C) le scrofe immunizzate con solo il carrier proteico BSA e la loro prole**.

FEGATO		scrofe			
		18D (V)	5611 (V)	5661 (C)	5D (C)
Lesioni	Stasi biliare	(-)	(+)	(+)	(-)
	Pigmenti nelle cellule del kupffer	(-)	(+)	(-)	(-)
	Rigonfiamento torbido	(-)	(+)	(+)	(-)
	Degenerazione idropico-vacuolare	(+)	(-)	(-)	(-)
	Steatosi	(-/+)	(-/+)	(-)	(-/+)
	Necrosi epatocitaria focale	(+)	(+)	(+)	(+)
	Rigenerazione epatociti	(+)	(+)	(-)	(-)
	Proliferazione dotti biliari	(+)	(-)	(+)	(-)
	Infiltrati cellulari interstiziali	(+)	(+)	(+)	(+)
	Infiltrati cellulari intraparenchimali	(++)	(+)	(+)	(+)
Fibrosi	(+)	(-)	(+)	(-)	

**Tabella 13:**lesioni a carico del parenchima epatico delle scrofe vaccinate con vaccino AFB1-BSA (V) e vaccinate con sola BSA ( C)

RENE		scrofe			
		18D (V)	5611 (V)	5661(C)	5D(C)
Lesioni	Infiltrati infiammatori Interstiziali	(-)	(-)	(-)	(-)
	Rigonfiamento torbido	(+)	(+)	(-)	(+)
	Degenerazione vacuolare	(-)	(-)	(-)	(-)
	Steatosi	(+)	(+)	(+)	(+)
	Rigenerazione epiteli tubulari	(-)	(-)	(++)	(-)
	Lesioni glomerulari	(-)	(-)	(++)	(-)
	Mitosi	(+)	(-)	(-)	(+)
	Macrocariosi	(-)	(-)	(-)	(-)
	Ectasia duttale , plasmorragia	(-)	(-)	(-)	(-)
	Fibrosi	( + )	(+)	(+)	(+)

**Tabella 14:** lesioni a carico del parenchima renale delle scrofe vaccinate con vaccino AFB1-BSA (V) e vaccinate con sola BSA ( C)

Le **scrofe** esposte al mangime contaminato hanno presentato lievi fenomeni degenerativi a livello epatico (rigonfiamento torbido, steatosi a carattere focale, stasi biliare) modici infiltrati a focolaio intraparenchimali di linfociti e macrofagi, espressione di necrosi di singoli epatociti, lievi fenomeni di fibrosi intralobulare, di disorganizzazione delle filiere epatocitarie e di proliferazione di piccoli dotti biliari .

Nei campioni istologici di parenchima epatico dei suinetti sia del **gruppo A** sia **del gruppo B** si osservano fenomeni regressivi di lieve o moderata entità a carattere focale o diffuso: rigonfiamento torbido e degenerazione idropica a carattere diffuso; fenomeni di steatosi, necrosi di singoli epatociti con scarsi infiltrati infiammatori intraparenchimali; i dotti biliari sono spesso dilatati per la presenza di materiale eosinofilo e tappezzati da epitelio cilindrico.

Nel **gruppo A** emergono in diversi soggetti anche aspetti di emopoiesi extra-midollare. Raramente si riscontra aumento del connettivo interstiziale o intra-lobulare.

FEGATO		Suinetti gruppo A						
		1 (V)	5 (V)	6 (V)	8 (V)	2 (C)	3 (C)	4 (C)
Lesioni	Rigonfiamento torbido	(-)	(++)	(-)	(-)	(+)	(++)	(+)
	Degenerazione idropico-vacuolare	(++)	(+)	(+)	(++)	(-)	(-)	(-)
	Steatosi	(+)	(++)	(+)	(++)	(+)	(++)	(-)
	Infiltrati interstiziali	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
	Infiltrati cellulari intraparenchimali	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	Emopoiesi extramidollare	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(+)	(++)
	Fibrosi	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

**Tabella 15:** lesioni a carico del parenchima epatico dei suinetti del Gruppo A

(V) → suinetti figli delle scrofe vaccinate con AFB1-BSA

(C) → suinetti figli delle scrofe vaccinate solo con BSA

FEGATO		Suinetti gruppo B				
		97 (C)	61 (C)	62 (C)	94 (C)	95 (C)
Lesioni	Rigonfiamento torbido	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	Degenerazione idropico-vacuolare	(++)	(++)	(+++)	(++)	(++)
	Steatosi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Infiltrati interstiziali	(++)	(-)	(+)	(-)	(+)
	Infiltrati cellulari intraparenchimali	(++)	(-)	(+)	(-)	(+)
	Emopoiesi extramidollare	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
	Fibrosi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

**Tabella 16:** lesioni a carico del parenchima epatico dei suinetti del Gruppo AB

(V) → suinetti figli delle scrofe vaccinate con AFB1-BSA

(C) → suinetti figli delle scrofe vaccinate solo con BSA

FEGATO		Suinetti gruppo B				
		98 (V)	96 (V)	63 (V)	100 (v)	99 (v)
Lesioni	Rigonfiamento torbido	(+)	(+)	(+)	(+)	(++)
	Degenerazione idropico-vacuolare	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)
	Steatosi	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
	Infiltrati interstiziali	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	Infiltrati cellulari intraparenchimali	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
	Emopoiesi extramidollare	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Fibrosi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

**Tabella 17:** lesioni a carico del parenchima epatico dei suinetti del Gruppo B

(V) → suinetti figli delle scrofe vaccinate con AFB1-BSA

(C) → suinetti figli delle scrofe vaccinate solo con BSA

Nel rene delle scrofe si osservano fenomeni di rigonfiamento torbido e di steatosi a carattere focale a livello dei tubuli contorti prossimali e distali e di fibrosi sempre a carattere focale a livello della zona midollare; in un soggetto si evidenziano lesioni glomerulari e aspetti di rigenerazione degli epitelii tubulari.

Nei preparati istologici di rene dei suinetti del **gruppo A e B** si osservano lesioni degenerative tubulari a carattere focale con coinvolgimento di segmenti tubulari diversi in una o più zone del parenchima renale: si rilevano aspetti di rigonfiamento torbido, steatosi degli epitelii dei tubuli contorti distali e prossimali, fenomeni di megacariori o di picnosi degli epitelii tubulari e di rigenerazione epiteliale. I corpuscoli glomerulari nei suinetti del gruppo A e B non evidenziano fenomeni lesivi; nel gruppo A a livello subcapsulare sono presenti ancora numerosi glomeruli immaturi.

RENE		Suinetti gruppo A						
		1 (V)	5 (V)	6 (V)	8 (V)	2 (C)	3 (C)	4 (C)
Lesioni	Infiltrati interstiziali infiammatori	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(++)	(-)
	Rigonfiamento torbido	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)
	Degenerazione vacuolare	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Steatosi	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)	(+)	(-)
	Lesioni glomerulari	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Rigenerazione epiteliale	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
	Mitosi	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)
	Ectasia duttale, plasmorragia	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

**Tabella 18:** lesioni a carico del parenchima renale dei suinetti del Gruppo A

(V) → suinetti figli delle scrofe vaccinate con AFB1-BSA

(C) → suinetti figli delle scrofe vaccinate solo con BSA



RENE		Suinetti gruppo B				
		63 (V )	100(V)	99(V)	62(C)	97(C)
Lesioni	Infiltrati Interstiziali infiammatori	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
	Rigonfiamento torbido	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
	Degenerazione vacuolare	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Steatosi	(-)	(-)	(+)	(++)	(+)
	Lesioni glomerulari	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Mitosi	(-)	(-)	(-)	(++)	(-)
	Rigenerazione epiteliale	(++)	(+)	(+)	(+)	(++)
Ectasia duttale, plasmorragia	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	

**Tabella 19:** lesioni a carico del parenchima renale dei suinetti del Gruppo A

(V) → suinetti figli delle scrofe vaccinate con AFB1-BSA

(C) → suinetti figli delle scrofe vaccinate solo con BSA

RENE		Suinetti gruppo B				
		98 (V )	94 (C)	95 (C)	96 (V)	61(C)
Lesioni	Infiltrati Interstiziali infiammatori	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Rigonfiamento torbido	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
	Degenerazione vacuolare	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
	Steatosi (tubuli cont. distali)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
	Lesioni glomerulari	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Rigenerazione epiteliale	(++)	(+)	(-)	(+)	(+)
	Mitosi	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
	Ectasia duttale, plasmorragia	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)

**Tabella 20:** lesioni a carico del parenchima renale dei suinetti del Gruppo B

(V) → suinetti figli delle scrofe vaccinate con AFB1-BSA

(C) → suinetti figli delle scrofe vaccinate solo con BSA

La milza non presenta in tutti gli animali sperimentali rilevanti fenomeni lesivi, i noduli linfatici appaiono per lo più non reattivi e nei suinetti del **gruppo A** raramente si presentano ipoplasici.

MILZA		scrofe			
		18D (V)	5611 (V)	5661 (C)	5D (C)
Lesioni	Iperplasia follicolare	(-)	(-)	(+)	(-)
	Ipoplasia follicolare	(-)	(-)	(-)	(-)
	Iperplasia polpa rossa	(-)	(-)	(-)	(-)
	Emosiderosi	(-)	(-)	(-)	(-)
	Emopoiesi	(-)	(-)	(-)	(-)

**Tabella 21:** lesioni a carico della milza scrofe vaccinate con vaccino AFB1-BSA (V) e vaccinate con sola BSA (C)

MILZA		Suinetti Gruppo A						
		1 (V)	5 (V)	6 (V)	8 (V)	2 (C)	3 (C)	4 (C)
Lesioni	Iperplasia follicolare	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
	Ipoplasia follicolare	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Iperplasia polpa rossa	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Emosiderosi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Emopoiesi	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)

**Tabella 22:** lesioni a carico della milza suinetti del Gruppo A

(V) → suinetti figli delle scrofe vaccinate con AFB1-BSA

(C) → suinetti figli delle scrofe vaccinate solo con BSA

MILZA		Suinetti Gruppo B				
		97 (C)	61 (C)	62 (C)	63 (V)	100 (V)
Lesioni	Iperplasia follicolare	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Ipoplasia follicolare	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Iperplasia polpa rossa	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Emosiderosi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Emopoiesi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

**Tabella 23:** lesioni a carico della milza suinetti del Gruppo B

(V) → suinetti figli delle scrofe vaccinate con AFB1-BSA

(C) → suinetti figli delle scrofe vaccinate solo con BSA

MILZA		Suinetti Gruppo B				
		98 (V)	99 (V)	94 (C)	95 (C)	96 (V)
Lesioni	Iperplasia follicolare	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Ipoplasia follicolare	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Iperplasia polpa rossa	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Emosiderosi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Emopoiesi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

**Tabella 24:** lesioni a carico della milza dei suinetti del Gruppo B

(V) → suinetti figli delle scrofe vaccinate con AFB1-BSA

(C) → suinetti figli delle scrofe vaccinate solo con BSA

Nelle scrofe il timo, organo target dell'azione tossica delle aflatossine, presenta fenomeni di involuzione e si osservano solo isolotti rudimentali dell'organo. In alcuni suinetti soprattutto del **gruppo A** si osserva riduzione e rarefazione della corticale, mentre nella midollare si evidenzia aumento del numero dei corpuscoli timici che mostrano fenomeni di metaplasia squamosa.

