

MICOTOSSINE

# Overview su tossicità, modalità operative e normativa nel settore veterinario

Fiorenza Minervini<sup>1</sup> e Giovanni Pagliarulo<sup>2</sup><sup>1</sup> Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA), CNR, Bari<sup>2</sup> Dirigente Veterinario, ASL-Bari, Putignano

**L**e micotossine sono metaboliti secondari prodotti da funghi filamentosi che attaccano prevalentemente i cereali appartenenti al genere *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Stachybotris*, *Alternaria* e che causano un effetto tossico (micotossicosi) quando ingeriti dagli animali e dall'uomo. Le micotossine possono essere sintetizzate dai funghi in campo, durante lo stoccaggio delle granaglie e lungo il ciclo di lavorazione dell'alimento, entro ambiti particolari di temperatura e umidità, variabili a seconda della specie fungina e della/e micotossina/e prodotta/e. Sebbene la presenza visibile di ammuffimento sia indice di deterioramento della qualità di un prodotto e di probabile presenza di micotossine, la mancanza visibile di ammuffimento non ne garantisce l'assenza. Oltre alla contaminazione diretta, spesso la contaminazione degli alimenti di origine animale può derivare da *carry over*, vale a dire la possibilità di passaggio delle tossine o loro derivati dal mangime ai tessuti commestibili, latte e uova compresi. Questo tipo di contaminazione "indiretta" assume particolare rilevanza in quanto i cereali, soprattutto le parti più esterne degli stessi, costituiscono gli ingredienti base delle formulazioni mangimistiche per gli animali in produzioni zootecnica, come i sottoprodotti della produzione delle farine per uso alimentare umano. Le micotossine determinano una vasta gamma di effetti biologici, dovuti alla loro capacità di danneggiare i vari organi e/o sistemi bersaglio e per tale ragione sono classificate in immunotossine, dermatotossine, epatotossine, nefrotossine e neurotossine, in relazione all'organo bersaglio interessato oppure in mutagene, cancerogene e/o teratogene a seconda del prevalente effetto citopatogenico. Gli effetti osservati solo raramente sono di tipo acuto, ma più frequentemente sono di tipo cronico (causati dai bassi livelli di esposizione). Le micotossine sono in grado di

determinare gravi effetti sulla salute dell'uomo e degli animali, e seri danni economici ad allevatori e aziende agricole in quanto le derrate alimentari, le granaglie e i mangimi per gli animali rappresentano substrati ideali per la crescita delle muffe. La contaminazione delle granaglie da micotossine è una problematica trasversale in quanto coinvolge il settore veterinario a differenti livelli (tabella 1).

Argomenti correlati e molto delicati per gli operatori sanitari coinvolti nel problema della vigilanza e sorveglianza delle micotossine sono quelli della rappresentatività dei campionamenti e della affidabilità delle determinazioni analitiche da effettuare presso i laboratori. Per quel che riguarda il primo infatti non bisogna mai dimenticare che le micotossine sono contaminanti che si ritrovano nelle derrate distribuite in modo non uniforme, ma molto eterogeneo, pertanto vige l'obbligo del rispetto di tutta una serie di procedure finalizzate ad assicurare che il campione sia effettivamente rappresentativo dell'intera partita, talvolta costituita da diverse decine o centinaia di tonnellate trasportate via nave su scala planetaria. Sotto questa dimensione resta ancora valido il datato D.M. 20.04.1978 che relativamente ai prelievi ufficiali sugli alimenti per animali realizzati dalle competenti Autorità Sanitarie, codifica le modalità di stesura del verbale, le procedure da applicare, gli strumenti da utilizzare, il numero dei campioni elementari da prelevare da punti diversi della partita in funzione della sua presentazione, delle sue dimensioni e della matrice da determinare in laboratorio.

Inoltre per quel che riguarda le determinazioni analitiche è indispensabile che siano effettuate con metodi quali/quantitativi riconosciuti e ben identificati presso laboratori accreditati. In tal senso codificano il Reg. (CE) n. 401/2006 del 23/02/2006, relativo ai metodi di campionamento e di anali-



	Competenza prevalente
Controllo sulla gestione del sistema qualità a livello di approvvigionamento presso impianti di produzione mangimi.	Consulenza aziendale; Serv. Vet. ASL – A. F. “C”
Controllo in azienda sulla qualità dei mangimi somministrati agli animali.	Veterinario aziendale Serv. Vet. ASL – A. F. “A” e “C”
Gestione e trattamento di casi clinici di tossicosi negli animali.	Veterinario aziendale Serv. Vet. ASL – A. F. “A” e “C”
Controllo sulla gestione del sistema qualità a livello di impianti di produzione/trasformazione di alimenti di origine animale.	Consulenza aziendale Serv. Vet. ASL – A. F. “B” e “C”
Controllo sulla salubrità degli alimenti di origine animale.	Serv. Vet. ASL – A. F. “B”

**Tabella 1.** Livelli di coinvolgimento delle diverse competenze afferenti alla Medicina Veterinaria.

si per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari, e il Reg. (CE) n. 152/2009 del 27/01/2009, che fissa metodi di campionamento e d'analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali. Tuttavia quest'ultimo all'Allegato V – Metodi di analisi per il controllo della presenza di sostanze indesiderabili negli alimenti per animali - nulla stabilisce ancora relativamente alle micotossine, quindi anche nel caso degli alimenti per gli animali si adottano regolarmente le disposizioni relative al citato Reg. 401/2006, in teoria valide solo per gli alimenti destinati all'uomo.

La gestione del problema è sicuramente molto complessa e la competenza veterinaria abbraccia diversi livelli, in relazione alle proprie conoscenze molto articolate in ambito tossicologico, sull'analisi del rischio, sulle diverse tecnologie di produzione, lavorazione e stoccaggio delle derrate alimentari, nonché sul piano legislativo che impone limiti e soglie di tollerabilità. Per tal motivo di seguito si riporta una rassegna sulle micotossine di interesse veterinario attualmente incluse in norme legislative, nazionali e/o comunitarie, con riferimenti alle derrate più suscettibili di contaminazione, alla tossicità riscontrabile negli animali, alle norme legislative specifiche e alle misure da adottare per ridurre l'esposizione degli animali a tali sostanze.

