



UNIVERSITÀ CATTOLICA DEL SACRO CUORE
MILANO

Dottorato di ricerca in: Fisiopatologia d'origine nutrizionale ed ambientale in sistemi zootecnici.

Ciclo XX°.

S.S.D: AGR18

Studio degli effetti tossici indotti dall'esposizione cronica a micotossine in ruminanti, mediante metodi di accertamento *in vivo* ed *ex vivo*.

Coordinatore: Ch.mo Prof. Giuseppe Bertoni.

(_____)

Tesi di dottorato di: Dr. Sabatini Andrea.

(_____)

Matricola: 3380054

Anno Accademico 2006/2007

Riassunto

Studio degli effetti tossici indotti dall'esposizione cronica a micotossine in ruminanti d'interesse zootecnico, mediante metodi d'accertamento *in vivo* ed *ex vivo*.

Questa tesi descrive lo stato delle conoscenze degli effetti tossici da micotossine su animali d'allevamento, ed alcuni esperimenti condotti per valutare gli effetti indotti da esposizione cronica da micotossine sui ruminanti. Uno studio è stato condotto su 15 aziende specializzate in sistemi di produzione intensiva di carni bovine, situate nel Nord Italia (province di Verona e Mantova), con l'obiettivo di individuare i rischi d'esposizione a contaminazione da micotossine. Alcuni metodi di laboratorio sono stati sviluppati: un metodo per la determinazione di ocratossina A (OTA) accumulata in tessuti e organi; Un metodo per valutare gli effetti delle fumonisine sulla biosintesi delle basi sfingoidi sfingosina (So) e sfinganina (Sa); Un metodo per rilevare l'addotto AFB₁-albumina. La razione totale mescolata (TMR) è risultata positiva alla AF e FB. Tra i singoli alimenti, il mais e la semola glutinata di mais sono stati i principali responsabili della contaminazione del TMR. Il livello di contaminazione è positivamente correlato al contenuto di umidità di mais. Il metodo per la determinazione dell'OTA nei tessuti ed organi ha mostrato un buon recupero medio. L'analisi del rapporto Sa/So nel sangue non ha mostrato alcun effetto negativo delle fumonisine sulla biosintesi lipidica. L'addotto AFB₁-albumina è risultato positivo per il 18% dei campioni totali di sangue.

Abstract

Study on toxic effects induced by chronic exposure to mycotoxin on ruminants by using *in vivo* and *ex vivo* methods of assessment.

The thesis describes the state of knowledge about toxic effects of mycotoxins on farm animals, and some experiments conducted to assess effects induced by chronic exposure to mycotoxins on ruminants. A field study for was carried out on 15 farms specialised for intensive beef production system, located in Northern Italy (provinces of Verona and Mantova), with the aim to identify risks of exposure to mycotoxins contamination. Some laboratory methods were performed: a method for the detection of ochratoxin A (OTA) concentration in tissues and organs; a method for evaluating the effects of fumonisin on biosynthesis of the two sphingoid bases sfingosine (So) and sphinganine (Sa); a method to

detect the AFB₁-albumin adduct. Total mixed rations (TMR) resulted positive for AF and FB contamination. Among single feedstuffs, corn and corn gluten feed were the main responsible for TMR contamination. Level of contamination was positively related to corn moisture content. The method for the determination of OTA in tissue and organ showed a good mean recovery. The analysis of ration Sa/So in blood did not show any negative effect by fumonisin on the lipidic biosynthesis. The AFB₁-albumin adduct was positive on 18% of total blood samples.

Ringraziamenti

Ringrazio le due Università: l'Università del Sacro Cuore di Piacenza e l'Università degli Studi della Tuscia di Viterbo, per la disponibilità e l'opportunità di svolgere il XX° Ciclo di dottorato di ricerca in: "Fisiopatologia d'origine nutrizionale ed ambientale in sistemi zootecnici".

Ringrazio il Chiarissimo Prof. Giuseppe Bertoni per i numerosi consigli e la disponibilità concessami in questi tre anni di dottorato di ricerca. Ringrazio il professor Bruno Ronchi per l'attività di tutor e il suo importante ruolo nella correzione e stesura finale della tesi di dottorato. Ringrazio il Prof. Umberto Bernabucci per i preziosi consigli e suggerimenti. Ringrazio tutti i colleghi compresi studenti, dottorandi, personale tecnico e segretarie per il loro aiuto e la pazienza concessami in questi anni.

Un ringraziamento al dottor Pierpaolo Danieli per il tempo e l'indispensabile aiuto concessomi nella compilazione di poster, abstracts e pubblicazioni ottenuti in questi tre anni di dottorato di ricerca. Infine ringrazio la mia famiglia che, come sempre, mi ha sostenuto negli studi e nel raggiungimento delle tappe più importanti nel campo universitario.

INDICE

CAPITOLO I - FUNGHI, MICOTOSSINE E MICOTOSSICOSI.....	1
I.1. Fattori regolatori la distribuzione di specie fungine.....	2
<i>I.1.1. Fattori biologici</i>	2
<i>I.1.2. Fattori fisici</i>	3
<i>I.1.3. Fattori chimici</i>	4
I.2. Micotossine	6
<i>I.2.1. Aflatossine</i>	6
<i>I.2.2. Fumonisine</i>	11
<i>I.2.2.1. Effetti inibitori causati dalle fumonisine sulla biosintesi dei fosfolipidi</i>	14
<i>I.2.3. Ocratossine</i>	16
<i>I.2.4. Tricoteceni</i>	19
<i>I.2.5. Zearalenone</i>	22
CAPITOLO II - MICOTOSSINE IN TESSUTI ED ORGANI IN DIVERSE SPECIE	
ANIMALI.....	25
II.1. Contaminazione da aflatossine: effetti e bioaccumulo.	26
II.2. Contaminazione da fumonisine: effetti e bioaccumulo	28
II.2.1. Determinazione della contaminazione alimentare da fumonisine tramite analisi del rapporto Sfinganina/Sfingosina (Sa/So).	31
II.3. Contaminazione da ocratossina A: effetti e bioaccumulo.....	33
II.4. Contaminazione da tricoteceni: effetti e bioaccumulo.....	36
<i>II.4.1. Tossina T2</i>	36
<i>II.4.2. DON</i>	40
II.4.3. Contaminazione da zearalenone: effetti e bioaccumulo	41
CAPITOLO III - QUADRO NORMATIVO PER LE MICOTOSSINE	45
CAPITOLO IV - PARTE SPERIMENTALE	49
IV.1 OBIETTIVI:	49
IV.2 MATERIALI E METODI.....	51
IV.2.1. Raccolta e campionamento degli alimenti.....	51
IV.2.2. Il sistema di analisi RP-HPLC.	51
IV.2.3. Estrazione aflatossine	52
IV.2.3.1 Determinazione delle aflatossine in RP-HPLC.....	52

IV.2.4. Estrazione fumonisine.....	53
IV.2.4.1 Determinazione delle fumonisine in RP-HPLC.....	54
IV.2.5. Estrazione ocratossina A (OTA).....	54
IV.2.5.1 Determinazione della ocratossina A (OTA) in RP-HPLC.....	55
IV.2.6. Estrazione tricoteceni (DON).....	55
IV.2.6.1 Determinazione del deossinivalenolo (DON) in RP-HPLC.....	56
IV.2.7. Estrazione zearalenone.....	56
IV.2.7.1 Determinazione dello zearalenone (ZEN) in RP-HPLC.....	56
IV.2.8. Estrazione della Ocratossina A (OTA) in tessuti ed organi di bovino da carne.....	57
IV.2.8.1 Analisi e condizioni RP-HPLC per OTA estratta da organi ed tessuti di bovino.....	57
IV.2.9. Estrazione basi sfingoidi da campioni di sangue di bovino.....	58
IV.2.9.1 Determinazione delle basi sfingoidi sfinganina (Sa) e sfingosina (So) in RP-HPLC.....	58
IV.2.10. Digestione enzimatica ed estrazione dell'addotto aflatossina B1-lisina (AFB1-Lys) negli standard e nei campioni di sangue di bovino.....	59
IV.2.10.1 Determinazione dell'addotto AFB ₁ -Lys in RP-HPLC in campioni di plasma.....	59
IV.2.11. Analisi statistica.....	60
IV.3. RISULTATI.....	61
IV.3.1. Analisi contaminazioni degli unifeed da aflatossine.....	61
IV.3.1.1 Analisi della varianza (ANOVA) e Newman-Keuls per le aflatossine in campioni di unifeed.....	62
IV.3.2. Analisi delle contaminazioni degli unifeed da fumonisine.....	63
IV.3.2.1 Analisi della varianza (ANOVA) e Test Newman-Keuls per le fumonisine in campioni di unifeed.....	64
IV.3.3. Contaminazione da micotossine in campioni di granella, sfarinato e semola glutinata di mais.....	65
IV.3.4. Analisi dell'OTA in organi e tessuti di bovino.....	70
IV.3.4.1 Determinazione dei recuperi medi percentuali degli spike di OTA in organi e tessuti.....	72
IV.3.5. Analisi sfinganina (Sa) Sfingosina (So): tempi di decadimento e recuperi percentuali in campioni di sangue di bovino.....	74
IV.3.5.1 Determinazione delle basi sfingoidi Sa e So in campioni di sangue bovino.....	76
IV.3.5.2. Analisi della Varianza (ANOVA) del rapporto Sa/So in campioni di sangue di bovino.....	77
IV.3.5.3 Test post-hoc LSD dei rapporti Sa/So in campioni di sangue di bovino da carne.....	78
IV.3.6. Analisi dell'addotto AFB ₁ -Lys in campioni di sangue di bovino.....	79
IV.3.6.1 Analisi della Varianza (ANOVA) e test post-hoc LSD in campioni di sangue contenenti AFB ₁ -BSA.....	81
IV.4. DISCUSSIONI.....	83
IV.4.1. Contaminazione alimentare da micotossine negli allevamenti di bovino da carne.....	83

IV.4.2. Considerazioni sulle capacità estrattive del protocollo di estrazione ed analisi in RP-HPLC dell'OTA in confronto con altre metodiche.	84
IV.4.3. Considerazioni sul rapporto sfinganina/sfingosina come biomarker in campioni di sangue bovini in presenza di contaminazione cronica alle fumonisine.....	86
IV.4.4. Considerazioni sull'analisi dell'addotto AFB ₁ -Lys in campioni di sangue bovino in presenza di contaminazione cronica da aflatossine.	88
IV.5. CONCLUSIONI	90
IV.5.1. Valutazione dei livelli di micotossine contenuti nelle razioni alimentari destinati ai bovini da carne.....	90
IV.5.2. Valutazione del protocollo d'analisi in RP-HPLC dell'OTA in tessuti ed organi di bovino da carne.....	91
IV.5.3. Valutazione del rapporto sfinganina/sfingosina (Sa/So) come indicatore di esposizione e da effetto alla Fumonisina B ₁	91
IV.5.4. Determinazione dell'addotto AFB ₁ -Lisina in campioni di sangue di bovino.....	92
 LISTA DELLE PUBBLICAZIONI	 94
 BIBLIOGRAFIA	 95

Capitolo I - Funghi, micotossine e micotossicosi

I funghi producono numerosi metaboliti secondari molti dei quali hanno effetti nocivi sulla salute degli animali e dell'uomo. Tra queste sostanze è stata individuata una classe costituita da diverse forme molecolari chiamate micotossine. Le micotossine sono sintetizzate nei miceli dei funghi filamentosi e si possono anche ritrovare nelle spore fungine (D'Mello e Macdonald 1997). Gli effetti nocivi causati dalle micotossine sono generalmente indicati come micotossicosi (D'Mello e Macdonald 1997). L'esposizione alle micotossine può avvenire per ingestione ma anche per inalazione e per contatto (Peraica *et al.*, 1999). Le maggiori specie fungine che causano micotossicosi sia nell'uomo sia negli animali sono quelle appartenenti ai generi: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Acremonium* e *Fomopsis* (D'Mello e Macdonald 1997).

I funghi patogeni ritrovati nelle colture sono stati suddivisi in due gruppi principali (Miller 1995). Al primo gruppo vi appartengono i funghi che infestano e producono tossine prima della raccolta, mentre al secondo gruppo vi appartengono i funghi che si sviluppano e producono tossine dopo la fase della raccolta, in genere durante il periodo di stoccaggio. All'interno di questi due gruppi si può fare una successiva divisione dei funghi in quattro tipi (Miller, 1995).

- 1) Funghi patogeni di piante es. *F. graminearum*.
- 2) Funghi che crescono su piante stressate o senescenti, come *F. moniliforme* e *A. flavus*.
- 3) Funghi che inizialmente colonizzano la pianta e dopo la fase di raccolta producono micotossine, es. *A. flavus*.
- 4) Funghi che si trovano nei suoli o in piante in fase di decomposizione, i quali possono svilupparsi nei semi della pianta e successivamente, in condizioni favorevoli, proliferano nel periodo di stoccaggio. es: *Penicillium verrucosum* e *A. ochraceus*.

I.1. Fattori regolatori la distribuzione di specie fungine.

La distribuzione delle diverse specie fungine e delle micotossine prodotte è regolata principalmente da fattori biologici, fisici, e chimici (D'Mello e Macdonald 1997).

I.1.1. Fattori biologici

I fattori biologici sono rappresentati dal ciclo di riproduzione e di sviluppo che lega la specie fungina alla pianta, o meglio dall'interazione fungo-pianta ospite (Miller, 1995). Questa interazione sembra più radicata nei casi in cui si trovano delle simbiosi mutualistiche, dove pianta e fungo ne traggono i maggiori benefici. Ad esempio è stata evidenziata la forte interazione mutualistica tra le piante di mais (*Zea mais*) e i funghi, dove la pianta ottiene il maggior beneficio ottenendo acido fusarico come metabolita secondario sintetizzato dal fungo (Wicklow, 1994). Tra le piante maggiormente interessate dal punto di vista della produzione e della alimentazione sia per l'uomo sia per gli animali, ricordiamo il mais, grano, foraggi, riso, olio di semi, sorgo, arachidi e semi di cotone (Marasas et. al., 1995; Scott, 1989; Strange, 1991; Shotwell, 1991; Yoshizawa, 1991). Tra le specie fungine maggiormente trovate in piante di *Zea mais* vanno citate le specie appartenenti ai generi *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. Parasiticus*) e *Fusarium* (*F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. proliferatum*, *F. sporotrichioides*) (Campbell e White, 1995; Foley 1962; Scott et al., 1989; Schaafsma et al., 1993).

In genere le micotossine sono distinguibili dalle specie fungine prodotte, dalla struttura chimica, e/o modo d'azione. Inoltre una singola specie fungina può produrre una o più micotossine, e una micotossina può essere prodotta da più specie fungine (Hussein e Brasel 2001). Ad esempio le aflatossine (AF) sono prodotte da molte specie fungine, hanno numerose variazioni strutturali, ed hanno diversi modi d'azione dipendenti dal tipo di animale (Hussein e Brasel 2001; Eaton et al., 1994). Studi su coltivazioni di mais contaminate da micotossine, hanno evidenziato la presenza di correlazioni tra la produzione specifica di una micotossina e la specie fungina infestante. Ad esempio alte produzioni di aflatossina B₁ (AFB₁) sono state evidenziate in piante di mais infestate da *A. flavus*, mentre alti livelli di deossinivalenolo o vomitossina (DON) sono stati trovati in piante di mais infestate da *Fusarium*. (Brown et. al., 1995; D'Mello et. al., 1997). In fine, in casi d'infezione da due o più specie fungine la produzione delle micotossine è influenzata dalle interazioni fungine che si instaurano (D'Mello et. al., 1993).

1.1.2. Fattori fisici

I fattori fisici come temperatura e umidità influenzano la presenza di una o più specie fungine, determinando la contaminazione di una o più micotossine, sia in campo sia negli ambienti di stoccaggio (D'Mello e Macdonald 1997). In genere, possiamo dire che la temperatura e la disponibilità di acqua o attività dell'acqua (aw) rappresentano i fattori promotori della crescita per qualsiasi specie fungina. (Smith e Moss 1985). Le condizioni ottimali di sviluppo delle specie fungine appartenenti al genere *Fusarium*, infestanti piante di cereali e soprattutto mais, è stata evidenziata nei paesi temperati. Per il genere *Aspergillus*, come per il *Fusarium*, sono richieste condizioni di sviluppo legate alle temperature e alla disponibilità di acqua e umidità ottimali (Scott, 1989; Smith e Moss 1985). Inoltre all'interno di ciascun genere si è riscontrata una diversa distribuzione geografica partendo da aree più calde sino ad aree più fredde. Ad esempio la specie *F. graminearum* è maggiormente presente in regioni calde dove sono coltivati cereali come Nord-America e Cina, mentre la specie *F. culmorum* è stata trovata in aree più fredde come la Finlandia, Francia, Polonia e Paesi Bassi. (Miller 1994; Saur, 1991; Snijders e Perkowski, 1990; Wang e Miller 1988). La presenza di temperature e disponibilità di acqua ottimali per la produzione delle micotossine differiscono nei diversi generi o all'interno della stessa specie. Ad esempio la specie *A. parasiticus* alla temperatura di 25-30°C ha la massima produzione delle aflatossine, mentre il genere *Fusarium* per produrre le fumonisine (FBs) richiede temperature ottimali di 20-30°C e un'umidità espressa dall'attività di acqua di 0.98 (Soriano et al., 2004). I tricoteceni come il deossinivalenolo (DON) e il nivalenolo (NIV) prodotti dalla stessa specie *F. culmorum* richiedono una temperatura ottimale di 25°C e una disponibilità d'acqua aw 0,995 (DON) e aw 0,981 (NIV) (Aldred e Magan, 2004).

Oltre alla temperatura e umidità anche la presenza di insetti che danneggiano le colture possono favorire lo sviluppo di funghi e di micotossine (Farrar e Davis, 1991). Gli insetti contribuiscono a facilitare le infezioni trasportando le spore dei funghi nelle colture vegetali o negli ambienti di stoccaggio. Ad esempio lo scarafaggio *Glyphrichilus quadrisignatus* trasporta spore dei funghi del genere *Fusarium* facilitando lo sviluppo di funghi e micotossine negli ambienti di stoccaggio (Attwater e Busch, 1983; Christensen e Schneider, 1950; Windels et al., 1976). L'attacco delle coltivazioni di mais da diverse specie di lepidotteri appartenenti al genere *Sesamia*, come la *Sesamia nonagrioides* e la *Sesamia cretica*, oltre a provocare danni fisici al mais e la riduzione della produzione, favoriscono l'attacco di alcune specie fungine appartenenti al genere *Fusarium*. In particolare una forte correlazione è stata evidenziata tra lo sviluppo di specie fungine come la *F. verticilloides* e la

F proliferatum e la presenza di *Sesamia* in colture di mais. In questo caso è stata trovata la presenza di FB₁ e FB₂ a valori alti nei campioni di mais danneggiati dalla *Sesamia nonagrioides* (Avantaggiato et al., 2002).

1.1.3. Fattori chimici

La conoscenza dei fattori chimici che influenza lo sviluppo dei funghi, la sintesi delle micotossine e la scoperta di composti organici e/o inorganici leganti le micotossine hanno assunto una notevole importanza nella lotta alle micotossine. Diversi studi sono stati eseguiti per definire la capacità di alcuni fungicidi al fine di ridurre i rischi di infezione fungina e di contaminazioni da micotossine (Badii e Moss, 1988; Gareis e Ceynowa, 1994; D’Mello et al., 1997). Dai risultati ottenuti sono state evidenziate situazioni in cui i livelli di sintesi delle micotossine sono stati incrementati, e in altri casi spostati verso la sintesi di una sola micotossina. (Badii e Moss, 1988; Gareis e Ceynowa, 1994). Ad esempio l’utilizzo del fenpropimorf in *A. parasiticus* ha incrementato la produzione di AFB₁ e AFG₁; è stato inoltre possibile spostare la produzione delle micotossine verso la sola sintesi della AFB₁. Un secondo esempio è dato dall’impiego di una soluzione costituita da tebuconazolo e triadimenolo impiegata per ridurre l’infestazione da *Fusarium* nelle farine, riportando un notevole incremento di produzione di nivalenolo (Gareis e Ceynowa, 1994).

In alternativa ai fungicidi sono stati proposti composti inorganici con capacità assorbenti specifiche per le micotossine da aggiungere nella razione. Tra questi ricordiamo gli zeoliti (SiO₄; AlO₄), alluminosilicati di sodio e di calcio (HSCAS) e le argille contenenti alluminosilicati (Davidson et al., 1987; Masimango et al., 1978; Mumpton e Fishman, 1977; Ramos e Hernandez, 1997; Huwing et al., 2001). La scelta degli assorbenti è legata alla loro specifica capacità di legarsi ad un tipo di micotossina, ad esempio l’HSCAS forma un legame forte e specifico con l’AFB₁, mentre risulta meno efficace per lo ZEA, OTA e completamente inefficiente per i tricoteceni (Bauer 1994; Bursian et al., 1992; Doerr 1989; Huf et al., 1992; Kubena et al., 1988, 1990, 1993, 1998; Patterson e Young 1993; Ramos e Hernandez, 1996).

In genere nessun assorbente è stato, sino ad ora, efficace con più di una micotossina, tuttavia l’aggiunta di diversi assorbenti negli alimenti comporta una forte riduzione d’assorbimento delle micotossine (Bauer 1994; Huwing et al., 2001). Infine è da prendere in considerazione anche l’utilizzo di lieviti e soprattutto delle membrane cellulari di lieviti da aggiungere negli alimenti contaminati da micotossine. In maiali alimentati con razioni contenenti lieviti si è

ottenuta una lieve riduzione di OTA, in sangue, bile e nei tessuti, mentre l'impiego delle sole membrane cellulari dei lieviti hanno ridotto notevolmente la concentrazione dell'OTA. La capacità di assorbimento delle membrane cellulari dei lieviti è mediata da polisaccaridi, proteine, e lipidi che formano legami di tipo ionico, ad idrogeno ed interazioni idrofobiche con le micotossine (Huwing et al., 2001). Questi risultati spingono verso un maggior impiego delle membrane dei lieviti nella riduzione delle micotossine negli alimenti.

I.2. Micotossine

Le micotossine sono prodotti metabolici secondari sintetizzati da funghi filamentosi e che non svolgono funzioni metaboliche importanti nella normale crescita e sviluppo dei funghi (Moss 1991). Esistono più di 300 tipi di micotossine prodotte da numerose specie fungine, e ciascuna di esse può essere prodotta da una singola specie o da più specie fungine (Betina 1984; Hussein et al., 2001). Le micotossine maggiormente studiate ed importanti dal punto di vista della salute pubblica e di quella della produzione degli animali da allevamento sono: aflatossine (AF), ocratossine (OT), tricoteceni, zearalenone (ZEA), fumonisine (FBs) e tossine tremorgeniche (Shane 1994; Hussein et al., 2001; Vasanthi e Bhat, 1998).

I.2.1. Aflatossine

Le aflatossine sono state inizialmente isolate nel 1960 in tacchini colpiti dalla malattia nominata Turkey X, e sono prodotte in maggior parte dalle due principali specie fungine *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (Asao et al., 1963; Asplin e Carnaghan 1961; Butler 1974; Blount 1961; Michelle McLean e Michael, 1995; Hussein e Brasel, 2001).

Queste specie fungine se sottoposte a raggi ultravioletti emettono una caratteristica fluorescenza di colore blu o verde secondo il tipo di tossina prodotta (Sargeant 1963). Per questo motivo le aflatossine sono state suddivise in quattro gruppi principali chiamati AFB₁, AFB₂, di colore blu fluorescente e AFG₁, AFG₂ di colore verde fluorescente (**Figura 1**). La sintesi delle aflatossine ha inizio partendo da un precursore comune chiamato sterigmatocistina (**Figura 1**) formato da un gruppo xantone fuso ad un gruppo diidrofurano o tetraidrofurano, ed ha effetti tossici e carcinogeni (Smith et al., 1994). All'interno dello stesso genere possiamo avere specie fungine diverse che sintetizzano tutte o soltanto alcune delle quattro micotossine. Ad esempio la specie *Aspergillus flavus* produce soltanto la AFB₁, la AFB₂ e l'acido ciclopiazonico, mentre la specie *Aspergillus parasiticus* produce le AFB₁, AFB₂ e le AFG₁ e AFG₂ (D'Mello e McDonald, 1997, Smith et al., 1985). L'ordine di tossicità cronica ed acuta delle aflatossine è: AFB₁ > AFG₁ > AFB₂ > AFG₂ e rispecchia le caratteristiche chimiche delle quattro molecole. Infatti, nelle AFB₁ e AFB₂ troviamo un anello ciclopentatnone, mentre un anello lattone caratterizza la minore reattività delle AFG₁ e AFG₂ (Wogan 1966).

Il fegato rappresenta l'organo principale di detossificazione per le micotossine per opera di sistemi enzimatici presenti nel citoplasma. Ad esempio il sistema delle mono-ossigenasi al livello epatico è stato indicato come il principale responsabile delle conversioni della AFB₁

nelle molecole polari AFQ₁, AFM₁, AFM₂ e AFP₁, (**Figura 1**). In particolare l'idrossilazione della AFB₁ nelle posizioni 3 e 9 forma le aflatoossine Q₁ (AFQ₁) e M₁ (AFM₁), mentre l'idrossilazione della AFB₂ produce la aflatoossina M₂ (AFM₂) (Dann et al., 1972; Eaton e Groopman, 1994; Holzapfel et al., 1966; McLean e Michael, 1995; Sweeney e Dobson, 1999). La AFQ₁ è generalmente considerato come un metabolita di detossificazione della AFB₁ a bassa tossicità, mutagenicità, e carcinogenicità, (Coulombe et al., 1982; Gurtoo et al., 1978; Hendricks et al., 1980; Hsich et al., 1974). Infine la reazione di O-Demetilazione della AFB₁ produce un altro metabolita meno tossico e mutageno della stessa AFB₁ denominato Aflatoossina P₁ (AFP₁) (Dalezios et al., 1971; Wong e Hsich, 1980; Stoloff et al., 1972). Tutte queste molecole sono successivamente eliminate dagli epatociti come molecole più o meno tossiche. In genere questi metaboliti secondari si ritrovano come prodotti di detossificazione nelle urine e feci. Ad esempio le AFM₁ e AFM₂ sono metaboliti rintracciabili nelle urine, feci e anche nel latte e nei suoi derivati (Holzapfel et al., 1966; Masri et al., 1967; Sweeney e Dobson, 1999). La presenza della AFM₁ nel latte si riscontra dopo alcune ore dall'assunzione e ritorna a livelli nulli solo dopo tre giorni con una alimentazione priva di tossine (Frobish et al., 1986). Il livello limite della M₁ nel latte e suoi derivati previsto dalla FDA è stato fissato a 0,5 ppb, mentre l'Unione Europea fissa un limite inferiore alla FDA pari a 0,05 ppb.

Tra le molecole maggiormente tossiche prodotte negli epatociti gli addotti AFB₁-DNA sono considerati i più nocivi. In questo caso la AFB₁ è convertita in AFB₁-8,9-epossido dalla reazione enzimatica delle mono-ossigenasi (Citocromo P450) in presenza del coenzima NADPH e di una molecola di ossigeno (Lin et al., 1978; Miller e Miller, 1977; Swenson et al., 1974). Il legame epossido formato tra la AFB₁ e gli acidi nucleici, come adotto 8,9-diidro-8-(guanin-N7-yl)-9-hydroxy-AFB₁ legato al carbonio nucleofilo C-8, conduce alla formazione di fenomeni di carcinogenesi (Swenson et al., 1974; Michelle McLean e Michael, 1995).

L'AFB₁ oltre che a legarsi alla molecola di DNA mostra anche un'elevata affinità di legame con le proteine, come dimostrato in alcuni lavori condotti su diverse specie animali (Sabbioni et al., 1987; Skipper et al., 1985). In particolare la proteina sierica albumina si lega all'epossido della AFB₁ tramite un legame chimico con l'aminoacido Lisina (AFB₁-Lys). Il rapporto di legame tra l'addotto AFB₁-DNA e AFB₁-albumina in cellule epatiche è risultato simile a basse dosi di contaminazione (Appleton et al., 1982), mostrando una simile affinità di legame della AFB₁ per entrambe le molecole. Inoltre, è stato evidenziato che in un tempo di 24h, con una singola iniezione di AFB₁, circa l'1-3% della dose è presente sottoforma di

addotto AFB₁-albumina (Skipper et al., 1985; Wild et al., 1986). Oltre alla albumina l'AFB₁ è stata ritrovata legata con l'emoglobina caratterizzata da un'emivita maggiore della albumina, ma con un'affinità di legame molto più bassa (Pereira e Chang, 1981; Tannebaum e Skipper, 1984). Questi dati mostrano la possibilità di impiegare l'albumina come biomarker per evidenziare la presenza di contaminazioni da AFB₁ e rilevarne lo stato di bioaccumulo e, dato il corrispondente rapporto di legame con il DNA, di valutare in maniera indiretta i possibili effetti sul DNA.

Le AF, oltre a legarsi alle proteine, possono anche essere a lungo termine accumulate nei tessuti ed organi sottoforma di molecola latente chiamata aflatossicolo AFL (Wong e Hsieh, 1980). In questo caso la reazione di riduzione del gruppo 1-Keto della AFB₁, catalizzata dall'enzima citosolico riduttasi estratto da fegato di pollo, produce il metabolita AFL (Chen et al., 1981). La reazione di ossidazione riconverte l'AFL in AFB₁ come dimostrato in vari studi condotti su frazioni di fegato di varie specie animali (Loveland et al., 1977; Salhab e Edwards, 1977; Wong et al., 1979). Oltre alle mono-ossigenasi e agli enzimi citosolici del fegato, anche il pH può contribuire alla detossificazione delle aflatossine. Ad esempio le reazioni di idratazione dei doppi legami, situati nell'anello terminale delle AFB₁ e AFG₁, producono i due metaboliti meno tossici AFB_{2a} e AFG_{2a} (**Figura 1**). Questa reazione sembra avvenire senza la presenza di enzimi ma in ambiente acido tipico dello stomaco dopo l'ingestione delle aflatossine (Pohland et al., 1968).

Per quanto concerne gli effetti su organi e tessuti è ormai accertato in numerosi studi che il maggior organo colpito dalle aflatossine è il fegato, ma anche organi come rene, polmoni sistema gastroenterico, nervoso e immunitario sono altrettanto sottoposti ad effetti di citotossicità, mutagenesi e carcinogenesi (Chaves-Carballo et al., 1976; Croy e Wogan, 1981; Cukrovà et al., 1991; 1992a, b; Epstein et al., 1969; Goerttler et al., 1980; Herrold 1969; Jackson e Groopman, 1999; Merkow et al., 1973; Moore et al., 1982; Newberne e Butler, 1969; Newberne e Rogers, 1973; Newberne e Suphakarn, 1977; Petska e Bondy, 1990, 1994; Pier 1973, 1986, 1992; Pier e McLoughlin, 1985; Pier et al., 1977, 1972; 1980, 1986, Potchinsky e Bloom, 1993; Richard et al., 1978; Reddy et al., 1987; Suphakarn et al., 1983; Thurston et al., 1972; Wogan e Newberne, 1967).

Oltre ad effetti di carcinogenesi e mutagenici, le aflatossine hanno capacità di ridurre la sintesi di DNA, mRNA e delle proteine, agendo principalmente sugli enzimi appartenenti alla biosintesi molecolare (Akao e Wogan, 1981; Akinrimisi et al., 1974; Ch'ih et al., 1993; Gelboin et al., 1966; Harley et al., 1969; Hsieh 1987; Irvin e Wogan, 1984; Kunitomo et al., 1974; Lafarge e Frayssinet, 1970; Meneghini e Schumacher, 1977; Michelle McLean e

Michael, 1995; Pong e Wogan, 1970; Roy 1968; Saunders et al., 1972; Sporn et al., 1966; Terao e Ueno, 1978; Yu 1977, 1981, 1983).

Studi condotti in vivo e in vitro hanno evidenziato, alla presenza di contaminazione da AF, una forte riduzione della degradazione della cellulosa e una bassa produzione degli acidi grassi volatili e ammoniaca (Mertens 1977). La contaminazione degli alimenti da aflatossine influisce sul benessere animale causando diversi effetti negativi come: la perdita di peso, ridotta appetibilità e produzione di latte. In particolare nei bovini sono state evidenziate alterazioni delle funzioni del rumine come: la riduzione della motilità del rumine (Cook et al., 1986).

Per quanto riguarda la decontaminazione degli alimenti dalle aflatossine non ci sono molte indicazioni utili e soprattutto efficaci. Infatti, le aflatossine presentano delle caratteristiche chimico-fisiche che le rendono resistenti alle normali procedure di trattamento. Ad esempio, le AF hanno un'elevata resistenza alle alte temperature rendendole indistruttibili alla temperatura di pastorizzazione o di cottura dei cibi, mantenendo così intatta la loro tossicità. Inoltre hanno una bassa solubilità in solventi molto polari come l'acqua, mentre sono più solubili in solventi debolmente polari come il cloroformio ed il metanolo. Per la detossificazione dei prodotti alimentari si utilizzano in genere dei trattamenti con acidi (es: acido propionico) (McLean e Michael, 1995). Queste caratteristiche rendono difficile la decontaminazione degli alimenti dalle micotossine e inoltre facilitano il passaggio delle aflatossine dagli alimenti agli animali e da questi all'uomo.

Aflatossine



Figura 1. Aflatossine: **a** sterigmatocistina, il precursore delle aflatossine **b**, **c**, **d** ed **e** (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂). In **f** e **g** (AFM₁ e AFM₂) sono rappresentati i metaboliti secondari della AFB₁ e AFB₂, mentre in **h** ed **i** (AFB_{2a} e AFG_{2a}) sono raffigurati i metaboliti secondari delle AFB₂ e AFG₂. Infine da **l** a **n** sono rappresentati le AFQ₁, AFP₁ e AFL derivati dalle reazioni enzimatiche della AFB₁ con il sistema delle mono-ossigenasi (AFQ₁, AFP₁) o con l'enzima citosolico riduttasi (AFL).

1.2.2. Fumonisine

Le fumonisine sono state isolate per la prima volta da colture di mais contaminate da *Fusarium moniliforme* (Gelderblom et al., 1988). Successivamente altre fumonisine sono state isolate da diverse specie appartenenti al genere *Fusarium* (*Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum*) e da altre specie come *Alternaria alternata* e la f.sp *lycopersici* (Chen et al., 1992). Nel 1988 uno studio condotto sulla struttura chimica delle fumonisine ha permesso di definire la tipica formula chimica di questa famiglia (Bezuidenhout et al., 1988). La struttura della FB₁ (**Figura 2**) è costituita da 2S-amino-12S,16R-dimetil-3S,5R,10R,14S,15R-penta-idrossi-eicosano con i gruppi idrossido in posizione C14 e C15 esterificati dal gruppo carbossile terminale dell'acido propano-1,2,3, tricarbossilico (TCA). Il gruppo amminico libero della FB₁ sembra giocare un ruolo specifico nell'attività biologica (Bolger et al., 2001). La fumonisina B2 (FB₂) ha struttura 10-deossi FB₁, mentre la FB₃ ha struttura 5-deossi FB₁ (**Figura 2**). Un secondo gruppo appartenente alle fumonisine è quello rappresentato dalle fumonisine C (FC), costituito dalla FC₁, FC₂, FC₃, e FC₄ mancanti del gruppo metile in posizione C₁ (**Figura 2**). Infine sottoponendo la FB₁ a trattamenti alcalini si trasforma la FB₁ nella forma idrolizzata FB₁ chiamata aminopentolo (AP₁). In breve la soluzione alcalina rimuove le catene degli acidi tricarbossilici nelle posizioni C14 e C15 causata dall'elevato pH, producendo un metabolita altrettanto tossico (Dombrink-Kurtzman e Dvorak, 1999; Murphy et al., 1996).

Il principale prodotto tossico delle fumonisine è la FB₁ promotore di tumori, leucoencefalomalacia, edema polmonare, carcinogenesi e apoptosi in diverse specie animali (Bucci et al., 1996; Brownie e Cullen, 1987; Buck et al., 1979; Caramelli et al., 1993; Chu e Li, 1994; De Lorenzi et al., 2005; Dombrink-Kurtzman 2003; Domenech et al., 1984a, b; Gelderblom et al., 1991, 1988; Harrison et al., 1990; Haschek et al., 2001; Howard et al., 2002; Howert et al., 1989; Jones et al., 2001; Kellerman et al., 1972 1990; Kim et al., 2001; Laurent et al., 1989; Lim et al., 1996; Marasas et al., 1976, 1988; Norred 1993; Pellegrin et al., 1990; Pienar et al., 1981; Rheeder et al., 1992; Ross et al., 1991a, b, 1993; Schmelz et al., 1998; Seefelder et al., 2003; Sharma et al., 1997; Thiel et al., 1991; Tolleson et al., 1996a, b; Voss et al., 1989, 2002; Wang et al., 1996; Wilkins et al., 1994; Wilson e Maronpot, 1971; Wilson et al., 1971, 1973, 1985a, b, 1990, 1991, 1992; Wolf 1994).

L'attività genotossica della fumonisina B1 è stata ben evidenziata in uno studio condotto su linfociti di bovino (De Lorenzi et al., 2005). Esponendo i linfociti alla fumonisina B₁ alla concentrazione di 50µM è stata rilevata la formazione di micronuclei e una ridotta capacità di

riproduzione cellulare, mentre un'esposizione dei linfociti a 100 μ M di FB₁ ha prodotto un incremento di scambio dei cromatidi fratelli con ridotte capacità di divisione mitotica linfocitaria.

Al livello cellulare, le fumonisine svolgono azioni di inibizione nella sintesi proteica e nel DNA e sono causa anche di frammentazione del DNA. (Doko et al., 1995; Dombrink-Kurtzman 1994; 2003; Gelderblom et al., 1995; Norred et al., 1990). Ad esempio, in cellule di rene di primate sottoposte a trattamenti di dosi di FB₁ è stata evidenziata una netta diminuzione della concentrazione della proteina chinasi C, come dimostrato anche in altri lavori (Hannun et al., 1986; Huang et al., 1995). La riduzione della proteina chinasi C altera la normale attività della via di trasduzione del segnale, causando tra i possibili effetti nocivi la formazione di fenomeni di carcinogenesi (Huang et al., 1995). Infine la biotrasformazione epatica per opera di enzimi epatici come la monoossigenasi P450, converte la FB₁ in forme molecolari più tossiche (Spotti et al., 2001). Difatti la FB₁ può essere parzialmente o completamente idrolizzata tramite la rimozione di una delle due catene di acidi tricarbossilici. Da questa reazione enzimatica si ottengono due molecole parzialmente idrolizzate chiamate aminopoliol 1, aminopoliol 2, e una molecola totalmente idrolizzata chiamata aminopentolo 1 (AP₁). Queste molecole presentano una maggiore capacità citotossica della FB₁, ma la perdita delle catene laterali degli acidi tricarbossilici li rende meno assimilabili al livello intestinale (Gelderblom et al., 1993; Hendrich et al., 1993; Hopmans et al., 1997). Nel caso dei ruminanti le fumonisine sono degradate dalla microflora ruminale e al livello delle feci si ritrovano le forme parzialmente e/o totalmente idrolizzate della FB₁ (Caloni et al., 2000; Gurung et al., 1999; Prelusky et al., 1996b; Rice e Ross, 1994). Uno studio condotto su microsomi epatici di bovino ha evidenziato la mancata trasformazione della FB₁ nei metaboliti idrolizzati dalla monoossigenasi P450. Questo risultato fa ipotizzare l'esistenza di un altro sistema di trasformazione della FB₁ nelle forme idrolizzate in altri organi, come l'intestino (Spotti et al., 2001). Questi risultati richiedono ulteriori studi per comprendere la biotrasformazione delle fumonisine nei ruminanti.

