

Capitolo II - Micotossine in tessuti ed organi in diverse specie animali

La presenza di micotossine nei tessuti ad uso alimentare come la carne e tutti i suoi derivati (salumi, prosciutti) o negli organi come fegato (patè di fegato), è riconducibile alla presenza contemporanea o non di due principali e comuni situazioni:

- a) Somministrazione all'animale prima della macellazione di alimenti contaminati da funghi e micotossine;
- b) Sviluppo di funghi presenti nell'ambiente di preparazione e stoccaggio degli insaccati e di tutti gli altri derivati delle carni.

In genere un ambiente con una attività di acqua pari a $a_w < 0.9$ e un valore del pH < 6.0 del prodotto, favorisce la crescita delle muffe e delle micotossine (Hansen 1995). Secondo un altro studio la produzione delle micotossine avviene se sono presenti le seguenti condizioni: presenza di ossigeno, temperature comprese tra i 4°C e i 40°C, pH 2,5-8, contenuto minimo dell'attività dell'acqua $a_w = 0,80$, ed infine una concentrazione massima di sale del 14% (Mižáková et al., 2002; Ostrý 2001).

Prodotti alimentari di origine animale contenenti micotossine possono derivare da diverse specie di interesse zootecnico. In questo capitolo sono prese in esame sperimentazioni eseguite in diverse specie animali, sottoposte ad alimentazioni contaminate naturalmente e/o artificialmente da micotossine. Molte delle micotossine ed i loro effetti sono stati determinati analizzando il contenuto di micotossine ed i metaboliti secondari prodotti nelle reazioni di detossificazione al livello epatico e analizzando alcuni biomarkers specifici in vari tessuti. Ad esempio l'aflatossina AFB₁ nel fegato è convertita ad epossido che si lega a DNA e a proteine come albumine e emoglobine. Mentre in casi di intossicazione alimentare da fumonisine si possono rilevare elevati valori di sfinganina Sa e del rapporto sfinganina:sfingosina (Sa/So), e una riduzione dei valori di sfingosina So nel sangue e urine.

II.1. Contaminazione da aflatossine: effetti e bioaccumulo.

La presenza delle aflatossine in organi e tessuti è stata ben documentata in diversi studi condotti su bovini, maiali, e polli (Furtado et al., 1979; Helferich et al., 1985; Jacobson et al., 1978; Rodricks e Stolof, 1977). In genere l'organo con la maggiore concentrazione di aflatossine è il fegato, ma la presenza delle AFB₁, AFB₂ e AFM₁ è stata riscontrata anche in altri organi, tessuti e prodotti alimentari come latte e formaggi (Allcroft e Roberts, 1968; Battacone et al., 2003; Forbish et al., 1986; Furtado et al., 1979; Helferich et al., 1985; Jacobson et al., 1978; Kiermeier e Buchner, 1977; Minervini et al., 2000; Robert e Shotwell 1981; Rodricks e Stolof, 1977; Sassahara et al., 2005; Trucksess et al., 1983). La quantità minima di aflatossine riscontrabile nelle carni è di 4 ng/g. Questo basso valore richiede quindi dei metodi di determinazione molto sensibili, con alti valori percentuali di recupero (Robert et al., 1981, Trucksess M.W. and Stoloff L. 1979). L'accumulo delle aflatossine nei tessuti dei ruminanti è stato documentato in diversi studi (Helferich et al., 1985; Hoogenboom et al., 2001; Trucksess et al., 1983). Ad esempio in uno studio condotto su bovini è stato somministrato nella dieta un pastone di arachidi contaminato da aflatossine (3,5 mg/kg) contenenti carbonio radioattivo (¹⁴C) per un periodo di 10 giorni. Al termine della sperimentazione gli animali sono stati macellati, e gli organi ed i tessuti sono stati prelevati e congelati (Hoogenboom et al., 2001). L'analisi della radioattività dei residui di aflatossina ([¹⁴C]AFB₁) distribuita nei vari tessuti ed organi ha permesso di valutare il seguente pattern di contaminazione: fegato > reni > polmoni > milza > cuore > grasso > muscolo. Infine alti livelli di aflatossine sono stati trovati in urine e feci.

Un secondo esempio che evidenzia il bioaccumulo e gli effetti nocivi causati dalla ingestione di AFB₁ è rappresentato da uno studio condotto su incroci di bovini da carne Hereford-Angus (Helferich et al., 1986a). In questo caso i bovini da carne sono stati sottoposti ad una alimentazione contaminata da [¹⁴C]AFB₁ a diverse dosi (0, 60 300 e 600 ppb per razione) per un periodo di 155 giorni. All'analisi si è evidenziato che il fegato è l'organo che ha subito maggiori effetti nocivi e con i livelli di accumulo di [¹⁴C]AFB₁ più alti. Il bioaccumulo di [¹⁴C]AFB₁, oltre che nel fegato, è stato rilevato anche in polmoni, cuore, rene e milza. Delle tre concentrazioni soltanto quella a 600 ppb ha mostrato evidenti segni di intossicazione, evidenziando alti livelli ematici di transaminasi e basse concentrazioni ematiche di colesterolo e glucosio (Helferich et al., 1986a).

La flora batterica del rumine ha una grande importanza nei processi di detossificazione delle micotossine. Uno studio condotto su bovini ha evidenziato che la concentrazione delle aflatossine accumulate nei tessuti dei ruminanti è influenzata dalla capacità di detossificazione

dei batteri e dai protozoi (Kießling et al., 1984). Oltre all'attività di detossificazione dei microrganismi del ruminante è da considerare anche la concentrazione di micotossine presenti nell'alimento, età e stato di benessere dell'animale. La concentrazione di 300-700 ppb di aflatoxine è considerata tossica per gli animali, ma in condizioni alimentari peggiori e/o di stress bastano solo 100 ppb per avere gli stessi effetti tossici (Applebaum et al., 1982; Garrett et al., 1968; Guthrie 1979; Masri et al., 1969; Patterson e Anderson, 1982). In genere possiamo dire che i valori delle aflatoxine oltre i quali si possono considerare tossici per i bovini variano secondo le seguenti situazioni:

- a) Bovini in fase di gestazione e vitelli possono ingerire un contenuto massimo di aflatoxine di 25 ppb senza avere effetti tossici.
- b) Bovini in fase finale di lattazione e in assenza di stress possono assumere non più di 100 ppb di aflatoxine negli alimenti.
- c) Bovini che hanno subito stress possono assumere un contenuto massimo di 20 ppb di aflatoxine.