## Aflatossine

Le Aflatossine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> sono micotossine prodotte soprattutto da *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* specialmente in aree geografiche caratterizzate da climi caldi e umidi ma, grazie all'economia globale che permette il reperimento di prodotti ovunque, ormai il problema delle aflatossine interessa qualsiasi area del mondo. Le derrate destinate agli animali maggiormente suscettibili di contaminazione sono rappresentate dal mais e prodotti derivati, semi di cotone e oleaginosi. Inoltre i prodotti di scarto dell'estrazione dell'olio (arachidi e semi di girasole) nonché i prodotti di derivazione della fermentazione alcolica (orzo, grano e miglio), spesso utilizzati per l'alimentazione animale, possono risultare contaminati da aflatossine e, per tale motivo,

pericolosi per bovini, suini e polli. L'Aflatossina B<sub>1</sub> è la prima micotossina per la quale sono stati fissati i limiti massimi consentiti nei mangimi al fine di poter salvaguardare la salute umana in quanto è l'unica micotossina con accertata attività cancerogena per l'uomo (e per tal motivo inclusa dall'*International Agency for Research of Cancer* [IARC] nel Gruppo 1 delle sostanze ad attività cancerogena) e i residui del suo metabolita (Aflatossina M<sub>1</sub>) nel latte rappresentano un serio pericolo per l'uomo.

Il Decreto Legislativo 10 maggio 2004 n. 149 (tabella 2) definisce i seguenti limiti massimi di Aflatossina B<sub>1</sub> nei mangimi completi e complementari delle diverse specie animali, invece il tenore massimo di Aflatossina M<sub>1</sub> nel latte è stabilito nell'allegato al Reg. (CE) N. 1881/2006 nella misura di 0,05 µg/kg (ppb).

In seguito a diversi riscontri di Aflatossina B<sub>1</sub> nei mangimi e di M<sub>1</sub> nel latte dal 2003 in poi, il Ministero della Salute, con nota prot. n. 28056/P del 01/08/2006 della Direzione Generale della Sicurezza degli Alimenti e della Nutrizione (ex D.G.S.V.A. – Uffici IX e XI bis), ha emanato le *Linee guida nazionali per la predisposizione di piani di prevenzione delle Aflatossine nei mangimi e nel latte vaccino, bufalino e ovi-caprino e nei prodotti a base di latte* sulla base delle quali diverse Regioni hanno redatto propri piani di controllo e prevenzione più specifici. Queste disposizioni riconoscono la propria finalità nella necessità di ridurre il rischio per il consumatore compatibilmente con quella di non sovraccaricare i laboratori, ma di mirare piuttosto alla ottimizzazione delle attività analitiche. La sintesi tra queste esigenze richiede un approccio diretto alla prevenzione più che al monitoraggio con l'attribuzione all'operatore di un ruolo fondamentale basato sui principi dell'autocontrollo sia nel settore dei mangimi sia in quello lattiero-caseario. Alle Autorità di controllo spetta il compito di verificare con estrema attenzione la capacità degli operatori di fornire le necessarie garanzie della corretta e costante applicazione del dettato normativo attraverso piani programmati di attività di controllo ufficiale, ai sensi del Reg. 882/2004, art. 3. Per quel che riguarda i controlli sugli alimenti per animali, questi devono essere svolti nei mangimifici, negli impianti di

lavorazione e nei depositi di cereali, granelle e farine. Il Piano di autocontrollo da attuare presso i mangimifici deve prevedere l'analisi per la ricerca di micotossine su tutti i lotti di granella di mais e suoi derivati in accettazione e sugli altri cereali/materie prime per mangimi, implementato con un efficace sistema di tracciabilità e rintracciabilità. Anche nelle aziende zootecniche di produzione di latte alimentare deve essere messo in atto il sistema di tracciabilità e rintracciabilità, differenziato se gli alimenti per animali vengono prodotti *in loco* o acquistati dall'esterno. Nel caso dei mangimi auto-prodotti deve identificare tutte le loro fasi produttive fino alla somministrazione agli animali identificando per ogni fase i rischi e le misure preventive adottate per prevenire la proliferazione delle muffe. Nel caso dei mangimi acquistati, l'autocontrollo aziendale deve prevedere la selezione dei fornitori sulla base di sistemi di garanzia del prodotto ritenuti idonei che tengano conto dei controlli adottati dal fornitore. Saranno somministrati agli animali solo alimenti per i quali sia attestata la conformità ai limiti imposti dalla normativa o addirittura al di sotto di eventuali limiti di attenzione considerati accettabili e concordati con il fornitore. La stessa nota ministeriale stabilisce che le aziende di produzione di latte vaccino, ovi-caprino o bufalino, i centri di raccolta e gli stabilimenti di trattamento e di trasformazione adottino piani di autocontrollo che prevedano analisi per la determinazione di Aflatossina M<sub>1</sub> su campioni di latte, con relative registrazioni. È necessario che la conformità delle produzioni di latte sia garantita attraverso periodiche analisi realizzate secondo specifici accordi tra l'allevatore e il primo raccoglitore, a cura di quest'ultimo. La frequenza dei prelievi deve essere tale da garantire un costante monitoraggio nei periodi più a rischio, fino a ridursi a un prelievo mensile in quelli considerati non a rischio. In ogni caso la frequenza andrebbe stabilita in considerazione dei fattori di rischio contingenti, quali modifiche nella razione alimentare giornaliera, introduzione di nuovi alimenti a rischio o apertura di nuova trincea di silo mais/pastone di mais. Qualora venga individuato il raggiungimento di un livello di attenzione è necessario prevedere un immediato intervento