Fumonisine

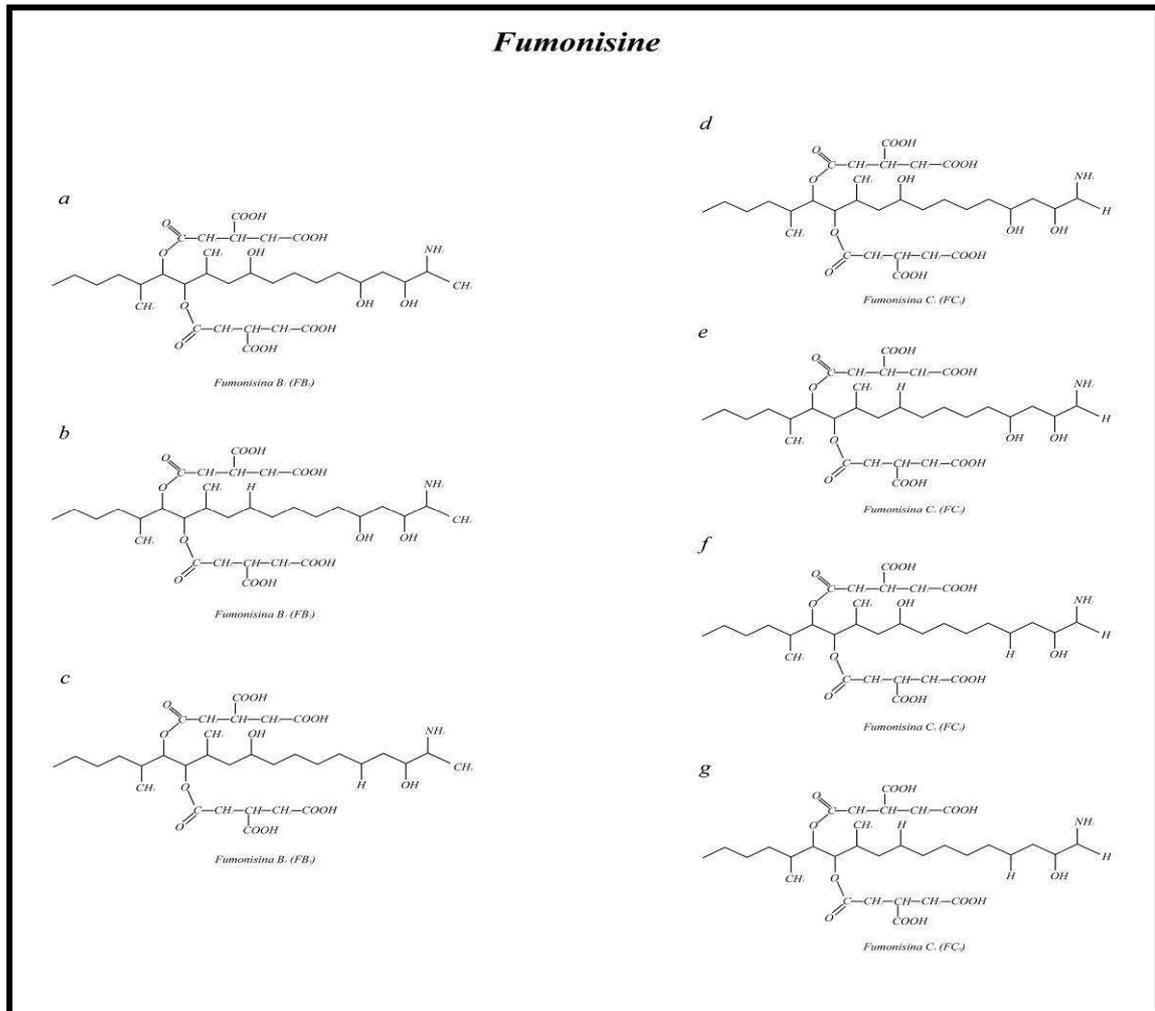


Figura 2. Fumonisine: In **a**, **b**, e **c** sono rappresentate le formule chimiche delle fumonisine B (FB₁, FB₂, e FB₃), mentre la struttura chimica delle fumonisine C è rappresentata dalle molecole **d**, **e**, **f** ed **g** (FC₁, FC₂, FC₃, FC₄). Le FC₁₋₄ differiscono dalle fumonisine B per la sostituzione del gruppo metilico con un atomo di idrogeno nel carbonio C₁.

1.2.2.1. Effetti inibitori causati dalle fumonisine sulla biosintesi dei fosfolipidi

La biosintesi lipidica avviene nel reticolo endoplasmatico rugoso (RER) e nell'apparato del Golgi (Huwiler et al., 2000; Kolter e Sandhoff, 1999). La sintesi biochimica dei lipidi inizia con la condensazione dell'aminoacido L-serina e un acido grasso (acil-CoA) come il palmitoil-CoA (*Figura 3*).

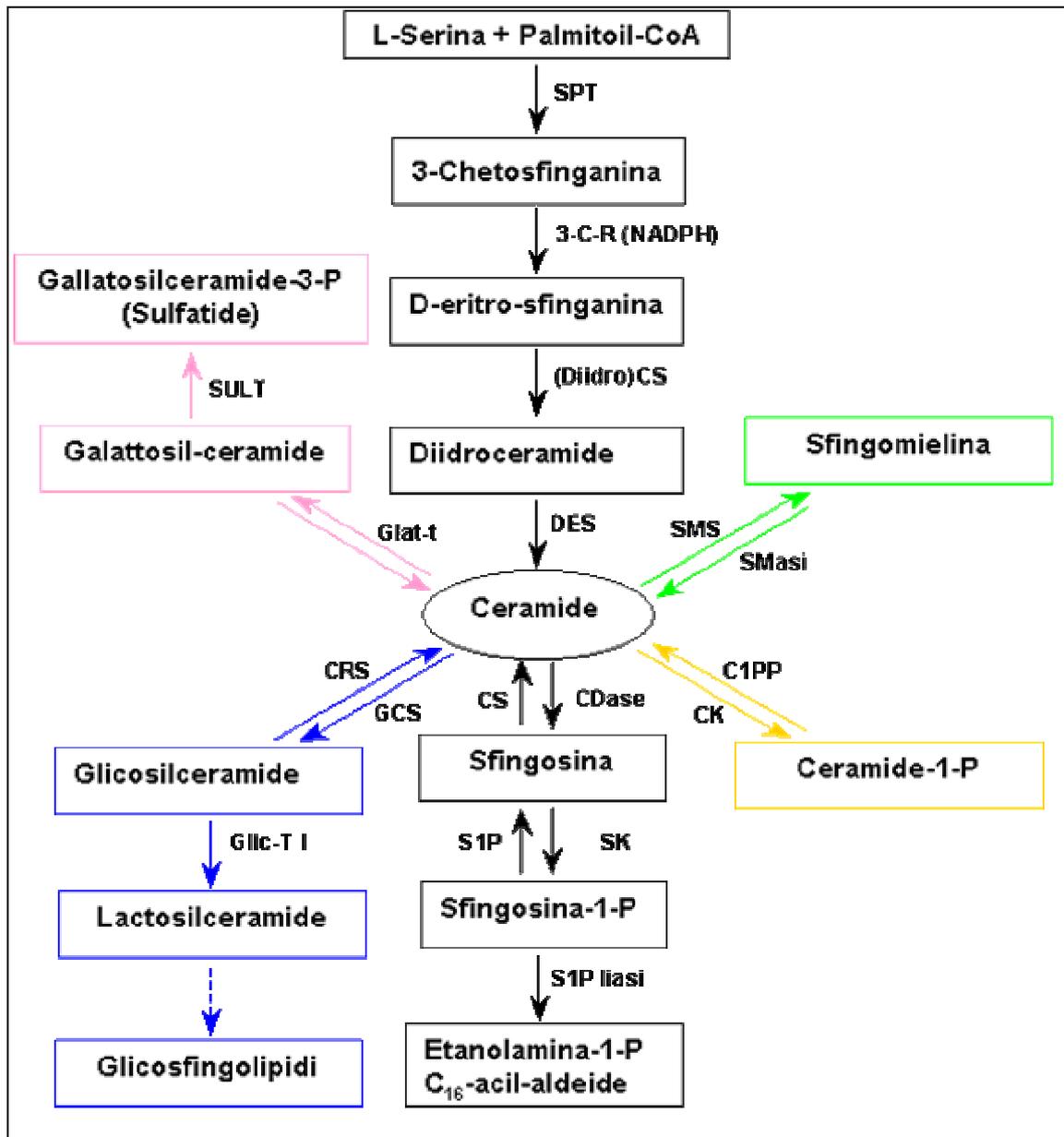


Figura 3. Biosintesi dei lipidi. In nero è indicata la biosintesi de-novo dei sfingolipidi, in verde quella della sfingomielinina, in rosa la sintesi dei sulfatidi, in blu è indicata la via dei glicosfingolipidi e in color oro è indicata la sintesi della ceramide-1-P. Gli enzimi della biosintesi sono indicati come: **DES** diidroceramide desaturasi; **(Diidro)CS** Diidroceramide sintasi o sfinganina N-aciltransferasi; **C1PP** ceramide-1-fosfatofosfatasi; **CK** ceramide chinasi; **Cs** ceramide sintasi; **CDase** ceramidasi; **CRS** cerebrosidasi; **3-C-R (NADPH)** 3-chetosfinganina reducttasi NADPH-dipendente; **Galt** galattosiltransferasi; **Glic-T I** glicosil transferasi I; **GCS** glucosilceramide sintasi; **SMasi** sfingomielinasi; **SMS** sfingomielinina sintasi; **SULT** sulfatide transferasi; **S1P** sfingosina 1 fosfatasi; **SK** sfingosina chinasi; **S1P liasi** sfingosina-1-fosfato liasi; **SPT** serina-palmitoil-transferasi.

Il primo step della biosintesi è rappresentato dalla reazione enzimatica catalizzata dall'enzima serina-palmitoil-transferasi (SPT). Dalla reazione di condensazione si libera una molecola di CO₂ e una molecola di acido grasso 3-chetosfinganina. Nello step successivo la 3-chetosfinganina è ridotta in D-eritro-sfinganina o sfinganina (Sa) dall'enzima 3-chetosfinganina riduttasi NADPH-dipendente. La sfinganina subisce un'acilazione con una molecola acilCoA catalizzata dalla Sfinganina N-aciltransferasi, producendo la D-eritro-diidroceramide. Quest'ultima è convertita a ceramide dalla Diidroceramide desaturasi. La ceramide così prodotta può essere impiegata per la biosintesi delle sfingomieline, dei glicosfingolipidi, dei sulfatidi, o dei sfingolipidi fosforilati come la sfingosina-1-fosfato (SP-1-P). Questa reazione avviene in due fasi successive. Nella prima fase l'enzima cellulare ceramidasi (CDase) per deacilazione della ceramide produce una molecola di sfingosina, mentre nella seconda fase la fosforilazione della sfingosina catalizzata dall'enzima sfingosina chinasi (SK) forma la SP-1-P. Quest'ultima può essere riconvertita ad sfingosina dalla sfingosina-1-fosfato fosfatasi (S1P), oppure dalla sfingosina-1-fosfato liasi (S1p liasi) la SP-1-P è scissa in etanolamina-1-fosfato e in un acido grasso C₁₆-acil-aldeide. La ceramide oltre che essere sintetizzata dalla sintesi de novo fosfolipidica può formarsi dalla ceramide 1P, dalle sfingomieline, dai glicosfingolipidi e dai sulfatidi provenienti dalla biosintesi cellulare o dalla alimentazione. Una caratteristica principale delle fumonisine è la loro similitudine molecolare con la sfingosina e la sfinganina (Shier 1992). Durante la sintesi de-novo dei sfingolipidi, regolata dall'enzima cellulare ceramide sintasi, la FB₁ è scambiata con la base sfingoide sfingosina (Riley et al., 1994a; Wang et al., 1991). In presenza della FB₁ l'equilibrio tra le basi sfingoidi Sa e So si sposta verso un accumulo della Sa che non è più convertita in So. In uno studio in vitro condotto su epatociti di ratto ha dimostrato che la FB₁ ha effetto inibitorio sulla biosintesi dei sfingolipidi, importanti nella formazione delle membrane e nella segnalazione cellulare (Wang et al., 1992). Lo stesso risultato è stato ottenuto anche in colture cellulari di rene, epitelio, neuroni cerebellari e dell'ippocampo, e in neuroblastomi di diverse specie animali (Harel e Futerman, 1993; Merrill et al., 1993a, b; Norred et al., 1992b; Rother et al., 1992; Schwartz et al., 1995; Yoo et al., 1992). L'accumulo della sfinganina produce effetti di accumulo di insulina e un incremento della sintesi del DNA, evidenziando quindi una capacità di induzione tumorale ad opera della FB₁ (Schroeder et al., 1994; Wolf 1994).

1.2.3. Ocratossine

Le ocratossine (**Figura 4**) sono metaboliti secondari prodotti dalle specie *Aspergillus ochraceus*, *A. niger* var. *nige*, *A. carbonarius* e dalle specie *Penicillium verrucosum*, *P. viridicantum*, e *P. cyclopium* (Abarca et al., 1994 D'Mello e MacDonald, 1997; Horie 1995; Pitt 1993; Van der Merwe et al., 1965 a). Questi composti eterociclici hanno effetti tossici in diversi animali, e sono nefrotossici e promotori di tumori nell'uomo. (Carlton e Truite, 1997; Krog 1978; Lanza et al., 1980; Manning e Wyatt, 1984; Wannemacher et al., 1991). l'Ocratossina A (OTA) è la molecola più tossica del gruppo delle ocratossine (**Figura 4**). Questa tossina è stata isolata dalla specie fungina *A. ochraceus* ed è stata successivamente ritrovata come metabolita secondario prodotto in alcune specie appartenenti al genere *Penicillium* in climi temperati (Smith e Moss, 1985; Van der Merwe et al., 1965 a). A questa famiglia vi appartengono altri derivati della ocratossina A, come l'ocratossina B (OTB), ocratossina C (OTC), ocratossina alfa (α -OTA), 4-idrossiocratossina (OTA-OH) e per ultima l'ocratossina con l'anello lattone aperto (OP-OTA) (Hutchinson et al., 1971; Steyn e Holzapfel, 1967; Steyn 1971, 1984; van der Merve et al., 1965 a,b; Xiao et al., 1995, 1996). Di questi metaboliti l'OTC ha la stessa tossicità della OTA, l'OTB è 10 volte meno tossica della OTA, mentre le α -OTA e OTA-OH non mostrano effetti tossici. In fine la molecola più pericolosa della famiglia è rappresentata dalla OP-OTA con un effetto tossico dieci volte maggiore della OTA (Marquardt e Frohlich, 1992; Xiao et al., 1996).

In genere l'OTA ha effetti citotossici e genotossici agendo nei seguenti modi:

- a) Inibizione della catena respiratoria al livello delle membrane mitocondriali, in particolare inibizione della succinato deidrogenasi, citocromo C e della attività intermembrana della ATPasi.(Castegnaro et al., 1991; Marquardt e Frohlich 1992; Wei et al., 1985;);
- b) Inibizione della sintesi proteica agendo in particolare su una inibizione della fenilalanin-tRNA sintasi (Bunge et al., 1978; Creppy et al., 1983a, b; 1984);
- c) Perossidazione lipidica delle membrane cellulari (Gillman et al.,1999; Hasinoff et al., 1990; Höhler et al., 1996, 1997a, b; Höhler 1998; Omar et al., 1990; 1991; Rahimtula et al., 1988);

d) Alterazione strutturale e funzionale del sistema immunitario, come riduzione del timo, del numero di cellule spleniche e del midollo osseo e basse concentrazioni delle interleuchine2 IL2. (Boorman 1989; Cooray 1984; Harvey et al., 1992; Haubeck et al., 1981; Kanisawa et al., 1977; Lea et al., 1989; Luster et al., 1987; Prior e Sisodia, 1982);

e) Effetti genotossici, come formazione di frammenti di DNA *in vivo* e *in vitro*, formazione di addotti del DNA, incremento degli scambi tra cromatidi fratelli, induzione alla formazione dei micronuclei e incremento delle mutazioni cellulari (Creppy et al., 1985; Degene et al., 1997; De Groene et al., 1996a, b; Ehrlich et al., 2002; Föllmann et al., 1995; Grosse et al., 1995; Kamp et al., 2005; Kane et al., 1986; Malaveille et al., 1994; Manolova et al., 1990; Mori et al., 1984; Obrecht-Pflumio e Dirheimer, 2000; Pfohl-Leskowicz et al., 1993);

f) Stimolo della apoptosi sia *in vivo* sia *in vitro* (Gekle et al., 2000; Lühe et al., 2003; Schwerdt et al., 1999; Seegers et al., 1994);

g) Nefrotossicità in specie animali e nell'uomo, in quest'ultimo caso conosciuta anche come Nefrotossicità Endemica dei Balcani (BEN). (Bacha et al., 1993; Breitholz et al., 1991; Breitholz-Emmanuelson et al., 1994; Castegnaro et al., 2000; Čeović et al., 1991, 1992; Creppy et al., 1995; Eko-Ebongue et al., 1994; Filali et al., 2002; Grosso et al., 2003; Goliński et al., 1984; Hald et al., 1991; Kalef et al., 1993; Krog et al., 1992, 1979, 1977, 1976, 1988; Kuiper-Goodman et al., 1993; Maaroufi et al., 1995a, b; Pavlović et al., 1979; Peraica et al., 1999; Petkova-Bocharova 1985, 1988; Pfohl-Leskowicz 2002; Pleština et al., 1990; Puntarić et al., 2001; Rutqvist et al., 1978; Tanchev e Dorossiev, 1991; Tatu et al., 1998; Ueno et al., 1998; Wafa et al., 1998; Zimmerli e Dick, 1995).

Ocratossine

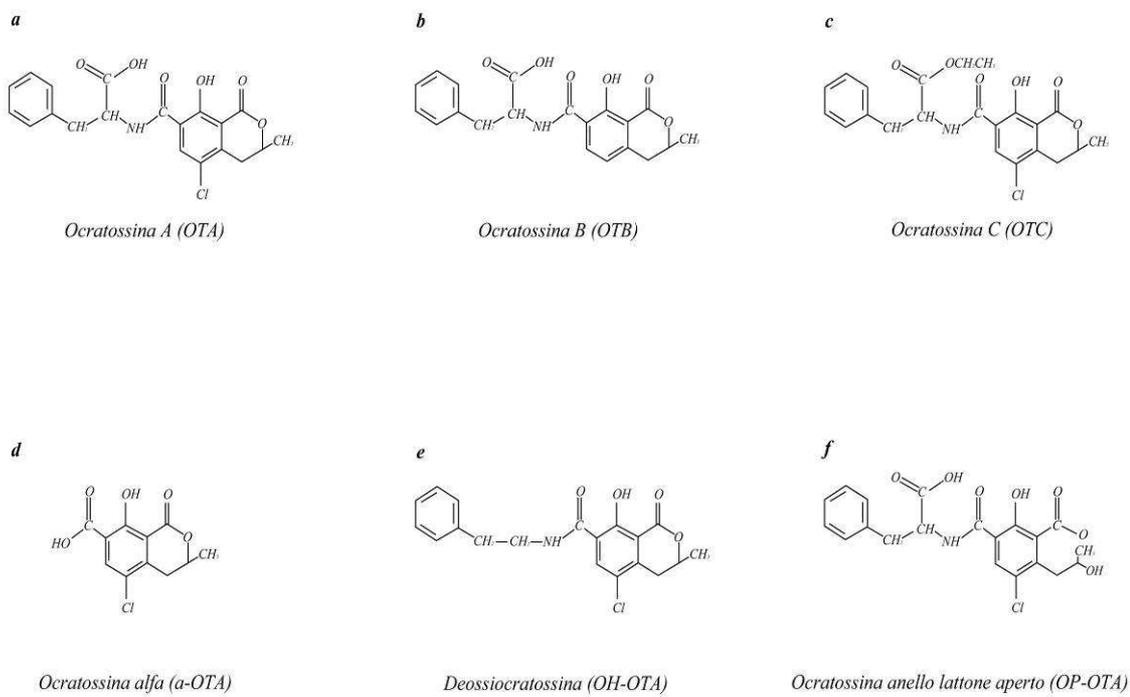


Figura 4. Ocratossine. In a) Ocratossina A (OA); b) Ocratossina B (OB); c) Ocratossina C (OC). I metaboliti secondari della ocratossina A Ocratossina sono rappresentati nelle rispettive figure d; e; f ocratossina alfa (α -OA); deossiocratossina (OH-OA) ed infine l'OA ad anello aperto Ocratossina anello lattone aperto (OP-OA).

1.2.4. Tricoteceni

I tricoteceni sono metaboliti secondari prodotti da diverse specie fungine appartenenti ai generi *Gibberella* (*Gibberella intricans*), *Fusarium* (*F. colmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. sporotrichioidi*), *Myrothecium* e *Tricotecium* (Lautraite et al., 1997; Hussein e Brasel, 2001; Jones e Lowe, 1960; Tamm e Breitenstein, 1984). I tricoteceni sono composti contenenti anelli del sesquiterpene e sono stati suddivisi in 4 gruppi principali indicati come Tipo A, B, C e D (**Figura 5**). Al tipo A vi appartengono la tossina T-2 (T-2), e la tossina HT-2 (HT-2). Al tipo B vi appartengono il deossinivalenolo o vomitossina (DON), il nivalenolo (NIV), il Fusarenone-X (Fus-X), la 3-Acetil-Deossinivalenolo (3AcDON) e la 15-Acetil-Deossinivalenolo (15AcDON). In fine il tipo C è caratterizzato dalla presenza di un gruppo epossido in posizione C_{7,8} (Crotocina), o in posizione C_{9,10} (bacarina), mentre il tipo D contiene un anello macrociclico in posizione C_{4,15} (saratossina e roridina) (Razzazi-Fazeli et al., 2003; Hussein e Brasel, 2001; Sudakin 2003). I tricoteceni hanno caratteristiche tossicologiche e chimico fisiche differenti all'interno del gruppo, infatti la T-2 è la micotossina più tossica del gruppo ed è solubile in solventi non polari, mentre DON e NIV sono solubili in solventi polari come gli alcoli (Trenholm et al., 1986). La presenza del gruppo epossido in posizione C₁₂₋₁₃ conferisce una forte attività tossicologica soprattutto nella inibizione della sintesi proteica. In particolare la tossina T-2 può inibire una delle tre fasi di inizio, allungamento e termine della sintesi proteica (Feinberg e McLaughlin, 1989; Sudakin 2003; Ueno 1968; Wei e McLaughlin, 1974; World Health Organization, 1990). Oltre all'inibizione proteica sono stati messi in evidenza anche effetti di inibizione nella sintesi del DNA e danni alle membrane cellulari, indicando la variegata attività tossica di questo gruppo nelle normali attività cellulari (Bunner e Morris, 1988; Eriksen et al., 2004; Rizzo et al., 1992; Rosenstein e Lafarge, 1983).

Numerosi studi sono stati condotti su gli effetti tossicodinamici dei tricoteceni a danno del sistema immunitario (Bondy e Pestka, 2000, Ihara et al., 1998; Islam et al., 1998; Nagata et al., 2001; Petska e Dong, 1994; Thuvander et al., 1999; Zhou et al., 1999). I principali effetti immunotossici attribuiti ai tricoteceni sono stati riscontrati principalmente in apoptosi dei linfociti, della milza, timo e linfonodi mesenterici. Inoltre si è evidenziata una forte riduzione delle concentrazioni dei linfociti B e T, delle immunoglobuline IgG e IgM. Infine sono state osservate azioni d'induzione dipendente del mRNA per alcune citochinine come TNF- α , IL6, IL1 beta (Cooray e Jhonsson, 1990; Hayes et al., 1980; Jagadeesan et al., 1982; Paucod et al., 1990; Rosenstein e Lafarge-Frayssinet, 1983; Thuvander et al., 1999; Yarom et al., 1984).

Studi in vivo condotti su diverse specie animali come ratti, maiali, ovini e bovini da latte hanno evidenziato la presenza di microrganismi intestinali e ruminanti capaci di ridurre l'anello epossido dei tricoteceni riducendo l'emivita di alcune tossine come la T-2 (meno di 30 minuti) e il DON (3-4 ore) (Kollarczik et al., 1994; Yagen e Bialer, 1993; Rotter et al., 1996a; Swanson e Corley, 1989). Tramite questa attività microbica i tricoteceni sono trasformati nelle molecole meno attive e successivamente rilasciate nelle urine e feci (Eriksen et al. 2002; Kollarczik et al., 1994; Onji et al., 1989; Swanson et al., 1988; Yoshizawa et al., 1986; 1983). Inoltre una percentuale di tricoteceni si può ritrovare legata alle proteine plasmatiche come dimostrato in diversi lavori (Mekey et al., 2003, Prelusky et al., 1987; 1988). I risultati ottenuti da questi studi evidenziando la capacità delle proteine plasmatiche di legarsi al DON ingerito o iniettato (9-11%)(Mekey et al., 2003, Prelusky et al., 1987; 1988). Il coniugato DON-glucoronide sembra essere il complesso tipico riscontrato nel sangue umano e può essere considerato un probabile e potenziale biomarker per identificare intossicazioni alimentari o esposizioni alle micotossine sia negli animali sia nell'uomo (Mekey et al., 2003).

Tricoteceni

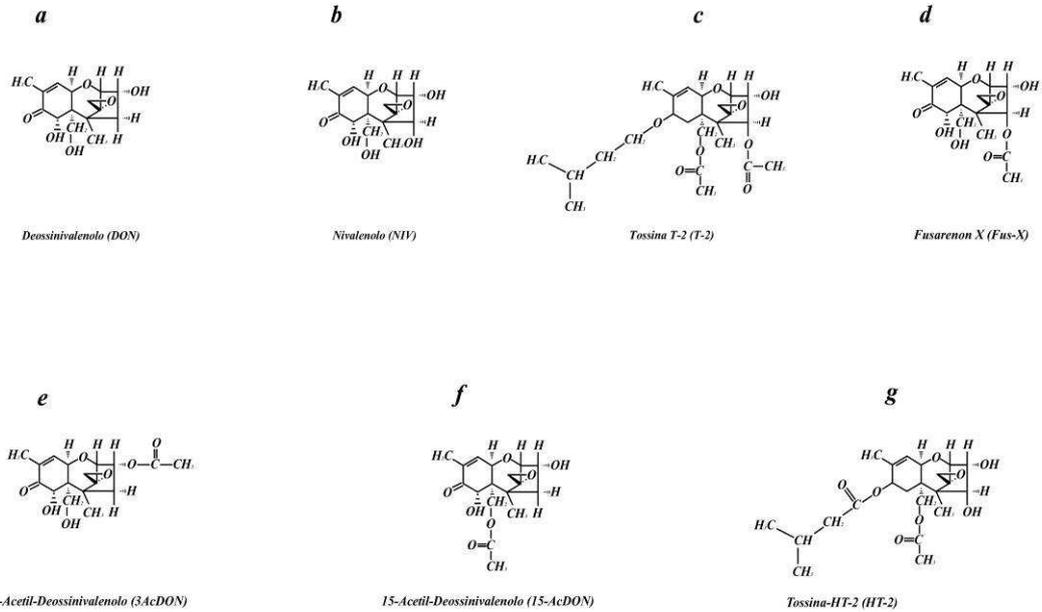


Figura 5. Principali micotossine appartenenti alla famiglia dei Tricoteceni. **a)** Deossinivalenolo (DON), **b)** Nivalenolo (NIV), **c)** Tossina T-2 (T-2), **d)** Fusarenone-X (Fus-X), **e)** 3-Acetil-Deossinivalenolo (3AcDON), **f)** 15-Acetil-Deossinivalenolo (15AcDON), **g)** Tossina-HT-2 (HT-2).

1.2.5. Zearalenone

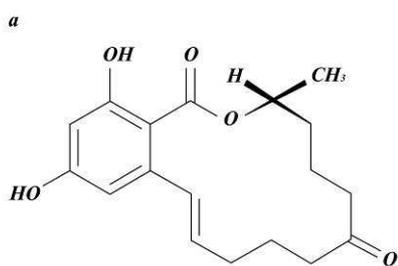
Lo Zearalenone (ZEA) è prodotto principalmente da diverse specie fungine appartenenti al genere *Fusarium* (*Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* e *Fusarium sporotrichioides*), dove la specie *Fusarium graminearum* è indicata come la principale responsabile degli effetti tossici ritrovati negli animali e in particolare nei maiali (Kuiper-Goodman et al., 1987; Marasas et al., 1991; Trenholmet al., 1985a; Hussein et al., 2001). Dalla molecola dello zearalenone si producono i due isomeri α -zearalenolo (α -ZOL) e β -zearalenolo (β -ZOL) con un rapporto di produzione che varia da specie a specie (**Figura 6**). I due metaboliti sono stati ritrovati ad elevate concentrazioni in colture di cereali contaminati da *Fusarium* e in molti altri prodotti alimentari (Botallico 1998; Kuiper-Goodman et al., 1987; Muller et al., 1998; Scudamore e Patel, 2000).

Lo ZEA presente nei prodotti alimentari è ingerito dagli animali, assorbito dall'intestino e trasportato dal sangue al fegato. Al livello del fegato lo zearalenone ZEA è convertito nelle due forme α -zearalenolo e β -zearalenolo. Studi condotti su diverse specie animali hanno messo in evidenza due tappe metaboliche che avvengono nella conversione dello ZEA nei due metaboliti secondari. Nella prima tappa si ha una reazione di coniugazione tra lo zearalenone e l'acido glucuronico, mentre nella seconda tappa si ha la reazione di riduzione dello ZEA nei due metaboliti secondari α -ZOL e β -ZOL (Mirocha et al., 1977; 1981). Tra i due metaboliti l' α -zearalenolo è quello con maggiori attività estrogene, anche se entrambe le due forme causano alterazioni nel tratto riproduttivo, inibizioni di fertilità, sviluppi anormali, aborti, riduzione di produzione di latte nei ruminanti, e diarrea in varie specie animali (Arukwe et al., 1999; Hagler et al., 1979; Kallela e Etalla, 1984; Khamis et al., 1986; Kuiper-Goodman et al., 1987; Mirocha et al., 1968., 1974; Roine et al., 1971; Smith et al., 1994; Smith et al., 1995; Sprosen e Towers, 1995; Towers et al., 1995a, b).

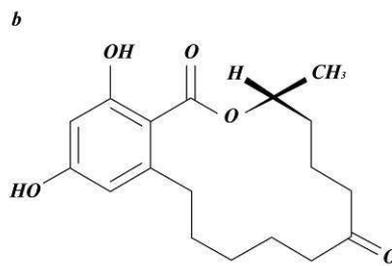
L'azione dello ZEA avviene a livello dei recettori degli estrogeni come descritto da Hayes (1994) e da Gentry (1986). Lo ZEA, una volta legato ai recettori degli estrogeni, viene trasportato verso il nucleo cellulare. Nel nucleo la coppia recettore-ZEA si lega ai recettori cromatinici attivandone la trascrizione di diversi RNA. In particolare lo ZEA compete con l'estradiolo B17 (E2) nel legame dei recettori citoplasmatici degli estrogeni, incrementando l'attività delle RNA polimerasi I, II e un aumento della sintesi proteica (Boyd e Wittliff, 1978; Kawabata et al., 1982). Il processo di attivazione genetico porta a diversi effetti biochimici, come riduzione di assorbimento dell'acqua e riduzione lipidica nei muscoli, incremento della permeabilità uterina al glucosio, ed una riduzione della sintesi degli ormoni

estrogenici. Molti degli effetti generati dagli isomeri dello ZEA sono stati studiati soprattutto *in vitro* (Kuiper-Goodman et al., 1987; Tiemann et al., 2003a, b). Tra questi ricordiamo gli effetti dei due isomeri α -ZOL e β -ZOL su colture di cellule della granulosa nella sintesi di Progesterone, un ormone ovarico importante nel preparare il tratto riproduttivo all'impianto dello zigote e al mantenimento dello stato riproduttivo (Tiemann et al., 2003b). La sintesi del progesterone avviene con la conversione del colesterolo in pregnenolone catalizzata dalla citocromo P450 (P450scc). Il pregnenolone è successivamente convertito in progesterone ad opera dell'enzima 3β -idrossisteroide deidrogenasi/isomerasi (3β -HSD). Le concentrazioni dei due enzimi sono a loro volta controllate dall'ormone follicolo stimolante (FSH), che stimola la sintesi degli mRNA dei due enzimi P450scc e 3β -HSD. Gli effetti dei due isomeri α -ZOL e β -ZOL sulla produzione ed accumulo del pregnenolone sono da attribuire ad una azione inibitoria dell'attività dell'FSH riducendo o bloccando la sintesi del progesterone. Inoltre si ha una riduzione numerica delle cellule aderenti a partire da basse concentrazioni dei due isomeri α -ZOL e β -ZOL. Oltre alla riduzione del progesterone, lo ZEA ha anche effetti sulla normale secrezione dell'ormone luteinizzante (LH) e della prolattina, evidenziando quindi una capacità di alterare la normale attività di secrezione della ghiandola pituitaria (Elsasser et al., 1983; Bongiovanni 1983). Nei ruminanti lo ZEA e i suoi metaboliti sono principalmente eliminati al livello della bile ed escreti nelle urine e feci. Questa attività di eliminazione dello ZEA, in combinazione a quella svolta dai batteri nel rumine, permette di avere un'elevata capacità di detossificazione e resistenza alle contaminazioni alimentari da ZEA (Biehl et al., 1993; Hidy et al., 1977; Kiessling et al., 1984; Kuiper-Goodman et al., 1987; Olsen et al., 1986;).

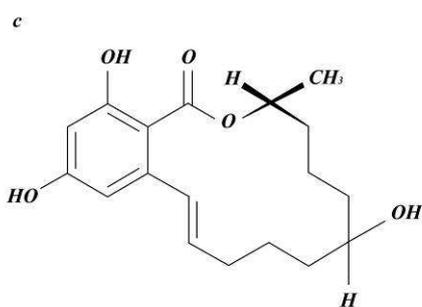
Zearalenone



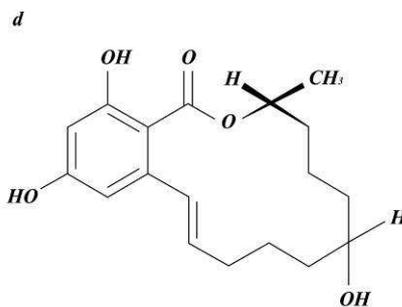
Zearalenone (ZEA)



Zearalanone (ZAN)



α-Zearalenolo (α-ZOL)



β-Zearalenolo (β-ZOL)

Figura 6. In **a** e **b** le due principali micotossine Zearalenone (ZEA) e Zearalanone (ZAN) prodotti da numerose specie del genere *Fusarium*. In **c** e **d** sono rappresentati rispettivamente i metaboliti secondari α -Zearalenolo (α -ZOL) e β -Zearalenolo (β -ZOL) prodotti dalla reazione di riduzione dello Zearalenone.

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 (Hanssen 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 AFB_1 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 ruminante 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 ruminale 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 aflatossine 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 aflatossine 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 aflatossine 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 aflatossine negli alimenti.
- c) Bovini che hanno subito stress possono assumere un contenuto massimo di 20 ppb di aflatossine.

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 (Özpinar 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, una 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 corrispettive 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). Altre 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).

Capitolo III - Quadro normativo per le micotossine

Tutta la normativa recente che disciplina i livelli massimi di micotossine ammissibili negli alimenti, deriva dalla legislazione europea. Tali norme, in forma di direttive, sono state poi recepite da ogni singolo Stato con delle proprie leggi, la cui entrata in vigore è risultata differente a seconda dei diversi iter legislativi. Di seguito sono riportate tutte le normative recenti che legiferano nell'ambito della contaminazione da micotossine:

- ✓ 1998, Regolamento (CE) N. 1525/98 del 16/07/'98 (modifica il regolamento (CE) n° 194/97): stabilisce i tenori massimi ammissibili per alcuni contaminanti presenti nei prodotti alimentari in particolare per le Aflatossine presenti nelle arachidi, nella frutta a guscio e frutta secca, cereali e latte;
- ✓ 1999, Direttiva 1999/29/CE del Consiglio del 22 aprile 1999: relativa alle sostanze ed ai prodotti indesiderabili nell'alimentazione degli animali, in particolare alle Aflatossine contenute nelle materie prime destinate alla formulazioni di mangimi;
- ✓ 1999, DMS del 21/5/'99 relativo all'Attuazione delle direttive 97/8/CE e 98/60/CE della Commissione, relative alle sostanze e ai prodotti indesiderabili nell'alimentazione degli animali;
- ✓ 1999, Circolare 09/06/'99 N°10 (pubblicata sulla G.U. 11/06/'99): stabilisce i valori massimi ammissibili di micotossine nelle derrate alimentari di origine nazionale, comunitaria e Paesi terzi (Aflatossine Ocratossine, Patulina);
- ✓ 2000, DM 23 dicembre 2000 (pubblicato sulla G.U. 09/02/01): Recepimento della direttiva 98/53/CE della Commissione che fissa i metodi per il prelievo di campioni e metodi d'analisi per il controllo ufficiale dei tenori massimi di taluni contaminanti nei prodotti alimentari;
- ✓ 2001, Regolamento (CE) N°466/2001 della Commissione dell'08/03/'01 che stabilisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari (Aflatossine);
- ✓ 2002, Regolamento (CE) N°472/2002 del 12/03/02: definisce i tenori massimi per le Aflatossine nelle spezie e per l'Ocratossina A nei cereali e nella frutta secca;
- ✓ 2002, Direttiva 2002/26/CE del 13/03/02: definisce i metodi di campionamento per la ricerca di Ocratossina A nei cereali;
- ✓ 2003, DMS del 31/05/'03 (GU n°161 del 14/7/'03): Recepimento della direttiva 2002/27/CE della Commissione del 13/03/'02 recante modifica della direttiva

98/53/CE che fissa metodi per il prelievo di campioni e metodi d'analisi per il controllo ufficiale dei tenori massimi di taluni contaminanti nei prodotti alimentari (tra gli altri Aflatossine);

- ✓ 2003, Circolare 28 novembre 2003, N°6: recante disposizioni relative sui valori massimi ammissibili di Ocratossina A nel cacao;
- ✓ 2003, Regolamento (CE) N° 2174/2003 della Commissione del 12/12/'03: modifica il regolamento (CE) N°466/2001 per quanto concerne le Aflatossine;
- ✓ 2006, 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;
- ✓ 2006, Raccomandazione (CE) N°576/2006 della Commissione del 17/08/2006 relativa ai valori massimi ammissibili di Deossinivalenolo, Ocratossina A, Fumonisine (B₁+B₂) e Zearalenone nei mangimi.