Nei piccoli ruminanti il bioaccumulo di AFB₁ è stato ben documentato in uno studio condotto su capre in fase di lattazione (Helferich W.G. et al., 1986b). Radionuclidi di AFB₁ contenenti ¹⁴C ([¹⁴C]AFB₁) sono stati somministrati per via alimentare con capsule gelatinose (contenenti 256 µCi/mol di [¹⁴C]AFB₁) o tramite iniezioni intravena (182 µCi/mol di [¹⁴C]AFB₁). Dopo 120 ore dalla somministrazione gli animali sono stati macellati, sia gli organi sia i tessuti sono stati prelevati e congelati. In entrambi i metodi di somministrazione il fegato è risultato contenere maggiori quantità di [¹⁴C]AFB₁, seguito da muscolo, reni, cuore, polmoni e milza, mentre nessuna traccia di [¹⁴C]AFB₁ è stata rilevata nel grasso. Inoltre [¹⁴C]AFB₁ è stato ritrovato ad alte concentrazioni nei campioni di latte, urine e feci raccolte durante le 120 ore. Infine soltanto gli animali alimentati con capsule gelatinose contenenti [¹⁴C]AFB₁ hanno prodotto latte contenente tracce di AFQ₁ e AFL. Questo indica che la maggior parte di AFB₁ ingerita è eliminata nei liquidi biologici (urine e latte) e nelle feci, mentre soltanto una piccola quantità di AFB₁ è accumulata negli organi e nei tessuti.

L'impiego dei radionuclidi [¹⁴C]AFB₁ è risultato efficace anche negli studi condotti su galline ovaiole, dove è stato evidenziato un modello di bioaccumulo simile a quello riportato nei ruminanti. Infatti i valori più alti di [¹⁴C]AFB₁ sono stati evidenziati nel fegato seguito da muscolo, pancreas, cute, tessuto adiposo, polmoni e milza (Sawhney et al., 1973a, b). Questo dato è stato confermato in un secondo studio condotto su polli alimentati sempre con [¹⁴C]AFB₁ (Harland e Cardeihac, 1975). I risultati ottenuti hanno mostrato che il fegato, reni e

midollo osseo accumulano le aflatossine a livelli di concentrazione più alti rispetto a cervello, muscolo e tessuto adiposo (Harland e Cardeihac, 1975).

A differenza dei bovini e dei polli, il bioaccumulo delle AF nei tessuti ed organi di maiali è stato determinato tramite l'analisi in HPLC (Miller et al., 1982; Trucksess et al., 1982). In questo caso alcuni maiali sono stati alimentati con dosi di aflatossine di 1,2 mg/kg peso corporeo per 10 settimane e successivamente macellati (Miller et al., 1982). I campioni di fegato, rene e muscolo sono stati raccolti dopo 12, 24 e 72 ore dall'ingestione delle micotossine. Nelle prime 12 h è stata riscontrata la presenza di aflatossine nel fegato e nei reni, mentre nessuna traccia è stata rilevata nei muscoli. A 24 h soltanto i muscoli hanno accumulato aflatossine, mentre non ci sono residui nel fegato e nei reni. Infine a 72 ore nessuna traccia di aflatossine è stata determinata nei tre campioni. Questi risultati hanno quindi messo in evidenza un tempo di 72 ore per avere la rimozione totale delle aflatossine e dei suoi derivati da organi e tessuti.

II.2. Contaminazione da fumonisine: effetti e bioaccumulo

Il principale alimento della razione giornaliera destinata agli animali da allevamento contaminato da fumonisine è rappresentato dal mais, sotto forma di insilati, granella e farine. Tra queste forme, gli insilati di mais costituiscono la componente base della alimentazione giornaliera di molte aziende. La sua proporzione costituisce circa il 30-50% della razione giornaliera, ma può raggiungere anche l'80% nei bovini da carne (EFSA J. 2005). Parte della degradazione delle Fumonisine presenti nel mais raccolto sembra avvenire nei sili ad opera di microrganismi, seppure non è stata ben definita la significativa riduzione della concentrazione delle fumonisine nei sili (Camillo et al., 2000). Una aggiunta della granella di mais nella porzione di concentrato fa sì che un altro 20% di sostanza secca contaminata da fumonisine sia somministrato alla razione giornaliera. In genere il mais costituisce la componente base della dieta giornaliera per l'alto apporto energetico in diverse specie animali da allevamento come maiali, polli e tacchini. Infatti nella prima fase di ingrasso la porzione di mais è somministrata ad alte concentrazioni (circa il 70%) e successivamente ridotte alla fase di finissaggio al 20% (EFESA J. 2005).

L'assorbimento di fumonisine presenti negli alimenti e il grado di accumulo in organi e tessuti varia secondo le specie animali interessate. I ruminanti hanno un'elevata capacità di resistenza ad alte dosi di fumonisine 400 ppm FB₁ e 130 ppm FB₂ (Smith e Thakur, 1996). Nei ruminanti la microflora batterica idrolizza le FB₁ in metaboliti secondari. Questi metaboliti sono meno tossici delle FBs e costituiscono circa il 60-90% delle fumonisine totali ingerite.

Tuttavia, questi valori possono variare nelle prove sperimentali dove la modalità di assunzione delle fumonisine può avvenire per ingestione o per iniezione. Nel primo caso circa l'80% delle fumonisine assimilate sono state trovate nelle feci e in basse tracce nelle urine (Smith e Thakur, 1996; Norred et al., 1993). Nel secondo caso, dopo 24 ore dalla iniezione, il 66% delle fumonisine totali sono state ritrovate nelle feci, il 32% nelle urine, l'1% nel fegato e meno dell'1% nei reni. In altri studi condotti su bovini da latte e polli la quantità di FB₁ nel sangue e nei tessuti è risultata molto bassa (<1% della dose) (Vudathala et al., 1994; Prelusky et al., 1996b).

Numerosi effetti nocivi sono stati riscontrati in diversi studi condotti su bovini da latte. Ad esempio in bovini da latte alimentati con 75 mg FB₁/kg per 14 giorni si sono osservati incrementi plasmatici di colesterolo e una ridotta produzione di latte (Richard et al., 1996). Inoltre in Bovini (manzi di Holstein) alimentati con 94 mg FB₁/kg per 253 giorni hanno mostrato un incremento delle attività enzimatiche di AST e γ -GT e indotto danni al livello epatico e una iperplasia epiteliale (Baker e Rottinghaus, 1999). L'incremento delle attività enzimatiche è stato riscontrato anche in uno studio condotto su 59 bovini da latte, suddivisi in un gruppo da 26 bovini alimentati con 105 mg/kg FB₁ e un secondo gruppo di 33 bovini sottoposti ad una dose di 148 mg/kg FB₁, per un periodo di 31 giorni (Osweiler *et al.*, 1992). Un significativo incremento è stato evidenziato nella concentrazione plasmatica di AST, γ -GT, LDH, bilirubina e colesterolo a partire dal decimo giorno di trattamento sino al 31° giorno, soprattutto per la dose a maggiore concentrazione. Gli stessi risultati sono stati ottenuti iniettando 1 mg/kg b.w. di FB₁ a bovini da latte per un periodo di una settimana, dove agli incrementi enzimatici al livello plasmatico sono state evidenziate anche lesioni nei reni e nel fegato (Mathur *et al.*, 2001).