correttivo sulla razione alimentare con l'eliminazione/riduzione degli alimenti a maggior rischio di contaminazione e relativa comunicazione al Servizio Veterinario ASL il quale sorveglia sulla sospensione del conferimento del latte prodotto, azioni intraprese, ulteriori determinazioni analitiche finalizzate alla ripresa del conferimento. L'autocontrollo degli stabilimenti di trattamento termico/trasformazione del latte deve dare garanzia che i prodotti siano ottenuti esclusivamente a partire da latte conforme. Pertanto il relativo manuale deve prevedere un capitolo specifico per il controllo dell'Aflatossina M<sub>1</sub>, con indicazione di: periodicità di campionamento, in relazione a capacità produttiva e tipologia dello stabilimento, metodi di analisi, sistema di rintracciabilità e azioni correttive in caso di non conformità. È opportuno che il livello di attenzione sia inferiore a quello limite fissato dal Reg. 1881/2006 (0,05 µg/kg). Il piano di campionamenti deve prevedere un'intensificazione dei controlli nel periodo a maggior rischio, con immediati controlli sul latte delle singole aziende conferenti a ogni anomalo innalzamento sul latte di cisterna. Ogni non conformità deve essere immediatamente comunicata ai Servizi Veterinari competenti per territorio. Questi infatti sono tenuti alla verifica dei protocolli di autocontrollo, delle relative registrazioni, eventuale richiesta di integrazioni/aggiornamenti/miglioramenti, alla contestazione delle sanzioni per le accertate violazioni, al ricorso a ulteriori prelievi per campioni ufficiali di alimenti per animali e/o latte. Tutti i prodotti riconosciuti contaminati o derivati da latte per il quale sia stata accertata la contaminazione, devono essere avviati alla distruzione in quanto non idonei all'alimentazione umana. Unica deroga prevista è relativa al latte crudo risultato non conforme in allevamento il quale può essere destinato ai soggetti giovani all'interno dell'azienda stessa.

#### Effetto tossico

Per quel che riguarda l'effetto tossico indotto dall'Aflatossina B<sub>1</sub>, le aflatossicosi manifeste sono molto rare e sono caratterizzate nella forma acuta da mortalità conseguente a episodi di emorragie severe e lesioni necrotiche

7. Aflatossina B <sub>1</sub>	mg/kg (ppm)	ppb
Tutte le materie prime per mangimi	0,02	20
Mangimi completi per bovini ovini caprini, ad eccezione di:	0,02	20
- mangimi completi per animali da latte	0,005	5
- mangimi completi per vitelli e agnelli	0,01	10
Mangimi completi per suini e pollame (salvo animali giovani)	0,02	20
Altri mangimi completi	0,01	10
Altri mangimi complementari per bovini ovini caprini	0,02	20
Mangimi complementari per suini e pollame (salvo animali giovani)	0,02	20
Altri mangimi complementari	0,005	5

(I valori si intendono riferiti a mangime al tasso di umidità del 12%)

Tabella 2. Decreto Legislativo n. 149 del 10 maggio 2004: estratto dall'Allegato I (art. 3, co. 1).



al fegato, invece le aflatossicosi croniche sono caratterizzate da diminuita assunzione dell'alimento, perdita di peso, astenia, aumentata sensibilità alle infezioni conseguente a immunosoppressione, fino a coma e morte. Caratteristiche sono le lesioni autoptiche che rivelano un fegato decolorato, spesso cirrotico con iperplasia dei canalicoli biliari. Tale quadro si ritrova nei suini dopo ingestione per un mese di 1-3 mg/kg di alimento contaminato. Anche nei volatili si ritrovano gli stessi sintomi e lesioni in seguito a somministrazione di 0,1-0,5 mg/kg di alimento per diverse settimane con emorragie, fragilità ossea e pigmentazione delle carcasse fegato e reni rappresentano gli organi accumulo, ma anche, in misura minore, muscoli e uova, quando si verifica l'ingestione di elevate quantità di micotossina. Nei ruminanti i sintomi di intossicazione si osservano dopo ingestione di 1-3 mg/kg nei bovini e di 50 mg/kg nei piccoli ruminanti e sono caratterizzati da alterazioni delle funzioni epatiche e immunosoppressione con conseguente alta sensibilità alle infezioni e diminuita resistenza acquisita alle vaccinazioni. L'eliminazione delle aflatossine con le urine e con il latte è estremamente rapida, infatti l'Aflatossina M<sub>1</sub> si ritrova nel latte dopo 12 ore dall'ingestione dell'alimento contaminato dalla B<sub>1</sub> e scompare dopo 4 giorni dalla sostituzione della razione. La percentuale di Aflatossina M<sub>1</sub> che viene eliminata con il latte (*carry-over*) è variabile (da 0,6 al 6%) e dipende dalla produzione di latte (maggiore eliminazione durante maggiore produzione). Anche i carnivori possono essere esposti ad aflatossicosi quando esposti ad alimenti per cani e gatti contenenti cereali contaminati e, per la lunga durata della vita, possono sviluppare anche forme tumorali al fegato, oltre a un'aumentata sensibilità alle infezioni e, per tal motivo sono stati definiti, dal D.Lgv. 149/2004, i limiti nella dizione «*Altri mangimi completi 0,01 mg/kg*». Nel caso degli equini, essi potrebbero essere esposti, in particolare dopo la sostituzione nella formulazione alimentare del riso (alimento molto costoso) con i pastoni di arachidi e mais (meno costosi). Infatti è stata segnalata un'intossicazione subacuta in seguito a ingestione di 400 µg/kg di alimento caratterizzata da epatite necrotica e mortalità elevata. Anche per questa specie si può considerare come sicuro il massimo livello di 10 µg/kg fissato dal D.Lgv. 149/2004. Nel caso dei pesci, la trota iridea (*Onchorhynchus mykiss*) risulta la specie più sensibile e i sintomi associati all'aflatossicosi acuta (dopo somministrazione di 0,5 µg/kg) sono rappresentati da anemia, diminuita coagulazione del sangue e ridotto accrescimento. In seguito ad esposizione cronica si osservano lesioni preneoplastiche a livello del fegato.