TIMO		scrofe			
		18D (V)	5611 (V)	5661 (C)	5D (C)
Lesioni	Atrofia corticale	(-)	(-)	(-)	(-)
	Atrofia midollare	(-)	(-)	(-)	(-)
	Involuzione	(+)	(+)	(+)	(+)
	Starry sky	(-)	(-)	(-)	(-)

**Tabella 25:** lesioni a carico del timo scrofe vaccinate con vaccino AFB1-BSA (V) e vaccinate con sola BSA (C)

TIMO		Suinetti Gruppo A						
		1 (V)	5 (V)	6 (V)	8 (V)	2 (C)	3 (C)	4 (C)
Lesioni	Atrofia corticale	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
	Atrofia midollare	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
	Involuzione	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Starry sky	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)

**Tabella 26:** lesioni a carico del timo dei suinetti del Gruppo A

(V) → suinetti figli delle scrofe vaccinate con AFB1-BSA

(C) → suinetti figli delle scrofe vaccinate solo con BSA

TIMO		Suinetti Gruppo B				
		97 (C)	61 (C)	62 (C)	63 (V)	100 (v)
Lesioni	Atrofia corticale	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
	Atrofia midollare	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Involuzione	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Starry sky	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)

**Tabella 27:** lesioni a carico del timo dei suinetti del Gruppo B

(V) → suinetti figli delle scrofe vaccinate con AFB1-BSA

(C) → suinetti figli delle scrofe vaccinate solo con BSA

TIMO		Suinetti del Gruppo B				
		98 (V)	99 (v)	94 (C)	95 (C)	96 (V)
Lesioni	Atrofia corticale	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
	Atrofia midollare	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
	Involuzione	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
	Starry sky	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)

**Tabella 28:** lesioni a carico del timo dei suinetti del Gruppo B

(V) → suinetti figli delle scrofe vaccinate con AFB1-BSA

(C) → suinetti figli delle scrofe vaccinate solo con BSA

I rilievi istopatologici sui linfonodi hanno evidenziato in due scrofe (5611 e 18D) lievi fenomeni di depauperamento dei noduli linfatici dei linfonodi meseraici, mentre nelle restanti scrofe si osservano moderati fenomeni di iperplasia follicolare aspecifica; anche nei suinetti del **gruppo A e B** si osserva iperplasia follicolare con lievi aspetti di rarefazione dei centri germinativi.

LINFONODI		scrofe			
		18D (V)	5611 (V)	5661 (C)	5D (C)
Lesioni	Iperplasia follicolare	(-)	(-)	(+)	(+)
	Ipoplasia follicolare	(-)	(-)	(-)	(-)
	Deplezione centri germinativi	(+)	(+)	(-)	(-)

**Tabella 29:** lesioni a carico dei linfonodi scrofe vaccinate con vaccino AFB1-BSA (V) e vaccinate con sola BSA (C)

LINFONODI		Suinetti Gruppo A						
		1 (V)	5 (V)	6 (V)	8 (V)	2 (C)	3 (C)	4 (C)
Lesioni	Iperplasia follicolare	(+)	(-)	(+)	(++)	(+)	(+)	(+)
	Ipoplasia follicolare	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
	Deplezione centri germinativi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

**Tabella 30:** lesioni a carico del linfonodo suinetti del Gruppo A

(V) → suinetti figli delle scrofe vaccinate con AFB1-BSA

(C) → suinetti figli delle scrofe vaccinate solo con BSA

LINFONODI		Suinetti Gruppo B				
		97 (C)	61 (C)	62 (C)	63 (V)	100 (v)
Lesioni	Iperplasia follicolare	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Ipoplasia follicolare	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Deplezione centri germinativi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

**Tabella 31:** lesioni a carico del linfonodo suinetti del Gruppo B

(V) → suinetti figli delle scrofe vaccinate con AFB1-BSA

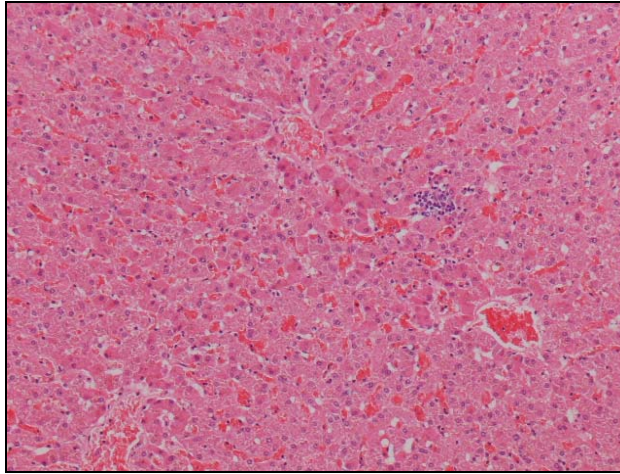
(C) → suinetti figli delle scrofe vaccinate solo con BSA

LINFONODI		Suinetti Gruppo B				
		98 (V)	99 (v)	94 (C)	95 (C)	96 (V)
Lesioni	Iperplasia follicolare	(+)	(+)	(++)	(-)	(+)
	Ipoplasia follicolare	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Deplezione centri germinativi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

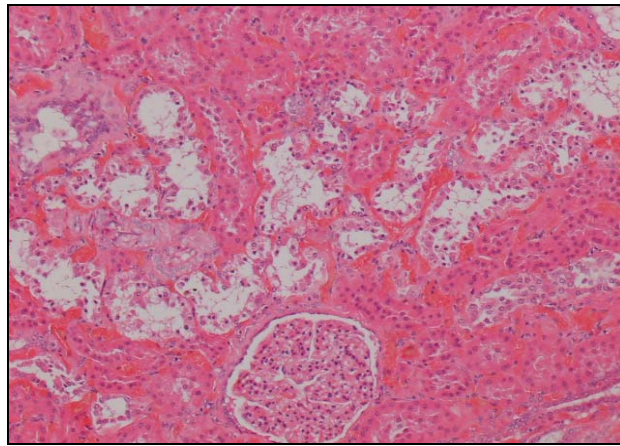
**Tabella 32:** lesioni a carico del linfonodo suinetti del Gruppo B

(V) → suinetti figli delle scrofe vaccinate con AFB1-BSA

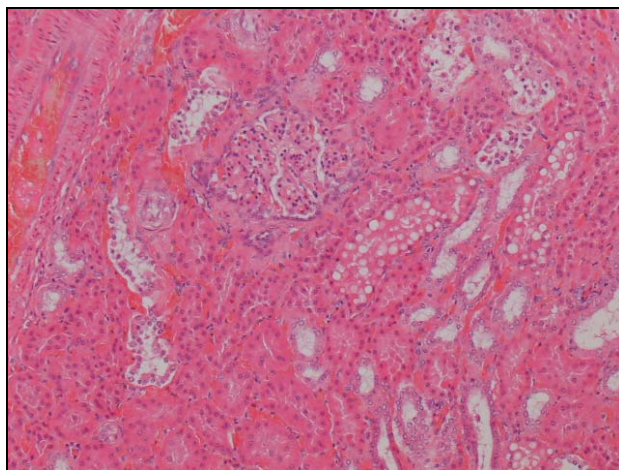
(C) → suinetti figli delle scrofe vaccinate solo con BSA



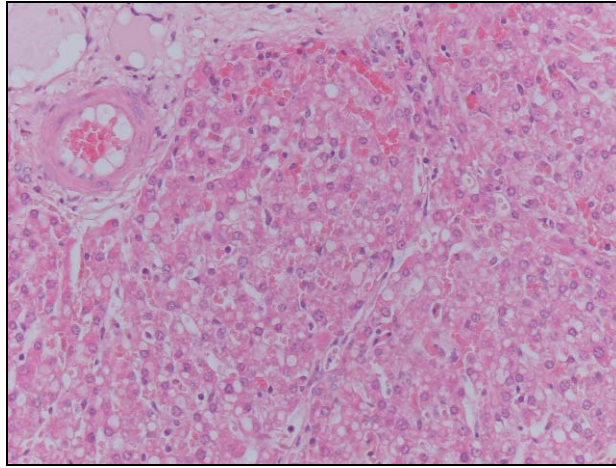
**Figura 13:** Scrofa 5611 (C ) fegato: infiltrati intraparenchimali a focolaio di linfociti (EE 10X)



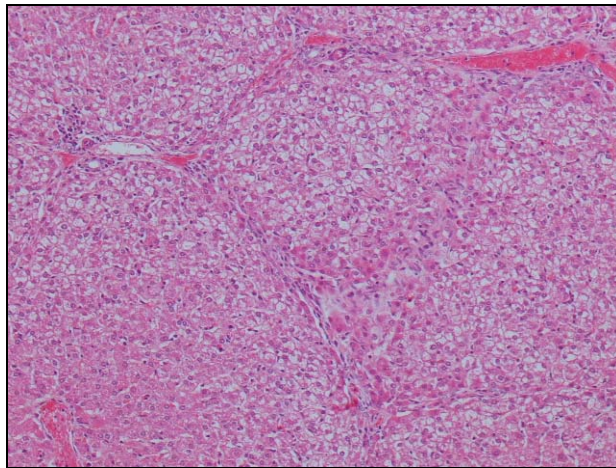
**Figura 14:** Scrofa 5D (C ) rene degenerazione degli epitelii tubulari e aspetti di picnosi (EE 10X)



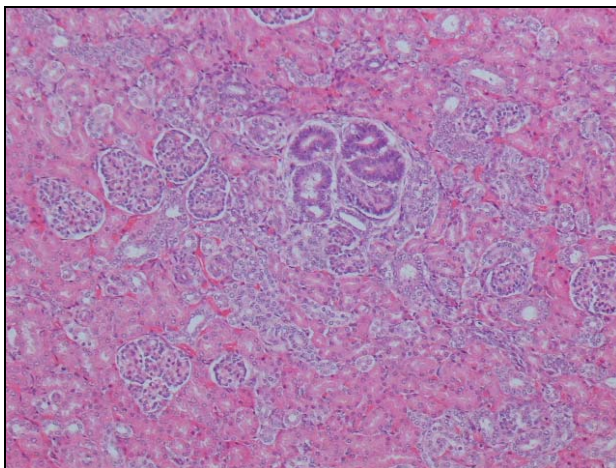
**Figura 15:** Scrofa 5611 (C ) rene con steatosi epitelii tubulari (EE 10X)