I primi esperimenti sugli effetti nocivi causati da contaminazione da fumonisine su polli in allevamento hanno evidenziato i livelli (massimi e minimi) e i periodi dove è possibile avere degli effetti nocivi ben visibili. Tra questi vanno ricordati: la variazione del peso corporeo ed evidenti danni arrecati negli organi e tessuti. Alimentando per un periodo di 14 giorni dei polli con FB₁ (125 mg/kg e 274 mg/kg) si sono evidenziate riduzioni degli incrementi ponderali, con un effetto marcato più nei polli giovani rispetto a quelli adulti e con decessi osservati soltanto nei polli con tre giorni di vita (Javed et al., 1993). In un secondo studio (Ledoux *et al.*, 1992) sono stati eseguiti esperimenti su polli di allevamento alimentati con dosi crescenti di Fumonisina B₁ da 0, 100, 200, 300, a 400 mg/kg FB₁ per un periodo di tre settimane. Anche in questo caso si sono registrati fenomeni di riduzione del peso corporeo con l'aumentare della dose giornaliera di FB₁. Inoltre sono state evidenziate lesioni a livello del fegato, incremento

plasmatico dei livelli di calcio, colesterolo, e AST soprattutto nei polli alimentati con dosi di 400 mg di FB₁ /kg di alimento. Infine l'utilizzo di fumonisine (FB₁, FB₂ e FB₃) ottenute da una coltura di *F. moliniforme* a dosi che vanno da 33 a 627 mg/kg per alimento ha permesso di determinare la dose effetto limite che determina la riduzione di peso ed effetti nocivi sui polli. In particolare sono stati evidenziati tre differenti effetti di iperplasia epatica: moderato a dosi giornaliere di 99-132 mg/kg, severo a dosi massime di 330 mg/kg e infine molto gravi a dosi di 429-627 mg/kg. Questi valori sono stati utilizzati dalla US-FDA 2001 dove sono stati definiti i livelli limite di contaminazione da fumonisine ad un valore di 66 mg/kg negli alimenti destinati a polli e tacchini.

Il carry-over e la distribuzione di accumulo delle fumonisine è stato determinata in studi condotti su galline ovaiole sottoposte a somministrazioni sia per via orale, sia per iniezione FB₁ marcata con ¹⁴C (0,2 mg/kg bw). Dopo 24h dalla somministrazione sono stati trovati bassi livelli di [¹⁴C]FB₁ nel fegato, rene, piccolo intestino e ceco (Vudathala et al., 1994).

I maiali a differenza dei polli e dei ruminanti hanno una maggiore sensibilità agli effetti tossici delle fumonisine. Infatti soltanto 120 ppm di FB₁ sono causa di edema polmonare, mentre 50 ppm sono causa di danni al fegato dopo 7-10 giorni dall'ingestione (Colvin e Harrison, 1992; Colvin et al., 1993).

Ricerche condotte su maiali, alimentati con dosi diverse di FB₁ (30, 10 mg/kg per alimento), hanno mostrato che circa l'80% della FB₁ si ritrova nelle feci, mentre nelle urine è presente soltanto il 2,5% della dose ingerita (Dilkina et al., 2003). I valori di FB₁ trovati nelle urine e feci sono stati ottenuti e confermati anche in un secondo studio, dove il fegato è stato indicato come l'organo principale di accumulo per le fumonisine (Prelusky et al., 1996b). La presenza di FB₁ è stata rilevata oltre che nel fegato, anche in altri organi come polmoni e cuore a concentrazioni minori. Mentre i livelli ematici di aspartato aminotransferasi (AST), alanina aminotransferasi (ALT), colesterolo (CHOL), bilirubina totale (BHBA) e proteine totali (PT) hanno subito un incremento significativo rispetto ai valori di controllo (Dilkina et al., 2003). Medesime alterazioni delle attività enzimatiche sono state trovate per le AST, ALT, ALP, γ -glutamyl transferasi (γ -GT), CHOL, BHBA, arginasi al livello plasmatico impiegando diverse dosi di fumonisine in numerosi studi (Motelin *et al.* 1994; Rotter *et al.*, 1996; Zomborsky-Kovács et al., 2002a,b). Inoltre l'analisi del pattern di distribuzione delle fumonisine mostra che la maggiore concentrazione di FBs è situata nel fegato e nei reni, e una minore concentrazione è presente nei polmoni, pancreas e cuore (Haschek et al., 1992; Osweiler et al., 1992; Smith et al., 2000). L'impiego delle fumonisine radiomarcate con ¹⁴C ha permesso ulteriormente di definire il pattern di distribuzione dei radionuclidi nei vari organi e tessuti e

di determinare il tempo di detossificazione. Nelle prime ore dalla somministrazione la distribuzione dei radionuclidi [^{14}C]FB₁ è risultata con i massimi valori nel fegato seguita da rene, intestino grande, cervello, polmoni, cuore, ghiandole surrenali e milza (Prelusky et al., 1994a; 1996), mentre a 72 h la dose totale somministrata è rintracciabile nelle feci, urine, e succhi biliari.

II.2.1. Determinazione della contaminazione alimentare da fumonisine tramite analisi del rapporto Sfinganina/Sfingosina (Sa/So).

Sebbene la FB₁ è rilevabile in piccole concentrazioni soprattutto nel fegato e rene sia nei ruminanti sia nei polli, la presenza di una intossicazione da fumonisine può essere evidenziata dalla analisi di alcuni biomarkers. In particolare le basi sfingoidi sfinganina (Sa) e sfingosina (So) sono i biomarkers specifici per evidenziare una intossicazione alimentare da fumonisine B₁. L'enzima ceramide sintasi (sfingosina [sfinganina] N-aciltransferasi) rappresenta il principale target della fumonisine B₁ (Solfrizzo et al., 1997; Wang et al., 1991). La similitudine della FB₁ con le basi sfingoidi gli permette di legarsi all'enzima con una alta affinità e di bloccare la conversione delle due basi sfingoidi (Merrill et al., 1993b; Norred et al., 1992; Riley et al., 1994a; Wang et al., 1991). Questo effetto altera l'equilibrio di sintesi e di degradazione dei lipidi di membrana. Le cellule in questo modo iniziano ad accumulare le sfinganine (Sa) e successivamente a rilasciarle nel sangue (Wang et al., 1992). La concentrazione alterata delle due basi sfingoidi nel sangue rappresenta un facile metodo per la valutazione degli effetti tossici generati dalle fumonisine.

Due esempi di studio in vivo su specie ruminanti mostrano come sia correlata la sintesi delle basi sfingoidi Sa e So con la presenza di fumonisine introdotte per via alimentare o per iniezioni. Un primo esempio è dato dai vitelli di 7-14 giorni con peso vivo medio di 43±7 kg (Mathur et al., 2001). Dieci vitelli sono stati divisi in due gruppi e trattati in maniera diversa. Il primo gruppo è stato sottoposto ad iniezioni intravenose di una soluzione fisiologica allo 0,9 % di NaCl, mentre il secondo gruppo è stato sottoposto ad iniezioni di soluzioni da 1 mg/kg di FB₁ per la durata di 7 giorni. Durante il periodo sperimentale sono state raccolte le urine e al termine della sperimentazione sono stati raccolti reni, fegato, cervello, polmoni, cuore e muscolo. Le analisi delle basi sfingoidi hanno mostrato un pattern di distribuzione delle due basi Sa e So con maggiore concentrazione nei seguenti organi e tessuti: polmone, cervello, fegato, cuore, rene e muscolo. Inoltre la variazione del rapporto Sa/So è stata rilevata nel gruppo sottoposto ad iniezioni di FB₁, mentre nessuna variazione è stata evidenziata nel

controllo. Le analisi del sangue hanno mostrato un incremento degli acidi non esterificati (NEFA) e della concentrazione del Ca^{2+} nel gruppo trattato, mentre nessuna variazione significativa è stata trovata per le proteine totali (TP), albumina (ALB), sodio (Na), potassio (K), cloro (Cl) e β -idrossibutirrato (BHOH).