## Ocratossina A

L'Ocratossina A (OTA) è un'altra micotossina sintetizzata da *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum* in particolare durante erronee condizioni di stoccaggio dei cereali, caratterizzata da potente nefrotossicità e cancerogenicità a

livello di tubuli prossimali in diverse specie animali. Poiché non è accertata la potenziale cancerogenicità per l'uomo la classificazione IARC la include nel Gruppo 2B. Oltre ad essere stata ritrovata in caffè, uva e fichi secchi, vino, birra, cacao, spezie e legumi, può contaminare anche cereali (in particolare grano, orzo, mais e avena) e prodotti derivati (scarti della lavorazione e crusca). La sua presenza è invece trascurabile nel latte vaccino e di altri ruminanti.

A seguito di un grave episodio nel 2006 di contaminazione di una grossa partita di grano proveniente dal Canada, il Ministero della Salute, sulla base dei pareri espressi dall'EFSA e dei valori guida individuati dalla Commissione Europea, con D.M. 15.05.2006 ha determinato, negli alimenti per animali, i limiti riportati in tabella 3.

Anche per l'OTA la determinazione deve essere riferita a mangimi con un contenuto di umidità del 12%. Nel caso questi limiti vengano superati l'autorità di controllo ne dispone il sequestro, il divieto di commercializzazione e la distruzione, a meno che il proprietario del prodotto non faccia richiesta di riutilizzo per altri fini e/o neutralizzazione della nocività.

I limiti suddetti sono stati successivamente confermati con la Raccomandazione della Commissione Europea n. 576 del 17.08.2006, relativa a presenza di deossinivalenolo, zearalenone, ocratossina A, tossine T-2 e HT-2 e fumonisine in prodotti destinati all'alimentazione degli animali (G.U.U.E.L. 229 del 23.08.2006).

### Metabolismo

Per quel che riguarda il metabolismo dell'OTA, dopo ingestione per via alimentare, si verifica un assorbimento massivo a livello dell'esofago e stomaco e, a livello ruminale e nei monogastrici a livello del grosso intestino, OTA viene degradata nel metabolita non tossico Ocratossina (OTα) e quindi rapidamente eliminata con le urine. Per la sua elevata affinità con le proteine, l'OTA nel sangue si lega all'albumina sierica rallentandone l'eliminazione con le urine e aumentando l'emivita: infatti il suino ha un periodo di emivita dell'OTA pari a 3-5 giorni, i vitelli con ruminazione di 3,2 giorni, il coniglio di 8,2 ore, il pollo di 4 ore. La via di escrezione è prevalentemente biliare e renale con un possibile riassorbimento a livello dei tubuli renali che determina un ritorno in circolo della micotossina e un suo

Ocratossina A (OTA)	mg/kg (ppm)
Materie prime per mangimi: cereali e derivati	0,25
Mangimi completi e complementari e razione giornaliera: per suini	0,05
per pollame	0,1

**Tabella 3.** Valori limite di Ocratossina A (OTA), negli alimenti per animali, stabiliti dal D.M. 15.05.2006.

accumulo a livello renale. Il cane e il suino sono le specie più sensibili.

### Tossicità

A riguardo della tossicità, nel suino la forma acuta (poco frequente) è caratterizzata da emorragie diffuse, necrosi epatiche e linfoidi, enterite e nefrite. Più frequente nel suino, invece, è il riscontro di una forma subacuta/cronica (MPS = *Mycotoxic Porcine Nephropathy*) in Norvegia, Danimarca, Polonia e caratterizzata da ritardi nella crescita, diminuita assunzione di alimenti, aumento dell'uremia, poliuria e poli-dipsia. È stato anche segnalato un effetto immunosoppressivo (con aumentata sensibilità alle infezioni), fetotossico-teratogeno (conseguente al passaggio dell'OTA attraverso la placenta) e spermotossico (conseguente al riscontro nel liquido seminale di OTA) caratterizzato da ridotta vitalità e motilità degli spermatozoi. A causa della lunga emivita e dell'accumulo di residui nei reni, l'OTA si può ritrovare nei salumi. Nel caso dei polli è stata segnalata una forma acuta, caratterizzata da anoressia, tremori, atassia e mortalità, e una forma cronica caratterizzata da ritardi nell'accrescimento, osteoporosi e una nefrosi severa con elevato accumulo di urati. I residui nei tessuti di questa specie risultano maggiori rispetto ad altre specie animali in particolare nei reni, fegato e muscolo mentre il rischio per la salute umana legato alla presenza di residui nelle uova è minimo. Nei ruminanti, come già detto, il rischio di intossicazione è basso a causa del potere disintossicante svolto dal rumine che trasforma l'OTA in OT $\alpha$  maggiormente quando si passa da un'alimentazione cerealicola a una prevalentemente a base di foraggio. Nel caso dei carnivori, considerata la lungadurata di vita, si osservano ripercussioni alla funzione renale ed al sistema immunitario con aumentata sensibilità agli

agenti infettivi. È stata segnalata una sindrome nefrosica caratterizzata da poliuria-podipsia, vomito, disidratazione, prostrazione, enterite emorragica. La sindrome è molto più grave in presenza contemporanea di OTA e citrinina, un'altra micotossina spesso sintetizzata dallo stesso fungo contemporaneamente all'OTA. I pesci, sebbene non ci siano segnalazioni di episodi, potrebbero essere potenzialmente esposti alla micotossina quando alimentati con cereali contaminati.

### Misure di prevenzione

Per quel che riguarda le misure di prevenzione della contaminazione dei cereali da OTA, poiché la micotossina è prodotta da funghi di stoccaggio, durante la conservazione dei cereali, specialmente nei silos, molta attenzione deve essere posta sul controllo dell'umidità (che non deve essere superiore al 18%) e della temperatura (più elevata temperatura aumenta la respirazione delle granaglie e, quindi, il vapore acqueo). Per tal motivo è necessario mantenere la temperatura più bassa possibile, provvedere ad essiccare le granaglie ed eseguire procedure di pulizia (prima o dopo lo stoccaggio) in modo da separare le granaglie diverse, rotte, più piccole oppure frammenti di pianta o paglia.