Il Regolamento N°2174/2003 (Tabella 7) fornisce indicazioni sulle concentrazioni massime di Aflatossine nei diversi prodotti alimentari, ma non da nessun tipo di indicazione per tutte le altre micotossine (che, se si esclude l'OTA e la Patulina, non risultano regolamentate neanche dalle normative precedenti).

Prodotto	Tenore massimo di Aflatossina ($\mu\text{g}/\text{kg}$) o ppb		
	B ₁	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	M ₁
Arachidi, frutta a guscio e frutta secca	2,0	4,0	-
Cereali e prodotti della lavorazione	2,0	4,0	-
Cereali destinati a cernita o ad altri trattamenti prima del consumo	2,0	4,0	-
Mais	5,0	10,0	-
Mangimi zootecnici	20	-	-
Latte crudo	-	-	0,05
Latte per lattanti	-	-	0,025

Tabella 1: Limiti AFB₁ previsti dal Regolamento N°2174/2003

Parlando di alimentazione animale e perciò di mangimi, notiamo che nessuna normativa stabilisce i tenori massimi di micotossine tollerabili (ad eccezione dell'AFB₁); tuttavia, oggi, di fronte alla crescita esponenziale del problema micotossine, si assiste all'utilizzo dei limiti imposti per gli alimenti umani come punto di riferimento anche per i mangimi. Ovviamente l'impiego di tali valori rappresenta solamente un'indicazione di quella che potrebbe essere la contaminazione reale vista la mancanza di norme, e quindi di limiti specifici per tali prodotti. A parte i limiti per AFB₁ negli alimenti per animali e per AFM₁ nel latte prodotto e destinato al consumo umano, la normativa europea e nazionale non prevede al momento altri limiti espressamente destinati al settore zootecnico. Tuttavia, è da considerarsi di riferimento, se non altro ai fini della qualità dei prodotti, il limite imposto per l'Ocratossina A nelle carni suine e insaccati che è fissato a $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ sulla base della Circolare del Ministero della Sanità n. 10 del 1999. Per l'OTA non corrisponde un limite per l'alimentazione del suino, né per le materie prime né, tanto meno, per i mangimi completi che possa garantire il rispetto della soglia sui prodotti. Sono tutt'ora in atto procedure per l'adozione di provvedimenti su scala comunitaria per la regolamentazione di altri metaboliti fungini oltre alle Aflatossine. Tra di loro la normativa N°576/2006 stabilisce i limiti massimi ammissibili per le materie prime

destinate alla produzione di mangimi. Il quadro appena descritto è illustrato in Tabella 2 (CE n°576/2006).

Micotossina	Prodotti destinati all'alimentazione animale	Valori guida (mg/kg ppm)
Deossivalenolo	Cereali e derivati tranne:	8
	✓ Prodotti derivati dal mais	12
Zearalenone	Mangimi complementari o completi tranne:	5
	✓ Suini;	0,9
	✓ Vitelli inferiori a 4 mesi, agnelli e capretti	2
	✓ Lattonzoli	0,1
Ocratossina	✓ Suini all'ingrasso e scrofe	0,25
	✓ Vitelli, vacche da latte, ovini e caprini	0,5
	Cereali e prodotti derivati;	0,25
	Mangimi complementari o completi per:	
Fumonisine	✓ Suini	0,05
	✓ Avicoli	0,1
	Mais e prodotti derivati	60
	Mangimi complementari o completi per:	
	✓ Suini, equini, conigli e animali da compagnia;	5
	✓ Pesci	10
✓ Avicoli, vitelli (< 4 mesi), agnelli e capretti	20	
✓ Ruminanti adulti (> 4 mesi) e visoni	50	

Tabella 2. Valori guida proposti per l'alimentazione animale (CE N°576/2006).

Capitolo IV - Parte sperimentale

IV.1 OBIETTIVI:

Lo scopo di questa tesi è stato finalizzato alla determinazione di contaminazioni da micotossine in alimenti utilizzati presso 15 allevamenti di bovini da carne del nord Italia, e all'analisi di alcuni biomarkers specifici dell'esposizione a micotossine. In particolare sono stati sviluppati i seguenti elementi della ricerca:

1. Analisi degli alimenti svolta alla ricerca delle più frequenti micotossine: aflatoxine (AF), fumonisine (FB), ocratoxina A (OTA) zearalenone (ZEA), deossinivalenolo (DON) nelle razioni totali miscelate (TMR) e nelle materie prime costituenti (concentrati, polpe di barbabietola, insilato di mais, granella di mais, sfarinato di mais semola glutinata di mais, ecc..). Inoltre sono state valutate le condizioni chimico-fisiche che possono aver favorito lo sviluppo delle micotossine nelle TMR e nelle materie prime.
2. Sviluppare una metodica di estrazione e determinazione fluorimetrica in RP-HPLC della ocratoxina A (OTA) in organi e tessuti di bovino, valutando l'effettiva applicabilità della metodica per la determinazione di bioaccumulo dell'OTA nei prodotti carnei.
3. Sviluppare una metodica d'estrazione e successiva determinazione del rapporto delle basi sfingoidi sfinganina/sfingosina (Sa/So) in RP-HPLC, al fine di valutare gli effetti nocivi causati dalla fumonisine B₁ sulla biosintesi lipidica. Sono stati considerati quali elementi d'approfondimento specifico, il miglioramento dei processi di estrazione delle basi sfingoidi da campioni di sangue di bovino da carne, e la valutazione della sensibilità e dei limiti di determinazione del rapporto Sa/So. Infine, è stato determinato l'effettivo stato di benessere animale analizzando il rapporto Sa/So dei campioni di sangue dei bovini allevati in alcune aziende campione
4. Sviluppare una metodica d'estrazione e successiva analisi fluorimetrica in RP-HPLC dell'addotto AFB₁-albumina, considerato un importante biomarker nella valutazione del bioaccumulo di AFB₁ nei tessuti animali. Sulla base di questo biomarker è stata valutata la percentuale di campioni di sangue di bovini da carne risultati positivi ad

un bioaccumulo di AFB₁ presente nelle razioni giornaliere oltre a valutare la possibilità di bioaccumulo di AFB₁ in condizioni di contaminazione alimentare cronica a livelli inferiori a quelli previsti dalla legge (2µg/kg, regolamento N°2174/2003).

IV.2 Materiali e metodi

IV.2.1. Raccolta e campionamento degli alimenti.

La sperimentazione ha previsto la valutazione del livello di esposizione a micotossine di 15 allevamenti intensivi di bovini da carne afferenti alla Cooperativa Scaligera nel periodo compreso tra maggio e ottobre 2005. Il piano di lavoro ha previsto dei prelievi sperimentali mensili per unifeed, foraggi (freschi ed insilati), mangimi semplici e complementari. In particolare, si è proceduto con il prelievo (da ogni azienda coinvolta nel progetto) di un campione di 2 kg di unifeed al momento della distribuzione in mangiatoia (conservato poi in congelatore), di un campione di 1 kg di mangime semplice o complementare conservato in ambiente asciutto e protetto in apposito sacco, e di un campione di 2 kg di foraggi insilati e secchi conservati poi in congelatore (insilati freschi) o in ambiente asciutto (foraggi secchi). I capi bovini, allevati con sistema intensivo in box, erano prevalentemente “broutard” francesi importati ad un peso di circa 440 kg (Charolaise) e 365 kg (Limousine) e sottoposti ad un periodo di quarantena di circa 20 giorni (con alimentazione controllata) e ad una fase di ingrasso e finissaggio di circa 5 mesi complessivi con incrementi di peso medi giornalieri di 1,5 kg. Nella Tab. 1 è riportato il quadro completo del campionamento di singoli alimenti e la loro utilizzazione nelle aziende campione.

	Unifeed	Insilato	Mangimi	Mais	Soia	Semola	Orzo	Polpe	Pastone di mais	Farine
N° campioni prelevati Maggio-Ottobre	95	34	64	101	18	62	4	72	6	3
N° Aziende che utilizzano l'alimento	15	12	10	15	4	11	2	13	3	1

Tabella 1. Quadro dei prelievi condotto su matrici alimentari provenienti da allevamenti di bovini da carne.

IV.2.2. Il sistema di analisi RP-HPLC.

Tutte le micotossine sono state analizzate con uno stesso sistema di analisi, seppur con relative variazioni per la determinazione al fluorimetro o all'ultravioletto. Lo stesso tipo di sistema è stato impiegato per le analisi delle basi sfingoidi D-eritrodeidro sfinganina Sa e sfingosina So.

Il sistema di analisi RP-HPLC si compone di un Vacuum Membrane Degaser SCM1000 (Thermo Separation Products, Riviera Beach, FL, USA), di una pompa quaternaria

SpectraSystem Gradient Pump P4000 (Thermo Separation Products, Riviera Beach, FL, USA), di una valvola d'iniezione a sei vie Rheodyne 7125NS (Rheodyne, L.P. – Rohnert Park, CA, USA) e di un autocampionatore termostato SpectraSystem 3000 (Thermo Finnigan, Product 355 river oaks parkway San Jose Ca, USA). Per l'analisi fluorimetrica è stato impiegato uno SpectraSystem Fluorescence Detector (Thermo Separation Products, Riviera Beach, FL, USA), mentre per l'analisi UV è stato impiegato uno SpectraSystem UV6000LP Detector (Thermo Separation Products Inc. USA). Per la gestione del sistema è stato impiegato il pacchetto software ChromQuest™ 3.0 (TermoQuest, Inc. San Jose CA, USA) che gira su OS Windows NT Workstation 4.0 (Microsoft Corporation, USA).

IV.2.3. Estrazione aflatossine

La presenza di aflatossine è stata determinata in campioni di unifeed, mais (granella, sfarinati, semola glutinata di mais e insilati di mais), polpe di barbabietola e mangimi. L'estrazione delle aflatossine è stata eseguita secondo il protocollo di estrazione della VICAM utilizzando colonnine di immunoaffinità AflaTest®_{WB} (Watertown, Ma USA).

Inizialmente sono stati messi, in una beuta da 300 ml, 25 g di campione macinato, al quale sono poi stati aggiunti 10 g di cloruro di sodio (NaCl) e 100 ml di soluzione estraente MetOH/H₂O (80:20). Il campione è stato agitato per 30 minuti a temperatura ambiente e successivamente 10 ml di estratto sono stati diluiti con 40 ml di acqua ultrapura (ASTM Type I) in falcon da 50 ml. Dopo l'agitazione il campione diluito è stato centrifugato a 3500 rpm alla temperatura di 4°C per 10 minuti. Alla centrifugazione è seguita una filtrazione su fibra di vetro (Eurolab srl, Bologna). Un volume di 45 ml della soluzione filtrata è stato eluito in colonne d'immunoaffinità AflaTest®_{WB} (VICAM, USA) seguito da un lavaggio con acqua ultrapura (ASTM Type I, 18,2 MΩ*cm). Il recupero della tossina è stato effettuato per eluizione della IAC con 1,5 ml di MetOH HPLC GRADE. Successivamente l'eluato è stato essiccato in un bagno termostato a 45°C sotto un flusso continuo di azoto (N₂). Al termine dell'essiccazione i campioni sono stati posti in frigo alla temperatura di 4°C in attesa di essere analizzati in HPLC.

IV.2.3.1 Determinazione delle aflatossine in RP-HPLC.

Per l'analisi in RP-HPLC delle aflatossine sono stati preparati gli standard della retta di calibrazione. Il protocollo utilizzato prevede la preparazione degli standard a partire dall'Aflatoxin Mix (AFB1 1 µg/ml, AFB2 0,3 µg/ml AFG1 1 µg/ml e AFG2 0,3 µg/ml)

(Supelco). 200 μ l di soluzione Aflatoxin Mix diluiti (AFB1 40,4 ng/ml, AFB2 9,9 ng/ml AFG1 40,2 ng/ml e AFG2 9,9 ng/ml) sono stati versati in una vial per HPLC ed essiccati in un bagno termostato a 45°C sotto un flusso continuo di azoto. È stata quindi effettuata una derivatizzazione degli standard con 200 μ l di acido trifluoroacetico (TFA, Sigma-Aldrich, USA) per 15 minuti al buio. Alla derivatizzazione è seguita una essiccazione e successiva risospensione degli standard derivatizzati in 1 ml di fase mobile MetOH/H₂O (40:60). Infine sono stati preparati 6 standard per diluizioni successive (in rapporto 1:2), versando 500 μ l di standard a concentrazione maggiore in una seconda provetta contenente 500 μ l di fase mobile. I campioni da analizzare sono stati derivatizzati in TFA per 15 minuti, essiccati e successivamente risospesi in 500 μ l di fase mobile MetOH/H₂O 40:60. L'analisi in RP-HPLC è stata eseguita facendo correre il campione per 15' mediante una colonna Synergi 4 μ Fusion-RP 80A 150 x 4,6 mm (Phenomenex, Chemtek Analytica, Bologna), impiegando una fase mobile MetOH/H₂O (40:60). I tempi di ritenzione delle quattro aflatoxine derivatizzate sono stati di 4,5' per l'AFG1, 6,2' per l'AFB1, 7,5' per l'AFG2 e 11,6' per l'AFB2.

I campioni analizzati sono stati mantenuti alla temperatura di 0°C per ridurre il tempo di decadimento dell'addotto aflatoxina-TFA, impiegando un autocampionatore termostato. Le aflatoxine derivatizzate sono state rilevate con fluorimetro settato con una lunghezza di eccitazione λ_{ex} 360nm e quella di emissione λ_{em} 440 nm.

IV.2.4. Estrazione fumonisine.

La presenza delle fumonisine è stata analizzata in campioni di unifeed, mais (granella, sfarinati, semola glutinata di mais e insilati di mais), polpe di barbabietola e mangimi. Il protocollo di estrazione VICAM (Watertown, Ma USA) è stato impiegato per le analisi delle fumonisine. 25 g di campione e 10 g di cloruro di sodio (NaCl) sono stati messi in una beuta da 300 ml nella quale sono stati poi aggiunti 100 ml di soluzione estraente MetOH/H₂O (80:20). I campioni sono stati inseriti in uno shaker e sottoposti a forte agitazione per 30 minuti. In seguito, 10 ml della soluzione estraente sono stati versati in una falcon contenete 40 ml di PBs 0,1M. La soluzione diluita è stata centrifugata a 3500 rpm alla temperatura di 4°C per 10 minuti. Successivamente la soluzione è stata filtrata su fibra di vetro (Eurolab srl, Bologna). Un volume di 45 ml del filtrato è stato eluito in colonne d'immunoaffinità FumonisinTest®_{WB} (VICAM, USA), seguito da un lavaggio in PBS 0,1 M. Il recupero della tossina è stato effettuato eluendo le IAC con 1,5 ml di MetOH HPLC GRADE e raccolto nelle vial per HPLC. L'eluato è stato sottoposto ad essiccazione in un bagno termostato a

45°C sotto un flusso continuo di azoto. Al termine dell'essiccazione i campioni sono stati posti in frigo alla temperatura di 4°C in attesa di essere analizzati in RP-HPLC.

IV.2.4.1 Determinazione delle fumonisine in RP-HPLC

Gli standard FB₁ 1 mg/ml (Sigma-Aldrich, USA) e FB₂ 0,5 mg/ml (Sigma-Aldrich, USA) sono stati miscelati alle concentrazioni finali di 12,5 ng/ml (FB₁) e 25 ng/ml (FB₂). Da questa soluzione sono stati preparati 6 standard per la retta di calibrazione tramite una serie di diluizioni successive (rapporto 1:2) versando 500 µl della soluzione standard a maggior concentrazione in una eppendorf contenente 500 µl di fase mobile MetOH/0,1N NaH₂PO₄ (70:30). Successivamente è stata preparata una soluzione di o-Ftalaldeide OPA, costituita da 5ml di sodio-tetraborato 0,1 M (B₄Na₂O₇), 1 ml di metanolo, 50 µl di 2-mercaptoetanololo e 40mg di OPA (Sigma-Aldrich, USA). Sia i campioni sia gli standard sono stati fatti reagire con L'OPA per 15' al buio. L'addotto formato OPA-FB₁ e OPA-FB₂ permette di rilevare al fluorimetro le fumonisine nei campioni e negli standards.

L'analisi in RP-HPLC delle fumonisine è stata eseguita impiegando una colonna Synergi 4µ Fusion-RP 80A 150 x 4,6 mm (Phenomenex, Chemtek Analytica, Bologna), e una fase mobile MetOH/NaH₂PO₄ 0,1 N pH 3,35 (70:30). Il flusso è stato settato a 1,0 ml/min, mentre la temperatura della colonna è stata settata a 30°C. I tempi di ritenzione delle fumonisine sono risultati di 7,03 minuti per la FB₁ e 5,6 minuti per la FB₂. I campioni analizzati sono stati mantenuti alla temperatura di 0°C per ridurre il tempo di decadimento dell'addotto OPA-FB₁ e OPA-FB₂, impiegando un autocampionatore termostato. L'addotto ortoftalaldeide-fumonisine (OPA-FBs) è stato rilevato al fluorimetro settando le due lunghezze di emissione λ_{em} 335 nm e di eccitazione λ_{ex} 440 nm.

IV.2.5. Estrazione ocratossina A (OTA).

L'estrazione delle ocratossine è stata eseguita su campioni di unifeed pesando 25 grammi di campione e aggiungendo 10 g di sale NaCl e 100 ml di soluzione estraente metanolo/acqua (MetOH/H₂O) 80:20. L'estrazione è stata eseguita su shaker agitando i campioni con la soluzione estraente per 30 minuti. Successivamente sono stati prelevati 10 ml della soluzione e versati in una falcon da 50 ml contenete 40 ml di acqua distillata (ASTM III). Alla diluizione del campione è seguita una filtrazione su fibra di vetro (Eurolab srl, Bologna), raccogliendo 45 ml di soluzione estraente. Le ocratossine contenute nell'estratto sono state eluite in colonne d'immunoaffinità Ocratest®_{WB} (VICAM, USA), a cui è seguito un

lavaggio con 10 ml di Mycotoxin washer 1X (25 gr NaCl, 5 gr NaHCO₃, 5,75 gr NaHCO₃*H₂O), 0,1 ml Tween20 acqua ultrapura (ASTM, Type I, 18,2 MΩ*cm) al volume finale di 1L. Infine le ocratossine sono state eluite con 1,5 ml di MetOH e raccolte in vial per RP-HPLC. L'essiccazione è stata eseguita in un bagno termostato a 45°C e sotto un flusso continuo di azoto. Al termine dell'essiccazione i campioni sono stati mantenuti in frigo alla temperatura di 4°C in attesa di essere analizzati in RP-HPLC.

IV.2.5.1 Determinazione della ocratossina A (OTA) in RP-HPLC

Gli standards per la retta di calibrazione sono stati preparati diluendo l'ocratossina A (OTA) 50 µg/ml (Sigma-Aldrich, USA) alla concentrazione più adatta all'analisi (2,5 µg/ml). Gli altri quattro standard sono stati preparati per successive diluizioni (rapporto 1:2) versando 500 µl di standard a maggiore concentrazione in una seconda vial contenente 500 µl di fase mobile acqua/acetonitrile H₂O/MetCN (43:56:1). I campioni sono stati ricostituiti con la stessa fase mobile impiegata nelle corse in RP-HPLC: Le condizioni di analisi della RP-HPLC sono state settate utilizzando una Colonna Discovery® C18 150 x 4,6 mm, 4µm (Supelco, USA) mantenuta alla temperatura di 35°C, con fase mobile MetCN/H₂O/MetCOOH (43:56:1). La corsa è stata settata per un tempo di 20 minuti ad un flusso di 0,9 ml/min, con un tempo di ritenzione per l'OTA di 9,5 minuti. Il fluorimetro è stato settato per le lunghezze d'onda di lavoro: λ_{ex} 334 nm e λ_{em} 460 nm.

IV.2.6. Estrazione tricoteceni (DON)

L'analisi degli unifeed per la determinazione dei tricoteceni, in particolare del deossivalenolo (DON) è stata eseguita utilizzando il protocollo di estrazione VICAM (Watertown, Ma USA). Gli unifeed sono stati essiccati in stufa a 65°C, successivamente sono stati pesati 25 g di campione e 5 g di polietilen glicole 8000 (PEG) e messi in una beuta da 300 ml. Nella beuta sono stati aggiunti 100 ml di acqua distillata (ASTM III). I campioni sono stati agitati per 30 minuti al buio. Dopo l'agitazione, 2 ml di estratto è stato caricato su colonnine DONTest®_{WB} (VICAM, USA), seguito da un lavaggio con 10 ml di acqua ultrapura (ASTM Type I, 18,2 MΩ*cm). Successivamente 1,5 ml di MetOH HPLC GRADE è stato fluito nella colonnina e recuperato nelle vial per RP-HPLC. Infine i campioni sono stati essiccati in un bagno termostato a 45°C sotto un flusso continuo di azoto. Dopo essiccazione i campioni sono stati conservati in frigo a 4°C in attesa di essere analizzati in RP-HPLC.

IV.2.6.1 Determinazione del deossinivalenolo (DON) in RP-HPLC

Gli standards per la retta di calibrazione sono stati preparati partendo da uno standard di 5mg di deossinivalenolo DON (Sigma-aldrich, USA). Cinque standard alle concentrazioni finali di 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml e 3,13 µg/ml di DON sono stati preparati per la retta di calibrazione. Sia gli standards che i campioni sono stati diluiti utilizzando la fase mobile acetonitrile/acqua MetCN/H₂O (10:90).

L'analisi all'RP-HPLC è stata eseguita utilizzando una colonna Discovery® C18 150 x 4,6 mm, 4µm (Supelco, USA) mantenuta alla temperatura di 30°C. La fase mobile è costituita da una soluzione di MetCN/H₂O (10:90). La corsa è stata settata per un tempo di 10 minuti con un flusso di 1,10 ml/min. Il detector UV6000LP è stato settato impiegando una lunghezza d'onda di lavoro di: λ_{abs} 218 nm,. Il segnale del Don è stato rilevato ad un tempo di ritenzione di 4,3 minuti.

IV.2.7. Estrazione zearalenone

I campioni di unifeed sono stati analizzati per determinare la presenza di contaminazione da zearalenone ZEN. Il protocollo VICAM prevede l'impiego di solventi organici per l'estrazione dello ZEN e successiva eluizione su colonnine ZearalaTest®_{WB} (VICAM, USA). Alla bilancia 25 g di campione e 10 g di NaCl sono stati pesati e messi in una beuta da 300 ml. Nella beuta sono stati versati 100 ml di soluzione estraente costituita da acetonitrile/acqua (MetCN/H₂O 90:10). I campioni sono stati agitati per 30 minuti in agitatore in assenza di luce. 1 ml di soluzione estraente è stata diluita in 49 ml di acqua distillata (ASTM III) e successivamente filtrata su carta da filtro tipo W4 (Whatman, Germany). La soluzione diluita è stata eluita su colonnina ZearalaTest®_{WB} e successivo lavaggio con 10 ml di acqua ultrapura (ASTM Type I, 18,2 MΩ*cm). Lo zearalenone è stato recuperato nelle vial da RP-HPLC versando 1,5 ml di MetOH HPLC GRADE nella colonnina. Le eppendorf sono state messe in un bagno termostato a 45°C sotto un flusso continuo di azoto. Dopo essiccazione i campioni sono stati conservati in frigo a 4°C in attesa di essere analizzati in RP-HPLC.

IV.2.7.1 Determinazione dello zearalenone (ZEN) in RP-HPLC

La retta di calibrazione per la determinazione delle concentrazione dello zearalenone nei campioni analizzati è stata preparata diluendo lo standard ZEN (50µg/ml, Sigma-Aldrich, USA) alla concentrazione finale di 100 ng/ml. Altri 5 standards a concentrazioni di 50 ng/ml,

25 ng/ml, 12,5 ng/ml e 6,25 ng/ml 3,13 ng/ml di ZEN sono stati preparati per diluizioni successive partendo dai 500 µl di Zen (100 ng/ml). La RP-HPLC è stata settata per l'analisi dello Zen utilizzando una colonna Discovery® C18 150 x 4,6 mm, 4 µm (Supelco, USA) mantenuta alla temperatura di 30°C. La corsa di 10 minuti in HPLC è stata settata utilizzando una fase mobile costituita da MetCN/MetOH/H₂O (46:8:46), con flusso di 1,2 ml/min. Il fluorimetro è stato settato per le lunghezze d'onda di eccitazione λ_{ex} 440 nm e di emissione λ_{em} 274 nm. Il tempo di ritenzione dello zearalenone è stato di 4,8 minuti. I campioni sono stati ricostituiti dopo l'essiccazione in 500 µl di fase mobile e analizzati in RP-HPLC.

IV.2.8. Estrazione della Ocratossina A (OTA) in tessuti ed organi di bovino da carne

Campioni di muscolo fegato e rene sono stati macinati con tritacarne, successivamente sono stati fortificati 25 g di campione (374 ng/ml (equivalenti a 14,96 ng/g)) di Ocratossina A (OTA). L'estrazione dell'OTA è stata eseguita utilizzando 100 ml di MetOH-sodio bicarbonato 1% p/v (70:30). Dopo 30 minuti di agitazione il campione è stato centrifugato a 3500 rpm per 15 minuti alla temperatura di 4°C. Il surnatante è stato filtrato su carta da filtro Whatman n.4 (Eurolab srl, Bologna). Un volume di 10, 20 e 45 ml di estratto è stato diluito rispettivamente in 40, 30 e 20 ml di PBS-Tween-20 0,01% e filtrato su fibra di vetro (Eurolab srl, Bologna). La soluzione filtrata è stata eluita in colonne d'immunoaffinità Ocratest®_{WB} (VICAM, USA), seguita da due lavaggi rispettivamente in PBS-Tween-20 0,01% e in acqua ultrapura (ASTM Type I, 18,2 MΩ*cm). Il recupero è stato effettuato con 1,5 ml di MetOH. Successivamente l'eluato è stato essiccato in un bagno termostato a 45°C e sotto un flusso continuo di azoto. Dopo risospensione in volume noto di fase mobile, i campioni sono stati sottoposti ad analisi in HPLC.

IV.2.8.1 Analisi e condizioni RP-HPLC per OTA estratta da organi ed tessuti di bovino.

Le analisi dei campioni contaminati con spike di ocratossina (OTA) sono stati analizzati utilizzando una colonna Synergi 4µ Fusion-RP 80A 150 x 4,6 mm (Phenomenex, Chemtek Analytica, Bologna).

La fase mobile per l'analisi dell'OTA è costituita da una soluzione di acetonitrile (AcN), acqua (H₂O) e acido acetico (AcOH) (43:56:1). Il flusso è stato settato alla velocità di 1,3 ml/min e la colonna termostata alla temperatura di 35°C. Dopo alcune prove preliminari, l'intera corsa è stata settata per un tempo di 18 minuti (in tali condizioni il tempo di ritenzione della OTA è compreso tra 11 e 12 minuti dall'inizio della corsa). Il fluorimetro è

stato settato con una lunghezza d'onda di eccitazione λ_{ex} 330 nm. ed una lunghezza d'onda di emissione λ_{em} 460 nm.

IV.2.9. Estrazione basi sfingoidi da campioni di sangue di bovino.

I campioni di sangue bovino sono stati sottoposti ad estrazione con solventi organici., quindi 500 μ l di campione sono stati trasferiti in tubi da 10 ml contenenti 1ml di metanolo (MetOH) grado HPLC, 1,5 ml di cloruro di potassio (KCl) 0,8% e 50 μ l di idrossido di potassio (KOH) 1M. Alla soluzione campione sono stati aggiunti 4 ml di acetato di etile grado HPLC (EtAC) come estraente. La soluzione è stata posta in agitazione per 30 minuti a temperatura ambiente (RT). Dopo la fase d'agitazione le provette sono state centrifugate a 3500 rpm per 15 minuti a RT. La fase surnatante contenente le basi sfingoidi è stata trasferita in provette da 3,5 ml e successivamente essiccata in un bagno termostato a 45°C in corrente di azoto. Parallelamente al trattamento dei campioni tal quale, sono state allestite prove per la determinazione dei recuperi percentuali su campioni fortificati con Sa e So a 4 ng/ml, 2 ng/ml e 1 ng/ml.

IV.2.9.1 Determinazione delle basi sfingoidi sfinganina (Sa) e sfingosina (So) in RP-HPLC

Per il duplice scopo di sviluppo del metodo in RP-HPLC (analisi recupero e verifica del decadimento degli addotti OPA-Sa, OPA-So) e dell'analisi di campioni tal quale, è stato necessario effettuare una doppia calibrazione su range differenti. Per la prima calibrazione, la preparazione degli standards è stata eseguita partendo dalle basi sfingoidi D-eritrodeidro sfingosina o sfinganina 4 mg/ml in MetOH (Sigma-Aldrich, Milano), e sfingosina 2 mg/ml in MetOH (Sigma-Aldrich, Milano) ad ottenere cinque standards alla concentrazione finale, per base sfingoide, di 0,625 ng/ml, 1,25 ng/ml, 2,5 ng/ml, 5 ng/ml e 10 ng/ml. L'analisi dei decadimenti è stata eseguita mantenendo gli addotti OPA-Sa e OPA-So alla temperatura costante di 0°C con autocampionatore termostato. Per l'analisi dei rapporti sfinganina/sfingosina nei campioni di sangue bovino, sono stati preparati 4 standards alla concentrazione, per base sfingoide, di 0,0325 ng/ml, 0,0625 ng/ml, 0,125 ng/ml e 0,25 ng/ml. Gli standard, gli spike e i campioni sono stati derivatizzati utilizzando una soluzione di *Orto*-ftalaldeide OPA (Sigma-Aldrich, Milano) con un rapporto derivatizzante/campione 7:1. Il sistema RP-HPLC è stato settato impiegando una colonna Synergi 4 μ Fusion-RP 80A 150 x 4,6 mm (Phenomenex, Chemtek Analytica, Bologna) termostata a 32°C. Come fase mobile

è stata impiegata una miscela metanolo (MetOH) e acqua (H₂O) in rapporto 90:10. La corsa è stata eseguita in isocratica per i primi 13 minuti, seguita da un gradiente di 2 minuti fino a MetOH 100% e terminata con un secondo gradiente per 5 minuti fino a MetOH/H₂O 90:10, per un tempo totale di 20 minuti. Le lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione del detector fluorimetrico impiegato (SpectraSYSTEM FL3000, Riviera Beach, FL, USA) sono state settate a: λ_{ex} 364 nm e λ_{em} 440 nm rispettivamente.

IV.2.10. Digestione enzimatica ed estrazione dell'addotto aflatossina B1-lisina (AFB₁-Lys) negli standard e nei campioni di sangue di bovino.

Uno standard di 5 mg AFB₁-BSA alla concentrazione di 9,77 moli/moli BSA (Sigma-Aldrich) è stato diluito con 2,5 ml di soluzione buffer sodio fosfato (PBS 0,1M, pH=7.4) in un tubo da 10 ml. Successivamente sono stati pesati 50 mg di proteasi E da 47500 U/g (Sigma-Aldrich, USA) e disciolti nella soluzione buffer contenente lo standard AFB₁-BSA. I campioni di siero di bovino sono stati preparati pesando 200 mg di proteasi E (47500 U/g) (Sigma-Aldrich, USA), sciogliendoli successivamente in 10 ml di soluzione di buffer sodio fosfato (PBS 0,1M, pH=7.4). Alla soluzione sono stati aggiunti 400 μ l di siero di bovino. Sia nello standard che nei campioni, la concentrazione enzima/AFB₁-BSA ottenuta è stata di 5300 U/g. Dopo una centrifugazione a 1000 rpm a 4°C per 1 minuto, sia gli standard sia i campioni sono stati messi in un agitatore termostato alla temperatura di 37°C per 12-15h per far avvenire l'idrolisi enzimatica ed ottenere l'addotto AFB₁-Lys. Al termine della digestione i campioni sono stati tolti dal termostato e alla soluzione è stato aggiunto NaCl ad una percentuale finale dello 0,9% p/v. Successivamente i campioni sono stati centrifugati a 1100 rpm a 4°C per 1 minuto. Le soluzioni dello standard e dei campioni sono state eluite su colonnine per immunoaffinità AflaTest®_{WB} (VICAM, USA), con successivo lavaggio con 10 ml di una soluzione buffer sodio fosfato (PBS 0,1M, pH=7.4). Il recupero dell'addotto AFB₁-Lys è stato effettuato per eluizione della IAC con 1,5 ml di MetOH HPLC GRADE. Infine l'eluato è stato essiccato in un bagno termostato a 45°C sotto un flusso continuo di azoto (N₂). Al termine dell'essiccazione i campioni e lo standard sono stati posti in frigo alla temperatura di 4°C in attesa di essere analizzati in RP-HPLC.

IV.2.10.1 Determinazione dell'addotto AFB₁-Lys in RP-HPLC in campioni di plasma.

Lo standard da 5mg AFB₁-BSA ottenuto dalla digestione enzimatica è stato utilizzato per ottenere una retta di calibrazione contenente le concentrazioni AFB₁-Lys di 9,77 moli/moli,

4,88 moli/moli; 2,44 moli/moli e 1,22 moli/moli. L'analisi all'RP-HPLC è stata eseguita utilizzando una colonna Lichosphere® 100 RP-18 (5 µm), 150 x 4,6 mm 5 µM (Merk, Germany) mantenuta alla temperatura di 37°C. La fase mobile è costituita da una isocratica costituita da MetOH 5% e PBS 0,02M pH 7.2 95% per i primi 22 minuti, seguita da un gradiente lineare di MetOH 60% e PBS 0,02M pH 7.2 40% per 11 minuti e successivo raggiungimento dell'isocratica di partenza ottenuta nei 7 minuti finali, ottenendo una corsa totale di 40 minuti con un flusso di 1.0 ml/min. Le lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione del detector fluorimetrico impiegato (SpectraSYSTEM FL3000, Riviera Beach, FL, USA), sono state settate a λ_{ex} 405 nm e λ_{em} 470 nm rispettivamente. Il tempo di ritenzione dell'addotto AFB₁-Lys è stato di circa 25 min.

IV.2.11. Analisi statistica.

I valori di tutte le variabili misurate sono stati analizzati come misure ripetute impiegando la procedura GLM del SAS (SAS, Institute, 1999). Il modello comprende, come effetti fissi, la razza (Charolaisee, Limousinee), il mese del campionamento (1,..3), l'azienda (1,..15) e l'errore. Le medie dei minimi quadrati sono stati separate con la procedura del PDIFF del SAS. Il coefficiente di correlazione è stato determinato tramite la procedura CORR del SAS. La significatività è stata definita per $P < 0.05$.

IV.3. Risultati

I metodi d'analisi sono stati sottoposti a controlli per la determinazione del recupero medio percentuale e per definire il limite di determinazione (LOD) per ciascuna micotossina analizzata. I controlli sono stati eseguiti impiegando materiali di riferimento certificati e/o matrici contaminate da spike di micotossine a concentrazione nota. Il recupero medio ottenuto per le AF è stato di 78%, mentre per lo ZEN è stato ottenuto un recupero medio percentuale del 102%. I limiti di determinazione LOD ottenuti sono stati di 0.12 ppb per AF, 9.1 ppb e 2.0 ppb per FB1 e FB2, 16.9 ppb per DON, 1.1 ppb per Zen e 0.25 ppb per l'OTA.

L'analisi delle principali micotossine in RP-HPLC ha evidenziato la presenza in tutti gli unifeed di aflatossine e fumonisine, mentre non è stata rilevata la presenza di deossinivalenolo DON, ocratossina A (OTA) e di zearalenone (ZEN). Delle materie prime impiegate nella razione alimentare delle razze Charolaise e Limousine, il mais e la semola glutinata di mais sono risultati i soli alimenti positivi alle aflatossine e fumonisine e negativi per le restanti micotossine DON, OTA e ZEN. Di seguito sono rappresentati i valori di contaminazione e la distribuzione delle aflatossine e delle fumonisine nei campioni di unifeed analizzati e nelle materie prime mais e semola glutinata di mais.

IV.3.1. Analisi contaminazioni degli unifeed da aflatossine.

La concentrazione delle aflatossine rilevata nei campioni di unifeed è stata determinata sommando i valori delle quattro aflatossine AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ determinate in RP-HPLC. Il contenuto massimo di AFB₁ consentito dal Regolamento CE N°2174/2003 è di 0,02 mg/kg (U 12%) o 2 g/kg (U 12%) e di 4 µg/kg inteso come somma di tutte le aflatossine nei cereali. Tali limiti sono però riferiti in maniera specifica all'uso alimentare umano, ma si adottano anche per l'uso alimentare negli animali da allevamento (bovini, ovini, suini e avicoli). Sebbene i valori di aflatossine riscontrati in tutti i campioni siano al di sotto del limite di legge, la contaminazione degli unifeed da aflatossine è risultata sistematicamente presente nel periodo di controllo in tutte le aziende.

La concentrazione media di aflatossine determinata nei tre periodi di Maggio-Giugno, Luglio-Agosto e Settembre-Ottobre è rappresentata in **Figura 1**, dove i valori medi crescono da maggio in poi raggiungendo i valori più alti nel periodo Settembre-Ottobre. I periodi di maggio-giugno e luglio-agosto mostrano una variabilità elevata che rende difficile evidenziare la variazione temporale delle contaminazioni da AF.

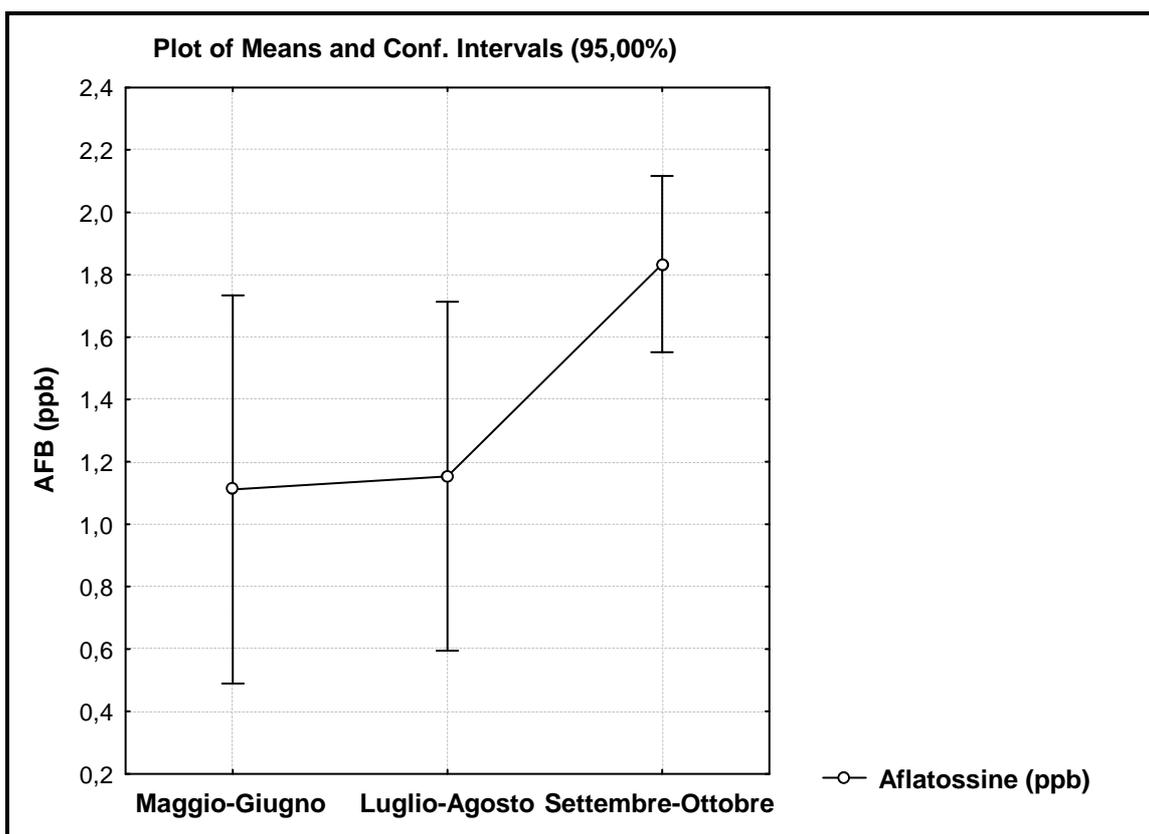


Figura. 1. Plot delle concentrazioni medie e intervallo di confidenza al 95% delle aflatossine (ppb) riscontrate nei campioni di unifeed nei tre periodi di Maggio-Giugno, Luglio-Agosto e Settembre-Ottobre.