In un secondo studio in vivo 8 capre (*Weanling angora*) sono state sottoposte ad una alimentazione contaminata con 95 mg/kg di FB1 per 112 giorni (Gurung et al., 1998). La presenza di FB₁ è stata analizzata nelle feci, mentre le concentrazioni delle basi sfingoidi sono state analizzate nel fegato, reni e cuore. Il 32% delle fumonisine assimilate dalla dieta è stato ritrovato nelle feci, mentre il restante 68% è stato idrolizzato e secreto. Il contenuto di sfingosina So è il rapporto Sa/So nel fegato ha subito un incremento di tre volte rispetto la condizione normale, mentre quello della sfinganina è risultato otto volte maggiore. Inoltre la concentrazione maggiore di So è stata rilevata nel rene, mentre quelle del fegato e cuore sono risultate in minore concentrazione. Viceversa se si considera la somma delle due basi sfingoidi So e Sa, allora, la concentrazione maggiore è risultata presente nel fegato, seguita da rene e cuore. Oltre alle concentrazioni delle basi sfingoidi altri fattori ematici possono essere aggiunti come ulteriori indicatori degli effetti nocivi generati dalle fumonisine su fegato e rene. Nel siero prelevato nel periodo da 22 a 112 giorni dalla intossicazione alimentare sono stati trovati alti livelli di aspartato aminotransferasi (AST), colesterolo (Col), lattico deidrogenasi (LDH) e γ -glutamyl transpeptidasi (GGTP), indicando la presenza di un effetto nocivo delle fumonisine a carico del fegato. L'azione nociva svolta dalle fumonisine si ripercuote oltre che nel fegato anche sui reni dove, dopo 56 giorni di alimentazione contaminata da FB1, sono stati rilevati alti valori di urea e di creatinina. Questi dati indicano la presenza di effetti citotossici che interessano oltre il fegato anche il rene (Gurung et al., 1998). I due esempi mostrano chiaramente quali siano gli effetti causati da intossicazioni alimentari da FB₁ e come influisce la FB₁ nella biosintesi delle basi sfingoidi Sa e So nei vari tessuti ed organi.

Diversamente dai ruminanti, i maiali hanno una maggiore sensibilità alle fumonisine. Infatti nei maiali i livelli di sfinganina e sfingosina ematici possono essere incrementati sottoponendoli ad una dieta alimentare contenente soltanto 5 ppm di FB₁, mentre raddoppiando la dose a 10 ppm di FB₁ vengono ad essere incrementati i valori Sa e So nel fegato e nel rene (Motelin et al., 1994; Riley et al., 1993a; Rotter et al., 1996b). Diversi esperimenti hanno mostrato una corrispettiva distribuzione di accumulo delle basi sfingoidi nei tessuti ed organi nei maiali (Gumprecht et al., 1998; Haschek et al., 1996; Riley et al., 1993a; Smith et al., 1998). In particolare le basi sfingoidi si distribuiscono nella seguente

maniera: rene > fegato > cuore > polmoni >> altri tessuti come linfonodi e muscolo scheletrico (Gumprecht et al., 1998; Haschek et al., 1996; Riley et al., 1993a; Smith et al., 1999). Inoltre, l'esposizione alimentare a dosi prolungate nel tempo di fumonisine porta ad un maggior accumulo nei soli polmoni, reni e fegato (Rotter et al., 1996b). In genere nei suini il rene rappresenta l'organo più sensibile agli effetti di contaminazione alimentare da fumonisine, con un maggior accumulo delle basi sfingoidi ed alterazione del rapporto Sa/So (Solfrizzo et al., 2000; Riley et al., 1993a).

Allo stesso modo anche nei polli può essere determinata una intossicazione alimentare da fumonisine analizzando il contenuto delle basi sfingoidi nel sangue. Diversi studi dimostrano l'importanza di questa analisi (Bermudez et al., 1995; FDA, 2001; Weibking et al., 1993a). Ad esempio polli, alimentati con diete contaminate con diverse dosi di fumonisine (89, 190, 283, 289, 481, 592 e 681 mg/kg di FB₁ per alimento) per 3 settimane, sono stati sottoposti ad analisi ematica delle basi sfingoidi. L'analisi del contenuto ematico del rapporto Sa/So ha evidenziato un incremento significativo (Weibking et al., 1993a; FDA, 2001a). Medesimo risultato è stato ottenuto in anatre alimentate con diete contenenti diverse dosi di FB₁ (120.5, 240.9 e 481.8 mg/kg FB₁) per 3 settimane, dove è stato evidenziato un incremento statisticamente significativo del rapporto Sa/So nel fegato ed un aumento della attività enzimatica della gamma glutamiltransferasi GGT (Bermudez et al., 1995; FDA, 2001a).

Quindi un'analisi delle basi sfingoidi e di alcuni parametri ematici permette di avere una maggiore informazione della presenza e degli effetti tossicologici delle fumonisine in qualsiasi specie animale. Questo può esser fatto senza dover ricorrere all'analisi diretta delle fumonisine, spesso accumulate con concentrazioni troppo basse per evidenziare l'avvenuta intossicazione alimentare.

II.3. Contaminazione da ocratossina A: effetti e bioaccumulo

La contaminazione da ocratossina A (OTA) negli organi e tessuti animali può avvenire da una introduzione e successivo sviluppo dei funghi durante la fase di lavorazione o di stoccaggio delle carni (Gareis M. 1996). Spesso le spezie, come ad esempio il pepe, impiegate nella lavorazione delle carni possono contenere OTA. Inoltre la contaminazione delle carni può derivare da tessuti ed organi che hanno accumulato OTA presente nelle razioni alimentari. In genere i ruminanti hanno una maggiore resistenza alle micotossine grazie ad una fauna microbica presente nel rumine (Hult et al., 1976). Questi microrganismi metabolizzano le tossine producendo molecole meno tossiche e facilmente eliminabili nelle feci e urine. Questa resistenza può però essere indebolita se si creano situazioni di mal nutrizione che determinano