**Figura 16:** Suinetto Gruppo A -8 (V) - fegato steatosi e degenerazione vacuolare diffusa (EE 4X)

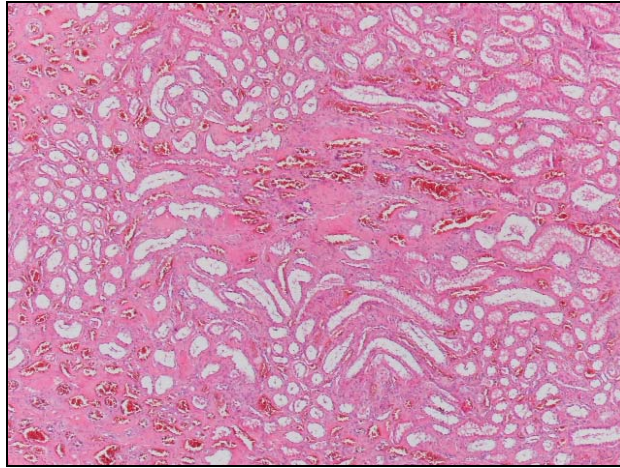


**Figura 17:** Suinetto Gruppo A -5 (V)- fegato degenerazione idropica diffusa (EE 4X)

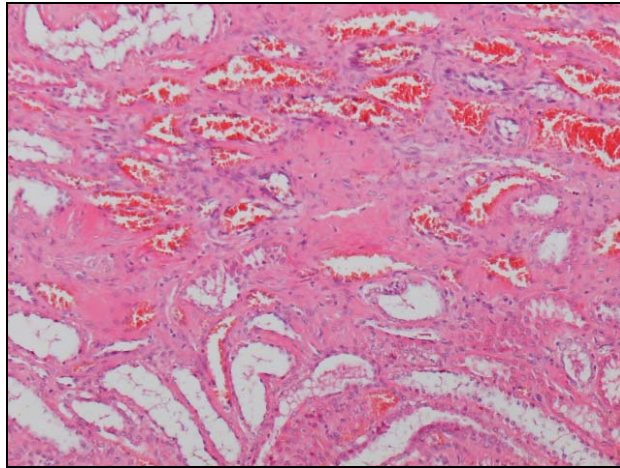


**Figura 18:** Suinetto Gruppo A - 5 (V) -rene con rigenerazione epiteli tubulari (EE 10X)

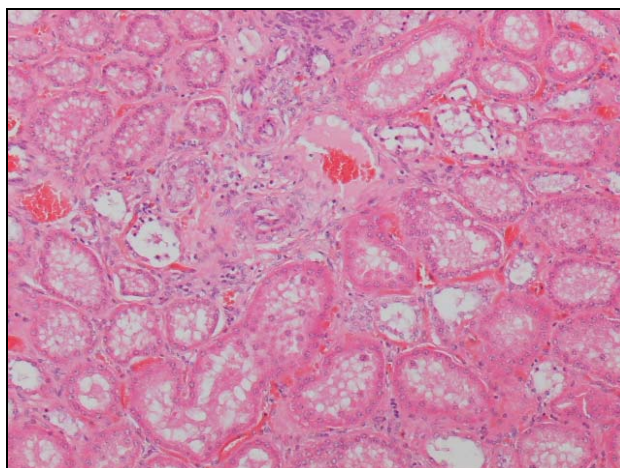




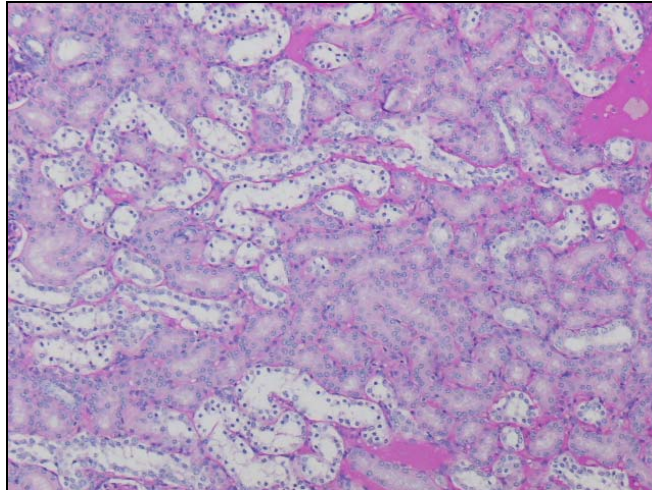
**Figura 19:** Scrofa 5D (C) rene fibrosi a livello della midollare(EE 4X)



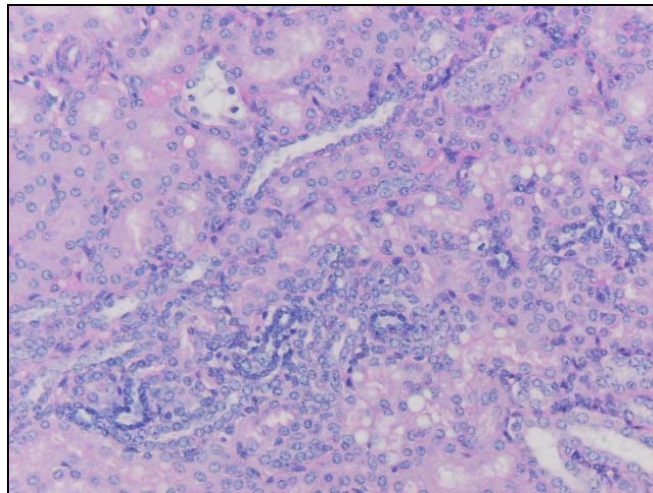
**Figura 20:** Scrofa 5D (C) rene aspetti di fibrosi interstiziale (EE 10X)



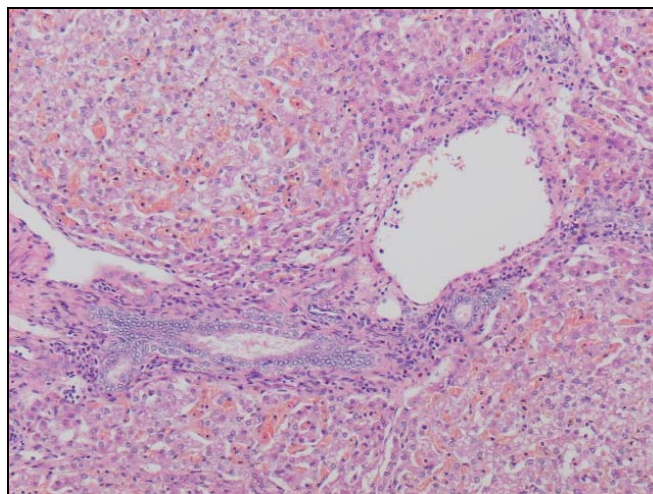
**Figura 21:** Scrofa 5D (C) rene degenerazione epiteliale e aspetti di Fibrosi (EE 10X)



**Figura 22:** Suinetto Gruppo B - 98 (V)- rene piccosi degli epitelii tubulari (PAS 10X)

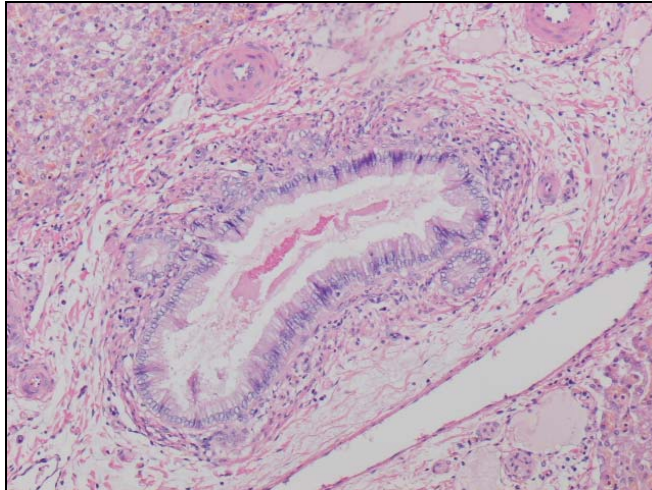


**Figura 23:** Suinetto Gruppo B - 98 (V)- rene steatosi e rigenerazione tubulare (PAS 20X)

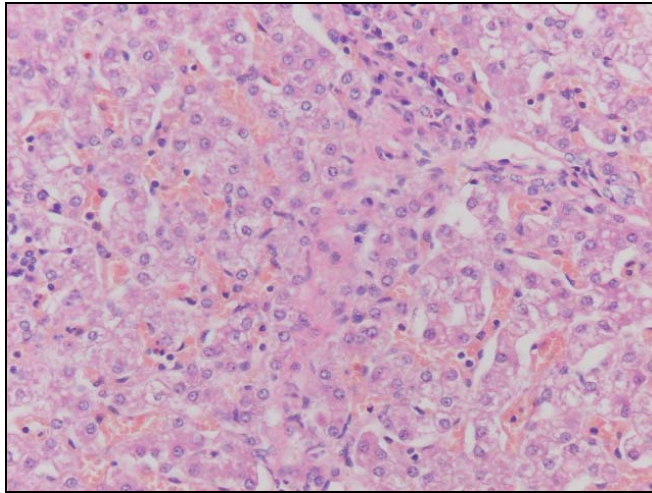


**Figura 24:** Suinetto Gruppo B -100 (V)- fegato scarsi infiltrati cellulari periduttali (EE 10X)

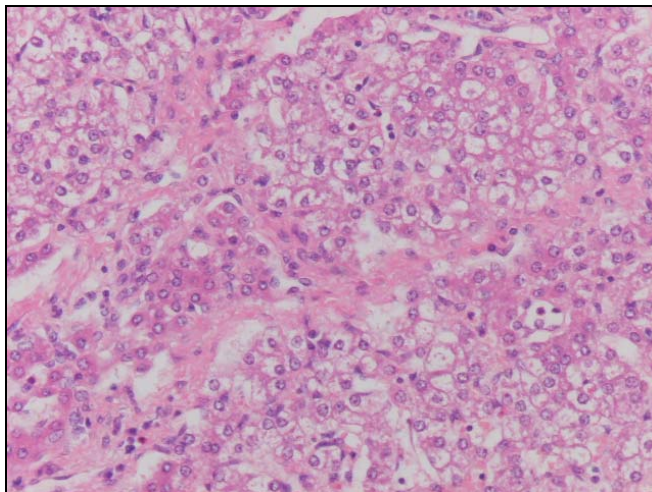




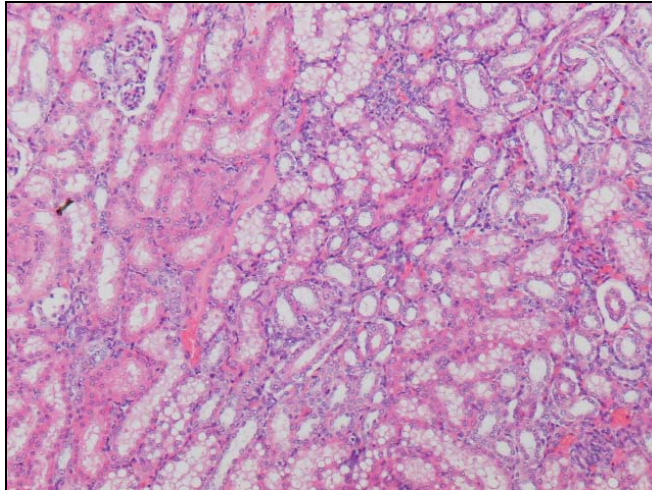
**Figura 25:** Suineto Gruppo B -100 (V)- dotto biliare con epitelio ipertrofico presenza di infiltrati periduttali (EE 10X)