IV.3.1.1 Analisi della varianza (ANOVA) e Newman-Keuls per le aflatossine in campioni di unifeed.

L'analisi della varianza ANOVA è risultata statisticamente non significativa come mostrato in **Tabella 1**.

Micotossine	Maggio-Giugno	Luglio-Agosto	Settembre-Ottobre	F	P
AF (ppb)	1,11	1,23	1,91	2,84	0,07

Tabella 1. Analisi della varianza (ANOVA) tra gli unifeed contaminati da aflatossine nelle 15 aziende.

I dati ottenuti mostrano una probabilità $P = 0,07$ superiore alla probabilità $P < 0,05$ considerata statisticamente significativa. Questo dato potrebbe risentire della grande varianza riscontrata soprattutto nei mesi di luglio-agosto e settembre-ottobre minimizzando così la differenza significativa di contaminazione da aflatossine nei periodi analizzati.

L'analisi statistica di Newman-Keuls applicata ai dati ottenuti permette di evidenziare quali sono i mesi con i valori medi di contaminazione più significativi (*Tabella 2*).

	Maggio-Giugno	Luglio-Agosto	Settembre-Ottobre
Maggio-Giugno	-	0,90	0,096
Luglio-Agosto	0,90	-	0,051
Settembre-Ottobre	0,096	0,051	-

Tabella 2. Newman-Keuls test applicato ai campioni di unifeed contaminati da aflatossine nei tre periodi di Maggio-Giugno, Luglio-Agosto e Settembre-Ottobre.

Il test non è risultato significativo per tutti e tre i periodi, anche se il confronto tra le epoche Luglio-Agosto e Settembre-Ottobre mostra una differenza di poco non significativa ($P < 0,051$). L'alta varianza dei campioni analizzati altera in maniera sensibile i dati rendendo difficile l'identificazione dei periodi di maggiore contaminazione, come già evidenziato nella ANOVA.

IV.3.2. Analisi delle contaminazioni degli unifeed da fumonisine.

I campioni di unifeed analizzati in RP-HPLC mostrano una contaminazione da Fumonisine in tutte le 15 aziende in tutti i periodi considerati. Nonostante ciò, in nessun caso è stato superato il limite di concentrazione delle fumonisine calcolato come somma delle FB₁ e FB₂. Il limite massimo per le fumonisine definito dalla FDA è di 30 ppm per i ruminanti da tre mesi di vita destinati alla macellazione. La Raccomandazione (CE) N. 576/2006 prevede una quantità massima di 60 mg kg⁻¹ per il totale di fumonisine B1, B2 e B3 nel mais. Tali tenori, pur essendo specifici per le derrate alimentari, sono adottati anche per i foraggi e le materie prime destinate all'alimentazione animale (bovini, ovini, suini, polli, ecc..) poiché mancano dei limiti comunitari precisi nell'ambito zootecnico. La distribuzione dei valori di contaminazione nelle 15 aziende presenta una variabilità nei tre periodi analizzati. La concentrazione media delle fumonisine determinata nelle tre epoche è rappresentata in **Figura 2**, dove il periodo di luglio-agosto sembra essere quello con il più alto valore medio di contaminazione. I mesi di settembre-ottobre e, soprattutto di maggio-giugno, mostrano valori medi più bassi.

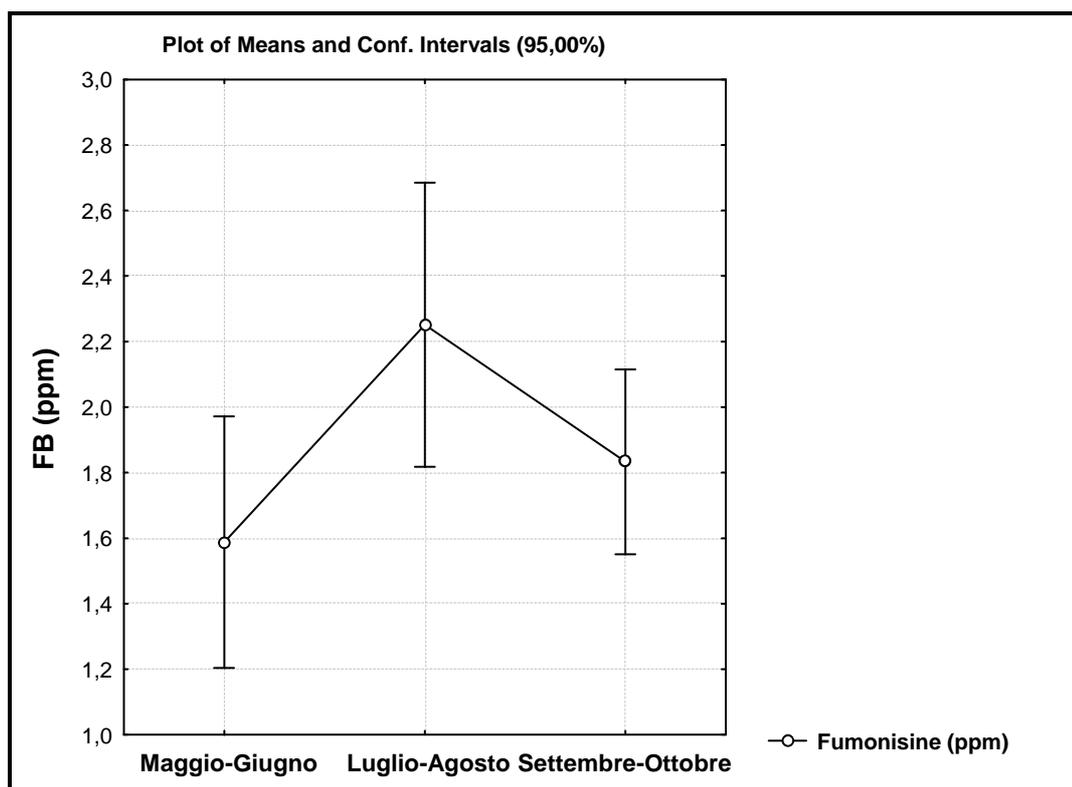


Figura 2. Plot delle concentrazioni medie e intervallo di confidenza al 95% delle fumonisine (ppm) riscontrate nei campioni di unifeed nei mesi di maggio, luglio ed ottobre.

IV.3.2.1 Analisi della varianza (ANOVA) e Test Newman-Keuls per le fumonisine in campioni di unifeed.

L'analisi della varianza (ANOVA) applicata ai dati ottenuti dall'analisi in RP-HPLC mostra e conferma che i valori medi di contaminazione da fumonisine riscontrati nelle 15 aziende nei tre periodi di analisi, sono statisticamente significativi (**Tabella 3**).

Tabella 3. Analisi della varianza (ANOVA) tra gli unifeed contaminati da fumonisine nelle 15 aziende.

Micotossina	Maggio-Giugno	Luglio-Agosto	Settembre-Ottobre	F	P
FB (ppm)	1,59	2,25	1,83	3,65	0,03

L'analisi è stata fatta confrontando i periodi di Maggio-Giugno, Luglio-Agosto e Settembre-Ottobre. I tre mesi mostrano una variabilità significativa nella contaminazione da fumonisine nelle 15 aziende con una $P < 0,05$.

Il test di Newman-Keuls mostra una differenza statisticamente significativa tra i periodi di luglio-agosto e maggio-giugno, mentre settembre-ottobre sembra essere più simile a luglio-

agosto e meno a maggio-giugno, anche se statisticamente non significativo in entrambi i casi (Tabella 4).

	Maggio-Giugno	Luglio-Agosto	Settembre-Ottobre
Maggio-Giugno	-	<i>0,027</i>	0,327
Luglio-Agosto	<i>0,027</i>	-	0,098
Settembre-Ottobre	0,327	0,098	-

Tabella 4. Analisi statistica delle concentrazioni delle fumonisine determinate negli unifeed nei tre mesi. I valori marcati in grassetto sono significativi per $p < 0,05$.

In generale l'epoca settembre-ottobre sembra portarsi verso i valori intermedi di maggio-giugno e luglio-agosto a causa probabilmente degli effetti climatici negativi sulla crescita delle micotossine. Dai dati statistici ottenuti, il mese di luglio-agosto risulta essere il periodo di contaminazione di maggior importanza. Anche se i livelli di tolleranza sono bassi per poter essere rilevati nelle carni e negli organi come fegato e reni, un effetto negativo può manifestarsi con la riduzione dell'appetibilità e del peso dell'animale. Particolare attenzione va quindi mostrata durante il periodo di luglio-agosto ai bovini pronti per il macello, poiché la concentrazione di micotossine negli alimenti è maggiore.

IV.3.3. Contaminazione da micotossine in campioni di granella, sfarinato e semola glutinata di mais.

Per evidenziare l'esistenza di un incremento delle concentrazioni delle micotossine con la condizione di umidità dei campioni di mais e semola glutinata di mais, sono stati messi in relazione i valori di umidità e le concentrazioni di aflatossine e fumonisine. (Tabella 5a, b, c d).

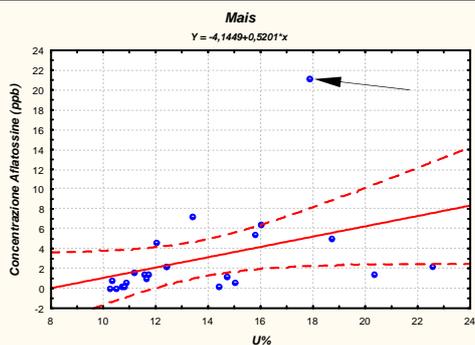


Tabella 5a. Correlazione tra la concentrazione di aflatossine ($\mu\text{g}/\text{kg}$) e umidità % in campioni di granella e sfarinato di mais. I campioni risultati fuori della retta sono indicati dalle frecce.

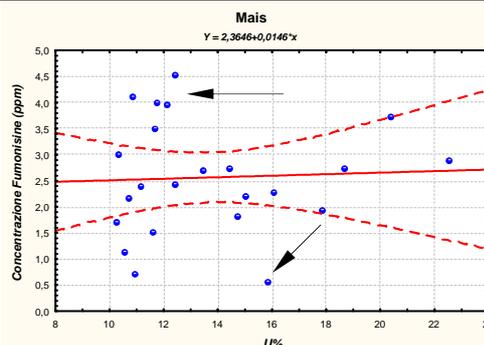


Tabella 5b. Correlazione tra la concentrazione delle fumonisine (mg/kg) e umidità % in campioni di granella e sfarinato di mais. I campioni risultati fuori della retta sono indicati dalle frecce.

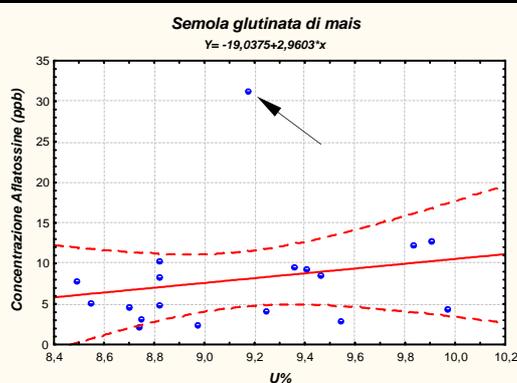


Tabella 5c. Correlazione tra la concentrazione delle aflatossine ($\mu\text{g}/\text{kg}$) e umidità % in campioni di semola glutinata di mais. I campioni risultati fuori della retta sono indicati dalle frecce.

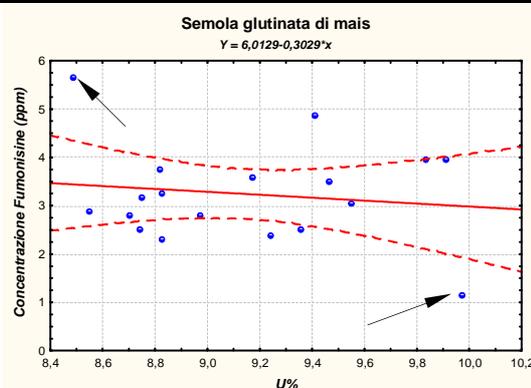


Tabella 5d. Correlazione tra la concentrazione delle fumonisine (mg/kg) e umidità % in campioni di semola glutinata di mais. I campioni risultati fuori della retta sono indicati dalle frecce.

I dati ottenuti mostrano una correlazione positiva tra il contenuto di aflatossine e l'umidità percentuale riscontrata nei campioni di mais ($r= 0,71$, $P < 0,05$), mentre una ridotta positività è stata rilevata nella correlazione tra aflatossine e semola glutinata di mais. La correlazione tra il contenuto di fumonisine e l'umidità dei campioni di mais e semola glutinata di mais non è risultata positiva. La contaminazione da entrambe le micotossine messe in relazione mostra una maggiore concentrazione delle fumonisine rispetto alle aflatossine nel mais analizzato (**Tabella 6a**), mentre nei campioni di semola glutinata le concentrazioni delle aflatossine e fumonisine sembrano meglio correlate (**Tabella 6b**).

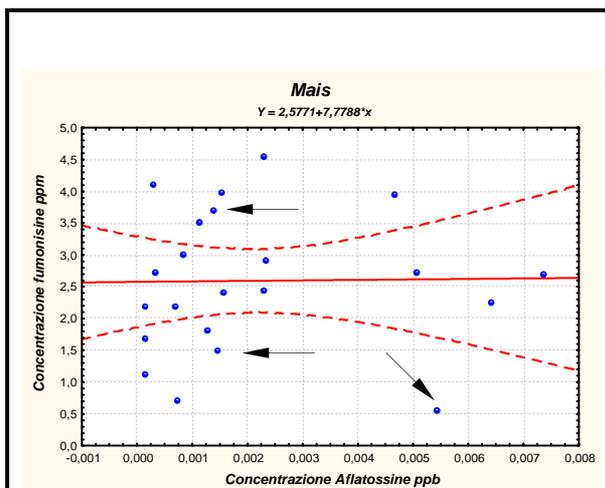


Tabella 6a. Confronto concentrazioni delle fumonisine (mg/kg) e aflatossine ($\mu\text{g}/\text{kg}$) in campioni di granella e sfarinato di mais.

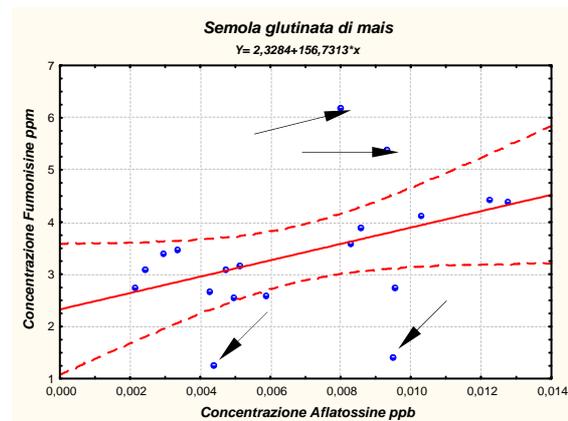


Tabella 6b. Confronto tra concentrazioni di fumonisine (mg/kg) e aflatossine ($\mu\text{g}/\text{kg}$) in campioni di semola glutinata di mais.

Data la correlazione positiva tra le aflatossine e l'umidità dei campioni di mais e di semola glutinata di mais, si è proposta una suddivisione dei campioni in 3 classi. La scelta delle classi è stata fatta in funzione dei valori percentuali di umidità determinata all'analisi (**Tabella.7a,b**).

Tabella 7a

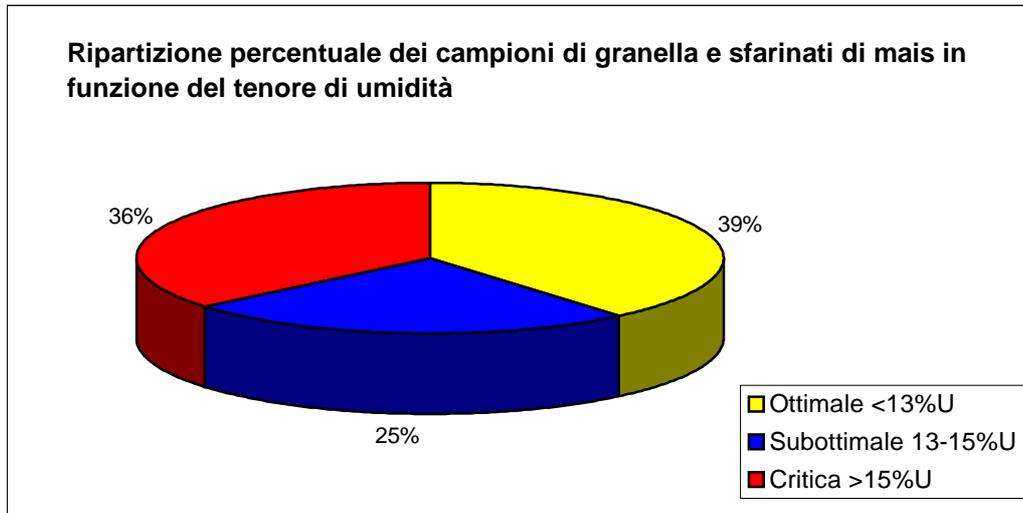
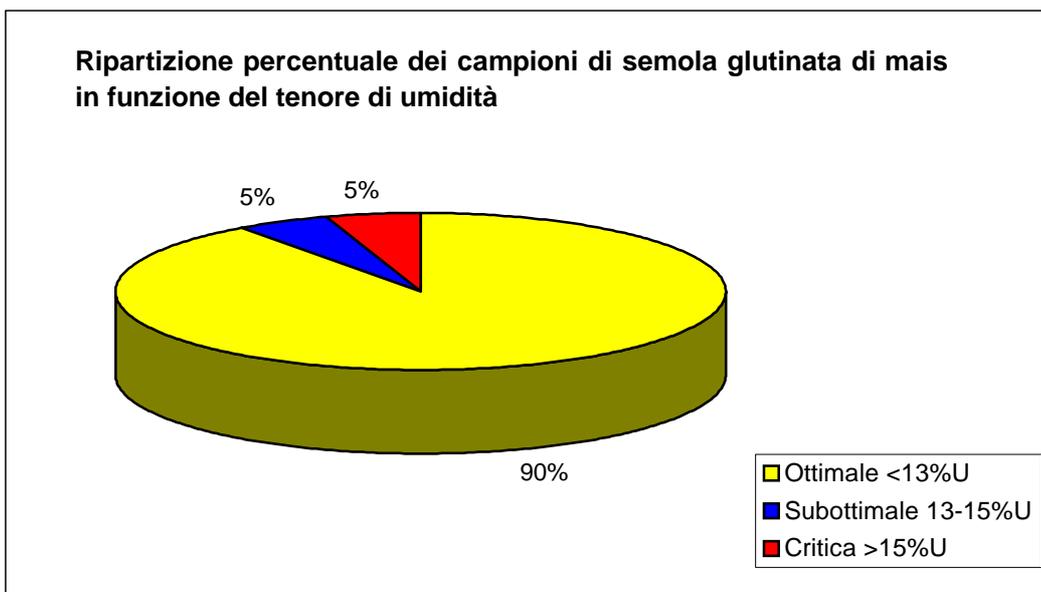


Tabella 7b



I campioni sono stati suddivisi nelle seguenti classi: ottimale, per i campioni con umidità inferiore a 13%, subottimale, per i campioni con umidità compresa tra 13% e 15%, infine una terza classe, definita critica, che comprende tutti i campioni con umidità superiore al 15%. Il 36% dei campioni di granella e sfarinato di mais analizzati è risultato appartenere ad una classe critica, il 25% cade nella classe subottimale, mentre il 39% è considerato ottimale. Dalla valutazione delle umidità dei campioni di semola glutinata di mais è emerso che soltanto il 5% presenta un livello critico di contaminazione, il 5% dei campioni analizzati è risultato subottimale, mentre il 90% appartiene ad una classe ottimale (**Tabella 7a, b**).

I risultati evidenziano che il maggior apporto di contaminazione degli unifeed per le aflatossine e le fumonisine è dato dal mais e soltanto un piccolo contributo è dato dalla semola glutinata di mais. L'analisi della varianza indica che la contaminazione da aflatossine nei campioni di mais è statisticamente correlata con la percentuale di umidità riscontrata nelle tre classi ($P < 0,03$), mentre le fumonisine non presentano una correlazione con la percentuale di umidità delle tre classi (**Tabella 8a, b**).

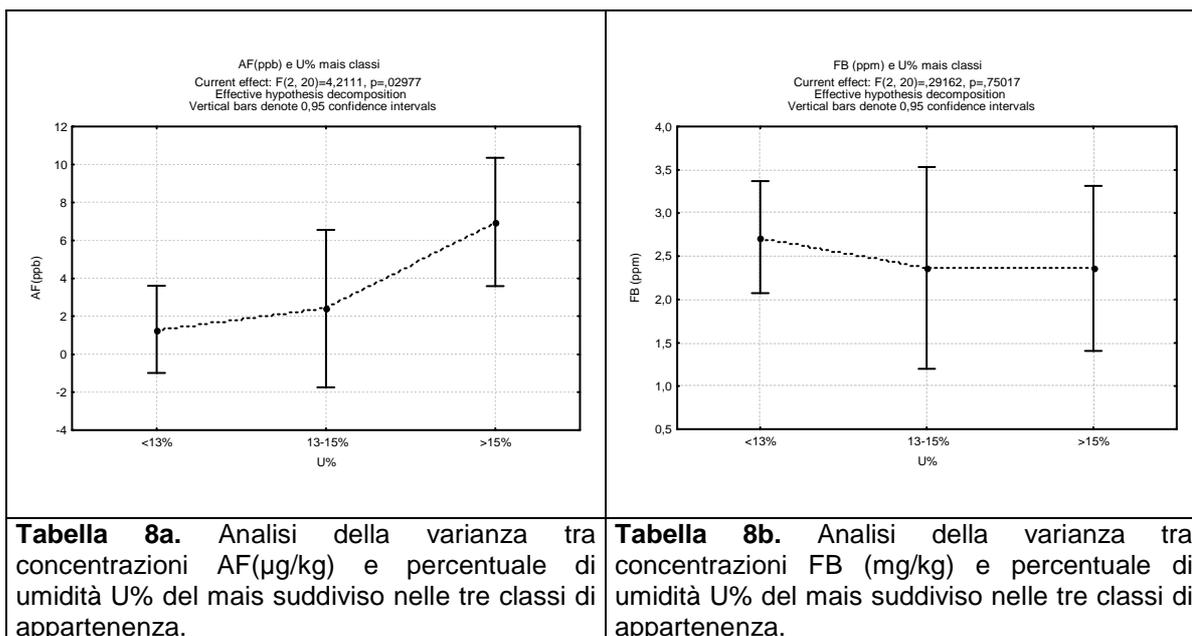


Tabella 8a. Analisi della varianza tra concentrazioni AF($\mu\text{g}/\text{kg}$) e percentuale di umidità U% del mais suddiviso nelle tre classi di appartenenza.

Tabella 8b. Analisi della varianza tra concentrazioni FB (mg/kg) e percentuale di umidità U% del mais suddiviso nelle tre classi di appartenenza.

I campioni di mais sono stati suddivisi successivamente in quattro categorie basate sulle dimensioni del mais macinato: granella di mais, farina di mais, mais sbriciolato e mais spezzato. Per ciascun gruppo sono stati determinati i valori medi e deviazione standard dell'umidità percentuale e delle concentrazioni di AF (**Tabella 9**).

Tipi di mais	Umidità, %	AF, ppb
Granella di mais	10 \pm 2	2.62 \pm 0.30
Farina di mais	11 \pm 1	0.94 \pm 0.77
Mais sbriciolato	14 \pm 2	2.38 \pm 2.86
Mais spezzato	17 \pm 3	6.41 \pm 6.88

Tabella 9: valori medi di umidità e concentrazione di AF per le diverse tipologie di mais.

I valori di umidità percentuali riscontrati nei 4 gruppi sono per la granella 10%, per la farina di mais 11%, per il mais sbriciolato 14% e per il mais spezzato 17%. Anche in questo caso sono stati proposti tre livelli con valori critici di umidità, ottimale <13%, subcritico 13÷15%,

critico >15%. I risultati mostrano quindi che il mais spezzato è mal conservato e con un'alta variabilità di contaminazione da AF (6.41 ± 6.88). Il mais sbriciolato mostra una contaminazione da AF meno evidente, ma sempre con un alta variabilità (2.38 ± 2.86). Infine, le granelle (2.62 ± 0.30) e le farine di mais (0.94 ± 0.77) rappresentano i gruppi meglio conservati con minore variabilità di contaminazione.

IV.3.4. Analisi dell'OTA in organi e tessuti di bovino.

Il protocollo di estrazione impiegato e la successiva analisi in RP-HPLC hanno permesso di valutare la capacità di estrazione e di ottenere risultati in tempi brevi dalla analisi in RP-HPLC. Inoltre è stata valutata l'efficacia della metodologia applicata a tre campioni diversi. I cromatogrammi ottenuti per muscolo, fegato e rene analizzati hanno dato un segnale pulito privo da impurezze in prossimità del picco di emissione dell'OTA. (**Figure 3, 4 e 5**), inoltre i tempi di ritenzione dei campioni sono risultati sovrapponibili a quelli ottenuti dagli standard.

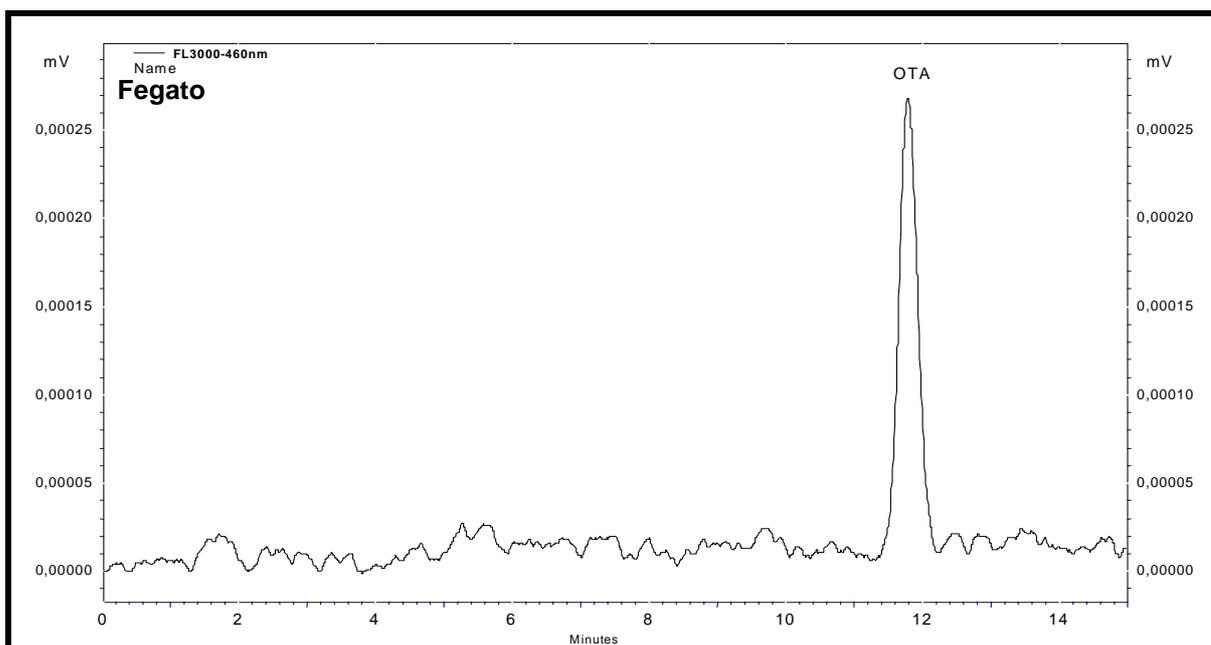


Figura 3. Cromatogramma relativo alla ocratossina (OTA) estratta da campioni di fegato contaminato da spike di 375 ng/ml. 50 μ l di campione sono stati iniettati, il segnale è stato rilevato ad un tempo di ritenzione di 11 minuti. Nessun segnale interferente è stato rilevato in prossimità del tempo di ritenzione dell'ocratossina (OTA).

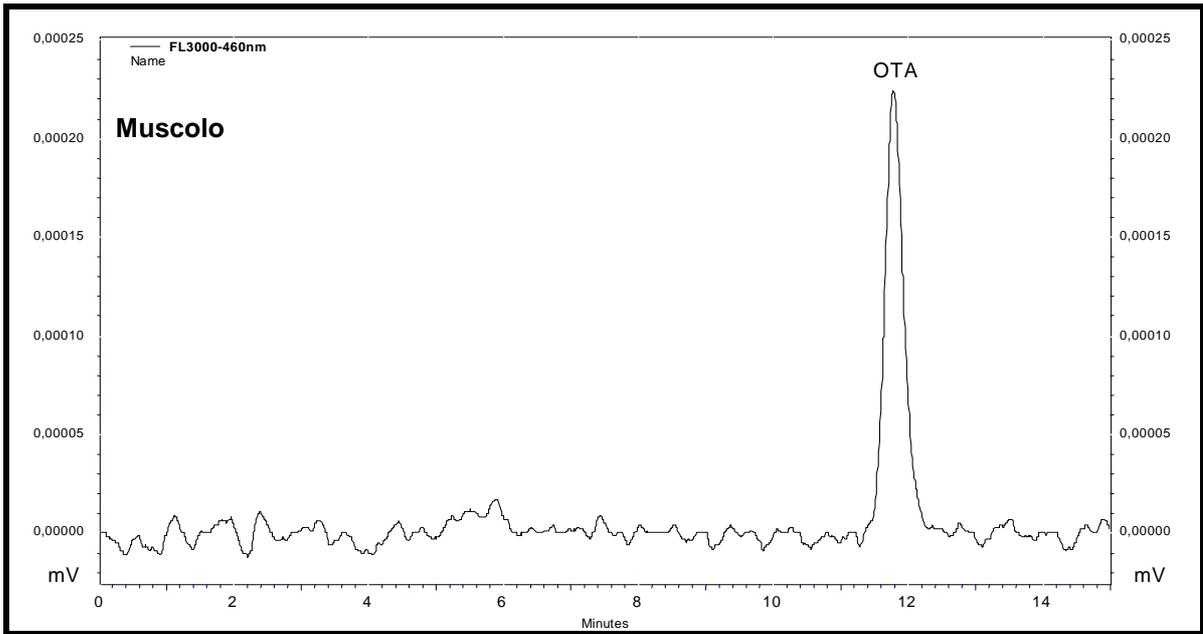


Figura 4. Cromatogramma relativo alla ocratossina (OTA) estratta da campioni di muscolo contaminato da spike di 375 ng/ml. 50 μ l di campione sono stati iniettati, anche in questo caso il segnale è stato rilevato ad un tempo di ritenzione di 11 minuti e privo disegni di impurezze nel medesimo o in vicinanza tempo di ritenzione.

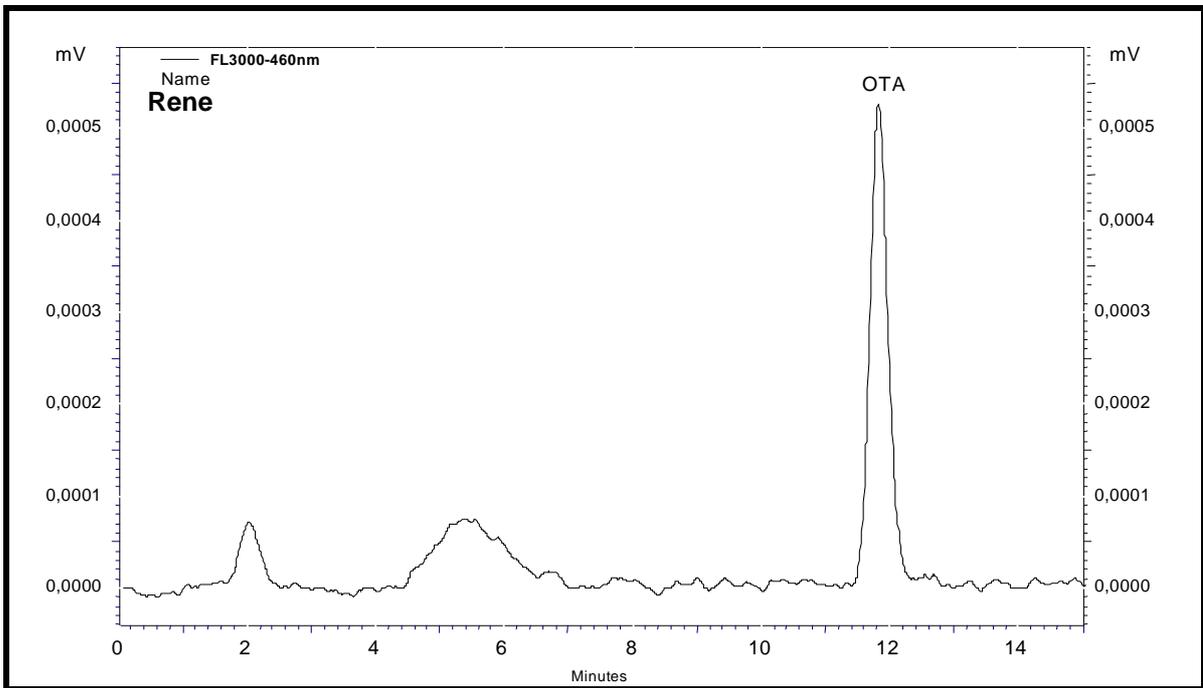


Figura 5. Cromatogramma relativo alla ocratossina (OTA) estratta da campioni di rene contaminato da spike di 375 ng/ml. 50 μ l di campione sono stati iniettati, il segnale è stato rilevato ad un tempo di ritenzione di 11 minuti. Segnali di impurezze sono stati rilevati a 2 e a 5,2 minuti.

Le concentrazioni OTA dei campioni analizzati sono state valutate impiegando una retta di calibrazione che comprende 5 standard (2,5 µg/ml; 1,25 µg/ml; 0,625 µg/ml; 0,312 µg/ml; 0,156 µg/ml), come indicato in figura 6.

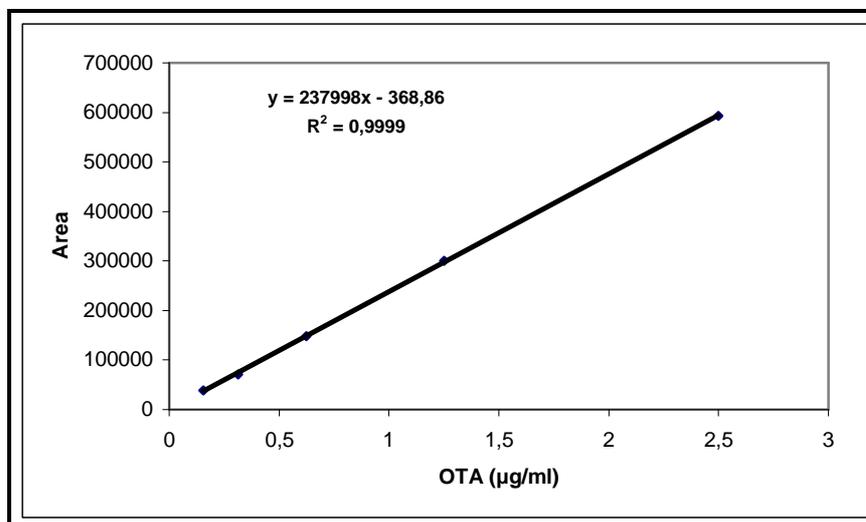


Figura 6. Retta di calibrazione OTA. In ordinate sono indicati i valori dell'area di integrazione di ogni standard, mentre in ascissa è indicata la concentrazione OTA espressa in µg/ml.

IV.3.4.1 Determinazione dei recuperi medi percentuali degli spike di OTA in organi e tessuti.

Al fine di valutare i recuperi degli spike di OTA eseguiti su fegato, rene e muscoli sono state eseguite analisi di recupero percentuale utilizzando i seguenti volumi di estrazione: 10, 20 e 45 ml (**Tabella 10**). I campioni di fegato, rene e muscolo eluiti su colonne Ocratest_{WB} (10 ml di volume fluito in IAC) hanno dato un valore medio di recupero del 63,8% per il rene, 59,2% per il muscolo e del 51,4% per il fegato. L'impiego di 20 ml di estratto chiarificato di fegato, rene e muscolo eluiti su colonne Ocratest_{WB} hanno dato un recupero medio di 45,0% per il fegato, il 71,1% per il rene e l'88,7% per il muscolo. Infine con 45 ml di estratto chiarificato per fegato rene e muscolo sono stati ottenuti i corrispettivi valori 56,7% 88,8% e l'88,9%. Delle tre soluzioni estraenti quella da 10 ml ha prodotto bassi recuperi, mentre percentuali di recupero maggiori e simili tra loro sono state ottenute per i volumi da 20 e 45 ml. Inoltre il fegato in tutti i casi ha mostrato sempre bassi livelli di recupero, mentre rene e muscolo hanno mostrato livelli maggiori. Il mantenimento delle attività enzimatiche nei campioni di fegato possono aver modificato l'OTA, convertendola ad esempio in OTA- α , e riducendo i valori di recupero. Per evitare tale problema è necessario quindi inattivare le

reazioni enzimatiche. Il metodo ha pertanto mostrato un'efficace capacità di estrazione di OTA e quindi ha indicato la possibilità di impiegare la metodica per valutare la presenza di residui di OTA in tessuti ed organi di ruminanti sottoposti ad un'alimentazione contaminata da OTA.

Campione	N	Soluzione estraente (ml)	Recupero medio (%)	RSD
Fegato	2	10	51,5	2,0
Rene	2	10	63,9	4,6
Muscolo	2	10	59,3	2,8
Fegato	2	20	45,0	2,6
Rene	2	20	71,1	3,1
Muscolo	2	20	87,7	6,9
Fegato	2	45	56,7	11,7
Rene	2	45	88,8	8,2
Muscolo	2	45	88,9	10,3

Tabella 10. Recuperi medi percentuali e RSD ottenuti con spike da 14,96 ng/g su fegato, rene e muscolo. I recuperi sono stati valutati impiegando tre diversi volumi di estraente (10, 20 e 45ml).

IV.3.5. Analisi sfinganina (Sa) Sfingosina (So): tempi di decadimento e recuperi percentuali in campioni di sangue di bovino.