la riduzione o scomparsa dei microrganismi del rumine. Ad esempio uno studio condotto su vacche da latte ha premesso di evidenziare quali fattori possono modificare la presenza dei protozoi e quindi la loro capacità di detossificazione delle micotossine (Özpınar H et al., 1999). In questo studio sono state preparate quattro diete con diverse razioni di *Medicago Sativa* (100%, 80%, 50%, 40%) e di concentrato (0%, 20%, 50%, 60%) tutte contaminate con OTA (200 µg/l). Il liquido ruminale è stato prelevato nei tempi di 1, 4, 12, 24, 32 e 48 ore dopo l'ingestione di una delle diverse razioni alimentari. Da questo liquido è stata calcolata l'emivita dell'OTA e della ocratossina- α (OTA- α). I risultati hanno evidenziato che la velocità di degradazione dell'OTA è maggiore nelle diete costituite dal 40% di fibra e 60% di concentrato. Sebbene lo stesso risultato sia stato confermato in un altro studio (Müller et al., 1995), in altre ricerche è stato dimostrato che la capacità di degradazione dell'OTA è bassa nelle diete ricche di concentrato, indicando una richiesta di fibra-concentrato ottimale per i microrganismi per meglio degradare l'OTA (Pettersson et al., 1982; Xiao et al., 1991). Inoltre la presenza dell'amido nella dieta ha permesso di ridurre l'emivita della OTA rispetto a quella ottenuta nelle diete prive di amido. Questi dati indicano che la popolazione dei protozoi nel rumine è significativamente influenzata dalla disponibilità di carboidrati fermentescibili come l'amido (Abe e Iriki, 1978). La capacità di degradazione dell'OTA dei protozoi è legata ad un valore ottimale di pH compreso tra 6 e 7 (Abou Akkde e Howard, 1962). In genere l'amido ingerito non è immediatamente assorbito dai protozoi ma viene in parte fermentato ad acido lattico dai batteri presenti nel rumine. Questa azione determina un abbassamento del pH e quindi una riduzione della capacità dei protozoi a degradare l'OTA. In altri termini una alimentazione scorretta con ridotto apporto di fibre, concentrato e un basso valore di pH nel rumine favorisce l'assimilazione dell'OTA ingerita. In genere l'ocratossina A e i suoi residui non si ritrovano nei tessuti e organi dei ruminanti perché l'OTA è metabolizzata dagli enzimi di protozoi e batteri (Galtier e Alvinerie 1976; Hult et al., 1976, Patterson et al., 1981). In esperimenti condotti su bovini alimentati con alte concentrazioni di OTA hanno permesso di definire gli organi e i tessuti di accumulo della OTA e dei suoi derivati. Ad esempio il residuo ocratossina- α è stato trovato nei reni e nel sangue alla concentrazione di 10 µg/kg di bovini alimentati con 300-500 µg/kg di ocratossina A (Patterson et al., 1981). In bovini da latte, alimentati per 11 settimane con 317-1125 µg/kg di ocratossina A, sono stati trovati nei reni 5 µg/kg di OTA accumulata, ma nessuna traccia della tossina è stata riscontrata in altri organi e tessuti, tanto meno l'ocratossina α (Shreeve 1979).

I maiali, a differenza dei ruminanti, mostrano una maggiore sensibilità agli effetti nocivi causati da intossicazioni alimentari da OTA. In maiali adulti alimentati con razioni contenenti

200-400 ppb di OTA per 3-4 mesi è stata riscontrata una riduzione della crescita, un aumento di assunzione di acqua e la presenza di microscopiche lesioni renali (Carlton e Krogh, 1979). In suinetti una dose di 2500 ppb di OTA assunta per 35 giorni ha causato come effetto tossico rilevante problemi di immunodepressione (Harvey et al., 1992). Il pattern di distribuzione dell'OTA accumulata negli organi e tessuti è stato ben documentato da diversi studi condotti su maiali (Curtui et al., 2001; Gareis 1996; Krogh et al., 1974, 1976). Questo accumulo è riconducibile alla mancanza di microrganismi che convertono l'OTA in metaboliti meno tossici e più facili da eliminare nelle feci e urine. L'ocratossina nei maiali si distribuisce secondo la seguente modalità: plasma > rene > fegato > muscolo > grasso. Questo è anche facilitato dalla alta affinità di legame della OTA a proteine come la sieralbumina del sangue, producendo così una molecola facile da accumulare nei tessuti ed organi (Hagelberg et al., 1989). Inoltre se consideriamo la produzione di salsicce contenenti sangue e fegato si incrementano ulteriormente le concentrazioni di OTA nel prodotto finale, causando maggiori possibilità di intossicazione alimentare da micotossine per l'uomo (Scheuer 1989; Lusky et al., 1994). Diversamente dai maiali e dai ruminanti, nei polli la presenza di OTA in tessuti ed organi è risultata più volte assente data la bassa emivita di circa 3,5-4 ore, dimostrando anche in questo caso una forte resistenza agli effetti nocivi dell'OTA (Hagelberg 1989; WHO/FAO 2001). Sebbene nei polli si ha una forte resistenza all'OTA numerosi sono gli esperimenti in vivo che documentano i possibili effetti nocivi in diverse specie volatili. Ad esempio, pulcini con un giorno di vita, alimentati con razioni contenenti 200, 500, 800 e 1600 ppb di OTA, hanno mostrato in tutti i casi una riduzione del peso corporeo rispetto a pulcini alimentati con diete prive di OTA. La dose di 1600 ppb ha inoltre causato edema in pancreas, rene e fegato, con aumento delle dimensioni di tutti e tre gli organi e riduzione della borsa del Fabrizio. Inoltre sono stati osservati decessi di pulcini affetti da una marcata fragilità delle ossa e da un ritardo di formazione della protrombina. Infine a dosi da 500 ppb di OTA assunte sono stati evidenziati problemi di immunosoppressione e una forte riduzione del numero di linfociti (Tucker e Hamilton, 1971; Doerr et al., 1974; Huff et al., 1974, 1975; Huff e Hamilton, 1975; Chang et al., 1979; Hamilton et al., 1982). Medesimi effetti sono stati riscontrati in galline ovaiole alimentate con razioni contenenti 300 500, 1000 e 4000 ppb di OTA. Anche in questo caso sono stati osservati danni al livello di fegato e reni, minore appetenza, un ridotto peso corporeo, un riduzione della produzione di uova e del loro peso (Carlton e Krogh, 1979, Gimeno et al., 2003; Page et al., 1980). In ultimo, tacchini di tre giorni di vita, trattati con concentrazioni crescenti di OTA da 1000 ppb a 8000 ppb di OTA, hanno mostrato un ridotto sviluppo, un allargamento del proventricolo e una riduzione del timo. A dosi maggiori

di 4000 e 8000 ppb sono stati provocati numerosi decessi, riduzione di assunzione di acqua e alti livelli di acido urico nelle urine (Chang et al., 1981).

II.4. Contaminazione da tricoteceni: effetti e bioaccumulo

La presenza dei tricoteceni nella alimentazione dei ruminanti può causare numerosi effetti negativi, come inappetenza, perdita di peso, vomito, sino ad arrivare alla morte dell'animale. In questo paragrafo sono elencati i principali effetti tossici della T2 e DON in diverse specie animali.

II.4.1. Tossina T2

Il primo caso di intossicazione da T2 presente negli alimenti alla concentrazione di 2 ppm è stato nel 1972 con la morte di ben 7 bovini da latte su 35 in 5 mesi (Hsu et al., 1972). Per meglio comprendere gli effetti causati dai tricoteceni in natura sono stati eseguiti vari studi su animali alimentati con diverse concentrazioni e tipi di tricoteceni. Tra questi va citato uno studio condotto su bovini da latte alimentati con dosi di 0,2 mg/kg peso corporeo di T2. Dopo 11 giorni le vacche hanno mostrato perdite di peso, inappetenza, debolezza, e neutrofilia sino ad aggravarsi e ad arrivare al decesso dell'animale (Patterson et al., 1979). La presenza di tracce dei tricoteceni nei tessuti dei ruminanti è stata analizzata su bovini da latte (Yoshizawa et al., 1981). I bovini sono stati sottoposti alla somministrazione di capsule contenenti 180 mg/kg di tossina T2 aggiunti a 160 mg di tossina triziata [³H]T-2 per 3 giorni (**Tabella 1**).