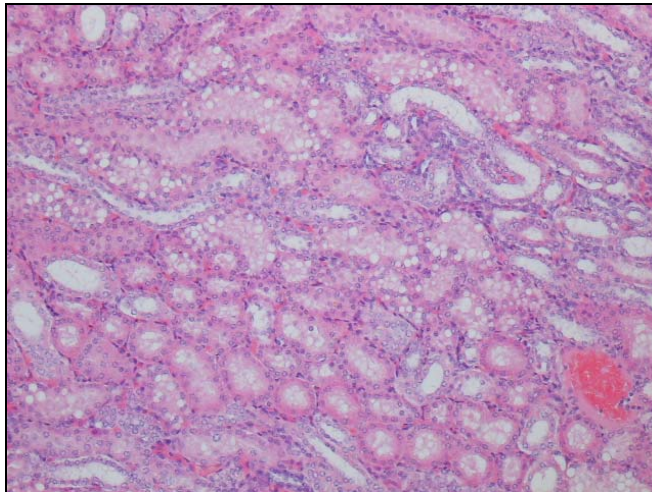
**Figura 26:** Suineto Gruppo B -100 (V)- fegato fibrosi Intralobulare (EE 10X)



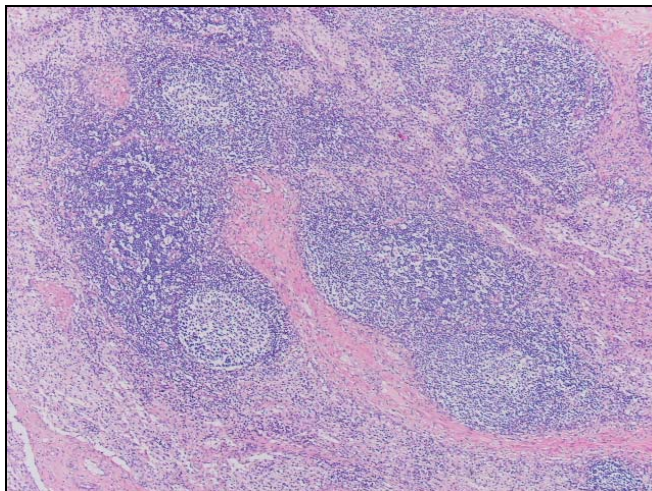
**Figura 27:** Suineto Gruppo B -99 (V)- fegato degenerazione idropica e Lievi fenomeni di fibrosi intralobulare (EE 20X)



**Figura 28:** Suinetto Gruppo B -99 (V)- rene steatosi degli epitelii tubulari (EE 20X)

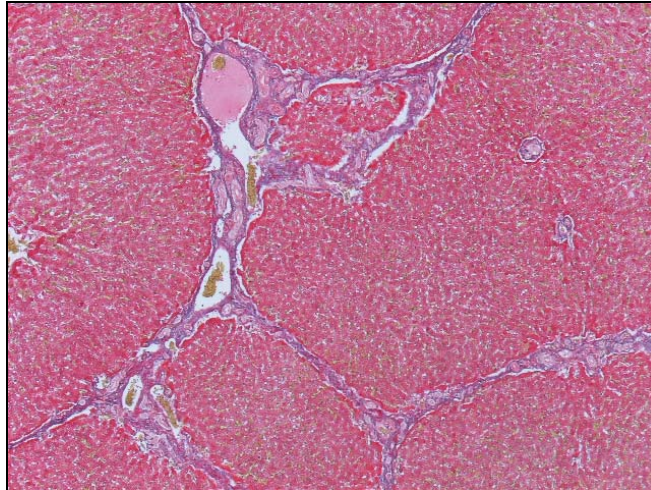


**Figura 29:** Suinetto Gruppo B -99 (V)- rene con steatosi (EE 2X)

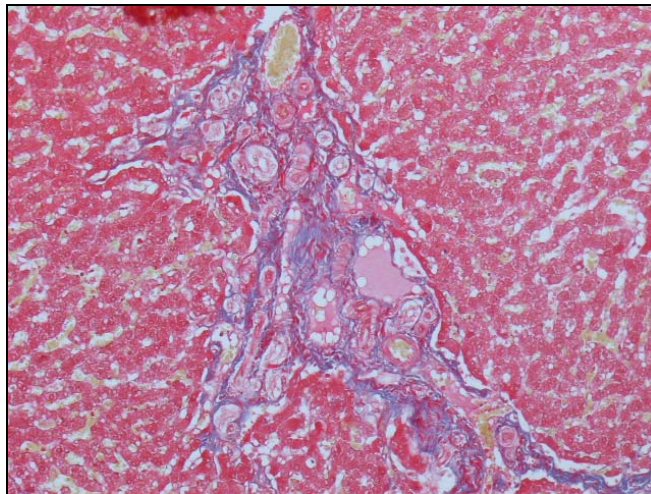


**Figura 30:** Scrofa 5D (C ) linfonodo- aspetti di iperplasia follicolare (EE 4X)

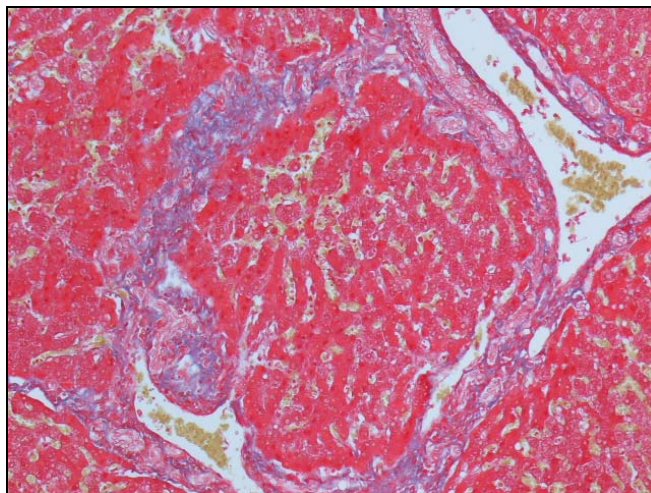




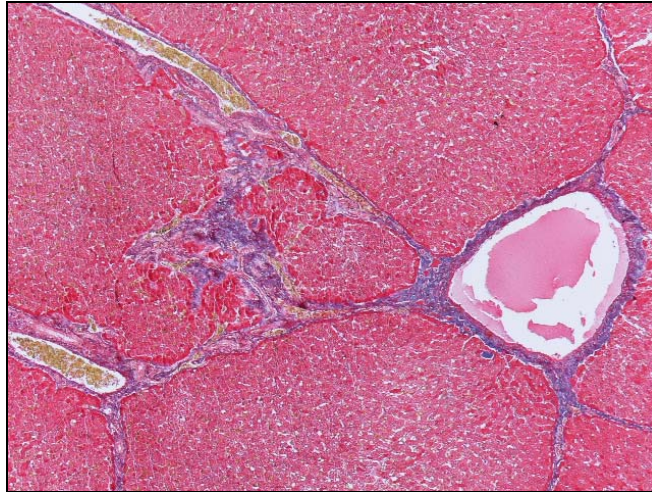
**Figura 31:** Scrofa 18 D (V) fegato- aumento del connettivo interlobulare (Tricromica di Masson 4X)



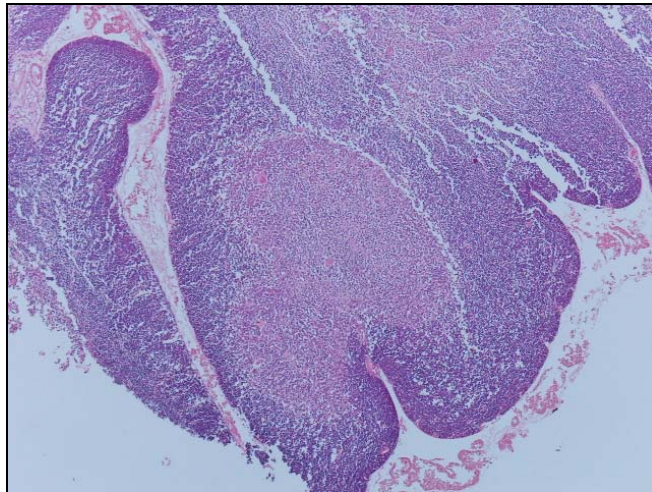
**Figura 32:** Scrofa 18 D (V) fegato- Proliferazione di piccoli dotti biliari (Tricromica di Masson 10X)



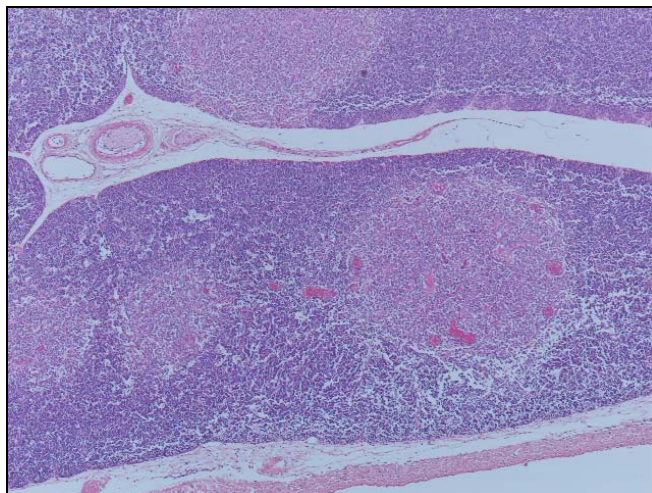
**Figura 33:** Scrofa 18 D (V) fegato – aumento del connettivo interlobulare (Tricromica di Masson 10X)