Nella fase sperimentale, per la determinazione delle basi sfingoidi sfingosina So e D-eritrodeidro sfingosina o Sfinganina (Sa), sono state testate le condizioni di analisi in HPLC e una colonna diversa da quella utilizzata nel lavoro di riferimento (Castegnaro et al., 1998). I risultati ottenuti in numerose prove hanno sempre dato esito positivo e costante (**Figura. 7**). Infatti sono stati rilevati due picchi a 7,4 minuti per la sfingosina (So) e 8,9 minuti per la sfinganina (Sa). I picchi rilevati per le basi sfingoidi sono risultati simmetrici ben risolti, mentre l'utilizzo di altre colonne compresa una Discovery C18 25cm x 4,6mm ID, 5 μ m (Supelco) ha mostrato picchi asimmetrici e con spalle laterali (dati non mostrati).

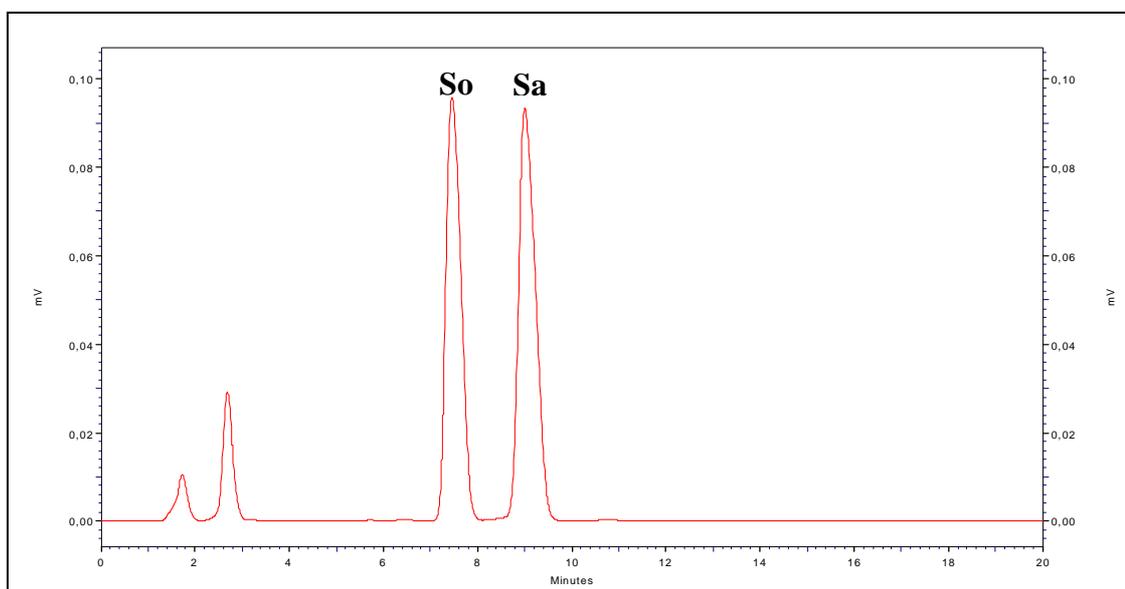


Figura. 7. Cromatogramma relativo alle basi sfingosina (So) sfinganina (Sa) entrambe alla concentrazione di 5 ng/ml. In ordine d'eluizione, la prima base sfingoide sfingosina (So) presenta un tempo di ritenzione di 7,3 minuti, mentre la base sfinganina (Sa) rappresenta un tempo di ritenzione di 8,8 minuti. Entrambi i picchi sono ben separati e simmetrici.

Le percentuali di decadimento sono state analizzate partendo da un campione Sa e un campione So (**Figura. 8**). Entro l'intervallo 0-240 min' dalla derivatizzazione con OPA, i risultati delle concentrazioni e dei corrispettivi intervalli di tempo sono stati utilizzati per costruire una curva di decadimento. Il decadimento in percentuale al tempo di 240 minuti è risultato modesto: 4% per OPA-So e 6% per OPA-Sa rispetto al segnale degli addotti al tempo zero, mostrando un'alta capacità di mantenimento del segnale delle basi sfingoidi alla temperatura di 0° C.

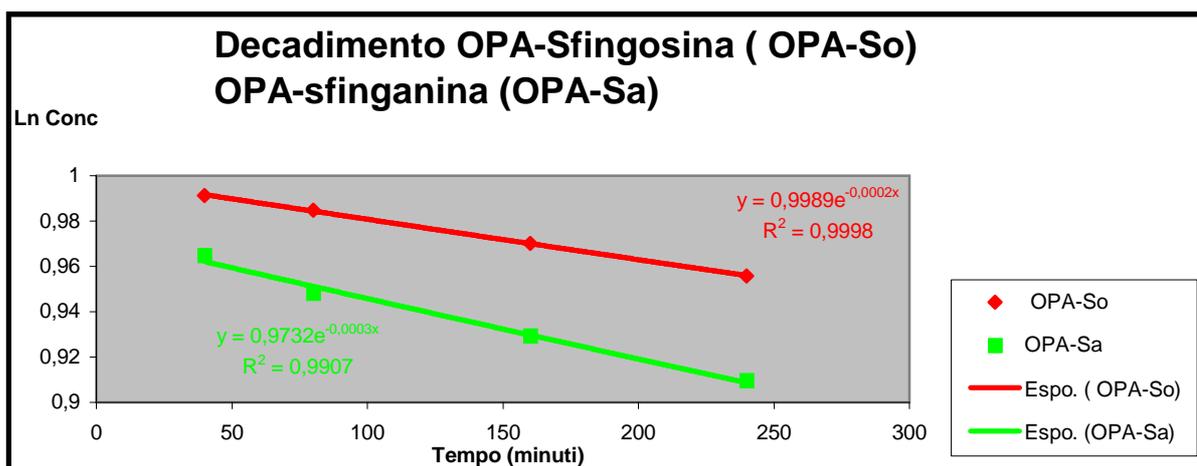


Figura 8. Decadimento dei derivatizzati OPA-sfinganina (OPA-Sa), OPA-sfingosina (OPA-So).

Infine la funzione di decadimento è stata stimata al fine di confrontare i valori osservati con quelli attesi (**Figura 9**).

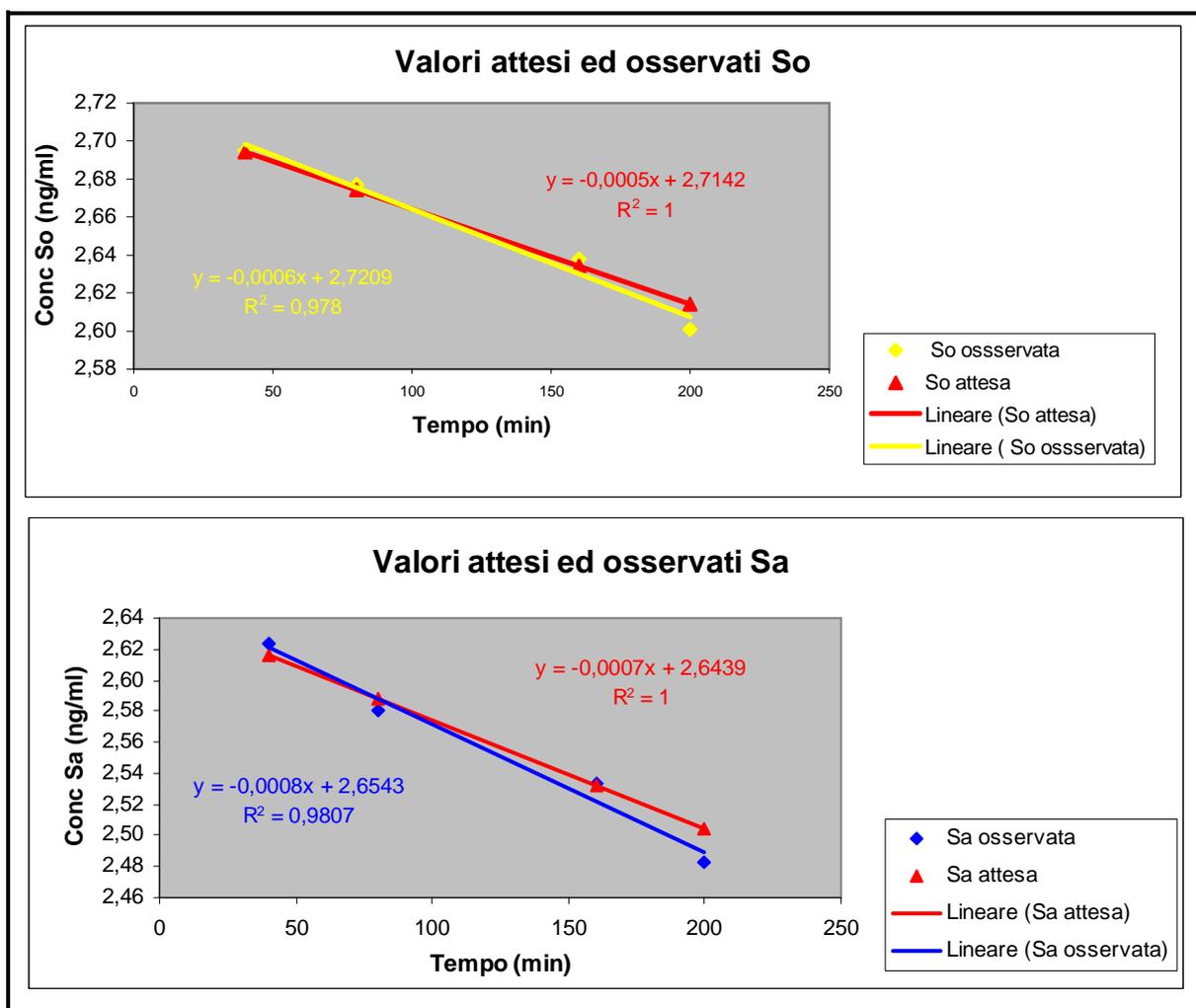


Figura 9. Curve di decadimento osservata ed attesa per le due basi sfingoidi Sa e So. In ordinata per le basi sfingoidi sono indicate le concentrazioni (ng/ml), mentre in ascissa è indicato il tempo (min.).

Le due rette, attese ed osservate, mostrano una buona sovrapposizione, indicando la possibilità di utilizzare tali equazioni delle rette per valutare i tempi massimi e quindi il numero di campioni da analizzare con un autocampionatore garantendo una perdita di segnale entro la soglia del 10%. In genere possiamo ipotizzare che in 4 ore possono essere analizzati ben 12 campioni mantenendo il decadimento entro il 96% per l'OPA-So e il 94% per l'OPA-Sa.

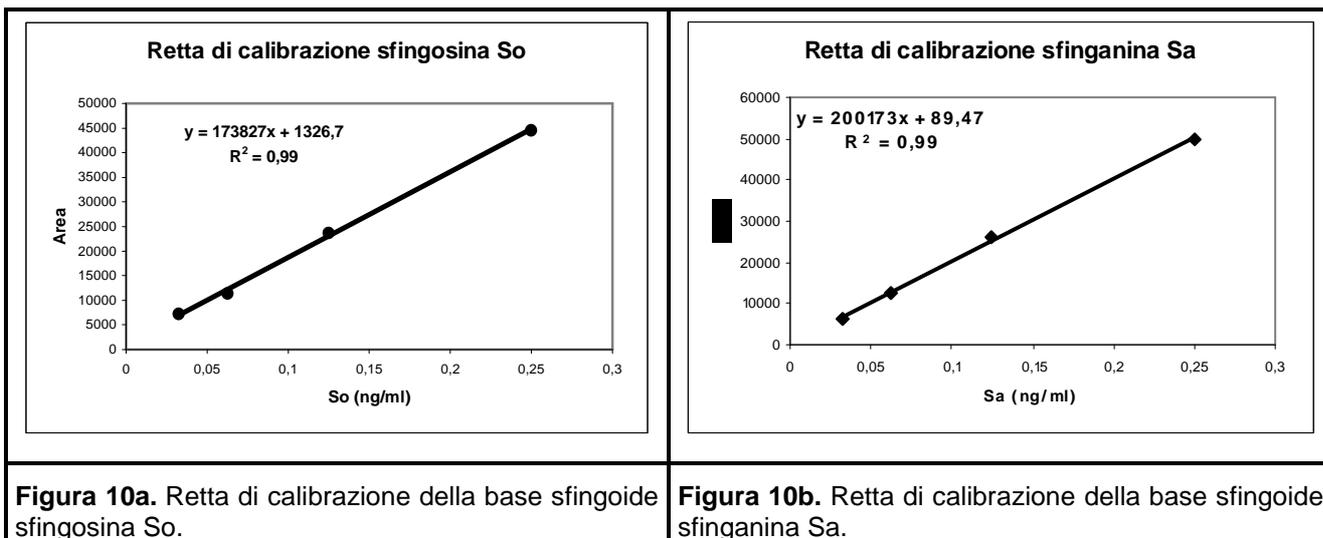
Le analisi di recupero delle basi sfingoidi Sa e So in campioni di sangue bovino hanno mostrato valori medi di recupero accettabili per i tre spike da 4 ng/ml, 2 ng/ml e 1 ng/ml come Sa e So (**Tabella 11**). In particolare gli spike da 1ng/ml mostrano una maggiore percentuale di recupero sui 500 µl di sangue di bovino analizzato, mentre i recuperi per gli spike da 4 ng/ml e 2 ng/ml sono risultati essere inferiori. Il metodo di estrazione ha mostrato che le percentuali di recupero delle singole basi sfingoidi Sa e So non sono sempre uguali, ma possono differire da un minimo del 3% ad un massimo del 10%.

Campione	Spike	Tempo	Recupero So (%)	Recupero Sa (%)
Plasma	4 ng/ml	30'	74	69
Plasma	4 ng/ml	30'	75	76
Plasma	2 ng/ml	30'	73	66
Plasma	2 ng/ml	30'	60	65
Plasma	1 ng/ml	30'	90	80
Plasma	1 ng/ml	30'	97	94

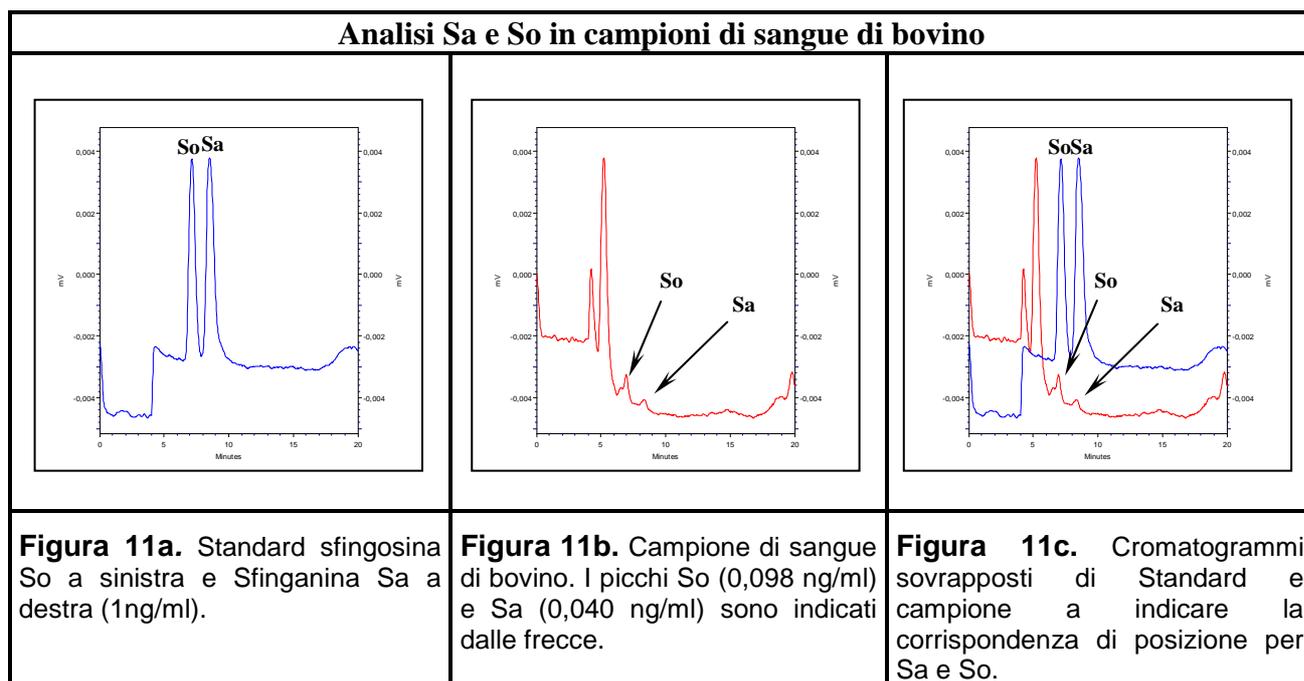
Tabella 11. Recuperi percentuali delle basi sfingoidi sfingosina (So) e sfinganina (Sa) per diverso livello di fortificazione (durata dell'estrazione 30 min.).

IV.3.5.1 Determinazione delle basi sfingoidi Sa e So in campioni di sangue bovino.

L'analisi dei campioni di sangue di bovino per la determinazione delle basi sfingoidi Sa e So è stata valutata sulla base della calibrazione per Sa e So nel range 0,0325 – 0,25 ng/ml (**Figure 10a e b**).



Dati i bassi valori di concentrazione di Sa ed So rilevati nei campioni di sangue bovino (**Figura. 11b**), la loro rivelazione è stata possibile solo aumentando la sensibilità del detector (aumentando i valori di PMT voltage da 700 a 900 mv).



IV.3.5.2. Analisi della Varianza (ANOVA) del rapporto Sa/So in campioni di sangue di bovino.

L'analisi della ANOVA dei rapporti Sa/So ottenuti dall'analisi in RP-HPLC ha permesso di evidenziare la presenza di differenze significative tra le 4 aziende (**Tabella 12**).

	Azienda 1 Ch	Azienda 2 Ch	Azienda 3 Lim	Azienda 4 Ch	Azienda 4 Lim	F	P
Sa/So	0,070±0,075	0,025±0,026	0,197±0,250	0,045±0,031	0,048±0,053	4,24	0,004
n	16	13	14	14	12		

Tabella 12. Analisi della varianza (ANOVA) in campioni di sangue di bovino nelle 4 aziende analizzate. Il rapporto medio Sa/So differisce nelle 4 aziende in maniera significativa, individuando l'azienda 3 con il valore medio più alto, Ch= Charolaise, Lim= Limousine.

I valori più alti di Sa/So sono stati ottenuti nella azienda 3 a cui seguono le aziende 4, 1 e 2.

IV.3.5.3 Test post-hoc LSD dei rapporti Sa/So in campioni di sangue di bovino da carne.

Il test LSD ha permesso di confrontare ed evidenziare le aziende che presentano un rapporto Sa/So statisticamente significativo e di individuare le aziende che possono essere considerate a maggior rischio per gli effetti nocivi causati da contaminazione da FBs sulla biosintesi lipidica (**Tabella 13**).

	Azienda 1 (Ch)	Azienda 2 (Ch)	Azienda 3 (Lim)	Azienda 4 (Ch)	Azienda 4 (Lim)
Azienda 1 (Ch)	-	0,3426	0,0070	0,6263	0,6286
Azienda 2 (Ch)	0,3426	-	0,0006	0,7004	0,7004
Azienda 3 (Lim)	0,0070	0,0006	-	0,0044	0,0019
Azienda 4 (Ch)	0,6263	0,7004	0,0044	-	0,9566
Azienda 4 (Lim)	0,6286	0,6273	0,0019	0,9566	-

Tabella 13. Test LSD applicato ai valori Sa/So in campioni di sangue di bovino proveniente dalle quattro aziende. I valori indicati in grassetto indicano significative differenze tra le aziende. In parentesi sono indicate le razze allevate nelle aziende Ch= Charolaise, Lim = Limousine.

Il test post-Hoc LSD in tabella 13 evidenzia quali differenze significative esistono tra le 4 aziende mettendo a confronto i valori Sa/So ottenuti all'analisi in RP-HPLC. Le aziende 1, 2 e 4 hanno mostrato i valori medi di Sa/So più bassi e statisticamente non differiscono tra di loro. A differenza delle altre aziende, si è evidenziato che l'azienda 3 mostra i valori Sa/So più alti mostrando un differenza statisticamente significativa in tutti i casi messi a confronto. I dati mostrano che l'azienda 3 ha una maggiore probabilità di risentire degli effetti negativi

della FB₁ nella sintesi lipidica, mentre i bassi valori di Sa/So nelle restanti aziende mostrano una situazione a minor rischio. Lo stato di benessere dei bovini, la presenza di stress più o meno intensi e il tipo di razionamento possono aver influenzato il metabolismo degli acidi grassi modificando la concentrazione degli acidi grassi e delle basi sfingoidi nei campioni di sangue di bovino provenienti dalle 4 aziende.

IV.3.6. Analisi dell'addotto AFB₁-Lys in campioni di sangue di bovino.

L'analisi in RP-HPLC ha permesso di valutare la presenza e i livelli di AFB₁-Lys nel sangue di bovino partendo da uno standard di AFB₁-Lys (**Figura 12**).

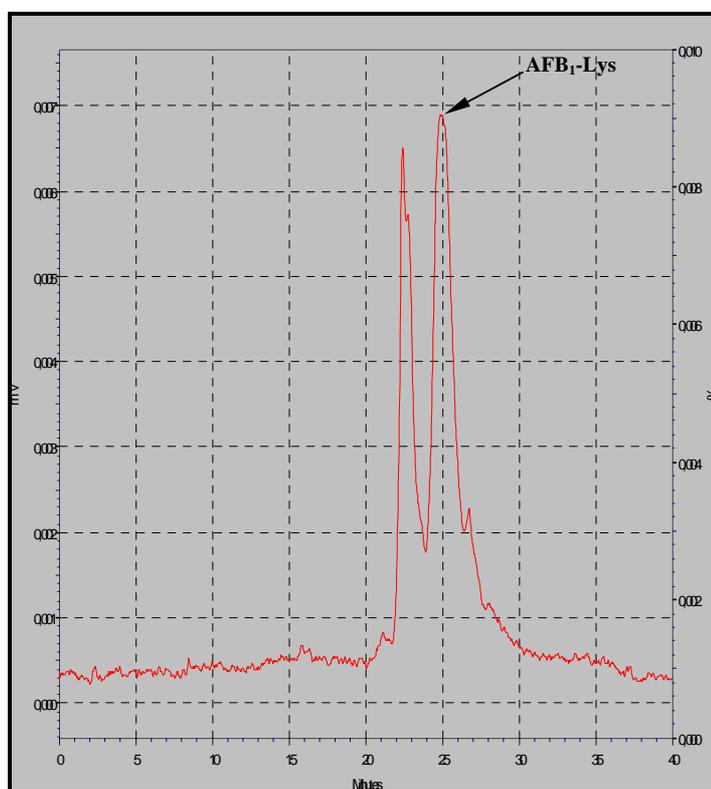


Figura 12. Standard AFB₁-BSA (4,88 mol/moli). In ascissa è indicato il tempo (minuti), mentre in ordinata è indicato il valore del segnale rilevato dal fluorimetro (mV). L'addotto AFB₁-Lys è indicato dalla freccia con un tempo di ritenzione di 25 min.

Da una concentrazione iniziale di 9,77 mol/moli di AFB₁-BSA sono stati ricavati quattro standard (st1 9,77 ; st2 4,885; st3 2,44; st4 1,22mol/moli AFB₁-BSA) utilizzati per la retta di calibrazione (**Figura 13**).

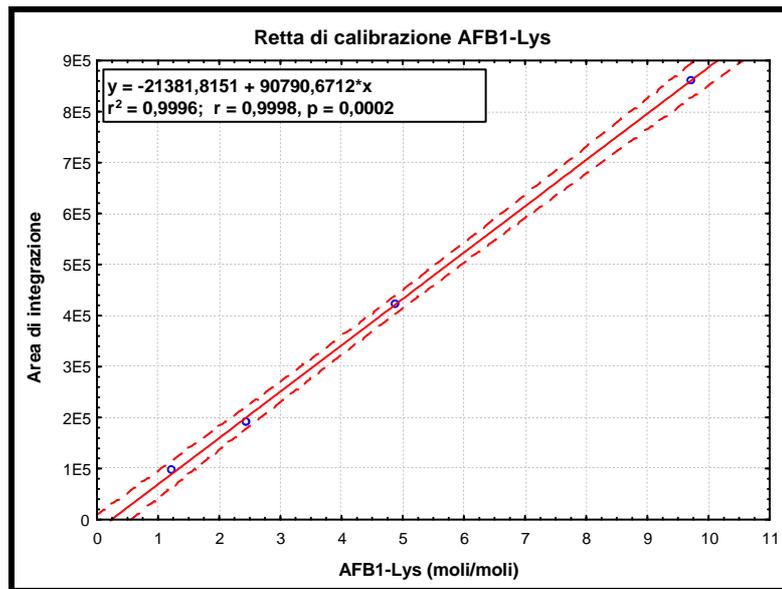


Figura 13. Retta di calibrazione AFB₁-Lys.

Dalla retta sono state determinate le concentrazioni di AFB₁-Lys nei campioni di sangue di bovino (**Figura 14**).

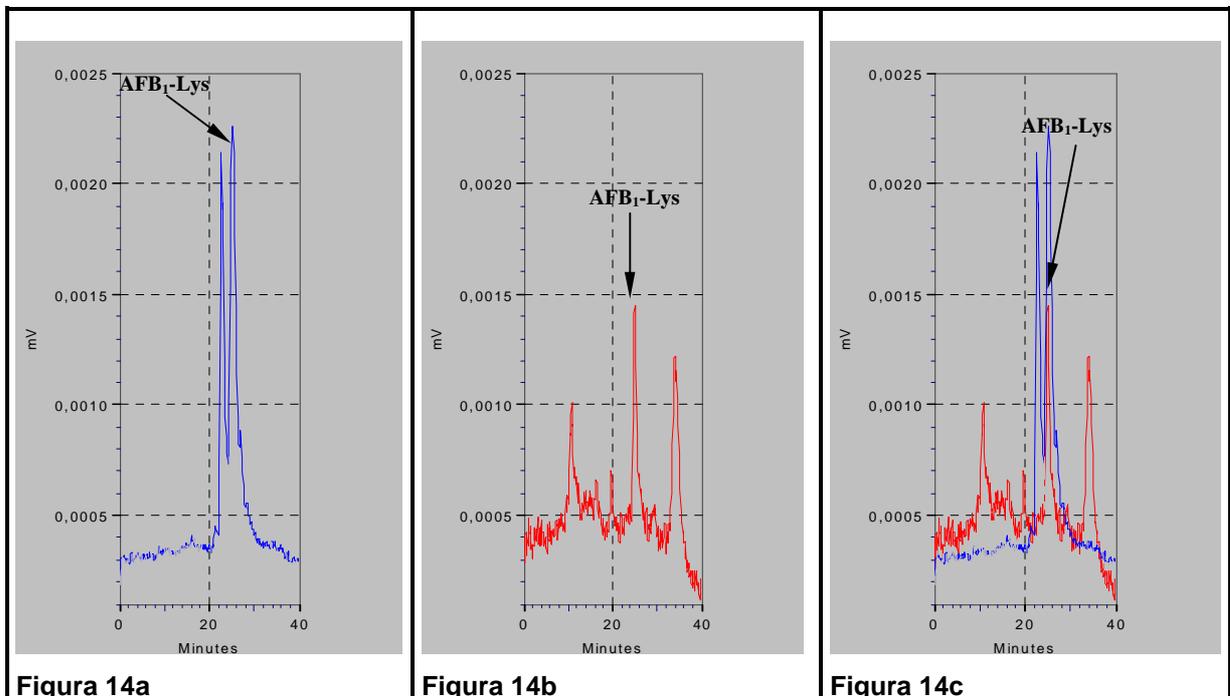


Figura 14. AFB₁-Lys in un campione di sangue bovino e standard. **Figura 14a.** Cromatogramma Standard AFB₁-Lys. **Figura 14b.** Cromatogramma AFB₁-Lys in campione di sangue bovino (AFB₁-Lys 1,41 moli). **Figura 14c.** Cromatogramma AFB₁-Lys standard e campione di sangue bovino.

L'addotto AFB₁-Lys ottenuto dalla digestione enzimatica della BSA con l'enzima PronaseE è stato evidenziato in alcuni dei campioni di sangue di bovino analizzati. In figura 10 è evidenziato il picco dello standard AFB₁-Lys in sovrapposizione con il picco AFB₁-Lys ottenuto da un campione di sangue analizzato, in entrambi i casi il picco ottenuto è simmetrico, ben risolto e ha un tempo di ritenzione di 25 min. La presenza del picco indica un accumulo di AFB₁ legato come addotto alla albumina sierica (AFB₁-BSA) di alcuni sieri di bovino raccolti alla macellazione. La contaminazione alimentare di AFB₁ riscontrata negli unifed ha quindi portato ad un bioaccumulo di AF nel sangue di alcuni bovini. Il 18% dei campioni analizzati è risultato positivo alla AFB₁-BSA, mentre il 82% è risultato negativo (Figura 15a). Dei campioni positivi alla AFB₁-BSA, il 77% ha una concentrazione compresa tra 0,1-0,5 moli/moli, il 15% tra 0,5-1,0 moli/moli e il restante 8% è risultato compreso tra 1,0-1,5 moli/moli (Figura 15b).

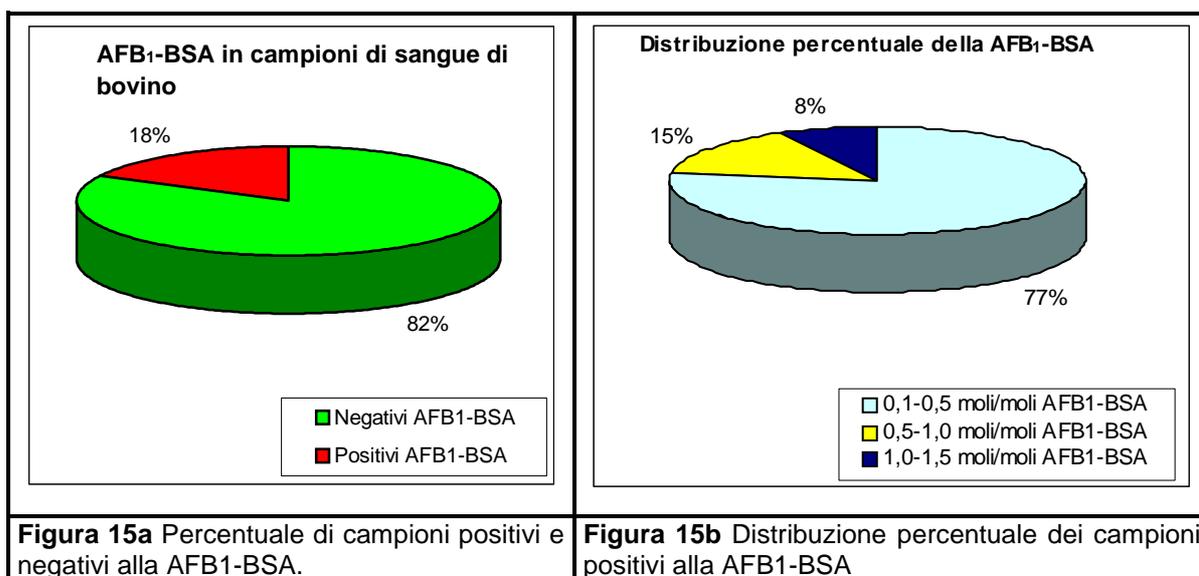


Figura 15. Campioni di sangue di bovino contenenti AFB₁-BSA.

IV.3.6.1 Analisi della Varianza (ANOVA) e test post-hoc LSD in campioni di sangue contenenti AFB₁-BSA.

La diversa concentrazione di AFB₁-BSA, espressa in µg/ml, riscontrata in alcuni campioni di sangue provenienti dalle 4 aziende, è risultata statisticamente significativa (p<0,05) alla ANOVA. Il test post-hoc LSD ha evidenziato nell'azienda 3 il livello di concentrazione media AFB₁-BSA (µg/ml) più alto, mentre le restanti aziende non hanno mostrato significative differenze (Tabella 14).

	Azienda 1 (Ch)	Azienda 2 (Ch)	Azienda 3 (Lim)	Azienda 4 (Ch)	Azienda 4 (Lim)
AFB₁-BSA (µg/ml)	73,57±6,09 ^a	82,56±18,44 ^a	316,02±86,85 ^b	101,18±17,04 ^a	103,06±41,31 ^a

a, b= p<0,05

Tabella 14. Concentrazione media AFB₁-BSA (µg/ml) in campioni di sangue bovino prelevati nelle 4 aziende. Ch= Charolaise, Lim= Limousine.

IV.4. Discussioni

IV.4.1. Contaminazione alimentare da micotossine negli allevamenti di bovino da carne.

La contaminazione da micotossine avviene di frequente in molte varietà alimentari come mais, cereali, semi di cotone, foraggi ecc.. (Brera et al., 2004; Camilo et al., 2000; EFSA, 2005; Kim et al., 2004; Marasas 1995; Scott 1989; Scudamore et al., 1997; 1998; Shotwell 1991; Strange 1991; Yoshizawa 1991). Queste contaminazioni presenti nella razione giornaliera dei bovini portano a un ridotto benessere dell'animale, ad una minore efficienza riproduttiva e una ridotta produzione (EFSA, 2005). Nei sistemi di produzione intensivi dei bovini da carne, il mais (insilati, semole glutinate di mais e granelle) rappresenta la fonte energetica di maggiore importanza e allo stesso tempo la fonte principale di intossicazione da micotossine. negli unifeed (Hussein e Brasel, 2001; EFSA, 2005). Gli insilati di mais rappresentano la componente base delle razioni alimentari destinate ai bovini e costituisce il 30-50% della razione giornaliera, mentre la percentuale di insilato di mais nella razione giornaliera di bovini da carne costituisce circa l'80% della razione totale (EFSA, 2005). Inoltre un 20% del concentrato impiegato nella razione giornaliera è costituito da granella di mais. Questa situazione espone i bovini da carne ad una maggiore probabilità di contaminazione alimentare facilitando l'assunzione delle micotossine presenti nelle razioni alimentari ingerite. Inoltre, la mancanza di sufficienti dati e studi su allevamenti di bovini da carne non permette di avere una completa ed esaustiva conoscenza degli effetti nocivi, delle perdite produttive e riproduttive causate da intossicazioni alimentari da micotossine.

Questa situazione ci ha spinti ad eseguire una attenta analisi delle micotossine presenti nelle razioni alimentari destinate a bovini da carne in aziende appartenenti ad una cooperativa del nord Italia. Le analisi hanno rilevato una contaminazione da aflatossine e fumonisine in tutti i campioni di unifeed e mais (insilati, granella e semola glutinata di mais). La divisione nelle tre classi (ottimale <13%; subottimale 13-15%; critica >15%) di contaminazione del mais proposta, rappresenta le tre condizioni dove si può avere lo sviluppo delle micotossine nel mais. Infatti, come confermato anche in altri lavori, al di sotto del 12-13% si ha una presenza limitata di micotossine o un blocco del loro, al di sopra del 13% si considera l'umidità ad un livello critico per lo sviluppo di esse e, infine, al 15-17%, o secondo altri sino al 20%, si determinano le condizioni ottimali di sviluppo (Behere et. al., 1978; Oberheul e Dabbert, 2001; Salunkhe et al., 1987; Stanlei 2007; Krasauskas et al., 2006).

IV.4.2. Considerazioni sulle capacità estrattive del protocollo di estrazione ed analisi in RP-HPLC dell'OTA in confronto con altre metodiche.

Le Ocratossine possono essere estratte da sangue, tessuti o organi animali utilizzando soluzioni estraenti costituite da acqua e solventi poco polari. Inoltre il valore del pH della soluzione estraente svolge una funzione importante. Ad esempio solventi come l'acqua a valori di $pH < 7,0$ diventa miscibile con il cloroformio, mentre in condizioni neutre o alcaline si ottiene una soluzione in forma dissociata. Spesso l'OTA può trovarsi legata a metaboliti o proteine che rende l'estrazione difficile. Ad esempio in tessuti come il sangue più del 99% di OTA è legato a proteine plasmatiche, formando un legame di tipo ionico con la siero albumina ad un pH compreso tra 4,0 e 6,0 (Marquardt et al., 1992; Galtier 1991; Uchiyama et al., 1985). Questo legame può essere indebolito utilizzando soluzioni con forte potere ionico e aumentando il volume di metanolo. Il valore del pH raccomandato per ottenere una completa e ottimale estrazione di OTA deve essere minore di 2,0 (Valenta 1998). L'OTA sottoposta a reazioni enzimatiche può trovarsi sottoforma di alternativi metaboliti dell'OTA, come ocratossina α ($O\alpha$), 4-R-idrossiocratossina A, 4-S-idrossiocratossina A, 10-idrossiocratossina A, e recentemente anche l'ocratossina lattone, trovati tutti in animali e cellule animali (Xiao et al., 1995).

Infine, un'altra forma metabolizzata al livello del fegato da includere tra i metaboliti dell'OTA, è rappresentata dalla Tiroxina-OA. In genere questi metaboliti dell'ocratossina sono prodotti da reazioni enzimatiche cellulari, ad esempio L'O α è prodotta dalla reazione di idrolisi della OTA catalizzata dall'enzima carbossipeptidasi (Valenta 1998; Kuiper-Goodman 1991). In numerosi studi l'estrazione di OTA da sangue e tessuti animali è stata ottenuta utilizzando cloroformio come estraente dopo acidificazione con acido cloridrico e cloruro di magnesio a pH 2,0 o a pH $< 2,5$ (Bauer et al., 1984; Baumann e Zimmerli, 1988; Beker e Radic, 1991; Breitholtz-Emanuelsson et al., 1993; Hult et al., 1982; Kühn 1993; Scheuer et al., 1997; Unglaub et al., 1990). La funzione del cloruro di magnesio, più che di incrementare la forza ionica della soluzione, ha la funzione di eliminare alcune sostanze di interferenza e impurezze varie (Hult et al., 1979). Questa tecnica è stata confrontata con un secondo metodo dove sono stati sostituiti il cloruro di magnesio e l'acido cloridrico con acido fosforico e una soluzione 2 M di cloruro di sodio (NaCl), ottenendo un valore medio di recupero maggiore del 40% (Zimmerli e Dick, 1995). In successivi studi sono state utilizzate soluzioni estraenti con maggiori concentrazioni di $MgCl_2$ aumentando la resa media, ma anche in questo caso, l'estrazione con acido fosforico e 2 M NaCl porta a migliori risultati. (Bauer et al., 1984; Kühn 1993; Scheuer et al., 1997; Unglaub et al., 1990; Valenta 1998).

Queste soluzioni estraenti possono però omettere l'uso di alcuni prodotti per ottenere migliori risultati che variano a seconda del tipo di organo o tessuto analizzato. Infatti in alcuni studi l'estrazione delle OTA in rene è stata ottenuta utilizzando solo cloroformio e acido fosforico (Büchman e Hald, 1985; Nesheim et al., 1992; Paulsch et al., 1982; Sharman M. 1992), oppure utilizzando CH_2Cl_2 . Infine nelle estrazioni di OTA nel latte sono stati impiegate soluzioni estraenti costituite da diclorometano (CH_2Cl_2), acido citrico e aggiunta di metanolo (Breitholtz-Emanuelsson et al., 1993; Gareis et al., 1988; Orti et al., 1986; Castegnaro et al., 1990; Valenta et al., 1993; Valenta e Goll, 1996). La maggior parte di queste soluzioni sono costituite da estraenti contenenti solventi alogenati che rendono le tecniche pericolose per chi esegue le estrazioni ed inoltre costituiscono un problema nella fase di eliminazione potendo dare luogo a facili contaminazioni ambientali. In considerazione di ciò, sino ad ora, considerando l'impiego sempre più comune di clean-UP con colonne per immunoaffinità, soltanto le estrazioni con cloroformio risultano essere le migliori (Valenta 1998).