Campioni	[³ H]T-2 (ppb)
Bile	27,2
Fegato	18,5
Reni	13,9
Sangue	13,3
Ghiandole mammarie	11,3
Ovari	10,7
Plasma	10,2
Cuore	10,1
Milza	9,4
Muscoli	8,8
Grasso	4,7

Tabella 1. Concentrazioni [³H]T2 in tessuti di bovino da latte

Dopo tre giorni i tessuti e gli organi sono stati prelevati e analizzati per determinare i livelli di [³H]T-2 accumulati. I tessuti con maggior livello di accumulo sono risultati la bile, fegato e il rene (Yoshizawa et al., 1981). Inoltre tracce di [³H]T2 sono state trovate anche in: sangue, ghiandole mammarie, cuore, milza, muscoli, e grasso. Infine si è stimato che dopo 72 h dalla somministrazione quasi tutta la [³H]T-2 è eliminata nelle feci ed urine, mentre soltanto lo 0,2% della dose totale è ancora rintracciabile nel latte (Yoshizawa et al., 1981).

Il pattern di secrezione e di distribuzione della T2 nei tessuti ed organi (**Tabella 2**) è stato ben documentato in maiali alimentati con dosi di 0,1 e 0,4 mg/kg peso corporeo (Pace et al., 1985; Robinson 1979a).

Campioni	0,1 mg/kg [³ H]T2	0,4 mg/kg [³ H]T2
Reni	15,8 mg/kg	61,4 µg/kg
Fegato	13,8 mg/kg	37,7 µg/kg
Muscolo	3,1 mg/kg	11,5 µg/kg
Grasso	0,49 mg/kg	-

Tabella 2. Dose [³H] T2 rilevata in rene, fegato, muscolo e grasso espressa in µg/kg bw in suini. Per ciascuna dose somministrata è stata analizzata la radioattività [³H] T2 dopo 18 ore dalla somministrazione.

Tra le due dosi quella di 0.4 mg/kg è stata stimata come la dose maggiore da somministrare senza avere fenomeni di emesi. Dopo 18 ore dalla somministrazione di 0,1 mg/kg di T2 si sono registrati i seguenti livelli di accumulo: rene 15,8 ppb, fegato 13,8 ppb, muscolo 3,1 ppb,

grasso 0,49 ppb. La dose maggiore di 0,4 mg/kg ha invece mostrato un livello dei residui della T2 nel seguente modo: rene 61,4 ppb, fegato 37,7 ppb, muscolo 11,5 ppb. Da questo studio è stato calcolato che approssimativamente circa il 25% della [³H]T2 totale è presente nelle feci alla dose di 0,1mg/kg, e circa lo 0,84% alla dose di 0,4 mg/kg. Mentre nelle urine sono stati stimati circa il 21,6% e il 17,6% di recupero delle corrispondenti dosi di 0,1 mg/kg, e 0,4 mg/kg somministrate.

La concentrazione delle T2 può variare nei tessuti e nelle urine al variare del tempo di intossicazione ed inoltre l'elevata velocità di metabolizzazione ed escrezione riduce ulteriormente le tracce di T2 ed HT2 nei tessuti ed organi. La modalità con cui è eliminata la T2 può essere evidenziata esaminando *in vivo* la distribuzione della [³H]T2 iniettata in maialini d'india da zero sino a 72 ore dopo l'iniezione. In questo caso maialini d'india sono stati sottoposti ad una iniezione intramuscolare di 1,04 mg/kg b.w. di [³H]T-2 (Pace et al., 1985). Dopo tre ore dalla somministrazione, la distribuzione della [³H]T2 si accumula nei tessuti con maggior concentrazione nel fegato seguito da reni, grasso, milza, polmoni, muscoli, testicoli, ghiandole renali, cuore, e sistema nervoso (**Tabella 3**).

Campioni	3h [³ H]T-2	72h [³ H]T-2
fegato	450 µg/g	47 µg/g
reni	400 µg/g	43 µg/g
grasso	290 µg/g	18 µg/g
milza	260 µg/g	28 µg/g
polmoni	230 µg/g	28 µg/g
muscoli	200 µg/g	24 µg/g
testicoli	200 µg/g	19 µg/g
ghiandole renali	130 µg/g	23 µg/g
cuore	110 µg/g	17 µg/g
cervello	77 µg/g	11 µg/g

Tabella 3. Concentrazioni [³H]T-2 espresse in µg/g peso umido rilevate nei vari tessuti ed organi di maiali. Le analisi sono state eseguite dopo 3 e 72 ore dalla somministrazione di 1,04 mg/kg peso corporeo di [³H]T-2 3 e 72h.

A 12 ore dalla somministrazione la [³H]T2 misurata nel plasma è di 140 µg/L, mentre nella bile arriva ad un massimo di 250.000 µg/L. Infine a 72 h la distribuzione della [³H]T2 è ancora maggiore nel fegato, seguito da rene, polmoni, milza, muscolo, ghiandole renali, testicoli, grasso, cuore e cervello (**Tabella 3**). In questo tempo la distribuzione della [³H] T2 nel sangue e nella bile è stata stimata 41 µg/L nel plasma e 18000 µg/L nella bile (Pace et al.,

1985), dimostrando che la via di secrezione principale per la rimozione dei tricoteceni è rappresentata dalla bile. Inoltre l'analisi del carry-over nelle vie principali di secrezione, urine e feci, ha mostrato che in 5 giorni circa il 75% della [³H] T2 totale è eliminata, mentre in 28 giorni totali circa il 99 % della dose iniettata è eliminata nelle feci e urine (Pace et al., 1985). I polli, a differenza dei maiali e dei ruminanti, hanno una maggiore resistenza all'azione tossica della T2. Una dose di 400 ppb di T2 per un periodo di 49-63 giorni provoca lesioni orali e perdita di peso corporeo, lo stesso risultato è stato ottenuto alimentando i polli con 1000 ppb di T2 per un periodo più breve di 21 giorni (Chi et al., 1977a; b). Impiegando dosi maggiori di T2 da 4000 ppb, 8000 ppb sino ad arrivare a 16000 ppb per 21 giorni si sono ottenuti maggiori effetti nocivi sino ad arrivare ad incremento del numero di polli deceduti. Inoltre delle tre dosi somministrate soltanto quelle a 8000 ppb e 16000 ppb hanno provocato un incremento del peso di milza e pancreas e una diminuzione in peso della borsa del Fabrizio (Chi et al., 1977b). Differenti dosi di T2 (da 500 ppb fino a 8000 ppb) per periodi più o meno lunghi causano nelle galline ovaiole una riduzione dell'appetito, perdita di peso, riduzione della produzione di uova e produzione di uova con gusci di ridotto spessore (Tobias et al., 1992; Leeson 1995; Chi et al., 1977b). Anatre alimentate con dosi di T2 da 250, 500 e 1000 ppb per una settimana hanno mostrato lesioni orali, mentre con dosi maggiori (2000 ppb) per un periodo di 9 giorni provocano significative ulcerazioni ed erosioni all'esofago e all'apparato boccale (Shlosberg 1986; Neiger 1994). Infine la presenza della T2 (1000 ppb) con diacetossiscirpenolo DAS (1000 ppb) provoca in tacchini giovani lesioni orali e un moderato cambiamento morfologico del piccolo intestino, mentre non mostra effetti se somministrato da solo (Sklan, 2003). L'impiego dei residui radio marcati di [³H]T2 e [³H]HT2 ha permesso di avere un'idea di come si distribuiscano le T2 e HT2 nei tessuti e come nel tempo vari la loro distribuzione sino alla completa eliminazione nei polli. In questo caso pulcini di 6 settimane sono stati sottoposti a una dose di [³H]T2 a 0,5 mg/kg peso corporeo. Successivamente a tempi diversi sono state analizzate le concentrazioni della [³H]T2 accumulata nei vari organi e tessuti. I risultati hanno evidenziato che dopo 4 ore dalla somministrazione quasi tutti i tessuti sono risultati radiomarcati, mentre a 12 ore i massimi valori di [³H]T2 sono stati trovati nei muscoli, cute e bile. Infine dopo 48 ore dalla somministrazione sono stati riscontrati circa 39 µg/kg di [³H]T2 nei muscoli e 40 µg/kg di [³H]T2 nel fegato. Nello stesso tempo alti valori di accumulo sono stati rilevati nella bile, dimostrando che la bile è la via di eliminazione dei tricoteceni di maggior importanza sia nei polli sia nei maiali (Chi et al., 1978; Pace et al., 1985).