**Figura 34:** Scrofa 5661 (C) fegato con fibrosi intralobulare (Tricromica di Masson 4X)

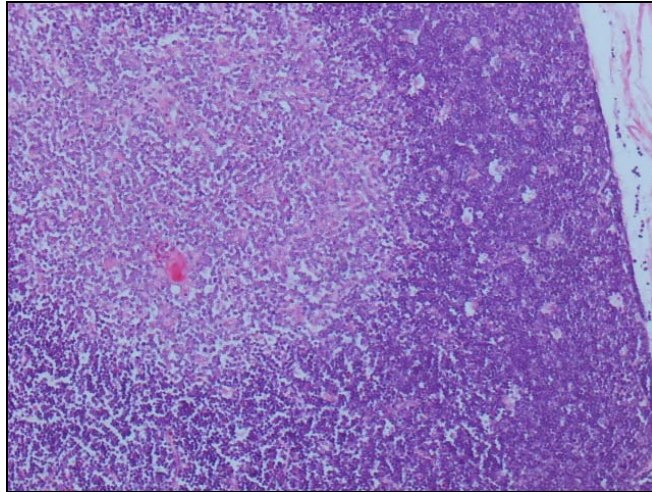


**Figura 35:** Suinetto Gruppo A - 8 (V) -timo con lieve riduzione e rarefazione della corticale (EE 4X)

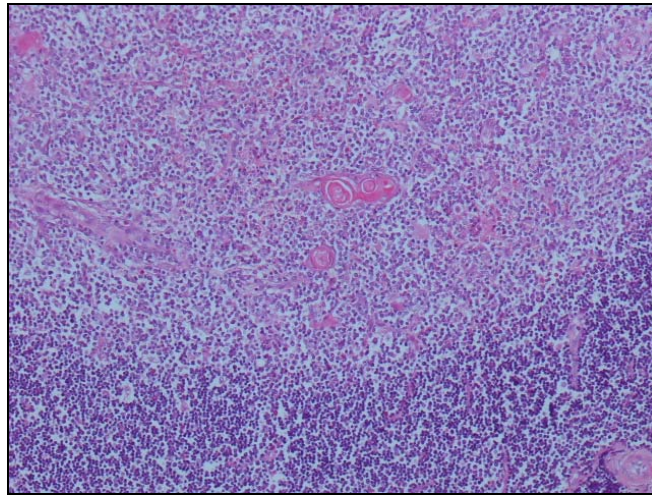


**Figura 36:** Suinetto Gruppo A - 8 (V)- timo atrofia della corticale (EE 4X)

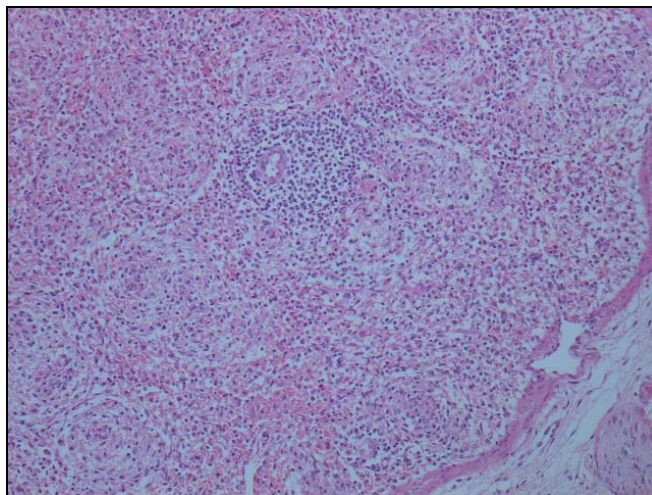




**Figura 37:** Suinetto Gruppo A - 3 ( C)- timo- aspetto a cielo stellato della corticale (Starry Sky) per fenomeni di apoptosi (EE 10X)



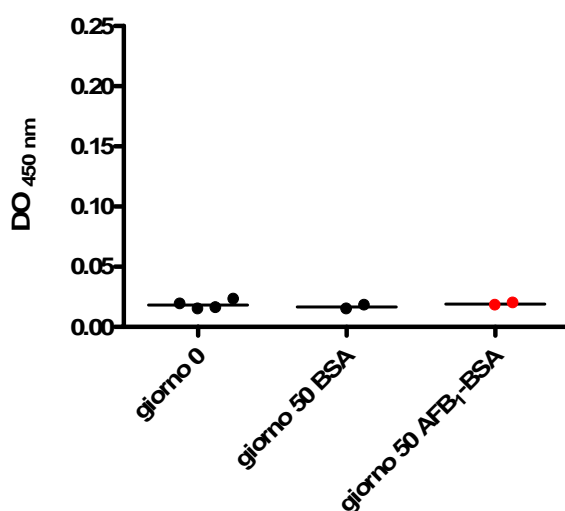
**Figura 38:** Suinetto Gruppo A - 3 ( C)- timo (EE 4X) presenza di numerosi corpuscoli di Hassal



**Figura 39:** Suinetto Gruppo A - 8 ( V)- Milza con atrofia dei noduli linfatici (EE 10X)

## Risultati valutazione dell'induzione di Ab specifici per AFB1 in scrofe immunizzate per via sistemica con AFB1-BSA o BSA.

I saggi immunoenzimatici effettuati sui sieri delle scrofe vaccinate con AFB1-BSA per verificare la presenza di Ab specifici nei confronti di AFB1, comparativamente ai sieri pre-immuni ed ai sieri delle scrofe di controllo, non hanno evidenziato una significativa produzione di Ab specifici per AFB1 in nessuno dei campioni analizzati. (Il livello degli Ab rilevati è stato espresso come valori di OD registrati a 450 nm)



**Figura 68** : Determinazione della presenza di anticorpi antiAFB1 nel siero delle scrofe vaccinate e non

(I sieri raccolti dopo la somministrazione dell'ultima dose di immunogeno (50° giorno post-immunizzazione AFB1-BSA) sono stati saggiati, mediante saggio immunoenzimatico diretto, comparativamente ai sieri raccolti il giorno 0 (pre-immunizzazione) e ai sieri del gruppo di controllo immunizzato secondo la stessa schedula con BSA (50° post-immunizzazione BSA). I punti in figura corrispondono ai valori netti di assorbanza a 450 nm letti per ciascun suino di ogni gruppo. Le linee mostrano il valore di assorbanza medio per ogni gruppo).



**Risultati della determinazione della concentrazione di AFM1 e AFB1 nei campioni di latte**

Scrofa	4/8	5/8	7/8	11/8	14/8	18/8	21/8	25/8	28/8
5661			X		X		X		X
18D			X		X		X		X
5D		X		X		X		X	
5611	X			X		X			

**Tabella n. 33** Date dei campioni di colostro/latte

Nei campioni di colostro e latte prelevati all'inizio e durante il periodo di lattazione (tabella n.34) si sono riscontrate solo tracce di AFB1 e di AFM1: solo in tre campioni sono stati riscontrati livelli più significativi. La presenza di minimi residui di AFM1 nel latte delle scrofe può essere associato alla bassa concentrazione di AFB1 nel mangime (500ppb/kg) o a patologie mammarie o sistemiche (Bonomi et al.,1997).

Latte scrofe	AFM1 ppt	AFB1 ppt
5D (C) 5/08/08	< 4	< 4
5D (C) 1/08/08	< 4	< 4
5D (C) 8/08/08	< 4	< 4
5D (C) 5/08/08	< 4	< 4
18D (V) 7/08/08	18	< 4

18D (V) 4/08/08	< 4	< 4
18D (V) 1/08/08	< 4	< 4
18D (V) 8/08/08	< 4	< 4
5611(C) 04/08	< 4	< 4
5611(C) 11/08	< 4	< 4
5611 (C) 18/08	8	< 4
5661 (V) 7/08	14	< 4
5661 (V) 14/08	< 4	< 4
5661 (V) 21/08	< 4	< 4
5661 (V) 28/08	< 4	< 4

**Tabella n. 34:** Presenza di AFB1 nei campioni di colostro/latte

In un lavoro di Silvotti et al. emerge che la concentrazione di AFB1 e AFM1 nei campioni di latte, analizzati con liquid chromatography, di scrofe alimentate con mangime contaminato da AFB1, durante la gravidanza e la lattazione, è di circa 1000 volte più basso rispetto alla concentrazione nel mangime, ma aumenta dopo 25 gg dal parto. I risultati di uno studio di Cabassi et al (1997) hanno suggerito che la contaminazione del latte di scrofe con 900 ppb di aflatossine non può determinare effetti immunotossici sui suinetti, se confrontati con i risultati di altri studi sperimentali (Panangala, 1986). È tuttavia possibile che l'esposizione prolungata all'aflatossina già in utero possa avere un ruolo fondamentale nel determinare effetti indiretti nel feto, dal momento che le aflatossine attraversano la barriera placentare (Silvotti L., 1997)

In una indagine di Bertuzzi et al (2003), quattro scrofe (Large White) sono state alimentate per i primi 7 giorni di lattazione con mangime naturalmente conta-

minato da aflatossine (AF) ad un livello di  $6,4 \pm 0,5$  e  $0,67 \pm 0,5$   $\mu\text{g/Kg}$  di AFB1 e AFB2. Campioni di colostro e latte (20-50 ml) sono stati prelevati quotidianamente da ciascuna scrofa per 10 giorni dopo il parto allo scopo di valutare l'escrezione di AF. L'aflatossina è stata estratta con colonne di immunoaffinità e determinata con l'HPLC. Nel latte sono stati rilevati livelli molto bassi di AFM1 e AFM2 (0,35%). I campioni di latte hanno dimostrato concentrazioni molto basse di AFM1 e AFM2 (3.9 e 4.6 ng/l rispettivamente), ma anche una consistente presenza di AFB1 (valore massimo 7.7 ng/l) più alta rispetto alla AFM1. L'escrezione di AFB1 può essere dovuta alla maggiore quantità di grassi (7-8%) rispetto al latte della vacca poiché l'AFB1 è meno polare rispetto all'AFM1. Il pattern di escrezione sembra essere diverso fra le diverse AF: AFB1 raggiunge il livello massimo rapidamente entro 2 giorni e poi decresce, l'opposto avviene per AFM1 e AFM2, che crescono lentamente perché i meccanismi di detossificazione possono richiedere qualche giorno per essere attivi. L'AFB1 carry-over così come AFM1 nel latte è estremamente più basso nella scrofa rispetto alla vacca (1-3%) (Bertuzzi et al., 2003). Inoltre vi è una notevole variabilità individuale nel carry-over influenzata giorno per giorno, da un prelievo di latte all'altro, dallo stato della lattazione (ad inizio lattazione il carry-over può essere 3,5 volte superiore rispetto a quello di animali a fine lattazione) e dallo stato sanitario della mammella, (in presenza di mastite la percentuale di carry-over aumenta) (Van Egmond, 1989).

## Conclusioni

Il costrutto AFB1-BSA si è mostrato in grado di produrre anticorpi specifici nei confronti di AFB1 nel topo e nel coniglio, come riportato in bibliografia (Gathumbi J.K., 2001, Guidi A., 2002), mentre nel suino limitatamente alla nostra indagine non è risultato immunogeno e non ha avuto l'effetto protettivo desiderato nei confronti dell'aflatossina B1 sia nelle due scrofe vaccinate e poi alimentate con mangime contaminato da AFB1 sia nella loro prole indirettamente esposta alla micotossina. La scarsa immunogenicità del vaccino AFB1-BSA potrebbe essere imputabile ad una scarsa quantità di vaccino inoculato, alla via di somministrazione, alla proteina carrier utilizzata nel vaccino; infatti le Aflatossine, a causa del loro basso peso molecolare (c.a. 300 d), non sono in grado di stimolare una risposta immunitaria adeguata e per essere riconosciute dal sistema immunitario devono essere associate a proteine carrier.