### Fusarium-tossine

Le *Fusarium*-tossine sono le micotossine prodotte da funghi del genere *Fusarium*, funghi che si trovano comunemente sui cereali coltivati nelle regioni temperate dell'America, dell'Europa e dell'Asia. Le Fusariotossine comprendono lo zearalenone (ZEA), le fumonisine e la classe dei tricoteceni. Questi ultimi a loro volta comprendono il deossinivalenolo (DON), il nivalenolo e le tossine T-2 e HT-2.

Micotossina	Limiti massimi consentiti	(mg/kg)
Fumonisine B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub>	Materie prime per mangimi: granoturco e derivati	60
	Mangimi complementari e completi per:	
	- suini, equini, conigli e animali da compagnia	5
	- pesci	10
	- pollame, vitelli (< 4 mesi), agnelli e capretti	20
	- ruminanti adulti (> 4 mesi) e visoni)	50
Zearalenone	Materie prime per mangimi: cereali e prodotti	2
	Sottoprodotti	3
	Mangimi complementari e completi:	
	- per suinetti e scrofette (giovani scrofe)	0,1
	- per scrofe e suini da ingrasso	0,25
	- per vitelli, bovini da latte, ovini e caprini	0,5
Deossinivalenolo	Materie prime per mangimi: cereali e prodotti a base di cereali	8
	Sottoprodotti del granturco	12
	Mangimi complementari e completi	5
	- suini	0,9
	- vitelli (< 4 mesi), agnelli e capretti	2
Tossina T-2 e HT-2	Non definiti	

**Tabella 4.** Limiti massimi consentiti di micotossine in base alla Raccomandazione della Commissione Europea n. 576 del 17.08.2006.



Diversi funghi del genere *Fusarium* sono in grado di produrre, in misura variabile, due o più delle suddette tossine, ampiamente diffuse nella catena alimentare. Le principali fonti di assunzione sono i prodotti a base di cereali, in particolare grano e granoturco.

Le specie di *Fusarium* infettano il grano prima del raccolto. Sono stati individuati diversi fattori di rischio legati all'infezione da *Fusarium* e alla produzione di micotossine. Le condizioni climatiche durante la crescita, in particolare durante la fioritura, hanno un'influenza significativa sul contenuto di micotossina. Tuttavia le buone prassi agricole, volte a ridurre al minimo i fattori di rischio, possono prevenire in certa misura la contaminazione da funghi del genere *Fusarium*.

Il contenuto di fusariotossine nei cereali grezzi può essere ridotto in varia misura mediante decorticazione e la trasformazione. La contaminazione avviene prevalentemente sul campo e la produzione di micotossine si realizza preferibilmente con climi freddi e viene bloccata dall'acidità (es. insilati). Le micotossine T-2 e HT-2 si ritrovano nel grano, mais, avena, orzo, riso, soia, mentre il DON e nivalenolo si trovano preferibilmente nel grano duro e mais, specialmente quando si verificano piogge nel periodo della fioritura, oppure quando si realizza una rotazione mais-grano.

A questo proposito occorre richiamare la Raccomandazione della Commissione Europea n. 576 del 17.08.2006 «Sulla presenza di deossinivalenolo, zearalenone, Ocratossina A, Tossine T-2 e HT-2 e fumonisine in prodotti destinati all'alimentazione degli animali», che invita gli Stati Membri, con la partecipazione degli operatori del settore dei mangimi, a potenziare il controllo sulla presenza di queste micotossine nei cereali e nei suoi derivati; a garantire la multi-analisi dei campioni per accertare la loro presenza e valutare il grado di presenza contemporanea; a rivolgere particolare attenzione alla loro presenza nei sottoprodotti e prodotti secondari destinati all'alimentazione degli animali; a trasmettere regolarmente alla Commissione i relativi risultati analitici; a garantire l'applicazione del sistema HACCP (analisi dei rischi e dei punti critici di controllo) nelle procedure di autocontrollo da parte degli operatori del settore. A tal fine si propongono nell'Allegato i valori di riferimento da considerare per la determinazione dell'accettabilità dei mangimi composti, dei cereali e prodotti a base di cereali destinati all'alimentazione animale (tabella 4).

### Zearalenone

Tra le fusariotossine merita attenzione lo zearalenone (ZEA), una micotossina ad attività estrogenica prodotta da *F. graminearum*, *F. culmorum* e *F. crokwellense*. Lo zearalenone si ritrova preferibilmente sui cereali (mais, sorgo, orzo, grano, riso e avena) e i funghi produttori possono sintetizzarlo sia in campo sia nei silos (specialmente nella zona periferica del silos). In Nuova Zelanda è stato riscontrato lo ZEA anche nei pascoli. Gli alimenti più contaminati sono rappresentati principalmente dal mais e, in misura minore,

dal grano, e gli scarti e le polveri delle granaglie rappresentano la componente più contaminata, che non deve essere destinata all'alimentazione animale.

### Metabolismo

Per quel che riguarda il metabolismo, il suino è l'animale più sensibile, (specialmente il pre-pubere) in quanto metabolizza lo ZEA prevalentemente in  $\alpha$ -zearalenolo, sostanza a più elevata attività estrogenica. La bile rappresenta la via di escrezione più importante e l'eliminazione avviene per via fecale e urinaria.

### Tossicità

Per quel che riguarda la tossicità, dopo ingestione di 1-2 mg/kg di ZEA, si osserva nel suino una sindrome iperestrogenica con prolasso nel retto e atrofia dei testicoli nel maschio. Nei soggetti puberi e nei soggetti gravidi l'iperestrogenismo si osserva a concentrazioni molto più elevate. Nei volatili, le concentrazioni attive sono molto più elevate (10 volte più elevate) e il tacchino risulta la specie più sensibile in cui è possibile osservare l'attività anabolizzante con ipertrofia dell'ovidutto. I volatili metabolizzano sia  $\alpha$ - sia  $\beta$ -zearalenolo e hanno una cinetica molto rapida. Nei ruminanti sono stati segnalati problemi di infertilità sia nelle vacche che nelle pecore, anche in seguito a ingestione di pascoli contaminati da *Fusarium*. In queste specie il rumine metabolizza quasi completamente lo zearalenone sia in  $\alpha$ - sia  $\beta$ -zearalenolo, per tal motivo è possibile ritrovare nella bile presenza di zearanol e taleranol, sostanze ad attività anabolizzante bandite dall'uso negli animali. Il rischio di residui nel latte è molto basso. Negli equini si è descritto un caso di intossicazione naturale con rifiuto del cibo, prolasso del retto ed emorragie interne. Al contrario è stata segnalata assenza di sintomatologia in seguito ad esposizione a livelli naturali di ZEA a livelli naturali. I carnivori sono sensibili all'azione della micotossina, come osservato in prove di intossicazioni sperimentale.