II.4.2. DON

A differenza della T2, il DON mostra una serie di effetti nocivi minori. Ad esempio, i ruminanti mostrano una forte resistenza agli effetti nocivi del DON, principalmente legata alla capacità dei microrganismi del rumine a metabolizzare il DON in 24 ore dopo avere ingerito una dose di 10 ppm (King et al., 1984). Lo stesso risultato è stato osservato in situazioni di intossicazione con 6,4 ppm per 6 settimane o con una dose maggiore di 66 ppm per 5 giorni. In entrambi i casi nessun segno di malessere è stato evidenziato (Trenholm et al., 1985b; Côté et al., 1986).

Diversamente dai ruminanti, nei maiali si sono evidenziati effetti di ridotta appetibilità causata da una alimentazione contaminata naturalmente con 2 ppm di DON (Trenholm et al., 1984; Friend et al., 1982; Rotter et al., 1994). Lo stesso risultato è stato osservato in suinetti alimentati con 1,3 ppm, seguito da un totale rifiuto dell'alimento con dosi di 12 ppm e fenomeni di emesi con solo 20 ppm di DON (Forsyth et al., 1977; Abbas et al., 1986; Young et al., 1983). Minori sono, invece, le informazioni riguardanti l'accumulo del DON nei tessuti dei maiali soprattutto per la mancanza di studi che utilizzano DON radiomarcato. Secondo Pollmann et al (1985), utilizzando il sistema d'analisi HPLC, il DON risulta accumulato principalmente nel rene, seguito da fegato, cuore e milza. L'accumulo sembra regolato dalla dose ricevuta; infatti a basse concentrazioni (<1÷1,2 mg/kg) la presenza di DON nei tessuti è molto bassa o nulla, mentre a dosi crescenti (2,2; 2,4; 4,2 mg/kg) si accumula una maggiore quantità.

A differenza dei maiali i polli sembrano avere una elevata resistenza agli effetti tossici del DON (Hamilton et al., 1985; Prelusky et al., 1986b; Bergsjö et al., 1993). Questo dato è confermato da numerosi lavori, dove sono stati messi in evidenza solo lievi effetti negativi sulla crescita, sulla appetibilità degli alimenti e sulla produzione di uova a diverse dosi di DON (Moran et al., 1982a, b; Trenholm et al., 1981; Hamilton et al., 1983; Hulan e Proudfoot 1982;). In polli alimentati con DON a dosi di 4-5 mg/kg per un periodo variabile da 29 a 190 giorni, non sono stati evidenziati accumuli di DON nei tessuti. In un altro studio condotto in pulcini dal 1° giorno sino a 35° giorno dalla nascita, alimentati con farine contenenti 0,9 e 18 mg/kg di DON non sono state evidenziate lesioni e residui in fegato, cuore, rene, e muscoli. Infine, in polli alimentati con maggiori quantità di tossine, sino a superare 116 mg/kg, è stato registrato solo un lieve effetto tossico del DON, ma nessuna traccia di accumulo nei tessuti (Hulan e Proudfoot, 1982; Moran et al., 1982b; Hamilton et al., 1983; 1985; Trenholm et al., 1984). Identico risultato è stato osservato alimentando polli con razioni alimentari contenenti 15000 ppb di DON per 42 giorni e 50000 ppb per 6 giorni (Romer 1983; Halloran 1983).

L'impiego di radionuclidi costituiti da DON contenente carbonio 14 (^{14}C) ha permesso di analizzare il percorso e i tempi di eliminazione del [^{14}C]DON (Prelusky et al., 1986). In questo caso 2,2 mg di [^{14}C]DON sono stati somministrati a galline livornesi. A tempi diversi i tessuti ed organi sono stati prelevati ed analizzati. Dopo 2-2,5 h dalla somministrazione un modesto picco radioattivo è stato rilevato nel plasma corrispondente a circa l'1% della dose totale. Tre ore dopo, la radioattività del [^{14}C]DON è stata rilevata in fegato, reni, cervello, cuore, milza, proventricolo, ventriglio, e piccolo intestino. Mentre a 6h il [^{14}C]DON è stato ritrovato anche in grasso, muscoli, e ovidotti. Dai risultati ottenuti si è evidenziato che la maggiore radioattività è rilevabile nel rene, fegato, e milza, con un valore medio dell'emivita del [^{14}C]DON nei tessuti di 16.83 +/- 8.2 hr (con un range di 7.7-33.3 h, dipendente dal tipo di tessuto). In conclusione i dati indicano che la secrezione del [^{14}C]DON avviene in maniera rapida con un recupero medio di 78.6, 92.1, e 98.5% per le dosi somministrate dopo 24, 48, e 72 ore.

II.4.3. Contaminazione da zearalenone: effetti e bioaccumulo

I ruminanti hanno una maggiore capacità di metabolizzare lo zearalenone rispetto alle altre specie animali (Coulombe et al., 1993). Questa caratteristica è da attribuire alla presenza di microrganismi del rumine che modificano gran parte dello ZEA ingerito in molecole meno tossiche e più facilmente eliminabili. L'attività microbica permette di convertire circa il 90% dello ZEA presente nel rumine nelle due isoforme α -zearalenolo e β -zearalenolo. Sia l' α -zearalenolo sia lo ZEA sono idrogenati a loro volta dai microrganismi del rumine in zeranolo, e in una molecola ormone-simile che stimola la crescita dell'animale (Kennedy et al., 1998). In genere la contaminazione da ZEA è di modesta entità, insufficiente per causare dei seri problemi nei ruminanti. Solo in casi di contaminazioni ad elevate concentrazioni, come segnalato da Towers e Sposen (1993), possono sorgere problemi di infertilità sia nei bovini che negli ovini. Alcuni studi hanno evidenziato la presenza di ulteriori effetti causati dall'ingestione di ZEN nei bovini, come l'inibizione di produzione del latte, sempre associati a iperestrogenismo e infertilità (Diekman e Green, 1992). In altri lavori condotti su ovini sono stati evidenziati aborti, vulvovaginiti e ipertrofia dell'utero (Radostits et al., 1994). Infine l'assunzione di ZEN alle concentrazioni di 3, 12 e 24 mg per 10 giorni consecutivi causa negli ovini problemi di ovulazione e di infertilità (Smith et al., 1986; 1990). Gli effetti nocivi causati dallo ZEN possono evidenziarsi dopo un accumulo negli organi sia in casi di contaminazione alimentare prolungata a basse concentrazioni di ZEN, oppure con una sola contaminazione contenente alte dosi di ZEN (Agag 2004). L'utilizzo di zearalenone marcato con