Presso il Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio Sezione di Microbiologia Università degli Studi di Parma sono già in corso diversi disegni sperimentali con l'intento di realizzare vaccini ricombinanti o genici da saggiare nel suino e in altre specie in allevamento zootecnico e poterne valutare il potere immunogeno e di protezione nei confronti delle micotossine.

Nei campioni di colostro e latte prelevati all'inizio e durante il periodo di lattazione (tabella n.34) si sono riscontrate solo tracce di AFB1 e di AFM1: solo in tre campioni sono stati riscontrati livelli più significativi. La presenza di minimi residui di AFM1 nel latte delle scrofe è stata segnalata da altri autori e può essere associata alle basse concentrazioni di AFB1 nel mangime (500ppb/kg), o a patologie sistemiche e mammarie (Bonomi et al., 1997).

Le alterazioni morfostrutturali osservate soprattutto a livello epatico e renale sia nelle scrofe sia nei suinetti esposti per diverse settimane a bassi dosaggi di AFB1, appaiono di lieve entità e sono assimilabili alle lesioni descritte in bibliografia in corso di aflatossicosi sub acute –croniche (Meissonnier G.M., 2007; Cabassi E., 2003; Newberne P., 1969) .

## BIBLIOGRAFIA

- **Allen SJ, Wild CP, Wheeler JG, Riley EM, Montesano R, Bennett S, Whittle HC, Hall AJ, Greenwood BM.** (1992) Aflatoxin exposure, malaria and hepatitis B infection in rural Gambian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 86:426-430.
- **Amstad P., Cerutti P.,** (1983). DNA binding of aflatoxin B1 by co-oxigenation in mouse embryo fibroblast C3H/10T1/2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112:1034-1040.
- **Atroshi F., Rizzo A., Westermarck T., Ali-Vhemas T.,** (2002) Antioxidant nutrients and mycotoxins. *Toxicology* 180:151-167.
- **Avantaggio G., Visconti A.** (2003). Misure di controllo della contaminazione da micotossine e strategie di detossificazione. *Tecnica Molitoria* 10:1025-1038.
- **Bedard L.L., and Massey, T.E.,** (2006). Aflatoxin B1-induced DNA damage and its repair. *Cancer Lett.* 241, 174-183.
- **Bertuzzi T., Pietri A., Barbieri G., Piva G.,** (2003). Aflatoxin residues in milk of sows fed a naturally contaminated diet. *Ital. J., Anim.Sci. vol 2 (suppl 1),* 342-236.
- **Bartolini R.** (2002). Come limitare le micotossine. *Rivista di Suinicoltura,* 4: 83-85
- **Barrett, J.R.,** (2000) Mycotoxins: of molds and maladies. *Environ. Health*

Perspect. Focus A, 20-23.

- **Bennett J.W., Klich M.**, (2003). Mycotoxins. Clinical Microbiology Review. 497- 516.
- **Bhatnagar D., Cary, W. J., Ehrlich K., Cleveland Yu and T.** (2006) understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. Mycopathologia 162: 155-166.
- **Blount, W.P.** Turkey "X" Disease. Turkeys, 9:52, 1961.
- **Bouhet S., Oswald IP.** (2005) The effects of mycotoxins, fungal food contaminants on the intestinal epithelial cell-derived innate immune response. Veterinary Immunology and Immunopathology; 108:Issue 1-2 , 199-209.
- **Bonomi A, Quarantelli A, Bonomi BM, Cabassi E, Corradi A, Di Lecce R** (1997). La contaminazione delle razioni per scrofe con aflatossine B1 e/o G1. Effetti sulle performances produttive della prole nelle fasi di accrescimento e di ingrasso. Rivista di scienze dell'alimentazione; 26:42-60.
- **Bonomi A.**, (1999). Effect of aflatoxicosis on meat quality and reproductive performances of pigs. Informatore Agrario v. 55(14) p. 49-53
- **Bruns, H.A.**, (2003). "Controlling Aflatoxin and Fumonisin in Maize by Crop Management ." J.Toxicol. TOXIN REVIEWS 22: 153-173.
- **Cabassi E., Di Lecce R., De Angelis E., Fusari A., Perillo A. e Borghetti P.**; (2004). Aflatoxicosis and Vitamins A and E Supplementation in Sows: Immunological State of their piglets. Veterinary Research Communications, 28: 275-277.

- **Cabassi E., Valente L., Miduri F.,** (2006) Esposizione a xenobiotici e modulazione immunitaria. Ann. Fac. Medic. Vet. Di Parma (vol. XXVI) 265-282.
- **Calvo A.M., Richard A. Wilson, Jin Woo Bok, and Nancy P. Keller.** (2002). Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Sept. 447-459
- **Carbone I., Jorge H.Ramirez-Prado, Jakobek j.L., Horn ,B.W., ,.** (2007). Gene duplication, Modularity and Adaption in the evolution of the Aflatoxin gene cluster. BMC Evol. Biol. 7,111 Doi: 10.1186/1471-2148-7-111.
- **CAST** (2003) Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. Task Force Report n.139 .Council for Agricultural Science and Tecnolog. Ames, IE, pp1-191.
- **Champeil, A., Fourbet, J.,F., Dore,T.,Rossignol,L.,** (2004). Influence of cropin system on Fusarium head blight and mycotoxin levels in winter wheat. Crop Protection 23, 531-537.
- **Chen T., Heflich H.R., Moore M.M., Mei N.,** (2009) Differential Mutagenicity of Aflatoxin B1 in the liver of neonatal and Adult Mice. Environmental and Molecular Mutagenesis 00 :000-000
- **Chung TK, Baker DH, Erdman JWJ.** Hydrated sodium calcium aluminosilicate: effects on zinc, manganese, vitamin A and riboflavin utilization. Poult Sci 1990; 69:1364-1370.
- **Ceruti A., Ceruti M., Vigano G.,** (1993). Botanica medica farmaceutica e veterinaria con elementi di biologia vegetale. Zanichelli , Bologna, Italy

- **Cook WO, Richard JL, Osweiler GD, Trampel DW.** Clinical and pathological changes in acute bovine aflatoxicoses: Rumen motility and tissue and fluid concentrations of aflatoxin B1 and M1. Am J Vet Res 1986; 47:1817-1825.
- **Costa S., Utan A., Speroni E., Cervellati R., Piva g. Prandini A., Guerra M.C.,** (2006) carcinosis acid from rosemary extracts : a potential chemoprotective agent against aflatoxin B1. An in vitro study. Journal of Applied Toxicology. 10 :1002/jat.186.
- **Cotty, P.** (1989). Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. Phytopathology 79, 808–814.
- **Denning, D. W.** (1998). Invasive aspergillosis, Clin Infect Dis 26, 781-803
- **Denissenko, M. F., Cahill, J., Koudriakova, T.B., Gerber N., Pfeifer G.P.,** (1999). Quantitation and mapping of aflatoxin B1-induced DNA damage in genomic DNA using aflatoxin B1-8,9-epoxide and microsomal activation systems. Mutation Research 425 :205-211.
- **Diekman DA, Green ML.** Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. J Anim Sci 1992; 70:1615-1627.
- **Eaton, D.L., Groopman, J. D. (Eds.),**(1994). The toxicology of Aflatoxins: Human Health Veterinary and Agricultural Significance. Academic Press, San Diego.
- **EFSA** (2007). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing



- maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. The EFSA Journal 446, 1-127.
- **Fandohan P., Gnonlonfin, B., Hell, K., Marasas, W.F.O., Wingfield, M.J.,** (2005) Natural occurrence of Fusarium and subsequent Fumonisin contamination in preharvest and stored maize in Benin, West Africa, International Journal of Food Microbiology 99, 173-183.
  - **FAO:** Food and Agriculture Organization. Codex Alimentarius - Food Labelling - Complete Texts - Revised 2001.
  - **Gathumbi J.K., Usleber E., Martlbauer E.,** (2001). Letters in Applied Microbiology. 32, 349-351
  - **Georgianna D. R., Payne G.A.,** (2009). Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: From gene to genome. Fungal Genetics and Biology 46 113-125.
  - **Gerola F. M., Gerola P.D.** (1986) Botanica per i corsi di Medicina Veterinaria e di Scienze della Produzione Animale. Utet, Torino.
  - **Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Bertuzzi, T., Battilani, P.,** (2007). Studies on Aspergillus Section Flavi isolated in northern Italy from maize. Int. J. Food Microbiol. 113:330-338.
  - **Goto, T., Wicklow, D. T., Ito, Y.,** (1996). Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a sclerotium-producing Aspergillus tamaris strai. Appl. Environ. Microbiol. 62:4036-4038.
  - **Groopman, J.D., Donahue, P. R., Zhu, J. Q., Chen, J. S., Wogan, G. N.** (1985). Aflatoxin in humans: detection of metabolites and nucleic acid adducts in urine by affinity chromatography. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.

82, 6492-6496.

- **Groopman JD.** Molecular dosimetry methods for assessing human aflatoxin exposures. In Eaton DL, Groopman JD, eds.(1994) The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary and agricultural significance. Academic Press, 259-279.
- **Groopman, J.D., Thomas W Kensles.** (1999). CRC Critical Reviews in Toxicology. Capter 19, 113-124.
- **GUIDI A., IANNONE G., CASTIGLIERO G., GIANFALDONI D.,** (2002) Produzione di anticorpi altamente specifici diretti contro l'aflatossina B1. Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria LV/2002. 195-204. ISSN 0365-4729
- **Harvey RB, Clark DE, Huff WE, Kubena LF, Corrier DE, Phillips TD.** Suppression of serum iron-binding capacity and bone marrow cellularity in pigs fed aflatoxin. Bull Environ Contam Toxicol 1988; 40:576-583.
- **Harvey RB, Kubena LF, Huff WE, Clark DE, Phillips TD.** Effects of aflatoxin, deoxynivalenol, and their combinations in the diets of growing pigs. Am J Vet Res 1989; 50:602-607.
- **Hatori Y, Sharma RP, Warren RP.** (1991) Resistance of C57B1/6 mice to immunosuppressive effects of aflatoxin B sub(1) and relationship with neuroendocrine mechanisms. Immunopharmacology; 22:127-136.
- **Hayes, J.D., Pulford,D.J., Ellis,E.M.,McLeod,R.,James,R.F.L., Seidegard,J., Mosialou,E.,Jemstrom, B.,Neal,G.E.,** (1998). Regulation of glutathione-S-transferase A5 by cancer chemopreventive agents:

- mechanisms of inducible resistance to aflatoxin B1. Chemico-Biological Interactions 111/112, 51-67
- **Henry SH, Bosch FX, Bowers JC.** (2002) Aflatoxin, hepatitis and worldwide liver cancer risks. Adv Exp Med Biol 504:229-233.
  - **Horn ,B.W., Jorge H.Ramirez-Prado, Carbone I.** (2009). Sexual reproduction and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus parasiticus*. Fungal Genetics and Biology. 46:169-175.
  - **Huwing, A., Freimund,S., Kappeli, O., Dutler H.,** (2001). Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbents. Toxicology Letters 122:179-188.
  - **Ito, Y., Peterson, S.W., Wicklow, D. T., Goto, T.** (2001). *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section Flavi. Mycol. Res. 105:233-239.
  - **International Agency for Research on Cancer (IARC),** (1993a). Ochratoxin A: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, vol.56. International Agency for Research on Cancer,Lyon, France,pp489-521.
  - **International Agency for Research on Cancer (IARC),** (1993b). Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, IARC.
  - **International Agency for Research on Cancer (IARC),** (2002). Traditional Herbal Medicines, Some mycotoxins, Naphthalene, and Styrene. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC,

82-171.