### Misure di controllo

Le misure di controllo devono essere indirizzate essenzialmente verso il mais, che rappresenta il cereale più contaminato, riducendo l'infezione in campo da *Fusarium* tramite l'applicazione delle "buone pratiche agronomiche". Inoltre, nel caso degli animali, specialmente per la specie suina più sensibile, si deve limitare l'uso di scarti della lavorazione dei cereali in quanto sono le frazioni derivanti dalla lavorazione con più elevata concentrazione di micotossine. Al momento non sono disponibili informazioni sui livelli di zearalenone nei foraggi e negli insilati.

### Fumonisin B<sub>1</sub>

Tra le fusariotossine incluse nella legislazione è da comprendere anche la Fumonisin B<sub>1</sub>, una micotossina prodotta sul mais e sorgo principalmente in campo da *Fusarium verticillioides* e *F. proliferatum*. I fattori predisponenti sono

l'attacco di piramide (*Ostrinia nubilisa*) e, per tal motivo si interviene con la lotta chimica all'insetto oppure con l'utilizzo di varietà di cereali resistenti (OGM). Tra le fumonisine la B<sub>1</sub> è considerata il derivato più comune e più tossico del gruppo. I dati sulla percentuale di passaggio (*carry over*) delle tossine dal mangime ai tessuti commestibili, latte e uova compresi, indicano che il *carry over* è modesto e pertanto i residui nei tessuti animali contribuiscono in misura insignificante all'esposizione umana totale.

L'alimentazione con prodotti a base di cereali, in particolare grano e mais, rappresenta, quindi, la principale fonte di assunzione della tossina per l'uomo, nel quale vi è il sospetto che possa causare tumore all'esofago. Nel 1993 l'IARC ha classificato la fumonina B1 nel Gruppo 2B, cioè come "possibile agente cancerogeno per l'uomo".

Gli alimenti destinati agli animali più a rischio sono rappresentati dal glutine, crusca e residui della lavorazione del mais, normalmente destinati agli equini.

#### Tossicità

Per quel che riguarda la tossicità, il suino è sensibile alla Fumonina B<sub>1</sub> presentando edema polmonare dopo ingestione di livelli da 1 a 330 mg/kg, senza variazione delle performance zootecniche. A livelli di 100 mg/kg si osserva dispnea, debolezza del treno posteriore, ittero e morte nel giro di poche ore. Nel siero e nei tessuti si ritrova un accumulo di sfingosina, che deriva da modificazioni del metabolismo dei lipidi a opera dell'inibizione dell'enzima ceramide sintetasi da parte della fumonina B<sub>1</sub> e che rappresenta un marker di esposizione alla micotossina precoce e sensibile. La fumonina B<sub>1</sub> induce effetto citotossico dei macrofagi alveolari e alterata attività fagocitaria. Le lesioni nell'apparato respiratorio sono caratterizzate da accumulo di liquido nella trachea, bronchi, come conseguenza di una tossicità cardio-vascolare; infatti l'edema polmonare è conseguente a ipertensione dell'arteria polmonare, riduzione del ritmo cardiaco e della contrazione del ventricolo sinistro. Sebbene si ritrovino residui nel fegato e nei reni, questo non comporta problemi di residui per la salute umana. Nei volatili si osserva rifiuto del cibo, diminuzione delle performance, diarrea e mortalità. Si è osservato passaggio della Fumonina B<sub>1</sub> nell'uovo, ma senza rischio di residui. Nei ruminanti la Fumonina B<sub>1</sub> viene degradata dalla flora ruminale in aminopentolo, ma non si osserva sintomatologia né passaggio di residui nel latte. Negli equini, la specie più sensibile, la Fumonina B<sub>1</sub> determina una sindrome nervosa indicata come leuco-encefalomalacia, caratterizzata da lesioni necrotiche a livello dell'encefalo (che è stata anche indotta nel coniglio e nel suino) come conseguenza di un deterioramento funzionale della muscolatura liscia dei piccoli vasi per inibizione dei canali del calcio. La dose minima che induce la sindrome nervosa è pari a 0,05 mg/kg p.c./die e induce il riscontro del marker serico (accumulo di sfingosina). I carnivori sono anch'essi potenzialmente esposti alla micotossina, se l'alimento secco contiene mais, ma non ci sono segna-

lazioni di intossicazione. Nei pesci, in particolare il pesce-gatto risulta sensibile, specialmente i soggetti giovani, con ridotto accrescimento. L'effetto più imponente è l'attività immunosoppressiva e il riscontro, nella trota iridea, di tumori epatici dopo esposizione a un iniziatore (ad esempio l'Aflatossina B1).

#### Misure di controllo

Per quel che riguarda le misure per ridurre l'esposizione degli animali, si citano le pratiche agronomiche (quali la lotta alla piramide e l'utilizzo di varietà resistenti alla contaminazione fungina) finalizzate a ridurre la contaminazione in campo, con la pulizia e la cernita dei cereali che determinano una cospicua riduzione dei livelli di micotossina in quanto le fusariotossine si accumulano prevalentemente nelle porzioni superficiali delle cariossidi, quali la crusca.