Diverse metodologie sono state impiegate sostituendo le soluzioni contenenti il cloroformio (Clarke J.R. et al., 1994; Kuiper-Goodman 1991; Langseth W. et al., 1991; Marley et al., 1995; Miraglia et al., 1995; Sreemannarayana et al., 1988; Takeda et al., 1991; Wilken et al., 1985). Ad esempio in estrazioni di OTA da rene sono stati impiegati acetato di etile e acido fosforico (Clarke et al., 1994; Wilken et al., 1985). Soluzioni di acetato di etile in presenza di cloruro di magnesio e acido cloridrico sono state utilizzate per estrazioni di OTA in latte umano (Miraglia et al., 1995). In altri casi come nel plasma è stato impiegato solo metanolo, o in alternativa sono state eseguiti Clean-UP su colonne ad immunoaffinità combinata con cartucce C18 con precedentemente acidificazione, questa metodologia è stata applicata anche su urine (Kuiper-Goodman 1991; Langseth et al., 1991; Sreemannarayana et al., 1988; Takeda et al., 1991). Infine soluzioni di metanolo e PBS (1:1, V/V) sono stati impiegati per estrazioni in rene di maiale recuperando soltanto il 40% (Marley et al., 1995). La determinazione delle OTA in tessuti e fluidi organici è oggi sempre più legata all'utilizzo di colonnine per immunoaffinità seguite da una separazione inversa su colonne per HPLC (Chiavaro et al., 2002; Curtui et al., 2001; Grosso et al., 2003; Jiménez et al., 2001; Jørgensen e Petersen, 2002; Nesheim et al., 1992; Peraica et al., 1999; Sklan 2003; Sharman et al., 1992; Tarín et al., 2004; Valenta 1998; Xiao et al., 1996; Zimmerli e Dick, 1995). Questa tecnica ha una maggiore sensibilità nella determinazione dell'OTA a basse concentrazioni grazie all'utilizzo di detector sensibili, inoltre il metodo ha una grande riproducibilità e può essere automatizzato per le analisi di numerosi campioni. Infine la

capacità di migliorare la sensibilità del detector fluorimetrico ha permesso di ottenere una maggiore sensibilità a basse concentrazioni di OTA in alimenti e tessuti umani ed animali. Infatti il miglioramento delle condizioni di analisi in HPLC ha portato ad ottenere bassi valori del limite di determinazione LOD per l'OTA. Ad esempio il LOD ha livelli di 0,01 ng/ml OTA in latte umano e di bovino e di 0,02 ng/ml in plasma umano (Valenta 1998).

L'utilizzo della soluzione estraente utilizzata in questo lavoro (MetOH-sodio bicarbonato 1% p/v 70:30) permette di sostituire le soluzioni contenenti solventi alogenati come cloroformio (Büchman e Hald, 1985; Nesheim et al., 1992; Paulsch et al., 1982; Valenta 1998) o il diclorometano (CH₂Cl₂) (Breitholtz-Emanuelsson et al., 1993; Garies et al., 1988; Orti et al., 1986; Castegnaro et al., 1990; Jørgensen e Petersen, 2002; Valenta et al., 1993; 1996). La metodica applicata ha quindi il pregio di consentire un facile smaltimento dei solventi, con minori rischi di intossicazione per l'operatore e ha permesso di ottenere dei buoni recuperi per rene e muscoli (meno per il fegato).

In particolare l'utilizzo di 20 e 45 ml di volume chiarificato ha permesso di ottenere alte percentuali di recupero sia per il rene (71,1% con 20 ml e 88,8% con 45 ml) sia per il muscolo (88,7% con 20 ml e 88,9% con 45 ml). L'efficienza di recupero del rene di bovino ottenuta con questa metodica estrattiva risulta simile a quella ottenuta in altri lavori condotti su rene di maiale, con un range di recupero compreso tra il 70 e il 100% (Entwisle et al., 1997; Jørgensen et al., 2002). Il recupero medio ottenuto nel muscolo di bovino è risultato migliore rispetto a quello ottenuto in muscolo di suino, dove è stato ottenuto un recupero medio del 53% (Jørgensen et al., 2002), mentre è risultato leggermente superiore al recupero medio dell'83% ottenuto in prosciutti di maiale (Chiavaro et al., 2002). Infine i recuperi medi del fegato di bovino ottenuti (45% con 20 ml di estratto e 57% con 45 ml), sono risultati inferiori se comparati con il recupero medio dell'85,7 % verificatosi con estrazioni in acetonitrile al 60% eseguite su fegato di maiale (Jiménez et al., 2001).

La metodica ha quindi permesso di ottenere ottimi risultati e potrebbe essere applicata per valutare il bioaccumolo in tessuti ed organi di bovini alimentati con razioni contaminate da OTA.

IV.4.3. Considerazioni sul rapporto sfinganina/sfingosina come biomarker in campioni di sangue bovini in presenza di contaminazione cronica alle fumonisine.

Diversi studi in vitro hanno evidenziato l'effetto inibitorio delle fumonisine sulla biosintesi degli sfingolipidi (Gelderblom et al., 1995; Riley et al., 1993b 1994a; Wang et al., 1991). Tra questi, le basi sfingoidi sfinganina e sfingosina sono influenzate dalla presenza delle

fumonisine che ne alterano il normale rapporto sfinganina/sfingosina (Gelderblom et al., 1995; Riley et al., 1993b 1994a; Wang et al., 1991). Numerosi lavori condotti su uomo e animali hanno evidenziato un incremento del rapporto Sa/So causato dall'aumento della Sa e una decrescita della So dopo ingestione o iniezione di fumonisine (Gumprecht et al., 1995; Prelusky et al., 1995; Riley et al., 1993a; Shephard et al., 1996; Shephard and Westhuizen 1998; Wang et al., 1992; Weibking et al., 1993). L'incremento del rapporto delle basi sfingoidi sfinganina/sfingosina è stato proposto da vari autori come biomarker specifico per valutare una intossicazione alimentare da fumonisine (Castegnaro et al., Goel et al., 1996; 1998; Riley et al., 1993a, b; 1994a; b; c; 1997; Shephard et al., 1996; Shephard and Westhuizen 1998; Solfrizzo et al., 1997; Westhuizen et al., 2001).

Sebbene i ruminanti abbiano una forte resistenza agli effetti nocivi delle fumonisine rispetto ad altri animali, è stato evidenziato in essi un incremento del rapporto Sa/So con una dose intravena di soli 0,20 mg/kg somministrata a bovini da latte di razza Holstein (Prelusky et al., 1995). Questo incremento è dovuto principalmente ad un aumento delle concentrazioni di Sa nel sangue, mentre nessuna alterazione significativa è stata evidenziata per la So. Lo stesso risultato è stato ottenuto in un secondo lavoro condotto su bovini da latte sottoposti ad una dose intravena di 1mg/kg wt di fumonisina B1 (Mathur et al., 2001). Oltre a questi lavori non ci sono informazioni sugli effetti del rapporto Sa/So causati dalle fumonisine in situazioni di intossicazioni alimentari a dosi minori e per tempi prolungati.

I campioni di sangue di bovino raccolti in questo studio sono provenienti da un allevamento dove è stata riscontrata una contaminazione cronica da fumonisine, sebbene i livelli medi di queste (1,59-2,25 ppm) non siano mai risultati al di fuori dei limiti di legge ((CE) N. 576/2006).

Al fine di valutare al meglio le variazioni del rapporto Sa/So, è necessario avere una soluzione organica con elevata efficacia di estrazione, come il cloroformio impiegato in diversi studi (Solfrizzo et al., 1997; Mathur et al., 2001; Gurung et al., 1998; Merrill et al., 1988; Shephard and Westhuizen 1998). L'enorme volume di cloroformio impiegato per queste analisi ha però mostrato una maggiore difficoltà di eliminazione e soprattutto un'elevata tossicità per chi lo utilizza. La sostituzione dell'acetato di etile grado HPLC (EtAC) con il cloroformio ha dato luogo ad un' alta capacità di estrazione per le basi sfingoidi Sa e So e ha diminuito allo stesso tempo il rischio d'intossicazione per l'operatore (Castegnaro et al., 1998; Weisthuzen et al., 2001).

Gli ottimi recuperi ottenuti in questo studio hanno dimostrato che l'EtAC ha un'efficace capacità di estrazione delle basi sfingoidi Sa e So anche in campioni di sangue di bovino,

soprattutto per i livelli più bassi delle due basi sfingoidi Sa e So (1 ng/ml). Inoltre le condizioni di analisi dell'RP-HPLC sono state migliorate ottenendo una maggiore sensibilità di risposta alle basse concentrazioni di Sa e So nei campioni di sangue analizzati. Infine, l'impiego dell'autocampionatore con temperature mantenute a 0°C ha consentito di avere un mantenimento della risposta OPA-Sa e OPA-So per tempi lunghi, permettendo di analizzare un sufficiente numero di campioni con una perdita del segnale inferiore al 10%.

Per quanto riguarda le analisi delle quattro aziende, non è stato rilevato alcun incremento del rapporto Sa/So che indichi un effetto nocivo da ingestione da fumonisine. Sebbene non sia stato mai riscontrato un incremento del rapporto Sa/So maggiore di 1, in una azienda è stato evidenziato un rapporto medio Sa/So maggiore rispetto alle altre tre. Questa differenza potrebbe essere influenzata da altri fattori di tipo alimentare o ambientale che potrebbero agire sulla biosintesi lipidica. Per questo motivo sono necessarie ulteriori indagini per comprendere come questi fattori, insieme alla presenza di intossicazione da fumonisine, influenzino la biosintesi lipidica. La mancanza di informazioni e di studi sull'impiego del rapporto Sa/So in allevamenti di bovino da carne richiede senza dubbio un maggior approfondimento e necessita di ulteriori dati. L'impiego futuro di queste informazioni potranno essere di aiuto per meglio comprendere quali situazioni siano presenti nelle aziende di allevamento e di valutare lo stato di benessere dell'animale in presenza di contaminazione alimentare da FB₁.

IV.4.4. Considerazioni sull'analisi dell'addotto AFB₁-Lys in campioni di sangue bovino in presenza di contaminazione cronica da aflatossine.

In numerosi studi è stato dimostrato che la AFB₁-8-9epossido rappresenta la molecola a maggiore attività carcinogena, generalmente ottenuta da una reazione enzimatica di epossidazione della AFB₁ nel fegato (Gamer et al., 1972; Schoental et al., 1970; Swenson et al., 1974). Questa molecola, una volta formata, si lega con il DNA formando l'addotto AFB₁-N⁷-guanina al gruppo nucleofico C8 (Essigmann et al., 1977). Inoltre è stato dimostrato che la molecola ha capacità di formare un legame con l'aminoacido lisina delle proteine del sangue (Dalezios et al., 1971; Pereira et al., 1981; Skipper et al., 1985; Tannenbaum et al., 1984; Wild et al., 1986). Di queste, la siero albumina e l'emoglobina rappresentano i target di maggiore importanza. In particolare la AFB₁-8-9 epossido ha una maggiore affinità di legame per la siero albumina, mentre mostra una bassa capacità di

legame con l'emoglobina (Dalezios et al., 1971; Pereira et al., 1981; Skipper et al., 1985; Tannenbaum et al., 1984; Wild et al., 1986);).

Inoltre in studi eseguiti su uomo è stato evidenziato che l'emivita dell'albumina si aggira intorno ai 14-20 giorni consentendo un accumulo prolungato degli addotti AFB₁-albumina, mentre in ratti è stata individuata una emivita della AFB₁-albumina di un solo giorno (Enger et al., 1995; Skipper et al., 1990; Waldman 1977; Wild et al., 1986). Questi risultati hanno ampiamente dimostrato che l'addotto AFB₁-albumina può essere impiegato come biomarker per evidenziare una esposizione ad aflatossine AFB₁ negli uomini e negli animali (Enger et al., 1995; Skipper et al., 1990; Waldman 1977; Wild et al., 1986).

Diversi lavori hanno dimostrato l'utilizzazione di tre diverse metodiche: saggio radioimmunologico (RIA), saggio di immunoassorbimento con enzima coniugato (ELISA) e cromatografia liquida ad alta prestazione in fase inversa (RP-HPLC) (Chen et al., 2001; Cupid et al., 2004; Frank et al., 1998; Sabbioni et al., 1987; 1990; Sabbioni e Wild, 1991; Sheabar et al., 1993; Wang et al., 1996; Turner et al., 1998; Wild et al., 1990; 1996). Queste tecniche sono risultate estremamente utili per valutare l'esposizione e l'accumulo di AFB₁ in campioni di sangue umano e animale.

In particolare l'analisi in RP-HPLC utilizza una metodica di estrazione che prevede una digestione enzimatica seguita da una eluizione su colonnine per immunoaffinità AflaTest®_{WB} (VICAM, USA) e successiva analisi fluorimetrica dell'addotto AFB₁-Lys. La stessa metodica di analisi è stata applicata in questo studio ottenendo buoni risultati nella determinazione dello standard e dell'addotto AFB₁-Lys trovato in alcuni dei campioni di sangue analizzati.

I risultati evidenziano e confermano l'effettivo impiego della metodica anche in campioni di sangue di bovino da carne sino ad ora mai impiegato. La positività alla AFB₁-albumina, evidenziata nel 18% dei campioni analizzati, ha permesso di constatare che in situazioni di esposizione cronica a bassi livelli di contaminazione alimentare da AFB₁, i bovini accumulano la AFB₁-albumina nel sangue. La mancanza di studi eseguiti su bovini non ci permette di poter confrontare i risultati ottenuti, pertanto saranno necessari ulteriori studi ed analisi per meglio comprendere le relazioni tra le concentrazioni AFB₁ ingerite, le condizioni di benessere dell'animale e l'accumulo della AFB₁-albumina nel sangue di bovino.

IV.5. Conclusioni

IV.5.1. Valutazione dei livelli di micotossine contenuti nelle razioni alimentari destinati ai bovini da carne.

I risultati ottenuti in questo studio evidenziano in maniera chiara un stato di conservazione degli alimenti che ha favorito il mantenimento e lo sviluppo di una contaminazione da micotossine. Tale contaminazione, può essere ricondotta sia a fattori ambientali di pre- e post-raccolta (umidità, temperatura), sia a fattori legati alla dinamica di commercio delle materie prime.

Nonostante i livelli di micotossine riscontrati nel periodo di controllo siano risultati inferiori ai limiti di legge, si è evidenziata una sistematica e continua esposizione dei bovini da carne ad aflatossine e fumonisine. Tale esposizione, dovrà essere attentamente valutata al fine di comprendere eventuali effetti da tossicità cronica sullo stato di salute e sulle prestazioni produttive degli animali allevati. Possono essere utili a tale scopo, studi *in vivo* ed *ex vivo* relativi alla valutazione degli effetti sul metabolismo ossidativo e sulla funzionalità del sistema immunitario. Dovranno inoltre essere valutate le prestazioni produttive derivanti da situazioni diverse d'esposizione cronica a micotossine, perché sono segnalati possibili effetti negativi sugli incrementi ponderali.

Ai fini della prevenzione delle contaminazioni, si ritiene necessario che le aziende mettano in atto un sistema di controllo e tracciabilità delle forniture mangimistiche. Particolare attenzione dovrà essere posta alla granella di mais e ai suoi derivati, in relazione alla elevata e sistematica contaminazione riscontrata. Le partite di granella e derivati di mais dovranno essere valutati preventivamente al momento dell'acquisto con strumenti rapidi, ad esempio con lampade U.V., ed eventualmente con sistemi analitici diretti. Attenzione dovrà essere posta al controllo del tenore d'umidità delle materie prime, poiché è stata chiaramente dimostrata una stretta relazione tra tenore d'umidità e livello di contaminazione, così come a garantire idonee condizioni di conservazione aziendale.

IV.5.2. Valutazione del protocollo d'analisi in RP-HPLC dell'OTA in tessuti ed organi di bovino da carne.

Lo sviluppo dei protocolli d'analisi per L'OTA in tessuti ed organi di bovino da carne ha permesso, sebbene nessuna contaminazione alimentare sia stata evidenziata nelle razioni analizzate, di ottenere ottimi valori di recupero percentuale. La metodica può essere quindi utilizzata in situazioni dove bovini da carne, alimentati con razioni contaminate da OTA, hanno accumulato OTA nei vari organi e tessuti. La metodica, di facile applicazione e con tempi di risposta in RP-HPLC molto brevi, presenta però problemi di recupero dell'OTA per il fegato, dove le attività enzimatiche riducono i livelli d'accumulo e il limite di determinabilità LOD. Ulteriori modifiche possono però essere proposte ed applicate al fine di bloccare le attività enzimatiche che riducono l'efficienza della metodica. L'utilizzo di una fase estraente meno pericolosa del cloroformio permette di poter operare in condizioni di maggior sicurezza, inoltre presenta un'estrema facilità d'esecuzione. Un suggerimento particolare alle aziende, è quello di sottoporre la carne a controlli di bioaccumulo di OTA nei muscoli, permettendo di ottenere una maggiore sicurezza sul prodotto finale e sulla salute umana. Tale condizione è maggiormente richiesta in quelle situazioni dove si riscontra una contaminazione alimentare da OTA negli allevamenti bovini, dove vanno considerati gli stessi livelli limite di OTA valutati per le carni suine e insaccati fissati a $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Circolare del Ministero della Sanità n. 10 del 1999).

IV.5.3. Valutazione del rapporto sfinganina/sfingosina (Sa/So) come indicatore di esposizione e da effetto alla Fumonisina B₁.

I risultati ottenuti in questo lavoro indicano una possibilità applicativa del metodo per l'analisi del rapporto Sa/So, al fine di valutare effetti dell'esposizione cronica di ruminanti a fumonisine. La capacità di estrazione del metodo ha permesso di valutare la possibilità di ottenere un buon recupero per valori bassi di Sa e So (fino a 1 ng/ml). La metodica è stata applicata su campioni di sangue di bovini da carne provenienti da 4 aziende, dove è stata evidenziata una contaminazione alimentare da FB₁ in tutto il periodo d'allevamento dell'animale. In nessun caso si sono ottenuti valori del rapporto Sa/So maggiori di 1, situazione in cui sono evidenti gli effetti negativi della FB₁ sulla biosintesi lipidica. Da queste considerazioni si è potuto valutare positivamente l'efficacia e la applicabilità della metodologia e dare risposte alle aziende sul benessere dei bovini da carne.

Lo stato di benessere dell'animale e l'alimentazione seguita nelle 4 aziende rappresentano i fattori importanti che influenzano il livello delle basi sfingoidi nel sangue. Sono quindi necessarie ulteriori indagini per meglio comprendere come valutare ed inserire questi fattori nelle analisi delle basi sfingoidi per meglio comprendere se le variazioni di Sa/So siano dovute dalla sola FB₁, dallo stato di alimentazione o da entrambe. L'effetto sinergico di queste informazioni, saranno d'utile impiego per meglio valutare gli effetti nocivi della FB₁ in situazioni di contaminazione cronica a bassi livelli di micotossine. Normalmente soltanto quando il rapporto Sa/So è maggiore di 1 si è in una condizione di contaminazione da fumonisine dove gli effetti nocivi sono già in atto. E' importante valutare in maniera diversa un valore limite, al quale si possono definire i primi effetti nocivi della FB₁ sulla biosintesi lipidica senza ad arrivare al rapporto Sa/So >1 ed avere perdite produttive. In ogni modo, l'impiego di quest'analisi è importante per le aziende al fine di valutare lo stato di benessere dell'animale, avere la certezza di una maggiore qualità del prodotto finale e un'alta produttività.

IV.5.4. Determinazione dell'addotto AFB₁-Lisina in campioni di sangue di bovino.

La metodica di digestione enzimatica, impiegata per la determinazione dell'addotto AFB₁-Lisina, ha permesso di rilevare la presenza di bioaccumulo con l'albumina sierica (AFB₁-BSA) in alcuni dei campioni di sangue di bovino. Questi dati riscontrati evidenziano una condizione di benessere non ottimale che ha facilitato l'assunzione dell'AFB₁ presente nelle razioni alimentari. La contaminazione d'aflatossine riscontrata nel TMR, seppure a livelli inferiori a quelli definiti dalla legge, dimostra che in alcuni casi si ha un bioaccumulo di AFB₁ sottoforma d'addotto AFB₁-BSA nel sangue. Questa condizione mette a rischio anche l'uomo, rappresentante l'anello terminale della filiera, al momento dell'acquisto delle carni. Si ritiene opportuno eseguire future ricerche per definire quali siano i livelli minimi di contaminazione delle TMR, che favoriscono l'assimilazione delle AF nelle carni di bovino. Inoltre, può essere importante valutare la presenza di una correlazione tra il livello di AFB₁-BSA e la ridotta crescita del peso corporeo dell'animale in situazioni di contaminazione cronica da aflatossine (AF). Per le aziende che sono interessate ad una migliore produttività e commercializzazione di carni di alta qualità si suggerisce di: applicare tutti gli accorgimenti per limitare la contaminazione alimentare da micotossine in fase di pre- e post-raccolta; nel caso d'intossicazioni da AF di eseguire analisi di laboratorio per valutare la presenza di AFB₁-BSA accumulata nei bovini.

Dal punto di vista scientifico, questo lavoro ha permesso di impiegare l'addotto AFB₁-BSA come biomarker specifico nel valutare lo stato di contaminazione da AF in allevamenti intensivi di bovino da carne. La mancanza di studi su bovini da carne ci spinge a continuare i nostri lavori e a impiegare i nostri risultati per colmare le numerose lacune incontrate in questo studio.

Lista delle Pubblicazioni

- ✓ Danieli P.P., Sabatini A., Ronchi B. (2006). Stabilità delle aflatossine M1 e M2 con derivatizzazione mediante acido trifluoro-acetico (TFA). Implicazioni sulle performances d'analisi in HPLC-FL. *II Congresso Nazionale Le micotossine nella filiera agro-alimentare ITISAN, Abstr. pp 94.*
- ✓ Danieli P.P., Sabatini A., G. Capitani, U. Bernabucci, B. Ronchi (2007). Particle size evaluation of total mixed rations in intensive beef production systems. *Italian Journal of Animal Science, Proceedings of the ASPA 17th Congress, Alghero, May 29- June 1, 2007. Abstr. Vol.6 Sup. 1 pp 298.*
- ✓ Ronchi B., Settineri D., Danieli P.P., Sabatini A., Carbone K., Bernabucci U., Gigli S. (2007). Feeding management and exposure to mycotoxins contamination in intensive beef cattle production system. *International Scientific Seminar "Beef cattle production as an alternative to the low milk quota" Warsaw, 28-29 June 2007 Abstr. Vol in print.*
- ✓ Sabatini A., Danieli P.P., Ronchi B. (2006). Analisi del rapporto ematico sfinganina/sfingosina (sa/so) in bovini da carne esposti a fumonisine per via alimentare. note metodologiche e risultati preliminari di un caso studio. *II Congresso Nazionale Le micotossine nella filiera agro-alimentare ITISAN, Abstr., pp 86.*
- ✓ Sabatini A., Danieli P.P., Bernabucci U., Ronchi B. (2007). Evaluation of mycotoxins contamination in intensive beef cattle production system. *Italian Journal of Animal Science, Proceedings of the ASPA 17th Congress, Alghero, May 29- June 1, 2007. Vol. 6 Sup. 1 pp 466-468.*

Bibliografia

- ❖ Abarca M.L., Bragulat M.R., Castellà G., Cabañes F.J., (1994). Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var *niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2650-2652.
- ❖ Abbas H.K. Mirocha C.J. and Tuite J. (1986). Natural occurrence of deoxynivalenol, 15-acetyl-deoxynivalenol and zearalenone in refused corn stored since 1972. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 841-843.
- ❖ Abe M. e Iriki T. (1978). Effects of diet on the protozoa population in permeable conditions cultures of rumen contents. *Br. J. Nutr.* **39**: 255-264.
- ❖ Abou Akkde A.R. e Howard B.H. (1962). The biochemistry of rumen protozoa 5. The nitrogen metabolism of Entodinium. *Biochem. J.* **82**: 313-320.
- ❖ Agag B.I. (2004). Mycotoxins in foods and feeds 3-zearalenone. *Ass. Univ. Bull. Environ. Res.* **7**: 159-176.
- ❖ Akao M; Kuroda K. and Wogan G.N. (1971). Aflatoxin B₁: The kidney as a site of action in the mouse. *Life Sci.* **10**: 495-501.
- ❖ Akinrimisi E.O., Benecke B.J. and Scifart K.H. (1974). Inhibition of rat-liver RNA polymerase in vitro by aflatoxin B₁ in the presence of a microsomal fraction. *Eur. J. Biochem.* **42**: 333-339.
- ❖ Aldred D. and Magan N. (2004). Prevention strategies for tricothecenes. *Toxicology Letters* **153**: 165-171.
- ❖ Allen N.K., Mirocha C.J., Weaver G., Aakus-Allen S. and Bates F. (1981a). Effect of dietary zearalenone on finishing broiler chickens and young turkey poults. *Poult. Sci.* **6**: 124-131.
- ❖ Allen N.K., Mirocha C.J., Aakus-Allen S., Bitgood J.J., Weaver G., and Bates F. (1981b). Effect of dietary zearalenone on reproduction of chickens. *Poult. Sci.* **60**: 1165-1174.
- ❖ Allcroft R., and Roberts B.A. (1968). Toxic groundnut meal: The relationship between aflatoxin B₁ intake by cows and extraction of aflatoxin M₁ in milk. *Vet. Rec.* **82**: 116-118.
- ❖ Applebaum R.S., Brackett R.E., Wiseman D.W., and Marth. E.L. (1982). Responses of dairy cows to dietary aflatoxin: feed intake and yield toxin content, and quality of milk of cows, treated with pure or impure aflatoxin. *J. Dairy Sci.* **65**: 1503-1508.

- ❖ Appleton B.S., Goetchium M.P. and Campbell T.C. (1982). Linear dose-response curve for hepatic macromolecular binding of aflatoxin B₁ in rats at very low exposures. *Cancer Res.* **42**, 3659-3662.
- ❖ Arukwe A., Grotmol T., Haugen T.B., Knudsen F.R., Goksøyr A. (1999). A Fish model for assessing the in vivo estrogenic potency of the mycotoxin Zearalenone and its metabolites. *The Sci. of the total Environ.* **236**: 153-161.
- ❖ Asao, T., Buchi, G., Abdel-Kader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L., Wogan, G.N. (1963). Aflatoxin B and G. *J. Am Chem. Soc.* **85**: 1706-1707.
- ❖ Asplin F.D. and Carnaghan, R.B.A. (1961). The toxicity of certain groundnut meals for poultry with special reference of their effect on ducklings and chickens. *Vet. Rec.* **73**: 1215-1219.
- ❖ Attwater, W.A., and Busch, L.V. (1983). Role of the sap beetle *Glischrochilus quadrisignatus* in the epidemiology of giberella ear rot. *Can. J. Pl. Path.* **5**: 158-163.
- ❖ Avantaggiato G., Quaranta F., Desiderio E. and Visconti A. (2002). Fumonisin contamination of maize hybrids visibly damaged by *Sesamia*. *J Sci. Food Agric.* **83**:13-18.
- ❖ Bacha H., Maaroufi K., Achour A., Hamammi M., Ellouz F., Creppy E.E. (1993). Ochratoxines et ochratoxicooses humaines en Tunisie. In: Creppy E.E., Castegnaro M., Dirheimer G. (Eds), Human ochratoxicosis and its Pathologies. *INSERM vol 213 John Libbey Eurotext Ltd Paris.* pp 111-121.
- ❖ Badii, F., Moss, M.O. (1988). The effect of the fungicides tridemorph, fenpropimorph and fenarimol on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* Speare. *Lett. Appl. Microbiol.* **7**: 37-39.
- ❖ Baker D.C., and Rottinghaus G.E. (1999). Chronic experimental fumonisin intoxication of calves. *J Vet Diagn Invest* **11**:289-292.
- ❖ Baldwin R.S., Williams R.D., Terry M.K. (1983). Zeranone: a review of the metabolism, toxicology, and analytical methods for detection of tissue residues. *Regul Toxicol Pharmacol.* **3**: 9-25.
- ❖ Battacone A., Nudda A., Cannas A., Cappio Borlino A., Bomboi G. and Pulina A. (2003). Excretion of aflatoxin M₁ in milk of dairy ewes treated with different doses of aflatoxin B₁. *J. Dairy Sci.* **86**: 2667-2675.
- ❖ Bauer J., Garies M., Gedek B., Berl.(1984). Muench Tieraerztl. *Wochenschr.* **97**, 279.
- ❖ Bauer J. (1994). Möglichkeiten zur Entgiftung mykotoxinhaltiger Futtermittel. *Monatsh Veterinärmed.* **49**: 175-181.
- ❖ Bauman U., Zimmerli B. (1988). Mitt. Gebiete Lebensom Hyg. **79**: 51.

- ❖ Behere A.G., Sharma A., Padwaldesai S.R. and Nadkarin G.B. (1978). Production of aflatoxin during storage of gamma-irradiated wheat. *J. of Food Safety* **43:1102–1102**.
- ❖ Beker D., Radic B., (1991). Fast determination of ochratoxin A in serum by liquid chromatography: comparison with enzymic spectrofluorimetric method. *J. Chromatogr.* **570, 441-445**.
- ❖ Bersjö B., Herstad O., Nafstad I. (1993). Effects of feeding deoxynivalenol-contaminated oats on reproduction performance in White Leghorn hens. *Br Poult Sci* **34:147-159**.
- ❖ Betina V. (1984). Biological effects of mycotoxins. In: Betina, V. (Ed.), *Mycotoxins-Production, Isolation, Separation and purification. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands*, pp **25-36**.
- ❖ Bezuidenhout S.C., Gelderblom W.C.A., Gorst-allman R.M.M., Marasas W.F.O., Spiteller G. and Vleggaar R. (1988). Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *fusarium moniliforme*. *J. Chem. Commun.* **11: 743-745**.
- ❖ Biehl, M.L.; Prelusky, D.B.; Koritz, G.D.; Hartin, K.E.; Buck, W.B. and Treholm, H.L. (1993) Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **121: 152-159**.
- ❖ Blount W.P. (1961). Turkey “X” disease. *J. Brit. Turkey Fed.* **9: 52-54**.
- ❖ Bolger M., Cocker R.D., DiNovi M., Gaylor D., Gelderblom, W., and Olsen M. (2001). *In safety evaluation of certain mycotoxins in food*. Edited by the Fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). FAO, Rome. pp **103-280**.
- ❖ Bongiovanni, A.M. (1983) An epidemic of premature thelarche in Puerto Rico. *J. Pediatr.* **103: 245-246**.
- ❖ Bondy G.S., Pestka J.J., (2000). Immunomodulation by fungal toxins. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit.* **3: 109-143**.
- ❖ Boorman G.A., (1989). Toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A in F344/N rats. *NTP Technical Report 358, NIH Publication.* **89: 2813**.
- ❖ Bottalico A. (1998). Fusarium diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europ. *Journal of Plant Pathology.* **80: 85-103**.
- ❖ Boyd, P.A. and Wittliff, J.L. (1978) Mechanism of Fusarium mycotoxin action in mammary gland. *J. Toxicol. Environ. Health.* **4: 1-8**

- ❖ Breitholtz-Emanuelsson A., Olsen M., Oskarsson A., Palminger I., Hult K. (1993). Ochratoxin A in cow's milk and in human milk with corresponding human blood samples. *J. AOAC Int.* **76: 842-846.**
- ❖ Brown, R.L., Cleveland, T.E., Payne, G.A., Woloshuk, C.P., Campbell, K.W., White, D.G. (1995). Determination of resistance to aflatoxin production in maize kernels and detection of fungal colonization using an *Aspergillus flavus* transformant expressing *Escherichia coli* B-glucuronidase. *Phytopathology*, **85: 983-989.**
- ❖ Brera C., Debegnach F., Grossi S. and Miraglia M. (2004). Effects of industrial processing on the distribution of fumonisin B₁ in dry milling corn fractions. *Journal of Food Protection* **67: 1261-1266.**
- ❖ Breitholz-Emmanuelson A., Minervini F., Hult K., Visconti A., (1994). Ochratoxin A in human serum samples collected in southern Italy from healthy individuals and individuals suffering from different kidneys disorders. *Natural Toxin* **2: 366-370.**
- ❖ Brownie C.F. and Cullen J. (1987). Characterization of experimentally induced equine leukoencephalomalacia (ELEM) in ponies (*Equus caballus*). *Vet. Hum. Toxicol.* **29: 34-38.**
- ❖ Bucci T.J., Hansen D.K., Laborde J.B. (1996). Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with fumonisin B₁ *Nat. Toxins* **4: 51-52.**
- ❖ Büchmann N.B. e Hald B. (1985). Analysis occurrence and control of ochratoxin A residues in Danish pig Kidney *Food Addit. Contam.* **2: 193-199.**
- ❖ Buck W.B., Haliburto J.C., Thilsted J.P., Lock T.F. and Vesonder R.F. (1979). Equine leukoencephalomalacia: comparative pathology of natural occurring and experimental cases. *Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn.* **22: 239-258.**
- ❖ Bunge I., Dirheimer G., Roschenthaler R. (1978). In vivo and in vitro inhibition of protein synthesis in *Bacillus stearothermophilus* by ochratoxin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **83: 398-405.**
- ❖ Bunner D.L., Morris E.R. (1988). Alteration of multiple cell membrane functions in L-6 myoblasts by T-2 toxin: an important mechanism of action. *Toxicology and Applied Pharmacology* **92: 113-121.**
- ❖ Bursian S.J., Aulerich R.J., Cameron J.K., Ames N.K., Steficek B.A. (1992). Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate in reducing the toxicity of dietary zearalenone to milk. *J. Appl. Toxicol.* **12: 85-90.**
- ❖ Butler W.H. (1974). Aflatoxin. In: Mycotoxins. *Elsevier Scientific Publishers Amsterdam.* **pp 1-28.**

- ❖ Caloni F., Spotti M., Auerbach H., Op den Camp H., Fink-Gremmels J. and Pompa G. (2000). *In vitro* metabolism of fumonisin B₁ by ruminal microflora. *Vet. Res. Com.* **24**: 379-387.
- ❖ Camilo S.B., Ono C.J., Ueno Y. and Hirooka E.Y. (2000). Anti-Fusarium moniliforme activity and fumonisin biodegradation by corn and silage microflora. *Arquivos de Biologia e Tecnologia* **43**: 159-164.
- ❖ Campbell, K.W., White, D.G. (1995). Evaluation of corn genotypes for resistance to *Aspergillus* ear rot, kernel infection and aflatoxin production. *Plant Dis.* **79**: 1039-1045.
- ❖ Caramelli M., Dondo A., Cortellazzi G.C., Visconti A., Minervini F., Doko M.B. and Guarda F. (1993). Leukoencephalomalacia in the equine caused by fumonisins: first report in Italy. *Ippologia* **4**: 49-56.
- ❖ Carlton, W.W., Tuite, J. (1977). Metabolites of *P. viridicatum* toxicology. In: Rodricks, J.V., Hesseltine, C.W., Mehlem, M.A. (Eds.), *Mycotoxin in Human and Animal Health. Pathotox, Park Forest South, II*: 525-541.
- ❖ Carlton, W.W. Krogh P. (1979). Ochratoxins In Conference on Mycotoxin in Animal Feed Grain Related to Animal Health. PB 300 *Sponsored by Bureau of Veterinary Medicine. Food and drug administration.* June 8 Rockville Maryl (USA). **pp 165-287.**
- ❖ Castegnaro M., Maru V., Maru G., Rui-Lopez M.D. (1990). Highperformance liquid chromatographic determination of ochratoxin A and its 4R-4-hydroxy metabolite in human urine. *Analyst* **115**: 129-131.
- ❖ Castegnaro M., Pleština R., Dirheimer G., Chernozemsky I.N. and Bartsch H. (1991). Mycotoxins, Endemic Nephropathy and urinary tract tumours. *IARC Sci. Publ. Oxford Univ. Press. Oxford, UK.* **115.**
- ❖ Castegnaro M., Garren L., Galendo L., Gelderblom W.C.A., Chelule P., Dutton M.F., Wild C.P (1998). Analytical method for the determination of sphinganine and sphingosine in serum as a potential biomarker for fumonisin exposure. *J. of Chromatography B*, **720**: 15-24.
- ❖ Castegnaro M., Pleština R., Dirheimer G., Chernozemsky I.N., Bartsch H. (2000). Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours. Lyon : International agency for research on cancer, 1991. - XV, **pp 340.**

- ❖ Čeović S., Pleština R., Miletić-Medved M., Stavljenić A., Mitar J., Vukelić M. (1991). Epidemiological aspects of Balkan endemic nephropathy in a typical focus in Yugoslavia. *IARC Sci Publ* **115: 5-10**.
- ❖ Čeović S., Hrabar A., Šarić M. (1992). Epidemiology of Balkan endemic nephropathy. *Food Chem. Toxicol.* **30: 183-188**.
- ❖ Chang K., Kurtz H., and Mirocha C.J. (1979). "Am. J. Vet. Res., 40:1260-1267, In: C.J Mirocha (1983) Fusarium toxins *Proc. Int. Symp. Mycotoxins*, pp **71-77**.
- ❖ Chang C.F., Huff W.E., Hamilton P.B. (1979). A leucocytopenia induced in chickens by dietary ochratoxin A. *Poult. Sci.* **58: 555-558**.
- ❖ Chang C.F., Doerr J.A., Hamilton P.B. (1981). Experimental ochratoxicosis in turkey poults. *Poult. Sci.* **60(1) 114-119**.
- ❖ Chen S.C.G., Wei R.D., and Hisch D.P.H. (1981). Purification and some properties of chicken-liver aflatoxin B₁ reductase. *Food Cosmet. Toxicol.* **19: 19-24**.
- ❖ Chen S.Y., Chen C.J., Tsai W.Y., Ahsan H., Liu T.Y., Lin J.T. and Santella R.M. (2001). Associations of plasma aflatoxin B₁-albumin adduct level with plasma selenium level and genetic polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and T1. *Nutrition and Cancer* **38: 179-185**.
- ❖ Chi M.S., Mirocha C.J., Kurtz H.J., Weaver G., Bates F., Shimoda W. and Burmeister H.R. (1977a). Acute toxicity of T-2 toxin in broiler chicks and laying hens. *Poultry Science* **56, 628-637**.
- ❖ Chi M.S., Mirocha C.J., Kurtz H.J., Weaver G., Bates F., and Shimoda W. (1977b). Effects of T-2 toxin on reproductive performance and health of laying. *Poultry Science* **56, 628-637**.
- ❖ Chi, M.S., T.S. Robison, C.J. Mirocha, S.P. Swanson and W. Shimoda, (1978). Excretion and tissue distribution of radioactivity from tritium-labeled T-2 toxin in chicks. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **45: 391-402**.
- ❖ Chi M.S., Mirocha C.J., Kurtz H.J., Weaver G.A., Bates F., Robison T. and Shimoda W. (1980). "Effect of dietary zearalenone on growing broiler chicks." *Poult. Sci.* **59:531-536**.
- ❖ Chiavaro E., Lepiani A., Colla F., Bettoni P., Pari E., Spotti E. (2002). Ochratoxin A determination in ham by immunoaffinity clean-up and a quick fluorometric method. *Food and additives and Contaminants* **19 575-581**.