- **Johnson, W.W., Harris, T. M., and Guengerich, F.P.** (1996). Kinetics and mechanism of hydrolysis of aflatoxin B1 exo-8,9-epoxide and rearrangement of the dihydrodiol. J. Am. Chem. Soc., 118, 8213-8220.
- **Johnson, W.W., Ueng, Y.F., Widersten, M., Manneervik, B., Hayes, J.D., Sherratt, P.J., Ketterer, B. and Guengerich, F.P.** (1997b). Conjugation of highly reactive aflatoxin B1 exo-8,9-epoxide catalysed by rat and human glutathione transferases: estimation of kinetic parameters. Biochemistry, 36, 3056-3060.
- **Jones, R. K., H., E. Duncan, and P. B. Hamilton.** (1981). Planting date, harvest date, and irrigation effects on infection and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in field corn. Phytopathology 71:810.
- **Kensler, T.W., Egner, P.A., Wang, J.B., Zhhu, Y.R., Zhang, B.C., Lu, P.X., Chen, J.G., Qian, G.S., Kuang, S.Y., Jackson, P.E., Gange, S.J., Jacobson, L.P., Munoz, A., Groopman, J.D.,** (2004). Chemoprevention of hepatocellular carcinoma in aflatoxin endemic areas. Gastroenterology 127, 310-318.
- **Kensler TW, Davis EF, Bolton MG.** Strategies for chemoprotection against aflatoxin-induced liver cancer. In Eaton DL, Groopman JD, eds. The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance. Academic Press, 1994; 281-306.
- **Krishnan Suganthini, E.K. Manavathu and P.H. Chandrasekar** (2009). *Aspergillus flavus*: an emerging non-*fumigatus* *Aspergillus* species of significance. Blackwell Verlag Gmbh Mycoses 52, 206-222.

- **Klich, M., Tiffany, L.H., Knaphus, G.** (1992). Ecology of the Aspergilli of soils and litter . In: Bennet, J.W., Klich, M.A., eds. Aspergillus Biology and Industrial Applications. Boston, Butterworth-Heinemann: 329-353.
- **Krishnan Suganthini, Elias K. Manavathu and Pranatharthi H. Chandrasekar.** (2009) *Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. Blackwell Verlag GmbH Mycoses 52, 206-222.
- **Kruiper-Goodman, T.,** (2004). Risk assessment and risk management of mycotoxins in food. In: Mogan, N., Olsen, M. (eds.), Mycotoxins in Food, Detection and Control. CRC Press, New York; Wood head Publishing Limited, Cambridge, England, pp. 3-31 (Chapter 1)
- **Kurtzman, C.P., Horn, B. W. & Hesseltine, C.W.** (1987) *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. Antonie van Leeuwenhoek, 53, 147-158.
- **Lanyasunya, T.P., Wamae, L.W., H.H., Olowofeso, O., Lokwaleput, I.K.,** (2005). The risk of mycotoxins contamination of dairy feed and milk on smallholder dairy farms in Kenya. Pakistan Journal of Nutrition 4, 162-169.
- **Larsson P, Tjalve H.** (1996) Bioactivation of aflatoxin B1 in the nasal and tracheal mucosa in swine. J Anim Sci; 74:1652-1680.
- **Luthy J, Zweifel U & Schlatter CH** (1980). Metabolism and tissue distribution of [<sup>14</sup>C] aflatoxin B1 in pigs. Food and Chemical Toxicology 18, 253-256.
- **Luppi A., De Angelis E., Losio N., Lombardi G., Miduri F., Cabassi**

- E., (2002). Immunotossicità da aflatossine in scrofe gravide. Atti S.I.P.A.S., XXVIII:127-136
- **Marin DE, Taranu I, Bunaciu RP, Pascale F, Tudor DS, Avram N, Sarca M, Cureu I, Criste RD, Suta V, Oswald IP** (2002). Changed in performance, blood parameters, humoral and cellular immune responses in weanling piglets exposed to low doses of aflatoxin. J Anim Sci; 80:1250-1257.
  - **Meissonnier, G. M., Laffitte, J., Loiseau, N., Benoit, E., Raymond, I., Pinton P., Cossalter A.M., Bertin G., Oswald I.P., Galtier P.,** (2007). Selective impairment of drug-metabolizing enzymes in pig liver during subchronic dietary exposure to aflatoxin B1. Food and Chemical Toxicology 45: 2145-2154.
  - **Miller DM, Crowell WA.** (1981) Experimental aflatoxicosis in swine: morphological and clinical pathological results. Can J Comp Med; 45:343-351.
  - **Moccheggiani E., Santarelli L., Tibaldi A., Corradi A., De Angelis E., Borghetti P., Bonomi A., Fabri N., Cabassi E.,** (1998). Zinc, thymic endocrine activity and myogenin responsiveness (PHA) in piglets exposed to maternal aflatoxicosis B1 and G1. Vet Immunol Immunopathol, 62:245-260.
  - **Moon EY.** (1999) Inhibition of various functions in murine peritoneal macrophages by aflatoxin B1 exposure in vivo. IntJ Immunopharmacol, 21:47-58
  - **Morgan, J, Wannemuehler, K. A., Marr, K. A., Hadley, S., Kontoyian-**

- nis, D. P., Walsh, T. J., Fridkin, S. K., Pappas, P. G. & Warnock, D. W. (2005). Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stemcell and solid organ transplantatio: interim results of a prospective multicenter surveillance program. Med Mycol 43 (suppl.1), S49-S58.
- **Morrow, P. E** (1980). Physics of airborne particles and their deposition in the lung. Ann N Y Acad Sci 353, 71-80.
  - **Miller DM, Wilson DM.** (1994) Veterinary diseases related to aflatoxins. In Eaton DL, Groopman JD, eds. The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural Significance. Academic Press; 347-364.
  - **Munkvold, G.P.,Hellminch,R.L.,** (2000). Genetically modified, insect resistant maize, implications for management of ear and stalk diseases. P-plant Health Program.
  - **Munkvold, G.P.** (2003). Cultural and Genetic Approches to managing mycotoxins in maize. Annual Review of Phytopathology Vol. 41: 99-116.
  - **Newberne P. and Butler W.H.,** (1969) :Acute and Chronic effects of Aflatoxin on the liver on domestic and laboratory animals: a review. Cancer Research 29, 236-250
  - **O’Callaghan, J., Stapleton, P.C., Dobson, A.D.W.** (2006). Ochratoxin Abiosynthetic genes in *Aspergillus Ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. Fungal Genet. Biol. 43:213-221.
  - **Ominski, K.H., Marquaardt, R.R., Sinha, R.N., Abramson D.,** (1994). Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi.

- In: J.D. Miller e H.L. Trenholm (eds). Mycotoxins in Grain, Compounds Other Than Aflatoxin. Eagan Press, St. Paul, MN,USA. 287-312.
- **Ottinger, CA | Kaattari, SL** (2000) Long-term immune dysfunction in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed as embryos to aflatoxin B sub. Fish & Shellfish Immunology [Fish Shellfish Immunol.]. Vol. 10, no. 1, pp. 101-106.
  - **Oswailer G.D.**, (1999) Mycotoxins. In Straw B.E., D'Allaire S., Mengeling W.L., Taylor D. J., Disease of Swine, Blackwell Science, Oxford.
  - **Panangala VS, Giambrone JJ, Diener UL, Davis ND, Hoerr FJ, Mitra A, Schultz RD, Wilt GR.**(1986) Effects of aflatoxin on the growth performance and immune responses of weanling swine. Am J Vet Res, 47:2062- 2077
  - **Paul M., Newberne and William H. Butler** (1969), Acute and Chronic Effects of Aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals: a review. Cancer research 29, 236-250.
  - **Payne G.A., W.M..Hagler,Jr, and Cr Adkins**, (1988). "Aflatoxin accumulation in inoculated eras of field-grown maize." Plant. Dis. 72: 422-429.
  - **Payne G.A.**,(1998). Process of contamination by aflatoxin-producing fungi and their impact on crops. In: Sinha, K. K., Bhatnagar, D., eds Mycotoxins in Agriculture and Food Safety. New York: Marcel Dekker, Inc. pp 279-306
  - **Peraica, M., Radic B., Lucic A., Pavlovic M.**, (1999) toxic effects of mycotoxins in humans . Bulletin of the World Health Organization, 77:



- 754-766.
- **Peterson, S.W. (1995).** Phylogenetic analysis of *Aspergillus* sections *Cremeri* and *Wentii*, based on ribosomal DNA sequences. *Mycol. Res* . 9:1349-1355.
  - **Phillips TD, Sarr AB, Grant PG.** Selective chemisorption and detoxification of aflatoxins by phyllosilicate clay. *Nat Toxins* 1995; 3:204-213.
  - **Phillips TD, Lemke SL, Grant P.** Characterization of clay-based enterosorbents for the prevention of aflatoxicosis. *Adv Exp Med Biol* 2002; 504:157-173.
  - **Pier AC, McLoughlin ME.** Mycotoxic suppression of immunity. In Lacey J, ed. *Tricothecenes and other mycotoxins*. New York: John Wiley, 1985a; 507-519.
  - **Pier AC, McLoughlin ME, Richard JL, Baetz A, Dahfren RR.** In utero transfer of aflatoxin and selected effects in neonatal pigs. In Lacey J, ed. *Tricothecenes and other mycotoxins*. New York: John Wiley, 1985b; 495–506.
  - **Pier AC, Varman MJ, Dahlgren RR, Belden EL, Maki LR. (1986).** Aflatoxic suppression of cell mediated immune response and interaction with T-2 toxin. In Steyn PS, Vleggar R, eds. *Mycotoxins and Phycotoxins*. Elsevier, Amsterdam,; 423-434.
  - **Pier AC., (1991)** The influence of mycotoxins on the immune system. In Smith JE, Henderson RS, eds. *Mycotoxins and Animal Foods*. CRC Press, Boca Raton, FL. 1991; 489-497
  - **Pier A. C., (1992)** Major biological consequences of aflatoxicosis in ani-