## Tricoteceni

Tra le Fusariotossine si devono includere anche i tricoteceni quali, da un punto di vista chimico, sono distinti in gruppo A, che comprende le tossine T-2 e HT-2, e in un gruppo B, in cui rientrano il deossinivalenolo (DON) e il nivalenolo. Da un punto di vista tossicologico, i tricoteceni appartenenti al gruppo A sono caratterizzati da un'elevatissima tossicità con repentina mortalità.

Per quel che riguarda la tossicità della tossina T-2, il suino è la specie più sensibile e, dopo ingestione, manifesta rifiuto del cibo con gravi conseguenze sulle performance di accrescimento, vomito, paresi del treno posteriore, arrossamento della mucosa boccale, difficoltà respiratoria e morte. All'autopsia si osservano emorragie al miocardio e intestino. La T-2 induce effetti sulla riproduzione determinando aborti e nascita di suinetti mummificati per passaggio attraverso la placenta. Nel caso del DON, la micotossina non viene metabolizzata e viene eliminata totalmente tramite le feci e le urine non creando problemi di residui nelle carni. L'ingestione di 1 mg/kg di DON causa riduzione dell'ingestione dell'alimento e/o vomito (probabilmente come risentimento di neuromodulatori) con notevoli ripercussioni sull'accrescimento e conseguenze nell'economia zootecnica. Nel caso dei volatili l'assorbimento dei tricoteceni di tipo A e B è rapido, il metabolismo è intenso trasformando i tricoteceni in prodotti meno tossici e l'eliminazione è prevalentemente fecale non essendoci problemi di residui nelle uova. L'intossicazione acuta è caratterizzata da turbe dell'apparato digestivo e nervoso con dispnea, letargia, perdita di equilibrio, disturbi nella deglutizione, diarrea e rifiuto del cibo con morte nel giro di poche ore. Le lesioni sono prevalentemente di tipo emorragico con localizzazione intestinale e muscolare. Si osservano ulcerazioni allo stomaco e congestione dell'intestino. Nella forma cronica si osservano alterazioni delle performance con lesioni radiomimetiche cutanee e anomalie del piumaggio con conseguente riduzione dell'accrescimento. Nei ruminanti il DON viene degradato



dalla microflora ruminale in DOM-1 (composto meno tossico) e, per tal motivo, gli animali più sensibili sono quelli con rumine non funzionante. Non sono stati segnalati problemi di residui in quanto i livelli ritrovati nel latte sono insignificanti. L'esposizione dei ruminanti può avvenire con l'ingestione di lotti di mais contaminati o con insilati di mais o concentrati a base di grano, che determinano una riduzione nella produzione di latte come conseguenza della diminuita ingestione di alimento. Nel caso degli equini è stata segnalata un'intossicazione da T-2 causata da orzo contaminato e caratterizzata da apatia, scialorrea e ipertemia con gravi turbe locomotorie e lesioni necrotiche labiali. Un altro episodio, legato alla presenza di una lettiera costituita da paglia contaminata da DON, era caratterizzato da un danno epatico e ridotto consumo alimentare. In conclusione il cavallo risulta sensibile all'azione dei tricoteceni, in particolare verso forme croniche. I carnivori sono sensibili come il suino e manifestano turbe digestive.

#### Misure di controllo

A proposito delle misure di prevenzione controllo, la Raccomandazione della Commissione N. 2006/583/CE sulla prevenzione e sulla riduzione delle *Fusarium-tossine* in cereali e prodotti derivati, stabilisce i fattori di rischio di cui tener conto nelle Buone Pratiche Agricole (BPA), in funzione del tipo di coltura, del clima e delle pratiche agricole locali, per controllare e gestire le contaminazioni. Infatti le BPA rappresentano la prima linea di difesa contro la contaminazione dei cereali e, conseguentemente, contro le *Fusarium-tossine*, seguite dall'attuazione delle Buone Pratiche di fabbricazione (BPF) durante la manipolazione, lo stoccaggio, la trasformazione e la distribuzione dei cereali. Poiché la contaminazione dei cereali può essere causata da una molteplicità di elementi, non tutti controllabili (come ad esempio le condizioni climatiche), occorre adottare una strategia integrata che tenga conto in modo oggettivo e ragionato dei diversi fattori di rischio evitandone l'accumulo. La raccomandazione n. 2006/583/CE auspica che l'elaborazione di codici nazionali di buona pratica redatti per le varie specie di cereali.

## Il Piano Nazionale per Alimentazione Animale

La Raccomandazione 2005/925/CE del 14 dicembre 2005 prevedeva che gli Stati Membri dovessero attuare un programma coordinato di controlli al fine di verificare le concentrazioni di micotossine (Aflatossina B<sub>1</sub>, OTA, ZEA, DON, fumonisine e Tossine T-2 e HT-2) nei mangimi, indicando i metodi di analisi. Prevedeva inoltre campionamenti casuali e campionamenti mirati, questi ultimi su materie prime per mangimi, in cui si ritiene possibile la presenza di concentrazioni elevate di micotossine, ad esempio cereali, semi oleosi e relativi prodotti e sottoprodotti, nonché mate-

rie prime per mangimi immagazzinati per un lungo periodo o trasportati via mare per lunghe distanze.

La già citata Raccomandazione 2006/576/CE raccomanda agli Stati membri di potenziare il controllo della presenza di tali contaminanti nei cereali e nei prodotti a base di cereali destinati all'alimentazione degli animali e nei mangimi composti trasmettendo regolarmente alla Commissione i risultati analitici ottenuti, per inserirli in una banca dati. Anche in virtù di queste raccomandazioni comunitarie il Ministero della Salute ha ritenuto di implementare il Piano Nazionale di Sorveglianza e Vigilanza sanitaria sull'Alimentazione per Animali (PNAA) con un capitolo sulle micotossine che prevede campionamenti distribuiti su tutto il territorio nazionale a opera dei Servizi Veterinari delle AA.SS.LL.

In virtù delle attuali acquisizioni scientifiche, ma anche in considerazione della necessità di razionalizzare le risorse economiche e di semplificare i carichi di lavoro, si propone, per quanto possibile, di privilegiare analisi con metodo multi-micotossina, per le seguenti determinazioni:

- mais e derivati: aflatossine, OTA, ZEA, DON e fumonisine;
- grano: aflatossine, OTA, DON, T-2 e HT-2;
- avena: T-2 e HT-2.