- ❖ Ch'ih J.J., Ewaskiewicz J.I., Taggart P. and Devlin T.M. (1993). Nuclear translocation of aflatoxin B₁-protein complex. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **190: 186-191.**
- ❖ Christensen J.J., and Schneider C.L. (1950). European corn borer (*Pyrausta nubilalis*) in relation to shank, stalk and ear rots of corn. *Phytopathology* **40: 284-291.**
- ❖ Chu F.S. and Li G.Y. (1994). Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and other mycotoxins in mouldy corn collected from the People's Republic of China in region with high incidence of oesophageal cancer. *Appl. and Environ. Microbiol.* **60: 847-852.**
- ❖ Clarke J.R., Marquardt R.R., Frohlich A.A., Pitura R.J. (1994). Quantification of Ochratoxin A in swine kidneys by Enzyme-Linked Immunosorbent assay using a simplified sample preparation procedure *J. Food. Prot.* **57, 991-995.**
- ❖ Colvin B.M. and Harrison L.R. (1992). Fumonisin- induced pulmonary oedema and hydrothorax in swine *Mycopa-thologia.*, **117: 79-82.**
- ❖ Colvin B.M., Cooley A.J., and Beaver R.W., (1993). Fumonisin toxicosis in swine: Clinical and pathology findings. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **5: 232-241.**
- ❖ Cook W.O., Richard J.L., Osweiler G.D., and Trampel D.W. (1986). Clinical and pathologic changes in acute bovine aflatoxicosis; Rumen motility and tissue and fluid concentration of aflatoxins B₁ and M₁. *Am. J. Vet. Res.* **47: 1817-1825.**
- ❖ Cooray R. (1984). Effects of some mycotoxins on mitogen induced blastogenesis and SCE frequency in human lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology* **22: 529-534.**
- ❖ Coulombe R.A., Shelton D.W., Sinnhuber R.O., and Nixon J.E. (1982). Comparative mutagenicity of aflatoxins using a Salmonella/trout hepatic enzyme activation system. *Carcinogenesis* **3: 1261-1264.**
- ❖ Cooray R., and Jhonsson PP., (1990). Modulation of resistance to mastitis pathogens by treatment of mice with T-2 toxin. *Food and Chemical Toxicology* **28: 687-692.**
- ❖ Côté L.M., Oahlem A.M., Yoshizawa L., Swanson S.P., and Buck W.B. (1986). Excretion of deoxynivalenol and its metabolite in milk, urine, and feces of lactating cows. *J. Dairy Sci.* **69: 2416-2423.**
- ❖ Coulombe R.A. Jr. (1993). Symposium: Biological action of mycotoxins, *J. Dairy Sci.* **76: 880-891.**
- ❖ Creppy E.E., Kern D., Steyn P.S., Vleggaar R., Roschenthaler R. and Dirheimer G. (1983a). Comparative study of the effect of ochratoxin A analogues on yeast

- aminoacyl-tRNA synthase and on the growth and on the protein synthesis of hepatoma cells. *Toxicol. Lett.* **19: 217-224.**
- ❖ Creppy E.E., Stormer F.C., Roschenthaler R. and Dirheimer G. (1983b). Effects of ochratoxin A metabolites on yeast phenylalanyl-tRNA synthase and on the growth and in vivo protein synthesis of hepatoma cells. *Chem. Biol. Interact.* **47: 239-247.**
 - ❖ Creppy E.E., Chakor K., Fisher M.J. and Dirheimer G. (1984). Inhibition of protein synthesis in mice by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. *Food Chem. Toxicol.* **22: 883-886.**
 - ❖ Creppy E.E., Kane A., Dirheimer G., Lafarge-Frayssinet C., Mousset S., Frayssinet C. (1985). Genotoxicity of ochratoxin A in mice: DNA single-strand break evaluation in spleen, liver and kidney. *Toxicol. Lett.* **28: 29-35.**
 - ❖ Creppy E.E., Baudrimont I., Betbeder A.M. (1995). Prevention of nephrotoxicity of Ochratoxin A, a food contaminant. *Toxicology Letter* **82/83: 869-877.**
 - ❖ Croy R.G. and Wogan G.N. (1981). Quantitative comparison of covalent aflatoxin-DNA adducts formed in rat and mouse livers and kidneys. *J. Natl. Cancer Inst.* **66: 761-768.**
 - ❖ Cukrovà V., Langrova E. and Akao M. (1991). Effects of aflatoxin B₁ on myelopoiesis in vitro. *Toxicology* **70: 203-211.**
 - ❖ Cukrovà V., Kurita N. and Akao M. (1992a) An early effect of aflatoxin B₁ administered in vivo on the growth of bone marrow CFU-GM and the production of some cytokines in rats. *Mycopathologia* **120: 113-119.**
 - ❖ Cukrovà V., Kurita N. and Akao M. (1992b). Alterations in the growth and cycling status of granulocyte-monocyte colony-forming units (CFU-GM) in rats injected single doses of aflatoxin B₁. *Neoplasma* **39: 93-96.**
 - ❖ Cupid B.C., Lightfoot T.J., Russell D., Gant S.J., Turner P.C., Dingley K.H., Curtis K.D., Leveson S.H., Turteltaub K.W., Garner R.C. (2004). The formation of AFB₁-macromolecular adducts in rats and human at dietary levels of exposure. *Food and Chem. Toxicol.* **42: 559-569.**
 - ❖ Curtui V.G., Gareis M., Usleber E., and Märtlbauer E. (2001). Survey of Romanian slaughtered pigs for the occurrence of mycotoxin ochratoxin A and B, and Zearalenone. *Food Additives and Contaminants.* **18: 730-738.**
 - ❖ Dalezios J. (1971). Aflatoxin P1: a new metabolite of aflatoxin B₁ its isolation and identification . PhD thesis Massachusetts Institute of Technology.

- ❖ Dalezios J., Wogan G.N., and Weinreb S.M. (1971). Aflatoxin P₁: A new aflatoxin metabolite in monkeys *Science* **171**: 584-585.
- ❖ Dann R.E., Mitscher I.A., and Couri D. (1972). The in vivo metabolism of ¹⁴C-labeled aflatoxins B₁, B₂, G₁ in rats. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **3**: 667-675.
- ❖ Davidson J.N., Babish J.G., Delaney K.A., Taylor D.R., Philips T.D. (1987). Hydrated sodium calcium aluminosilicate decrease the bioavailability of aflatoxin in the chicken. *Poult. Sci.* **66**: 89.
- ❖ De Lorenzi L., De Giovanni A., Malagutti L., Molteni L., Sciaraffia F., Tamburini A., Zanotti M. (2005). *Ital. J. Anim. Sci.* **4**: 395-402.
- ❖ D’Mello, J.P.F., MacDonald, A.M.C., Cochran, M.P. (1993). A preliminary study of the potential for mycotoxin production in barley grain. *Aspects Appl. Biol.* **36**: 375-382.
- ❖ D’Mello, J.P.F., Porter J.K., MacDonald, A.M.C., Placinta, C.M. (1997). *Fusarium mycotoxins*. In: D’Mello, J.P.F., (ED.), Handbook of Plant and Fungal Toxicants. CRC, Press, Boca Raton, FL. pp 287-301.
- ❖ D’Mello, J.P.F., MacDonald, A.M.C. (1997). Mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Technol.* **69**: 155-166.
- ❖ Degene G.H., Gerber M.M., Obrecht-Pflumio S., Dirheimer G. (1997). Induction of micronuclei with ochratoxin A in ovine seminal vesicle cell cultures. *Arch. Toxicol.* **71**: 365-371.
- ❖ De Groene E.M., Hassing I.G.A.M., Blom M.J., Seinen W., Fink-Gremmels J., Horbach G.J.(1996a). Development of human cytochrome P450-expressing cell lines: Application in mutagenicity testing of ochratoxin A. *Cancer Research* **56**: 299-304.
- ❖ De Groene E.M., Jahn A., Horbach G.J., Fink-Gremmels J. (1996b). Mutagenicity and genotoxicity of the mycotoxin ochratoxin A. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* **1**: 21-26.
- ❖ Diekman M.A. and Green M.L. (1992). “Mycotoxins and reproduction in domestic livestock” *J. Animal Sci.* **70**: 1615-1627.
- ❖ Dilkina P., Zorzetea P., Mallmannb C.A., Gomesc J.D.F., Utiyama C.E., Oettingc L.L., Corrêa B. (2003) Toxicological effects of chronic low doses of aflatoxin B1 and fumonisin B1-containing *Fusarium moniliforme* culture material in weaned piglets. *Food and Chemical toxicology* **41**:1345-1353.

- ❖ Doerr J.A. Huff W.E., Tung H.T., Wyat R.D., Hamilton P.B. (1974). A survey of T-2 toxin, ochratoxin, and aflatoxin for their effects on the coagulation of blood in young broiler chickens. *Poult. Sci.* **53**: 1728-1734.
- ❖ Doerr J.A. (1989). Effect of aluminosilicate on broiler chickens during aflatoxicosis. *Poult. Sci.* **68**: 45.
- ❖ Doko M.B., Rapior S., Visconti A., and Schjth J.E. (1995). Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* **43**: 429-434.
- ❖ Dombrink-Kurtzman M.A., (2003). Fumonisin and beauvericin induce apoptosis in turkey peripheral blood lymphocytes. *Kluwer Academic Publisher Mycopathologia* **156**: 357-364.
- ❖ Dombrink-Kurtzman M.A., Bennett G.A., and Richard J.L. (1994). An optimized MTT bioassay for determination of cytotoxicity of fumonisins in turkey lymphocytes. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **77**: 512-516.
- ❖ Dombrink-Kurtzman M.A., and Dvorak, T.J. (1999). Fumonisin content in masa and tortillas from Mexico. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* **47**: 622-627.
- ❖ Domenech J. Boccas B., Pellegrin F., Laurent D., Kohler F., Magnol J. and Lambert C. (1984a) *Fusarium moniliforme* fusariosis of maize in New Caledonia and related equine pathology: toxic leukoencephalomalacia. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* **37**: 253-259.
- ❖ Domenech J. Boccas B., Pellegrin F., Laurent D., Kohler F., Magnol J. and Lambert C. (1984b). Equine leukoencephalomalacia in New Caledonia. *Aust. Vet. J.* **62**: 422-423.
- ❖ Eaton D.L., Ramsdell H.S., Neal G.E., (1994). Biotransformation of aflatoxins. In: Eaton D.L., Groopman J.D. (Eds.), *The toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural Significance.* Accademic Press, San Diego, CA, pp 45-72.
- ❖ EFESA J. (2005). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to fumonisins as undesirable substances in animal feed. *The EFSA Journal, Request No. EFSA-Q-2003-040.* **235**, 1 - 32
- ❖ Ehrlich V., Darroundi F., Uhl M., Steinkellner H., Gann M., Majer B.J., Eisenbauer M., Knasmüller S. (2002). Genotoxic effects of ochratoxin A in human-derived hepatoma (HepG2) cells. *Food and Chemical Toxicology* **40**: 1085-1090.

- ❖ Eko-Ebongue S., Antalick J.P., Bonini M., Betbeder A.M., Faugère J.G., Maaroufi K. Bacha H., Achour M., Grosse Y., Pfohl-Leszkowicz A., Creppy E.E. (1994). Détermination des teneurs en ochratoxine A, vitamine E et vitamine A dans les sérums humains de France et de Tunisie: recherche d'une corrélation. *Annales de Falsification de l'Expertise Chimique* **929: 213-224.**
- ❖ Elsassser, T.H.; Bolt, D.J.; Bradly, B.D. and Roper, H. (1983) Lutinizng hormone, follicle stimulating hormone and prolactin secretion in ewes and wethers after zeranol or estradiol injection. *J. Anim. Sci.* **57: 443.**
- ❖ Enger P.A., Gange S.J., Dolan P.M., Groopman J.D., Muñoz A. and Kensler T.W. (1995). Levels of aflatoxin-albumin biomarkers in rat plasma are modulated by long-term and transient interventions with oltipraz. *Carcinogenesis (London)* **16:1769-1773.**
- ❖ Entwisle A.C., Jorgensen K., Williams A.C., Boenke A. and Hult K. (1997). An intercomparison of methods for the determination of Ochratoxin A in pig kidney. *Food and Additives and Contaminants.* **14: 223-236.**
- ❖ Epstein S.M., Bartus B. and Farber E. (1969). Renal epithelial neoplasm induced in male Wistar rats by oral aflatoxin B₁. *Cancer Res.* **29: 1045-1050.**
- ❖ Eriksen G.S. Pettersson H., Lundh T. (2004). Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites. *Food and Chemical Toxicology* **42: 619-624.**
- ❖ Eriksen G.S., Pettersson H., Johnsen K., Lindberg J.E. (2002). Transformation of trichothecenes in ilea digesta and feces from pigs. *Archives of Animal Nutrition* **56: 263-274.**
- ❖ Essigmann J.M., Croy R.G., Nadzan A.M., Busby W.F. Jr., Resinold V.N., Buchi G. and Wogan G.N. (1977). Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B₁ *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74: 1870-1874.**
- ❖ Farrar, J.J., Davis, R.M. (1991). Relationships among ear morphology, western flower thrips and *Fusarium* ear rot of corn. *Phytophatology* **81: 661-666.**
- ❖ Feinberg B., McLaughlin C.S. (1989). Biochemical mechanism of action of trichothecene mycotoxin. In: Beasley, V.R. (Ed.), *Trichothecene Mycotoxicosis Pathophysiologic Effects*, Volume I. *CRC-Press, Boca Rata*, pp **27-35.**
- ❖ Filali A., Betbeder A.M., Baudrimont I., Benayad A., Soulaymani R., Creppy E.E. (2002). Ochratoxin A in human plasma in Morocco: a preliminary survey. *Human Experimental Toxicology* **21: 241-245.**

- ❖ Foley, D.C. (1962). Systemic infection of corn by *Fusarium moniliforme*, *Phytopathology*, **68**: 1331-1335.
- ❖ Föllmann W., Hillebrand I.E., Creppy E.E., Bolt H.M. (1995). Sister chromatid exchange frequency in cultured isolated porcine urinary bladder epithelial cells (PUBEC) treated with ochratoxin A and alpha. *Archives of Toxicology* **69**: 280-286.
- ❖ Forsyth D.M., Yoshizawa T., Moronxa N. and Tuite J. (1977). Emetic and refusal activity of deoxynivalenol to swine. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**: 547-552.
- ❖ Frank S., Renner T., Ruppert T., Scherer G. (1998). Determination of albumin adducts of (+)-anti-benzo[a]pyrene-diol-epoxide using an high-performance liquid chromatographic column switching technique for sample preparation and gas chromatography-mass spectrometry for the final detection. *J. of Chromatography B* **713**: 331-337.
- ❖ Friend D.W., Trenholm H.L., Elliot J.L., Thompson B.K. and Hartin K.E. (1982). Effect of feeding vomitoxin-contaminated wheat to pig. *Can. J. Anim. Sci.* **62**:1211-1222.
- ❖ Frobish R.A., Bradley B.D., Wagner P.E., Long-Bradley P.E., and Hariston H. (1986). Aflatoxin residues in milk of diary cows after ingestion of natural contaminated grain. *J. Food. Prot.* **49**: 781-785.
- ❖ Furtado R.M., Pearson A.M., Hogberg M.G. and Miller E.R. (1979). Aflatoxin residues in the tissues of pigs fed a contaminated diet. *J. Agric. Food Chem.* **27**: 1351-1354.
- ❖ Galtier P (1991). In: Castegnaro M., Plestina R., Dirheimer G., Chernozemsky I.N., Bartsch H. (Editor), *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours, IARC Sci. Publ. No 115, International Agency for Research on Cancer Lyon*, p. 187.
- ❖ Galtier, P. and Alvineire, M. (1976). *In vitro* transformation of ochratoxin A by animal microbial floras. *Ann. Rech. Vét.* **7**: 91-98.
- ❖ Gamer R.C., Miller E.C., and Miller J.A. (1972). Liver microsomal metabolism of aflatoxin B1 to reactive derivative toxic to *Salmonella ryphimurium* TA 1530. *Cancer Res.* **32**: 2058-2066.
- ❖ Gareis M., Martlbauer E., Bauer J., Gedek Z.(1988). Determination of ochratoxin A in human milk. *Lebensm Unters Forsch.* **186**: 114-117.
- ❖ Gareis M. (1996). Fate of ochratoxin A on processing of meat products. *Food additive and contaminats.* **13**: 35-37.

- ❖ Gareis M., Ceynowa, J. (1994). Influence of fungicide Matador (tebuconazole/triadimenol) on mycotoxin production by *Fusarium culmorum*. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **198**: 244-248.
- ❖ Garrett W.N., Heitman H., Jr. and Booth A.N. (1968). Aflatoxin toxicity in beef cattle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **127**: 188-190.
- ❖ Gekle M., Schwerdt G., Freudinger R., Mildenerger S., Wilfingseder D., Pollack V., Dander M., Schramek H. (2000). Ochratoxin A induces JNK activation and apoptosis in MDCK-C7 cells at nanomolar concentrations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **293**: 837-844.
- ❖ Gelboin H.V., Wortham J.S., Wilson R.G., Friedman M.A. and Wogan G.N.(1966). Rapid and marked inhibition of rat-liver RNA polymerase by aflatoxin B₁. *Science* **154**: 1205-1206.
- ❖ Gelderblom W.C.A., Jaskiewicz K., Marasas W.F.O., Thiel P.G., Horak R.M., Vleggar R., Kriek N.P.J. (1988). Fumonisin novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme* *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1806-1811.
- ❖ Gelderblom W.C.A., Kriek N.P.J., Marasas W.F.O. and Thiel P.G. (1991). Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁ in rats. *Carcinogenesis* **12**: 1247-1251.
- ❖ Gelderblom W.C.A., Cawood M.E., Snyman S.D., Vleggar R. and Marasas W.F.O (1993). Structure-activity relationships in short-term carcinogenesis and cytotoxicity assay. *Food and Chem. Toxicol.* **31**: 407-414.
- ❖ Gelderblom W.C.A., Snyman S.D., Van der Westhuizen L. and Marasas W.F.O (1995). Mitoinhibitory effect of fumonisin B1 on rat hepatocytes in primary culture. *Carcinogenesis* **16**: 625-631.
- ❖ Gillman I.G., Clark T.N., Manderville R.A. (1999). Oxidation of ochratoxin A by an Fe-porphyrin system: model for enzymatic activation and DNA cleavage. *Chem. Res. Toxicol.* **12**: 1066-1076.
- ❖ Gimeno A. Martins M.L. (2003). Fusaritomicotoxicosis comparativa entre pollos, gallinas vacas lecheras y conejos. *Alb itar* **63** :42-44.
- ❖ Goel S., Schumacher J., Lenz S.D., and Kempainen B.W. (1996). Effects of *Fusarium moniliforme* isolates on tissue and serum sphingolipid concentrations in horses. *Vet. Human Toxicol.* **38**:265-270.

- ❖ Goerttler K., Löhrke H., Schweizer H.J. and Hesse B. (1980). Effects of aflatoxin B₁ on pregnant inbred Sprague-Dawley rats and their F₁ generation. A contribution to transplacental carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* **64**: 1349-1354.
- ❖ Goliński P., Hult K., Grabarkiewicz-Szcżsna G., Chedkowski J., Kneblewski P. and Szebiotko K. (1984). Mycotoxic porcine nephropathy and spontaneous occurrence of ochratoxin A residues in kidneys and blood of polish swine. *Applied and Environmental Microbiology.* **47**: 1210-1212.
- ❖ Eaton D.L. and Groopman J.D. (1994). The toxicology of aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance. *San Diego, CA Academic Press INC.*
- ❖ Grosse Y., Baudrimont I., Castegnaro M., Betbeder A.M., Creppy E.E., Dirheimer G., Pfohl-Leszkowicz A. (1995). Formation of ochratoxin A metabolites and DNA-adducts in monkey cells. *Chemico-Biological Interactions* **95**: 175-187.
- ❖ Grosso F., Säid S., Mabrouk I., Fremy J.M., Castegnaro M., Jemmali M., Dragacci S. (2003). New data on the occurrence of ochratoxin A in human sera from patients affected or not by renal disease in Tunisia. *Food and Chemical Toxicology* **41**: 1133-1140.
- ❖ Gumprecht L.A., Beasley V.R., Weigel R.M., Parker H.M., Tumbleson M.E., Bacon C.W., Meredith F.I., Haschek W.M. (1998). Development of fumonisin-induced hepatotoxicity and pulmonary edema in orally dosed swine: morphological and biochemical alterations. *Toxicol Pathol* **26**:777-788.
- ❖ Gupta M., Sasmal D., Bandyopadhyay G., Bagchi T., Chatterjee T. and Dey S. (1983). Hematological changes produced in mice by ochratoxin A and citrinin. *Toxicology* **26**: 55-62.
- ❖ Gurtoo H.L., Dhams R.P. and Paigen B. (1978). Metabolic activation of aflatoxins related to their mutagenicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **81**: 965-972.
- ❖ Gurung N.K., Rankins D.L. Jr. Shelby R.A. and Goel S. (1998). Effects of fumonisin B₁-Contaminated Feeds on Weanling Angora Goats. *J. Anim. Sci.* **76**: 2863-2870.
- ❖ Gurung N.K., Darrell L. and Rankins D.L. (1999). *In vitro* ruminal disappearance of fumonisin B₁ and its effect on *in vitro* dry matter disappearance. *Vet. and Human Toxicol.* **41**: 196-199.
- ❖ Guthrie L.D. (1979). Effects of Aflatoxin in corn on production and reproduction in dairy cattle. *Proc. Annu Met U S Anim Health Assoc.* **83**: 202-204.
- ❖ Hagelberg S., Hult K. and Fuchs R. (1989). Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *J. of Appl. Toxicol.* **9**: 91-96.

- ❖ Hagler, W.M.; Mirocha, C.J. Pathre, S.V. and Behrens, J.C. (1979) Identification of the naturally occurring isomer of zearalenol produced by *Fusarium roseum Gibbosum* in rice culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **37: 849-853.**
- ❖ Hald B. (1991). Ochratoxin A in human blood in European countries. In: Castegnaro M., Pleština M., Dirheimer G., Chernozemsky I.N., Bartsch H (Eds.), Mycotoxin, Endemic, Nephropathy and urinary tract tumours. *IARC scientific Publication* **115: 159-164.**
- ❖ Halloran H.R. (1983). *Feedstuffs.* **2: 18.**
- ❖ Hamilton R.M.G., Trenholm H.L., and Thompson B.K. (1983). Effects of feeding chicks and laying hens diets that contain vomitoxin (deoxynivalenol) contaminated wheat. *Proc. Annu. Nutr. Conf. Feed Manuf.* **19: 48-55.**
- ❖ Hamilton PB., Huff W.E., Harris J.R.,Wyatt R.D. (1982). Natural occurrences of ochratoxicosis in poultry. *Poultry Sci.* **61: 1832-1841.**
- ❖ Hamilton R.M.G., Trenholm H.L., Thompson B.K. and Greenhalgh R. (1985). The tolerance of white Leghorn and broiler chicks, and turkey poults to diets that contain deoxynivalenol (vomitoxin)-contaminated wheat. *Poultry Sci.* **64: 273-286.**
- ❖ Hannun Y., Loomis C.R., Merrill A.H. and Bell R.M. (1986). Sphingosine inhibition of protein kinase activity and phorbol dibutyrate binding *in vitro* and human platelets. *J. Biol. Chem.* **261: 12604-12609.**
- ❖ Hansen H.P. (1995). Mould in the meat processing industry. *Fleischwirtschaft* **75: 52.**
- ❖ Harley E.H., Rees K.R. and Cohen A.(1969). A comparative study of the effects of aflatoxin B₁ and actinomycin D on HeLa cells. *Biochem. J.* **114: 289-298.**
- ❖ Harel R. and Futerman A.H. (1993). Inhibition of sphingolipid synthesis affects axonal outgrowth in cultured hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* **268: 14476-14481.**
- ❖ Harland, E.C. and Cardeilhac, P.T. (1975) Excretion of carbon-14-labeled aflatoxin B₁ via bile, urine and intestinal contents of the chicken. *Am. J. Vet. Res.*, **36: 909-912.**
- ❖ Harrison L.R., Colvin B.M., Greene J.T., Newman L.E., Cole J.R., Jr. (1990). Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *J. Vet. Diagn. Invest.* **2: 217-221.**
- ❖ Haschek W.M., Motelin G., Ness D.K., Harlin K.S., Hail W.F., Vesonder R., Peterson R and Beasley V.R. (2001). Characterization of fumonisin toxicity in orally and intravenously dosed swine. *Mycopathologia.* **177: 83-96.**

- ❖ Haschek W.M., Gumprecht L.A., Smith G.W., Parker H.M., Beasley V.R., Tumbleson M.E. (1996). Effects of fumonisins in swine: implications for biomedical research. In: *Advances in Swine in Biomedical Research* (Tumbleson ME, Schook LB, eds). *New York: Plenum Press.* **99–112.**
- ❖ Haschek W.M., Motelin G., Ness D.K., Harlin K.S., Hail W.F., Vesonder R., Peterson R and Beasley V.R. (2001). Characterisation of fumonisin toxicity in orally and intravenously dosed swine. *Mycopathologia* **117: 83-96.**
- ❖ Harvey R.B., Elissalde M.H., Kubena L.F., Weaver E.A., Corrier D.E. and Clement B.A. (1992). Immunotoxicity of ochratoxin A to growing gilts. *American Journal of Veterinary Research.* **53: 1966-1970.**
- ❖ Hasinoff B.B., Rahimtula A.D. and Omar R.F. (1990). NADPH-cytochrome-P450 reductase promoted hydroxyl radical production by the iron (III)-ochratoxin A complex. *Biocim. Biophys. Acta.* **1032: 78-81.**
- ❖ Haubeck H.D., Lorkowski G., Kölsch E. and Rösenthaller R. (1981). Immunosuppression by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. *Applied and Environmental Microbiology.* **41: 1040-1042.**
- ❖ Hayes M.A., Bellamy J.E.C., and Schiefer H.B. (1980). Subacute toxicity of dietary T-2 toxin in mice: morphological and hematological effects. *Canadian Journal of Comparative Medicine* **44: 203-218.**
- ❖ Helferich W.G., Garrett W.N., Hsieh D.P.H. and Baldwin R.L. (1986a). Feedlot performance and tissue residues of cattle consuming diets containing aflatoxins. *J. Animal Sci.* **62 (3): 691-696.**
- ❖ Helferich W.G., Baldwin R.L., and Hsieh D.P.H. (1986b). [¹⁴C]-aflatoxin B₁ metabolism in lactating goats and rats. *J. Anim. Sci.* **62 (3): 697-705.**
- ❖ Hendrich S., Miller K.A., Wilson T.M. and Murphy P.M. (1993). Toxicity of *Fusarium proliferatum* fermented nixtamalized corn-based diets fed to rats: effect of nutritional status. *J. Of Agric. and Food Chem.* **41: 1649-1654.**
- ❖ Hendricks J.D., Sinnhuber R.O., Nixon J.E., Wales J.H., Masri M.S., and Hsieh D.P.H. (1980). Carcinogenic response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to aflatoxin Q₁ and synergistic effect of cyclopropenoid fatty acid. *J. Natl. Cancer Inst.* **64: 523-527.**
- ❖ Herrold K.M. (1969). Aflatoxin induced lesions in syrian hamster. *Br. J. Cancer* **23: 655-660.**

- ❖ Hidy, P.H.; Baldwin, R.S.; Greasham, R.L.; Keith, C.L. and McMullan, J.R. (1977). Zearalenone and some derivatives, production and biological activities. *Adv. Appl. Microbiol*, **22**: 55-82.
- ❖ Höhler D., Marquardt R.R., McIntosh A.R., Xiao H. (1996). Free radical generation as induced by ochratoxin A and its analogs in bacteria (*Bacillus brevis*). *J. Biol. Chem.* **271**: 27388-27394.
- ❖ Höhler D., Marquardt R.R., Frohlich A.A. (1997a). Lipid peroxidation as one mode of action in ochratoxin A toxicity in rats and chicks. *Can J. Anim. Sci.* **77**: 287-292.
- ❖ Höhler D., Marquardt R.R., McIntosh A.R., Hatch G.M. (1997b). Induction of free radicals in hepatocytes, mitochondria and microsomes of rats by ochratoxin A and its analogs. *Biochim. Biophys. Acta.* **1357**: 225-233.
- ❖ Höhler D. (1998). Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode of action. *Z. Ernährungswiss.* **37**: 2-12.
- ❖ Holzapfel C.W., Steyn P.S., and Purchase I.F.H. (1966). Isolation and structure of aflatoxin M₁ and M₂. *Tet. Lett.* **25**: 2799-2803.
- ❖ Hoogenboom L.A.P., Tulliez J., Gautier J.P., Coker R.D., Melcion J.P., Nagler M.J., Polman Th. H.G. and Delort-Laval J. (2001). Absorption, distribution and excretion of aflatoxin-derived ammoniation products in lactating cows. *Food Additives and Contamination* **18**: 47-58.
- ❖ Hopmans E.C., Hauck C.C., Hendrich S. and Murphy P.A. (1997). Excretion of fumonisin B₁ hydrolyzed fumonisin B₁ and the fumonisinB₁-fructose adduct in rats. *J. of Agric. and Food Chem.* **45**: 2618-2625.
- ❖ Horie Y. (1995) Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section *Nigri*. *Nippon Kingakukai Kaiho* **36**: 73-76.
- ❖ Howard P.C., Couch L.H., Patton R.E., Eppley R.M., Doerge D.R., Churchwell M.I., Marques M.M., Okerberg C.V. (2002). Comparison of the toxicity of several fumonisin derivatives in a 28-day feeding study with female B6C3F1 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **185**: 153-165.
- ❖ Howert E.W., Wyatt R.D. and Hayes D.A. (1989). Equine leucoencephalomalacia in white tailed deer from North Carolina. *J. Wildl. Dis.* **25**: 384-387.
- ❖ Hult K., Plestina R., Habazin-Novak V., Radic B., Ceovic S. (1982). Ochratoxin A in human blood and Balkan endemic nephropathy *Arch. Toxicol.* **51**: 313-321.
- ❖ Hsieh D.P.H. (1987). Mode of action of mycotoxin. In: *Mycotoxin in food* Krogh P. (eds) *Academic Press, Cambridge.* pp 149-176.

- ❖ Hsich D.P.H., Salhab A.S., Wong J.J., and Yang S.L. (1974). Toxicity of aflatoxin Q₁ as evaluated with the chicken embryo and bacterial auxotrophs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **30**: 237-242.
- ❖ Hsu, I.-C., Smalley, E. B., Strong, F. M., Ribelin, W. E. (1972). Identification of T-2 Toxin in Moldy Corn Associated with a Lethal Toxicosis in Dairy Cattle. *Appl. Microbiol.* **24**: 684-690.
- ❖ Huff W.E., Wyatt R.D., Tucker T.L., Hamilton P.B. (1974). Ochratoxicosis in the broiler chicken. *Poult. Sci.* **53**: 1585-1591.
- ❖ Huff W.E., Hamilton P.B. (1975). The interaction of ochratoxin A with some environmental extremes. *Poultry Sci.* **54**: 1659-1662.
- ❖ Huff W.E., Wyatt R.D., Hamilton P.B. (1975). Nephrotoxicity of dietary ochratoxin A in broiler chickens. *Applied Microbiology.* **30**: 48-51.
- ❖ Huff W.E., Kubena L.F., Harvey R.B., Philips T.D. (1992). Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the individual and combined toxicity of aflatoxin and ochratoxin A. *Poult. Sci.* **71**: 64-69.
- ❖ Hulan H.W. and Proudfoot F.W. (1982). Effects of feeding vomitoxin contaminated wheat on the performance of broiler chickens. *Poultry Sci.* **61**: 1653-1659.
- ❖ Hult K., Hokby E., Hagglund U., Gatenbeck S., Rutqvist L., Selley G. (1979). Ochratoxin A in Pig blood: Method of Analysis and use as a tool for feed studies. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**: 772-776.
- ❖ Hult K., Teiling A., Gatenbeck, S. (1976). Degradation of ochratoxin A by a ruminant. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**: 443-444.
- ❖ Hussein, H.S., and Brasel J.M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* **167**: 101-134.
- ❖ Hutchinson R.D., Steyn P.S., and Thompson D.L. (1971). The isolation and structure of 4-hydroxyochratoxin A and 7-carboxy-3, 4-dihydro-8-hydroxy-3-methylisocoumarin from *Penicillium viridicantum*. *Tetrahedron Lett.* **43**: 4033-4036.
- ❖ Huwiler A., Kolter T., Pfeilschifter J., Sandhoff K. (2000). Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1485**: 63-99.
- ❖ Huwing A., Freimund S., Käppeli O., Dutler H. (2001). Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicol. Lett.* **122**: 179-188.

- ❖ Ihara T., Yamamoto T., Sugamata M., Okumura H., and Ueno Y. (1998). The process of ultrastructural changes from nuclei to apoptotic body. *Virchows Arch.* **433: 443-447.**
- ❖ Irvin T.R. and Wogan G.N. (1984) Quantitation of aflatoxin B₁ adduction within the ribosomal RNA gene sequences of rat liver DNA. *Proc. Natan. Acad. Sci. U.S.A.* **81: 664-668.**
- ❖ Islam Z., Nagase M., Yoshizawa T., Yamauchi K., and Sakato N (1998). T-2 toxin induces thymic apoptosis in vivo in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **148: 205-214.**
- ❖ Jackson P.E., Groopman J.D. (1999). Aflatoxin and liver cancer. *Baillière's Clinical Gastroenterology* **4: 545-555.**
- ❖ Jacobsen B.J., Bowen K.L. Shelby R.A. Diener U.L., Kemppainen B.W. and Floyd J. (1993). Mycotoxin and mycotoxicosis circular ANR- 767. Auburn Univ. Auburn, Alabama.
- ❖ Jacobson W.C., Harmeyer W.C., Jackson J.E., Armbrrecht B. and Wiseman H.G. (1978). Transmission of aflatoxin B₁ into the tissues of growing pigs *Bull Environ Contam. Toxicol.* **18: 156-161.**
- ❖ Jagadeesan V., Rukmini C., Vijayavaraghavan M., and Tulpule P.G. (1982). Immune studies with T-2 toxin ; effects of feeding and withdrawal in monkeys. *Food and Chemical Toxicology* **20: 83-87.**
- ❖ Javed T., Bennett G.A. Richard J.L., Dombink-Kurtzman M.A., Cote L.M. and Buck W.B. (1993). Mortality in broiler chicks on feed amended with *Fusarium proliferatum* culture material or with purified fumonisin B₁ and moniliformin. *Mycopathologia* **123:171-184.**
- ❖ Jiménez A.M., López de Crain A., Gonzalez-Peñas E., and Bello J. (2001). Determination of ochratoxin A in pig liver-derived pâtés by high-performance liquid chromatography. *Food Additives and Contaminants.* **18: 559-563.**
- ❖ Jørgensen K. and Petersen A.(2002). Content of ochratoxin A in paired kidney and meats samples from healthy Danish slaughter pigs. *Food Additives and Contaminants.* **19: 562-567.**
- ❖ Jones C., Janice R., Ciacci-Zanella., Zhang Y., Henderson G., and Dickman M. (2001). Analysis of fumonisin B₁ -Induced apoptosis. *Environmental Health Perspectives* **109: 315-320.**
- ❖ Jones, E.R.H. and Lowe, G. (1960). The biogenesis of tricothecene. *Chem. Soc. J.* **63: 3959-3962.**

- ❖ Kalef A., Zidane C., Charef C., Gharbi A., Tadjerouna M., Betbeder A.M., Creppy E.E. (1993). Ochratoxicoses humaines en Algérie. In: Creppy E.E., Castegnaro M., Dirheimer G. (Eds.) Human Ochratoxicosis and its Pathologies. *INSERM John Libbey Eurotext Ltd, Paris* **231: 123-127.**
- ❖ Kallela K., and Etalla E. (1984). The estrogenic *Fusarium toxin* (zearalenone) in hay as a cause of early abortions in the cow. *Nord. Vet. Med.* **36: 305-309.**
- ❖ Kamp H.G., Turesky R., Schlatter J., Eisenbrand G., Janzowski C. (2005). Ochratoxin A: induction of oxidative DNA damage in primary rat tubular cells and in rats. *Arch. Pharmacol.* **369: R124-495.**
- ❖ Kane A., Creppy E.E., Roth A., Röschenthaler R., Dirheimer G. (1986). Distribution of the [³H]-label from low doses of radioactive ochratoxin A ingested by rats, and evidence for DNA-single strand breaks caused in liver and kidneys. *Toxicology* **58: 219-224.**
- ❖ Kanisawa M., Suzuki S., Kozuka Y. and Yamazaki M. (1977). Histopathological studies on the toxicity of ochratoxin A in rats. I. Acute oral toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology.* **42: 55-64.**
- ❖ Kawabata, Y.; Tashiro, F. and Ueno, Y. (1982) Synthesis of a specific protein induced by zearalenone and its derivatives in rat uterus. *J. Biochem.* **91: 801-808.**
- ❖ Kellerman T.S., Marasas W.F.O., Pienaar J.G. and Naude T.W. (1972). A mycotoxicosis of equidae caused by *Fusarium moniliforme*. Onderstepoort *J. Vet. Res.* **39: 205-208.**
- ❖ Kellerman T.S., Marasas W.F.O., Thiel P.G., Gelderblom W.C.A., Cawood M and Coetzer J.A.W.(1990). Leucoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B₁. Onderstepoort *J. Vet. Res.* **57: 269-275.**
- ❖ Kennedy D.G., Hewitt S.A., McEvoy J.D., Currie J.W., Cannavan A., Blanchflower W.J., Elliot C.T. (1998). Zeranone is formed from *Fusarium* sp. toxins in cattle in vivo, *Food Addit. Contam.* **15: 393-400.**
- ❖ Khamis Y., Hammad H.A. and Hemeida N.A. (1986). Mycotoxicosis with estrogenic effect in cattle. *Zuchthyg.* **21: 233-236.**
- ❖ Kiermeier F., and Buchner M. (1977). On the aflatoxin M content of the cheese during ripening and storage. *Z. Lebensm Unters. Forsch.* **164: 87-91.**
- ❖ Kim M.S., Lee D.Y., Wang T., Schroeder J.J. (2001). Fumonisin B₁ induces apoptosis in LLC-PK1 renal epithelial cells via a sphinganine and calmodulin-dependent pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **176: 118-126.**

- ❖ Kim E.K., Maragos C.M. and Kendra D.F. (2004). Liquid chromatography determination of fumonisins B1, B2 and B3 in corn siliage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52: 196-200.**
- ❖ King R.R., McQusen R.E., Levesque D. and Greenhalgh R. (1984). Transformation of deoxynivalnol (vomitoxin) by rumen microorganism. *J. Agric. Food Chem.* **32: 1181-1183.**
- ❖ Kollarczik B., Gareis M., Hanelt M. (1994). In vitro transformation of the fusarium mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone by the normal gut microflora of pigs. *Natural Toxins* **2: 105-110.**
- ❖ Kolter T., Sandhoff K. (1999). Angew. Chem. 111. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38: 1532-1568.**
- ❖ Krasauskas A., Railienė M., Steponavičius D., Raila A., Steponavičienė A. (2006). The impact of natural environment and technological measures on the mycological contamination of grain. *Ekologija*. **3: 80–87.**
- ❖ Krogh P. (1992). Role of ochratoxin in disease causation. *Food Chem. Toxicol.* **30: 213-224.**
- ❖ Krogh P., Gyrd-Hanses N., Hald B., Larsen S., Nielsen J.P., Smith M et al., (1988). Renal enzyme activities in experimental ochratoxin A-induced porcine nephropathy: diagnostic potential of phosphoenolpyruvate carboxykinase and gamma-glutamyl transpeptidase activity. *J. Toxicol. Environ. Health* **23: 1-14.**
- ❖ Krog, P. (1978). Casual association of mycotoxic nephropathy. *Acta. Pathol. et. Microbiol. Scand.* **269: 1S-28S.**
- ❖ Krogh P. (1977). Ochratoxin A residues in tissue of slaughter pigs with nephropathy. *Nord Vet. Med.* **29: 402-405.**
- ❖ Krogh P., Elling F., Hald B., Larsen A.E., Lillehøj E.B., Madsen A., and Mortensen H.P. (1976). Time-dependent disappearance of ochratoxin A residues in tissues of bacon pigs. *Toxicology*. **6: 235-242.**
- ❖ Krogh P., Axelsen N.H., Gyrd-Hanses N., Hald B., Hyldgaard-Jensen J., Larsen A.E., Madsen A., and Mortensen H.P. (1974). Experimental porcine nephropathy. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*. **246: 1-21.**
- ❖ Kubena L.F., Harvey R.B., Philips T.D., Huff W.E. (1988). Modulation of aflatoxicosis in growing chickens by dietary addition of a hydrated sodium calcium aluminosilicate. *Poult. Sci.* **67: 106.**

- ❖ Kubena L.F., Harvey R.B., Huff W.E., Corrier D.E., Philips T.D., Rottinghaus G.E. (1990). Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin. *Poult. Sci.* **69**: 1078-1086.
- ❖ Kubena L.F., Harvey R.B., Huff W.E., Elissalde M.H., Yersin A.G., Philips T.D., Rottinghaus G.E. (1993). Efficacy of Hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and diacetoxyscirpenol. *Poult. Sci.* **72**: 51-59.
- ❖ Kubena L.F., Harvey R.B., Bailey R.H., Buckley S.A., Rottinghaus G.E. (1998). Effects of hydrated sodium calcium aluminosilicate T-Bind™ on mycotoxicosis in young broiler chickens. *Poult. Sci.* **77**: 1502-1509.
- ❖ Kühn I., (1993). Thesis, *Landbauforsch. Völkernrode, Sonderheft.* **137**.
- ❖ Kuiper-Goodman T., Scott P.M., Watanabe H. (1987). Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul Toxicol Pharmacol.* **7**: 253-306.
- ❖ Kuiper-Goodman T., Ominski K., Marquardt R.R., Malcolm S., McMullen E., Lombaert G.A. and Morton T. (1993). Estimating human exposure to ochratoxin A in Canada. In: Creppy E.E., Castegnaro M. and Dirheimer G. (Eds.). Human Ochratoxicosis and its Pathologies. *Jhon Libbey Eurotext INSERM* **231**: 167-174.
- ❖ Kuiper-Goodman T. (1991). Risk assessment to humans of mycotoxins in animal-derived food products. *Vet. Hum. Toxicol.* **33**, 325-333.
- ❖ Kunimoto T., Kunimoto Y., Aibara K. and Miyaki K. (1974). Inhibition of nucleoside transport by aflatoxins and sterigmatocystin. *Cancer Res.* **34**: 968-973.
- ❖ Kurtz H.J. and Mirocha Mirocha C.J. (1978). "Zearalenone (F-2) induced estrogenic syndrome in swine." In: Sillie T.D., and Morehouse L.G. (eds) Mycotoxin fungi, Mycotoxins, Mycotoxicosis. *An. Encyclopedic Handbook, New York: Marcel Decker,* **2:260-265**.
- ❖ Lafarge C and Frayssinet C. (1970). The reversibility of inhibition of RNA and DNA synthesis induced by aflatoxin in rat liver. A tentative explanation for carcinogenic metabolism. *Int. J. Cancer* **6**: 74-83.
- ❖ Langseth W., Nymoer U., Bergsjø B. (1991). Ochratoxin A in plasma of norwegian swine determined. by an HPLC column-switching method. *Natural Toxin* **1**, 216-221.
- ❖ Lanza, G.M., Washburn, K.W., Wyatt, R.D. (1980). Variation with age in response of broilers to aflatoxin. *Poult. Sci.* **59**: 282-288.