trizio [³HT]ZEA ha permesso di determinare la distribuzione dello ZEA nei tessuti di bovini (Baldwin et al., 1983). In questo caso, ai bovini sono stati somministrati 36 mg di [³HT]ZEA e dopo 45 giorni sono stati macellati. Gli organi e tessuti prelevati al macello sono stati successivamente sottoposti ad una analisi della radioattività acquisita. I risultati ottenuti hanno mostrato un livello di 2 ppb di ZEA accumulati nel fegato, mentre nel rene e nel grasso il livello era di circa 1 ppb, ed infine circa 0.2 ppb sono stati calcolati nel muscolo e nel plasma. A differenza dei ruminanti i maiali mostrano una maggiore sensibilità alle intossicazioni da ZEA (Coulombe et al., 1993; Yiannikouris e Jouany 2002; Vincelli e Paker, 2003). Una volta ingerito lo ZEA è assorbito dall'intestino per circa l'80-85%. Successivamente lo ZEA è trasportato dal sangue al fegato dove è ridotto nelle due isoforme α -zearalenolo e β -zearalenolo. Nei maiali a differenza dei bovini l'isoforma predominante è rappresentata dalla α -zearalenolo, mentre quella in minore concentrazione è la β -zearalenolo. L'emivita dello ZEA e dei suoi metaboliti è stata calcolata utilizzando [³H]ZEA iniettato o ingerito dall'animale. Nel primo caso in sole 86.6 ore si ha la totale eliminazione dello ZEA, mentre nel secondo caso sono necessarie circa 3,34 h. La quantità maggiore dello ZEA è stata riscontrata nella bile e nel sangue, dove lo zearalenone è principalmente coniugato all'acido glucuronico. Questa reazione sembra catalizzata al livello della mucosa intestinale dove prima riduce lo ZEA nello zearalenolo, mentre in una seconda reazione enzimatica produce il coniugato glucoronide-ZEA (Bihel et al., 1993). Questa situazione è stata confermata in un altro esperimento dove alcuni maiali sono stati alimentati con una dose di 80 μ g zearalenone/kg peso corporeo (Olsen *et al.* 1985). In questo caso è riportato che quasi tutto lo zearalenone e l' α -zearalenol sono stati coniugati con l'acido glucuronico presente nel sangue e nelle urine. Mentre soltanto il 10% dello ZEA totale ingerito era presente nel sangue e nelle urine come forma libera.

I principali effetti tossici causati dall'ingestione di ZEA nei maiali sono: prolasso vaginale, ipertrofia vulvare e uterina, emorragie, atrofia ovarica, infertilità, alta mortalità dei maialini e mummificazione fetale (Chang et al., 1979; Mirocha et al., 1979; McNutt et al., 1928; Kurtz e Mirocha, 1978).

Le specie avicole risultano relativamente più resistenti alle contaminazioni da ZEA (Coulombe et al., 1993; Jacobsen et al., 1993; Yiannikouris e Jouany, 2002). Studi *in vivo* (Olsen et al., 1986), effettuati su tacchini di 3 settimane sottoposti ad una alimentazione contenente ZEA (800 mg/kg) per un periodo di due settimane, hanno permesso di evidenziare che i livelli maggiori di zearalenone e di α -zearalenolo si riscontrano nel fegato; a seguire, liquidi di secrezione, reni, sangue, cuore e polmoni (**Tabella 4**).

Campioni	ZEA	α-zearalenolo
Fegato	276 \pm 54 ng/g	2715 \pm 590 ng/g
Liquidi di secrezione	182 \pm 33 mg/g	644 \pm 86 mg/g
Reni	122 \pm 25 ng/g	477 \pm 53 ng/g
Sangue	66 \pm 27 ng/ml	194 \pm 80 ng/ml
Cuore	57 \pm 40 ng/g	238 \pm 121 ng/g
Polmoni	56 \pm 45 ng/g	202 \pm 161 ng/g

Tabella 4. Concentrazioni ZEA e α -zearalenolo accumulate nei tessuti di Tacchini di 3 settimane dopo una di alimentazione contaminata con 800 mg/kg di ZEA per 2 settimane. Le concentrazioni sono espresse come valori medi con relative deviazioni standard.

A differenza dell' α -zearalenolo, l'isoforma β -zearalenolo è stata determinata in piccole tracce in sangue, liquidi fecali, e tessuti. Inoltre sia lo ZEA che l' α -zearalenolo sono stati trovati legati principalmente all'acido glucuronico, che nei liquidi di secrezione rappresenta il 65% dello ZEA e dell' α -zearalenolo totale. Oltre all'acido glucuronico anche i gruppi solfati delle proteine sono coniugati allo ZEA e all' α -zearalenolo, ed in particolar modo sono presenti in alte concentrazioni nel sangue.

Numerosi studi hanno confermato l'estrema resistenza allo ZEA dei polli (Allen et al., 1981a,b; Chi et al., 1980; Jacobsen et al., 1993; Leeson et al., 1995; Palyusik et al., 1975; Vincelli e Parker, 2003). L'elevata resistenza allo ZEA è stata testata alimentando per 21 giorni dei polli adulti con concentrazioni da 10 ppm fino ad un massimo di 800 ppm. I dati ottenuti non hanno riportato effetti nocivi a basse concentrazioni di ZEA, mentre i polli alimentati con la dose massima di 800 ppm hanno mostrato un'evidente ipertrofia degli ovidotti (Chi et al., 1980). Medesimo risultato è stato ottenuto somministrando a polli di 6-9 settimane alimenti contaminati da ZEA (50-800 ppm), dove il confronto tra i polli trattati e i polli di controllo non ha mostrato evidenti differenze (Allen et al., 1981a). Ulteriore conferma è stata ottenuta da altri studi eseguiti su polli adulti maschi e femmine nutriti con alimenti contaminati da ZEA (>800 ppm). I risultati non hanno riportato effetti negativi sull'appetibilità, sulla produzione delle uova, sulle dimensioni e spessore dell'uovo, sul peso corporeo dell'animale e degli organi fegato e milza. Dall'analisi degli organi post-mortem non è stato evidenziato nessun tipo di effetto tossicologico (Allen et al., 1981b; Leeson et al., 1995). Infine gli stessi risultati sono stati osservati anche in tacchini e oche alimentati

rispettivamente con razioni contenenti 300 ppm e 100 ppm di ZEA (Jacobsen et al., 1993; Palyusik et al., 1975; Vincelli e Parker, 2003).