Il capitolo dedicato alle micotossine del PNAA, redatto per gli anni 2009-2011, si articola in un Piano di Sorveglianza e uno di Vigilanza.

Il Piano di Sorveglianza è finalizzato a monitorare la situazione epidemiologica relativa a possibili fonti di rischio emergenti o ri-emergenti attraverso campionamenti casuali (random) relativi ad aflatossine, OTA, ZEA, DON, fumonisine, T-2 e HT-2. La finalità è quella di realizzare una mappatura del rischio di contaminazione sul territorio nazionale per quel che riguarda anche le micotossine che non hanno ancora soglia limite di contaminazione nei cereali, anche in relazione all'eventuale presenza contemporanea di più micotossine nello stesso campione. In relazione agli obiettivi proposti sono stati assegnati a ogni regione 60 campioni per la determinazione di Aflatossina B<sub>1</sub>, OTA, ZEA, DON e fumonisine in mangimi per animali da reddito, inoltre 400 campioni di avena e grano per determinazione di T-2 e HT-2 e 152 campioni su alimenti per cani e gatti per la determinazione di Aflatossina B<sub>1</sub> e OTA, distribuiti su tutto il territorio del nostro Paese.

Il Piano di Vigilanza è invece finalizzato alla verifica lungo tutta la catena agro-alimentare e zootecnica della conformità ai limiti massimi stabiliti dalle normative vigenti per le micotossine per le quali è accertato un maggior rischio sanitario, quali aflatossine, OTA e fumonisine. La numerosità campionaria assegnata alle diverse Regioni tiene conto di evidenze scientifiche, fattori climatici e produttivi, numerosità delle aziende presenti. In funzione di questi elementi si riconosce un gradiente decrescente dal Nord al Sud Italia con un concentrazione dei campionamenti soprattutto nel Nord-Est. Si tiene anche conto della correlazione tra clima e



contaminazione da micotossine nel senso che per aflatossine e OTA, essendo tossine da stoccaggio, la ricerca privilegia il campionamento presso centri di deposito, mentre per le fusariotossine non essendo praticabile il campionamento in campo, dove di fatto si sviluppa la tossina, si ricorre a quello in qualsiasi sito dopo l'essiccazione. È previsto che il prelievo sia mirato relativamente sia alla tipologia di impianto oggetto del controllo e specie animale di destinazione del prodotto che per le matrici da campionare. Poiché per Aflatossina B1 e OTA la normativa stabilisce limiti precisi, si ricorre al prelievo ufficiale in più aliquote che permettano l'eventuale revisione d'analisi presso l'Istituto Superiore di Sanità (I.S.S.). In caso di non conformità le ASL adottano tutti i provvedimenti necessari finalizzati al controllo del rischio per la salute animale e per quella umana (per fenomeni di *carry-over*), che assicurino che il prodotto sia ritirato dal commercio e dalla somministrazione agli animali. Nel caso invece di accertamento di contaminazione da ZEA, DON, fumonisine, T-2 e HT-2 sarà possibile, previa accurata analisi del rischio, destinare l'alimento contaminato alle specie meno sensibili. Ove i prelievi siano realizzati solo a scopo conoscitivo la raccomandazione è che il numero delle aliquote per campione sia coerente con il numero delle micotossine da controllare.

## Riferimenti legislativi

- *Decreto Ministeriale 20 aprile 1978* (G.U. n. 165 del 15/06/78) sulla modalità di prelievo dei campioni per il controllo ufficiale degli alimenti per gli animali.
- *Decreto Legislativo 10 maggio 2004, n. 149* Attuazione delle direttive 2001/102/CA, 2002/32/CE, 2003/57/CE e 2003/100/CE, relative alle sostanze e ai prodotti indesiderabili nell'alimentazione degli animali (G.U.R.I. n. 139 del 16/04/2004).
- *Regolamento CE n. 882/2004* del Parlamento europeo e del Consiglio del 29-04-2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di man-

gimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali.

- *Raccomandazione 2005/925/CE* del 14 dicembre 2005 – Programma coordinato di controlli nel settore dell'alimentazione animale per l'anno 2006 in conformità della direttiva 95/53/CE del Consiglio, al fine di verificare, tra l'altro, la concentrazione di Aflatossina B1, Ocratossina A, zearalenone, deossinivalenolo, fumonisine, tossine T-2 e HT-2 nei mangimi.

- *Nota Ministero della Salute prot. N. 28056/P del 01/08/2006* - Linee guida nazionali per la predisposizione di piani di prevenzione delle aflatossine nei mangimi e nel latte vaccino, bufalino e ovicaprino e nei prodotti a base di latte.

- *Raccomandazione della Commissione Europea 2006/576* del 17 agosto 2006 (Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea L 229/8 del 23.8.2006) raccomanda gli Stati Membri, con la partecipazione attiva degli operatori del settore dei mangimi, a potenziare il controllo della presenza delle micotossine deossinivalenolo, zearalenone, Ocratossina A, Fumonisin B1 e B2 e delle

tossine T-2 e HT-2 nei cereali e nei prodotti a base di cereali destinati all'alimentazione degli animali e nei mangimi composti.

- *Decreto ministeriale 15/05/2006* – determinazione dei limiti di Ocratossina A negli alimenti per animali.
- *Regolamento CE n. 401/2006* della Commissione del 23/02/2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari.
- *Raccomandazione della commissione europea* del 17 agosto 2006 (2006/583 CEE) sulla prevenzione e sulla riduzione delle Fusarium-tossine in cereali e prodotti derivati.
- *Regolamento CE n. 152/2009* della commissione del 27 gennaio 2009 (G.U. dell'Unione Europea L54/1 del 26.2.2009) che fissa i metodi di campionamento e di analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per animali.
- *Piano Nazione dell'Alimentazione Animale (PNAA) 2009-2011* emesso dal Ministero del Lavoro, della salute e delle politiche sociali.