- mal production. J. Anim Sci 70:3964-3967.
- **Pietri**, (1998). Micotossine, la situazione odierna in Italia. Rivista di Avicoltura 1/2:32-38 .
  - **Pietri A.**, Micotossine e produzioni casearie. [www.dairyonline.it](http://www.dairyonline.it)
  - **Piva G. e Pietri A.** (2002) Atti SIPAS 2002, XXVIII, 43-65
  - **Pompa G.**, (1994). Aflatossine. In: C. Beretta ed Tossicologia Veterinaria. Casa editrice Ambrosiana, Milano, Italy, 360-365
  - **Reddy RV, Taylor MJ, Sharma RP.** (1987) Studies of immune function of CD-1mice exposed to aflatoxin B sub(1). Toxicology; 43:123-132.
  - **Richard J, Thurston JR, Pier AC.** (1978) Effects of mycotoxins on immunity. In Rosenberg P, ed. Toxins: animal, plant and microbial. New York: Pergamon Press; 801-817.
  - **Richard, J.L.**, (1991): Mycotoxins as immunomodulators in animal system. In: Bray, G.A., Ryan, D.H. (Eds.), Mycotoxins, Cancer, and Health, Pennington Center Nutrition Series. Louisiana State University Press, Baton Rouge, LA, pp. 197-220.
  - **Roebuck BD, Maxuitenko YY.** (1994) Biochemical mechanisms and biological implications of the toxicity of aflatoxins as related to aflatoxin carcinogenesis. In Eaton DL, Groopman JD, eds. The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary and agricultural significance. Academic Press; 27-43.

- **Sabbioni ,G., and Wild,CP** (1991) identification o fan aflatoxin G1-serum albumin adduct and its relevance to the measurement of human exposure to aflatoxins. Carcinogenesis, 12,97-103.
- **Sawhney D.W, DV Vadehra, RC Baker** –(1973) ] The metabolism of 14C aflatoxins in laying hens.: Poult Sci. Jul;52(4):1302-9.
- **Samson, R. A. (2001).** Current fungal taxonomy and mycotocins. In: Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millenium. Wageningen. The Netherlands: Ponsen & Looyen.
- **Sandrine Bouhet, Isabelle P.Oswald** (2005). “the effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the epithelial cell-derived innate immune response.” Vet. Immunology and Immunopathology. 108: 199-209.
- **Santin, E.,** (2005). Mould Growth and mycotoxin production. In : The Mycotoxin Blue Book, Diaz, D.E. (eds.), Nottingham University Press. Thrumpron, Nottingham, pp.225-234.
- **Scheidegger and Payne** (2003). “Unlocking the Secrets Behind Secondary Metabolism: A review of Aspergillus Flavus from Pathogenicity to Functional Genomics.” Journal of Toxicology 22:Nos, 2 &3 : 423-459.
- **Schmidt-Heydt M., Abdel-Hadi A., Magan N., Geisen R** (2009). Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of aspergikllus flavus in relation to various combinations of water activity and temperature. Internal Journal of Food Microbiolgy 135 231-237.
- **Shane SM.** (1994). Economic issues associated with aflatoxins. In Eaton DL, Groopman JD, eds. The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance. Academic Press, 513-527.

- **Sharma, R.P.**, (1993) immunotoxicity of mycotoxins. J. Dairy Sci. 76, 892-897.
- **Sherif O. Sherif, Emad E. Salama, Mosaad A. Abdel-Wahhab.** (2009) mycotoxins and child health: the need for health risk assessment. Int.J. Hyg. Environ Health 212:347-368.
- **Silvotti L, Petterino C, Bonomi A, Cabassi E.** (1997) Immunotoxicological effects on piglets of feeding sows diets containing aflatoxins. Vet Rec, 141:469-472.
- **Smart, M. G., Wicklow, D.T., Caldwell, R.W.** (1990). Pathogenesis in *Aspergillus* ear rot of maize: light microscopy of fungal spread from wounds. Phytopathology 80 (12):1287-1294.
- **Smela M.E., Currier S., A. Bailey., Essigmann**(2001). The chemistry and biology of aflatoxin B(1): from mutational spectrometry to carcinogenesis. Carcinogenesis 22,n4 535-545.
- **Smela M.E., Hamm, M. L., Henderson, P.T., Harris, C.M., Harris, T.M., and Essigmann, J.M.**, (2002). The aflatoxin B(1) formamidopyrimidine adduct plays a major role in causing the types of mutations observed in human hepatocellular carcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 6655-6660.
- **Smith JE, Solomons G, Lewis C, Anderson JG** (1995) Role of mycotoxins in human and animal nutrition and health. Nat Toxins. 3(4):187-92; discussion 221.
- **Somapundo, S., Devliegherea, F., Geeraerdc, A. H., De Meulenaerb, B., Van Impec, J. F., Debeverea J.**, (2007). Modelling of the individual

- and combined effects of water activity and temperature on the radial growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on corn. Food. Microbiol. 24:517-529.
- **Tamura, M., Kawahara, K., Sugiyama, J. I.** (2000). Molecular phylogeny of *Aspergillus* and associated teleomorphs in trichocomaceae (Eurotiales). In: Samson, R.S., Pitt, J. I. Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Singapore : Harwood Academic Publishers, pp.357-372.
  - **Tiemersma, E.W., Omer, R.E., Bunschoten, A., Van't, V.P., Kok, F.J., Idris, M.O., Kadaru, A.M., Fedail, S.S., and Kampan, E.** (2001). Role of genetic polymorphism of glutathione-S-transferase T1 and microsomal epoxide hydrolase in aflatoxin-associated hepatocellular carcinoma. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev 10, 785-791.
  - **Trail F., Mahanti N., Linz J.** (1995). Molecular biology of aflatoxin biosynthesis. Microbiology, 141, 755-765.
  - **Trucksess MW, Stoloff L, Brumley W, Wilson D, Hale O, Sangster LT, Miller DM.** Aflatoxicol and Aflatoxins B1 and M1 in the tissues of pigs receiving aflatoxin. J Assoc Off Anal Chem 1982; 65:884-887.
  - **Turner PC, Moore SE, Hall AJ, Prentice AM, Wild CP.** (2003) Modification of immune function through exposure to dietary aflatoxin in Gambian children. Environ Health Perspect ;111:217-220.
  - **Turner, P., Sylla, A., Gong, Y., Diallo, M., Sutcliffe, A., Hall, A., Wild, C.,** (2005). Reduction of exposure to carcinogenic aflatoxins by postharvest intervention measures in West Africa: a community-based intervention

- study. Lancet 365, 1950-1959.
- **Van Egmond HP.** (1989) Aflatoxin M1: Occurrence, Toxicity, Regulation. In van Egmond HP, ed. Mycotoxins in Dairy Products. Elsevier Applied Science, London and New York
  - **Varga,J., Rigo, K., Toth, B., Teren, J., Kozakiewicz, Z.,** (2003). Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. Food Technol. Biotechnol. 41 (1):29-39.
  - **Wagacha J.M., Muthomi J.W.,** (2008) Mycotoxin problem in Africa: Current status, implications to food safety and Health and possible management strategies. International Journal of Food Microbiology, 124 :1-12.
  - **Wang JS, Qian GS, Zarba A, He X, Zhu YR, Zhang BC, Jacobson L, Gange SJ, Munoz A, Kensler TW, Groopman JD.** (1996) Temporal patterns of aflatoxin-albumin adducts in hepatitis B surface antigen-positive and antigen-negative residents of Daxin, Qidong county, People's Republic of China. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 5:253-261.
  - **Wild C.P., Turner P.C.** (2002). The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decision. Mutagenesis 17: 471-481.
  - **Widstrom, N.W.** (1996). The aflatoxin problem with corn grain. In: Sparks D.L., ed. Advances in Agronomy. New York: Academic Press, pp.219-280.
  - **Williams JH, Phillips TJ, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D.** (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicol-

- ogy, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr* ; 80:1106-1122.
- **World Health Organization (WHO)**, (1986). Principles for evaluating health risks from chemicals during infancy and early childhood; the need for a special approach, IPCS, Environmental Health Criteria 59, WHO, Geneva.
  - **World Health Organization (WHO)**, (2006). "Mycotoxins in African foods: implications to food safety and health." AFRO Food Safety Newsletter. World Health Organization Food Safety (FOS), Issue No. July 2006.
  - **Wu Q., Jezkova A., Yuan Z., Pavlikova L., Dohnal V.**, (2009). Biological degradation of aflatoxins . Drug Metabolism Reviews, 41 (1):1-7.
  - **Wu Q., Jezkova A., Zonghui Y., Pavlikova L., Dohnal V., and Kuca K.**, (2009) Biological degradation of aflatoxins. Drug Metabolism Reviews : 41 (1):1-7
  - **Yabe K., Nakajima H.**, (2004) Enzyme reactions and genes in aflatoxin biosynthesis. Appl. Microbiol Biotechnol 64: 745-755.
  - **Yannikouris, A. and Jouany, J. P.** (2002). Mycotoxins in feed and their fate in animals: a review. Animal Research 51:81-99.
  - **Young RH, Hendrickse RG, Maxwell SM, Maegraith BG.** (1988) Influence of aflatoxin on malarial infection in mice. Trans R Soc Trop Med Hyg; 82:559-560.
  - **Yu, J., Chang, P.K., Ehrlich, K.C., Cary.J.W., Bhatnagr, D., Cleveland, T.E., Payne, G.A., Linz, J.E., Woloshuk, C.P.,Bennett,**

- J.W.**, (2004). Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. Appl. Environ. Microbiol. 70: 1253-1262
- **Zaghini, A., Lambertini, L.**, (1995) Piante e funghi di interesse veterinario. Caratteristiche Botaniche ed Aspetti Farmacologici e Tossicologici. CLUEB, Bologna, Italia.
  - **Zaghini, A., Sardi L., Altafini A., Rizzi, L.**, (2005). Residues of aflatoxins B1 and M1 in different biological matrices of swine orally administered aflatoxin B1 and *Saccharomyces cerevisiae*. Ital. J. Animal.Sci Vol. 4 (Suppl.2), 488-490.
  - **Zaghini, A., Martelli, G., Roncada, P., Simioli, M., Rizzi, L.**, (2005). Mannan oligosaccharides and aflatoxin B1 in feed for laying hens: effects on egg quality, aflatoxin B1 and M1 residues in eggs, and aflatoxins B1 levels in liver. Poul. Sci. 84: 825-832.



## Ringraziamenti

Ringrazio sentitamente per la collaborazione e il contributo scientifico e tecnico la Prof.ssa Anna Maria Cantoni, il Prof. Attilio Corradi, il Prof. Valter Magliani, il dottor Stefano Jottini e la signora Paola Gianelli.