- ❖ Laurent D., Pellegrin F., Kholer F., Costa R., Thevenon J., Lambert C., and Huerre M. (1989). Fumonisin B₁ in equine leucoencephalomalacia pathogenesis. *Microbiol. Aliment. Nutr.* **7**: 285-291.
- ❖ Lautraite S., Rio B., Guinard J., and Parent-Massin (1997). In vitro effects of diacetoxyscirpenol (DAS) on human and rat granulo-monocytic progenitors. *Micopath.* **140**: 59-64.
- ❖ Lea T., Steien K. And Störmer F. (1989). Mechanism of ochratoxin A-induced immunosuppression. *Mycopathologia* **107**: 153-159.
- ❖ Ledoux D.R., Brown T.P., Weibking T.S. and Rottinghaus G.E. 1992. Fumonisin toxicity in broiler chicks. *J Vet Diagn Invest* **4**: 330-333.
- ❖ Leeson S., Diaz G.J. and Summers J.D. (1995). Poultry metabolic disorders and mycotoxins. *University Books, Guelph, Ontario, Canada*, pp. 326-332.
- ❖ Lim C.W., Parker H.M., Vesonder R., Haschek W.M. (1996). Intravenous fumonisin B₁ induces cell proliferation and apoptosis in the rat. *Natural Toxins* **4**: 34-41.
- ❖ Lin J.K. Kennan K.A., Miller E.C., Miller J.A. (1978). Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent formation of 2,3-dihydro-2,3 dihydroxy aflatoxin B₁ by hepatic microsomes. *Cancer Res.* **38**: 24-28.
- ❖ Loveland P.M., Sinnhuber R.O., Berggren K.E., Libbey L.M., Nixon J.E., and Pawlowski N.E. (1977). Formation of aflatoxin B₁ from aflatoxinol by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) liver in vitro. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **16**: 167-170.
- ❖ Lühe A., Hildebrand H., Bach U., Dingermann T., Ahr H.J., (2003). A new approach to studying ochratoxin (OTA)-induced nephrotoxicity: expression and profiling in vivo and in vitro employing cDNA microarrays. *Toxicol. Sci.* **73**: 315-328.
- ❖ Lusky K., Tesch D. Göbel R. and Döberschütz K.D. (1994). Ochratoxin A Untersuchungen zum Rückstandsverhalten beim Schwein und daraus hergestellten Lebensmitteln. *Fleischwirtschaft* **74**: 558-560.
- ❖ Luster M.I., Germolec D.R., Burleson G.R., Jameson C.W., Ackermann M.F., Lamm K.R and Hayes H.T. (1987). Selective immunosuppression in mice of natural killer cell activity by ochratoxin A. *Cancer Research* **47**: 2259-2263.
- ❖ Maaroufi K., Achour A., Hammami M., el May M., Betbeder A.M., Ellouz F., et al., (1995a). Ochratoxin A in human blood in relation to nephropathy in Tunisia. *Hum. Exp. Toxicol.* **14**: 609-614.

- ❖ Maaroufi K., Achour A., Betbeder A.M., Hammami M., Ellouz F., Creppy E.E. et al., (1995b). Foodstuffs and human blood contamination by the mycotoxin ochratoxin A: correlation with chronic interstitial nephropathy in Tunisia. *Arch Toxicol* **69**: 552-558.
- ❖ Malaveille C., Brun G. and Bartsch H. (1994). Structure-activity studies in *E. coli* strains on ochratoxin A (OTA) and its analogues implicate a genotoxic free radical and cytotoxic thiol derivate as reactive metabolites. *Mutat. Res.* **307**: 141-147.
- ❖ Manning, R.O. and Wyatt, R.D. (1984). Effect of cold acclimation of broiler chicks on susceptibility to acute aflatoxicosis. *Poult. Sci.* **63**: 24S.
- ❖ Manolova Y., Manolov L., Parvanova L., Petkova-Bocharova M., Castegnaro M. and Chernozemsky I.N. (1990). Induction of characteristic chromosomal aberration, particularly X-trisomy, in cultured human lymphocytes treated by ochratoxin A, a mycotoxin implicated in Balkan endemic nephropathy. *Mutat. Res.* **292**: 143-149.
- ❖ Marasas W.F., Kellerman T.S., Gelderblom W.C., Pienaar J.G. and Naude T.W. (1976). Leukoencephalomalacia: a mycotoxicosis of equidae caused by *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **43**: 113-122.
- ❖ Marasas W.F., Kellerman T.S., Gelderblom W.C., Coetzer J.A., Thiel P.G., van der Lugt J.J. (1988). Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **55**: 197-203.
- ❖ Marasas W.F.O. (1991). Toxigenic Fusaria. In: Smith J.E., Anderson, R.A (Eds.), *Mycotoxins and Animal Foods*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 119-139.
- ❖ Marasas W.F.O. (1995). Fumonisin: their implication for human and animal health. *Nat. Toxins* **3**: 193-198.
- ❖ Marley E.C., Nicol W.C., Candlish A.A.G., (1995). Determination of ochratoxin A by immunoaffinity column clean-up and HPLC in wheat and pig liver. *Mycotoxin Res.* **11**, 111-116.
- ❖ Marquardt R.R., and Frohlich, A.A. (1992) A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J. Anim. Sci.* **70**, 3968-3988.
- ❖ Masri M.S., Garcia V.C., Page J.R., (1969). The aflatoxin M₁ content of milk from cows fed known amounts of aflatoxin. *Vet. Rec.* **84**: 146-147.
- ❖ Masri M.S., Lundin R.E., Page J.R., and Garcia V.C. (1967). Crystalline aflatoxin M₁ from urine and milk. *Nature (London)*. **215**: 753-755.

- ❖ Masimango N., Remacle J., Ramaut J. (1978). The role of adsorption in the elimination of aflatoxin B₁ from contaminated media. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **6: 101-105.**
- ❖ Mathur S., Constable P.D., Eppley R.M., Waggoner A.L., Tumbleson M.E. and Haschek W.M. (2001). Fumonisin B-1 is hepatotoxic and nephrotoxic in milk-fed calves. *Toxicol Sci* **60:385-396.**
- ❖ McNutt S.H., Purwin P. and Marray C. (1928). Vulvovaginitis in swines. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **73: 484.**
- ❖ Mekey F.A., Turner P.C., Ashcroft A.E., Miller J.D., Qiao Y.L., Roth M.J., Wild C.P. (2003). Development of a urinary biomarker of human exposure to deoxynivalenol. *Food and Chemical Toxicology* **41: 265-273.**
- ❖ Meneghini R. and Schumacher R.I. (1977). Aflatoxin B₁ a selective inhibitor of DNA synthesis in mammalian cells. *Chem. Biol. Interact.* **18: 267-276.**
- ❖ Merkow L.P., Epstein S.M., Slifkin M. and Pardo M. (1973). The ultrastructure of renal neoplasm induced by aflatoxin B₁. *Cancer Res.* **33: 1608-1614.**
- ❖ Merrill A.H. Jr., Wang E., Mullins R.E., Jamison W.C.L., Nimkar S., Liotta C. (1998). Quantitation of free sphingosine in liver by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **171: 373-381.**
- ❖ Merrill A.H., van Echten G., Wang E. and Sandhoff K. (1993a). Fumonisin B₁ inhibits sphingosine N acyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis in cultured neurons in situ. *J. Biol. Chem.* **268: 27299-27306.**
- ❖ Merrill A.H., Wang E., Gilchrist D.G., and Riley R.T. (1993b). Fumonisin and other inhibitors of de novo sphingolipid biosynthesis. *Adv. Lipid Res.* **26: 215-234.**
- ❖ Mertens D.R. (1977). Biological effect of mycotoxins upon rumen function in lactating dairy cows. In: "Interactions of Mycotoxins in Animal Production. *National Academy of Sciences, Washington D.C.* pp **118-136.**
- ❖ Michelle McLean., and Michael F. Dutton (1995). Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: An update. *Pharmac. Ther.* **65: 163-192.**
- ❖ Miller D.M., Wilson D.M., Wyatt R.D., McKinney J.K., Crowell W.A. Stuart B.P. (1982). High performance liquid chromatographic determination and clearance time of aflatoxin residues in swine tissues. *J. Assoc. Off. Anal Chem.* **65: 1-4.**
- ❖ Miller, J.D. (1995). Fungi and mycotoxin in grain: implication for stored product research. *Pergamon J. Stored. Prod. Res.* **1: 1-16.**

- ❖ Miller, J.D. (1994). Epidemiology of *Fusarium* ear diseases. In *Mycotoxins Grain* (Edited by Miller J.D. and Trenholm H.L.). *Eagan Press, St Paul Mn* **pp 19-36**.
- ❖ Miller J.A., Miller E.C. (1977). Ultimate chemical carcinogen as reactive mutagenic electrophiles. In: Hiat H.H., Watson J.O., Winsten J.A. (Eds). *Origin of human Cancer. Cold Spring Harbour, Spring Harbour*. **pp 605-667**.
- ❖ Minervini F., Monaci L., Montagna M.T., Dragoni I., and Visconti A. (2000). On the occurrence of aflatoxin M and and toxigenic fungi in sheep and goat dairy products collected from southern Italy. *Proc 14th Natl. Congr. Società Italiana di Patologia e allevamento degli Ovini e dei Caprini. Vietri sul Mare, Salerno Italy*. **pp 144-145**.
- ❖ Miraglia M., De Dominicis A., Brera C., Corneli S., Cava E., Menghetti E., Miraglia E. (1995). Ochratoxin A levels in human milk and related food samples: an exposure assessment. *Natural Toxins* **3, 436-444**.
- ❖ Mirocha C.J., Harrison J., Nichols A.A. and McClintock M. (1968). Detection of fungal estrogen (F-2). In hay associated with infertility in dairy cattle. *Appl. Microbiol.* **16: 797-798**.
- ❖ Mirocha C.J., Pathre S.V. and Christensen C.M. (1974). Zearalenone. *In J.V.* **pp 345-364**.
- ❖ Mirocha C.J., Pathre S.V., Christensen C.M. (1977). Zearalenone. In: Rodricks J.V., Hesseltine C.W., Mehlman , M.A. (Eds), *Mycotoxin in Human and Animal Health. Pathox Pub, Park Forest South, IL* **pp 345-364**.
- ❖ Mirocha C.J., Schauerhamer B., Christensen C.M., Niku-Plavola M.L. and Nummi M. (1979). "Incidence of Zearalenone in animal feed." *Appl. Environ. Microbiol.* **38: 749**.
- ❖ Mirocha C.J., Pathre S.V., Robinson T.S. (1981). Comparative metabolism of zearalenone and trasmission into bovine milk. *Food and cosmetics Toxicology.* **19: 25-30**.
- ❖ Mižáková A., Pipová M. and Turek P. (2001). The occurrence of moulds in fermented raw meat products. *Czech J. Food Sci.* **20: 89-94**.
- ❖ Moore M.R., Pitot H.C., Miller E.C., Miller J.A. (1982). Cholangio-cellular carcinomas induced in syrian golden hamster administered aflatoxin B1 in large doses. *J. National Cancer Inst.* **68: 271-278**.
- ❖ Moran E.T., Jr., Hunter D.B., and Young L.R. (1982a). Effect of vomitoxin contaminated corn on poultry production. *Proc. Maryland Nutr. Conf.* **61-65**.

- ❖ Moran E.T., Jr., Hunter D.B., Ferket P., Young L.R. and McGirr L.G. (1982b). High tolerance of broilers to vomitoxin from corn infected with *Fusarium graminearum*. *Poultry Sci.* **61**: 1828-1831.
- ❖ Mori H., Kawai K., Ohbayashi F., Kuniyasu T., Yamasaki M., Hamasaki T. and Williams G.M. (1984). Genotoxicity of a variety of mycotoxins in the hepatocyte primary culture/DNA repair test and mouse hepatocytes. *Cancer Res.* **44**: 2918-2923.
- ❖ Motelin G.K. Haschek W.M. Ness D.K. Hall W.F. Harlin K.S. Schaeffer D.J. and Beasley V.R. (1994). Temporal and dose- response features in swine fed corn screenings contaminated with fumonisin mycotoxins. *Mycopathologia*, **126**: 27- 40.
- ❖ Moss M.O. (1991). The environmental factors controlling mycotoxin formation. In: Smith, J.E., Anderson, R.A. (Eds.) *Mycotoxin and Animals Foods*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 37-56.
- ❖ Müller G., Kielstein P., Rosner H., Berndt A., Rosner H. (1995). Studies on the influence of ochratoxin A on immune and defense reactions in the mouse model. *Mycoses* **38**, 85-91.
- ❖ Muller H.M., Reimann J., Schumacher U., Schwadorf K. (1998). Natural occurrence of Fusarium toxins in oats harvested during five years in an area of southwest Germany. *Food and Additives Contaminants* **15**: 801-806.
- ❖ Mumpton F.A. and Fishman P.H. (1977). The application of natural zeolites in animal sciences and aquaculture. *J. Anim. Sci.* **45**: 1188-1203.
- ❖ Murphy P.A., Hendrich S., Hopmans E.C., Hauck C.C., Lu Z., Buseman G. (1996). Effect of processing fumonisin content of corn. *Advances in Experimental and Medicine Biology*, **392**: 323-334.
- ❖ Nagata T., Suzuki H., Ishigami N., Shinozuka J., Uetsuka K., Nakayama H., Doi K., (2001). Development of apoptosis and changes in lymphocyte subsets in thymus, mesenteric lymph nodes and Peyer's patches of mice orally inoculated with T-2 toxin. *Exp. Toxicol. Pathol.* **53**: 309-315.
- ❖ Neiger R.D., Johnson T.J., Hurley D.J., Higgins K.F., Rottinghaus G.E., Stahr H (1994). The Short-Term Effect of Low Concentrations of Dietary Aflatoxin and T-2 Toxin on Mallard Ducklings. *Avian Diseases* **38**:738-743.
- ❖ Nesheim S., Stack M.E., Trucksess M.W., Eppley R.M., and Krogh P. (1992). Rapid solvent-efficient method for liquid chromatographic determination of ochratoxin A in corn, barley and kidney: collaborative study. *J. of AOAC International.* **75**: 481-487.

- ❖ Newberne P.M., Butler W.M. (1969). Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals: a review. *Cancer Res.* **29**: 236-250.
- ❖ Newberne P.M. and Rogers A.M. (1973). Rat colon carcinomas associated with aflatoxin and marginal vitamin A. *J. Natl. Cancer Inst.* **50**: 439-448.
- ❖ Newberne P.M. e Suphakarn V. (1977). Preventative role of vitamin A in colon carcinogenesis in rats. *Cancer* **40**: 2553-2556.
- ❖ Norred W.P., Wang E., Yoo H., Riley R.T. and Merrill A.H. (1992). In vitro toxicology of fumonisins and the mechanistic implications. *Mycopathologia* **117**:73-78.
- ❖ Norred W.P. (1993). Fumonisin: mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *J. Toxicol. Environ. Health* **38**: 309-328.
- ❖ Norred W.P., Bacon C.W., Porter J.K. and Voss K.A. (1990). Inhibition of protein synthesis in rat primary hepatocytes by extracts of *Fusarium moniliforme* contaminated corn. *Food Chem. Toxicol.* **28**: 89-94.
- ❖ Obrecht-Pflumio S and Dirheimer G. (2000). In vitro DNA and dGMP adducts formation caused by ochratoxin A. *Chmico-Biological Interactions.* **127**: 29-44.
- ❖ Oberheul D.G. and Dabbert C.B. (2001). Aflatoxin production in supplemental feeders provided for northern bobwhite in texas and oklahoma. *Journal of Wildlife Diseases,* **37**: 475–480.
- ❖ Olsen M., Pettersson H., Sandholm K. and Kiessling K.H. (1985). Quantitative liquid chromatographic method using fluorescence detecton for determining zearalenone and its metabolites in blood plasma and urine. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **68**: 632-635.
- ❖ Olsen, M.; Mirocha, C.J.; Abbas, H.K. and Johansson, B. (1986). Metabolism of high concentrations of dietary zearalenone by young male turkey poults. *Poult. Sci.* **65**: 1905-1910.
- ❖ Omar R.F., Hasinoff B.B., Mejilla F. and Rahimtula A.D. (1990). Mechanism of ochratoxin A stimulated lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* **40**: 1183-1191.
- ❖ Omar R.F., Rahimtula A.D. and Bartsch H. (1991). Role of cytochrome P-450 in ochratoxin A-stimulated lipid peroxidation. *J. Biochem. Toxicol.* **6**: 203-209.
- ❖ Onji Y., Dohi Y., Aoki Y., Moriyama T., Nagami H., Uno M., Tanaka T., Yamazoe Y. (1989). Deepoxynivalenol: A new metabolite of nivalenol found in the excreta of orally administered rats. *J. of Agricultural and Food Chemistry.* **37**: 478-481.

- ❖ Orti D.L., Hill R.H., Liddle J.A., Needham L.L. Vickers L. (1986). High performance liquid chromatography of mycotoxin metabolites in human urine. *J. Anal. Toxicol.* **10: 41-45.**
- ❖ Ostrý V. (2001). Výskut plisni v mase a masných výrobcich (I). *Vliv na zdravi človeka. Maso*, **12: 20-24.**
- ❖ Osweiler G.D., Kehrl E., Stabel J.R., Thurston J.R., Ross P.F. and Wilson T.M. (1992). Effects of fumonisin-contaminated corn screenings on growth and health of feeder calves. *J. Anim. Sci.* **71: 459-466.**
- ❖ Özpınar H., Augonnyte G., Drochner W. (1999). Inactivation of ochratoxin in ruminal fluid with variation of pH-value and fermentation parameters in an in vitro system. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* **7: 1-9.**
- ❖ Pace, J.G., Watts, M.R., Burrows, E.P., Dinterman, R.E., Matson, C., Hauer, E.C. & Wannemacher, R.W., Jr (1985) Fate and distribution of ³H labeled T-2 mycotoxin in guinea pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **80: 377–385.**
- ❖ Page R.K., Stewart G., Wyatt R., Bush P., Fletcher O.J., Brown J. (1980). Influence of low levels of ochratoxin A on egg production, egg-shell stains, and serum uric-acid levels in Leghorn-type hens. *Avian Disease.* **24: 777-780.**
- ❖ Palyusik M and Karlic-Kovacs E. (1975). Effect on laying geese of feeds containing the fusariotoxins T-2 and F-2. *Acta Vet. Acad Sci Hung.* **25:363.**
- ❖ Patterson D.S.P. and Anderson P.H. (1982). Recent aflatoxin feeding experiments in cattle. *Vet. Rec.* **110: 60-61.**
- ❖ Patterson D.S.P., Matthews J.G., Shreeve B.J., Roberts B.A., McDonald S.M. and Hayes A.W. (1979). The failure of trichothecene mycotoxins and whole cultures of *Fusarium tricinctum* to cause experimental haemorrhagic syndromes in calves and pigs. *Vet. Rec.*, **105: 252–253.**
- ❖ Patterson D.S.P., Shreeve B.J., Roberts B.A., Berrett S., Brush P.J., Glancy, E.M. and Krogh P. (1981). Effect on calves of barley naturally contaminated with ochratoxin A and groundnut meal contaminated with low concentrations of aflatoxin B₁. *Res. vet. Sci.*, **31: 213-218.**
- ❖ Patterson R., Young L.G. (1993). Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicates, screening and dilution in reducing the effects of mold contaminated corn in pigs. *Can. J. Anim. Sci.* **73: 615-624.**
- ❖ Paulsch W.E., Van Egmond H. P., Schuller P.L. (1982). Proc. V. Int. JUPAC Symposium Mycotoxins and Phycotoxins. **pp. 40.**

- ❖ Paucod J.C., Krivobok S., and Vidal D. (1990). Immunotoxicity testing of mycotoxins T-2 and patulin on BALB/c mice. *Acta Microbiologica Hungarica* **37: 331-339.**
- ❖ Pavlović M., Pleština R., Krog P. (1979). Ochratoxin A contamination on foodstuffs in an area with Balkan (endemic) nephropathy. *Acta Pathol Microbiol Scand* **87: 243-246.**
- ❖ Pellegrin F., Laurent D., Kholer F., Sauviat M.P., and Platzer N. (1990). Corn fusarium associated with equine leucoencephalomalacia. *Microbiol. Aliment. Nutr.* **8: 249-256.**
- ❖ Peraica , M., Radic, B., Lucic, A., Pavlovic, M. (1999). “Toxic effect of mycotoxins in humans”. *Bull. World Health Organ.*, **77: 754-66.**
- ❖ Periera M.A., and Chang L.W. (1981). Binding of chemical carcinogens and mutagens to rat hemoglobin. *Chem. Biol. Interactions* **33, 301-305.**
- ❖ Pestka J.J., and Bondy G.S. (1990). Alteration of immune function following dietary mycotoxin exposure. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **68: 1009-1016.**
- ❖ Pestka J.J., and Bondy G.S. (1994). Immunotoxic effects of mycotoxins. In: *Mycotoxin in Grain. Compounds Other Than Aflatoxin.* pp **339-358.**
- ❖ Pestka J.J., and Dong W. (1994). Progressive serum IgE elevation in the B6C3F1 mouse following withdrawal of dietary vomitoxin (deoxynivalenol). *Fundam. Appl. Toxicol.* **23: 314-316.**
- ❖ Petkova-Bocharova T., Castegnaro M. (1985). Ochratoxin A contamination of cereals in an area of high incidence of Balkan endemic nephropathy in Bulgaria. *Food Addit Contam* **2: 267-270.**
- ❖ Petkova-Bocharova T., Chernozemsky I.N., Castegnaro M. (1988). Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria. *Food Addit Contam* **5: 299-301.**
- ❖ Pettersson H., Kiessling K.H., Cisluck P. (1982). Degradation of ochratoxin A in rumen. *V International Symposium on Mycotoxins and Phytotoxins. Vienna, Austria.* pp **313-316.**
- ❖ Pfohl-Leskowicz A., Grosse Y., Kane A., Creppy E.E. and Dirheimer G. (1993). Differential DNA adduct formation and disappearance in three mouse tissue after treatment with the mycotoxin ochratoxin A. *Mutat. Res.* **289: 265-273.**
- ❖ Pfohl-Leskowicz A., Petkova-Bocharova T., Chernozemsky I.N., Castegnaro M. (2002). Balkan endemic nephropathy and the associated urinary tract tumours: review

- on etiological causes, potential role of mycotoxin. *Food Additives and Contaminants*. **5: 299-301.**
- ❖ Pienar J.G., Kellerman T.S., and Marasa W.F.O (1981). Field outbreaks of leukoencephalomalacia in horses consuming maize infected by *Fusarium verticillioides* in South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **52: 21-24.**
 - ❖ Pier A.C., Heddleston K.L., Cysewski S.J. and Patterson J.M. (1972). Effect of aflatoxin on immunity in turkeys. II. Reversal of impaired resistance to bacterial infection by passive supplementation. *Avian Dis.* **16: 381-387.**
 - ❖ Pier A.C. (1973). An overview of the mycotoxicoses in domestic animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **163: 1259-1261.**
 - ❖ Pier A.C., Fitchner R.E. and Cysewski S.J. (1977). Effects of aflatoxin on the cellular immune system. *Ann. Nutr. Aliment.* **31: 781-787.**
 - ❖ Pier A.C., Richard J.L. and Thurston J.R. (1980). Effects of mycotoxins on immunity and resistance of animals. In: *Natural Toxin Eaker D and Wadström T. (eds) Pergamon Press Oxford New York, Toronto Sydney Paris, Frankfurt.* **pp 691-699.**
 - ❖ Pier A.C. and McLoughlin M.E. (1985). Mycotoxic suppression of immunity. In: *Trichothecenes and other Mycotoxins Lacey J. (ed) John Wiley and Sons, Chichester.* **pp 507-519.**
 - ❖ Pier A.C. (1986). Immunomodulation in aflatoxicosis. In: *Diagnosis of Mycotoxicoses Richard J.L., and Thurston J.R. (eds) Martinus Nijhoff Publishers, Boston.* **pp 143-147.**
 - ❖ Pier A.C., Varman M.J., Dahlgren R.R., Belden E.L. and Maki L.R. (1986). Aflatoxin suppression of cell mediated immune response and interaction with T-2 toxin. In: *Mycotoxin and Phycotoxins Steyn P.S., and Vleggaar R (eds). Elsevier Scientific Publishers, Amsterdam.* **pp 423-434.**
 - ❖ Pier A.C.(1992). Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. *J. Anim. Sci.* **70: 3964-3967.**
 - ❖ Pitt J.I., Hocking A.D., Bhudhasamai K. Miscamble B.F., Wheeler, K.A., Tanboon Ek.P. (1993). The normal mycoflora of commodities from thailand. 1. Nuts and oilseed. *Int. J. Food Microbiol.* **20: 221-226.**
 - ❖ Pleština R., Čeović S., Gatenbeck S., Habazin-Novak V., Hult K., Hokby E et al., (1990). Human exposure to ochratoxin A in areas of Yugoslavia with endemic nephropathy. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **10: 145-148.**

- ❖ Prelusky Dan B., Savard Marc. E. and Locksley Trenholm H. (1995). Pilot study on the plasma pharmacokinetics of Fumonisin B1 in cows following a single dose by oral gavage or intravenous administration. *Natural Toxins* **3:389-394**.
- ❖ Pollmann D.S., Koch B.A., Seitz L.M., Mohr H.E. and Kennedy G.A. (1985). Deoxynivalenol-contaminated wheat in swine diets. *J. of Anim. Sci.* **60:239-247**.
- ❖ Potchinsky M.B and Bloom S.E. (1993). Selective aflatoxin B₁-induced sister chromatid exchanges and cytotoxicity in differentiating B and T lymphocytes in vivo. *Environ. Molec. Mutagen.* **21: 87-94**.
- ❖ Prelusky, D. B.; Hamilton, R.M.; Trenholm, H. L.; Miller, J. D., (1986). Tissue distribution and excretion of radioactivity following administration of ¹⁴C-labeled deoxynivalenol to White Leghorn hens. *Fund. Appl. Toxicol.* **7: 635-645**.
- ❖ Prelusky D.B., Veira D.M., Trenholm H.L., Foster B.C., (1987). Metabolic fate and elimination in milk, urine and bile of deoxynivalenol following administration to lactating sheep. *Journal of Environmental Science and Health* **22: 125-148**.
- ❖ Prelusky D.B., Hartin K.E., Trenholm H.L., Miller J.D. (1988). Pharmacokinetic fate of [¹⁴C]-labeled deoxynivalenol in swine. *Fundamental and Applied Toxicology* **10: 276-286**.
- ❖ Prelusky DB, Trenholm HL, Savard ME. Pharmacokinetic fate of ¹⁴C-labelled fumonisin B1 in swine (1994). *Nat Toxins* **2:73–80**.
- ❖ Prelusky DB, Miller JD, Trenholm HL (1996a). Disposition of ¹⁴C-derived residues in tissues of pigs fed radiolabelled fumonisin B1. *Food Addit Contam* **13:155–162**.
- ❖ Prelusky D.B., Trenholm H.L., Rotter B.A., Miller J.D., Savard M.E., Yeung J.M. and Scott P.M. (1996b). Biological fate of fumonisin B1 in food-producing animals. *Advances in Exp. Med. and Biol.* **392: 265-278**.
- ❖ Prior M.G. and Sisodia C.S. (1982). The effects of ochratoxin A on the immune response of Swiss mice. *Canadian Journal of Comparative Medicine* **46: 91-96**.
- ❖ Pong R.S. and Wogan G.N. (1970). Time course dose-response characteristics of aflatoxin B₁. Effects on rat liver RNA polymerase and ultrastructure. *Cancer Res.* **30: 294-304**.
- ❖ Puntarić D., Bošnjir J., Šmit Z., Škes I., Baklajić Z. (2001). Ochratoxin A in corn and wheat: Geographical association with Endemic Nephropathy. *Croatian Medical Journal Public Health* **42: 175-180**.
- ❖ Radostits O.M., Blood D.C. and Gay C.C. (1994). "Veterinary medicine." 8th ed. *W.B. Saunders Co., Ltd London pp1604-1605*.

- ❖ Rahimtula A.D., Bereziat J.C., Bussacchini-Griot V. and Bartsch H. (1988). Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity. *Biochem. Pharmacol.* **37: 4469-4477.**
- ❖ Ramos A.J., Hernandez E. (1996). In vitro aflatoxin adsorption by means of a montmorillonite silicate. A study of adsorption isotherms. *Anim. Feed Sci. Technol.* **62: 263-269.**
- ❖ Ramos A.J., Hernandez E. (1997). Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs. *A review Anim. Feed Sci. Technol.* **65: 197-206.**
- ❖ Razzazi-Fazeli E., Böhm J., Jarukamjorn K., Zentek J. (2003). Simultaneous determination of major B-trichothecenes and the-epoxy-metabolite of deoxynivalenol in pig urine and maize using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. of Chromatography B* **796: 21-23.**
- ❖ Reddy R.V., Taylor M.J., and Sharma .R.P. (1987). Studies of immune fuction of CD-1 mice exposed to aflatoxin B₁. *Toxicology* **43: 123-132.**
- ❖ Rheeder J.P., Marasas W.F.O., Thiel P.G., Sydenham E.W., Shephard G.S. and Van Schalkwyk D.J. (1992). *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology* **82: 353-357.**
- ❖ Rice L.G. and Ross P.F. (1994). Methods for detection and quantification of fumonisins in corn, cereal products and animal excreta. *J. of Food Prot.* **57: 536-540.**
- ❖ Richard J.L., Thurston J.R. and Pier A.C. (1978). Effects of mycotoxins on immunity. In: *Toxins, Animals, Plant, and Microbial.* **pp 801-817.**
- ❖ Richard J.L., Meerdink G., Maragos C.M., Tumbleson M., Bordson G., Rice L.G. and Ross P.F. (1996). Absence of detectable fumonisins in the milk of cows fed *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg culture material. *Mycopathologia* **133:123-126.**
- ❖ Riley R.T.; An N.H., Showker J.L., Yoo H.S., Norred W.P., Chamberlain W.J., Wang E., Merrill A.H.Jr., Motelin G., Beasley V.R. and Haschek W.M. (1993a). Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: An early biomarker of exposure to fumonisin- containing feeds in pigs. *Toxicol. Appl. Pharamacol.*, **118: 105-112.**
- ❖ Riley R.T.; Hinton D.M., Chamberlain W.J., Bacon C.W., Merrill A.H., Voss K.A. (1993b). Fumonisin inhibition of sphingolipid biosynthesis: A new mechanism of nephrotoxicity. *Toxicologist Abstr.* **13: 133.**

- ❖ Riley R.T., Hinton D.M., Chamberlain W.J., Bacon C.W., Wang E., Merrill A.H. Jr, Voss K.A. (1994a). Dietary fumonisin B1 induces disruption of sphingolipid metabolism in Sprague-Dawley rats: a new mechanism of nephrotoxicity. *J Nutr* **124:594–603**.
- ❖ Riley R.T., Voss K.A., Yoo K.S., Gelderblom W.C.A., Merrill A.H. (1994b). Mechanism of fumonisin toxicity and carcinogenesis. *J. Food Prot.* **57: 528-535**.
- ❖ Riley R.T., Wang E., Merrill A.H. Jr, (1994c). Liquid chromatographic determination of sphinganine and sphingosine: Use of the free sphinganine-to-sphingosine ratio as biomarker for consumption of fumonisins. *J. AOAC. Int.* **77:533-540**.
- ❖ Riley R.T., Showker J.L., Owens D.L., Ross P.F. (1997). Disruption of sphingolipid metabolism and induction of equine leukoencephalomalacia by *Fusarium proliferatum* culture material containing fumonisin B₂ or B₃. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* **3: 221-228**.
- ❖ Rizzo A.F., Atroshi F., Hirvi T., Saloniemi H. (1992). The hemolytic activity of deoxynivalenol and T-2 toxin. *Natural Toxins* **1: 106-110**.
- ❖ Robert D.S. and Shotwell O. (1981). Determination of aflatoxin A in animal tissues. *J. Assoc. Chem.* **64: 964-968**.
- ❖ Robison, T.S., Mirocha, C.J., Kurtz, H.J., Behrens, J.C., Weaver, G.A. & Chi, M.S. (1979a) Distribution of tritium labeled T-2 toxin in swine. *J. Agric. Food Chem.*, **27: 1411–1413**.
- ❖ Robison, T.S., Mirocha, C.J., Kurtz, H.J., Behrens, J.C., Chi, M.S., Weaver, G.A. & Nystrom, S.D. (1979b) Transmission of T-2 toxin into bovine and porcine milk. *J. Dairy Sci.*, **62: 637–641**.
- ❖ Rodricks J.V. and Stolof L. (1977). In *Mycotoxins in human and animal health*, J.V. Rodricks, C.W. Hesseltine, & M.A. Mehlman (Eds), Pathotox Publisher, Inc., Park Forest South, IL, **pp 67-79**.
- ❖ Roine K., Korpinen E.I. and Kallela K. (1971). Mycotoxicosis as a probable cause of infertility in dairy cows. *Nord Vet. Med.* **23: 628-633**.
- ❖ Romer T.R. (1983). *Feedstuffs.* **11: 30-31**.
- ❖ Rosenstein Y., Lafarge F. (1983). Inhibitory effect of fusarium T2-toxin on lymphoid DNA and protein synthesis. *Toxicology and Applied Pharmacology* **70: 283-288**.
- ❖ Ross P., Rice L.G., Plattner R.D., Osweiler G.D., Wilson T.M., Owens D.L., Nelson P.E. and Richard J.L. (1991a). Concentrations of fumonisin B1 in feeds associated with animal health problems. *Mycopathologia* **114: 129-135**.

- ❖ Ross P., Rice L.G., Reagor J.C., Osweiler G.D., Wilson T.M., Nelson P.E., Owens D.L., Plattner R.D., Harlin K.A., Richard J.L., Colvin B.M and Banton M.I. (1991b). Fumonisin B₁ concentration in feeds from 45 confirmed equine encephalomalacia cases. *J. Vet. Diagn. Invest.* **3**: 238-241.
- ❖ Ross P., Ledet A.E., Owens D.L., Rice L.G., Nelson H.A., Osweiler G.D., and Wilson T.M. (1993). Experimental equine leukoencephalomalacia, toxic hepatothosis and encephalopathy caused by corn naturally contaminated with fumonisin. *J. Vet. Diagn. Invest.* **5**: 69-74.
- ❖ Rother J., van Echten G., Schwartzman G. and Sandhoff K. (1992). Biosynthesis of sphingolipids: dihydroceramide and not sphinganine is desaturated by cultured cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**: 14-20.
- ❖ Rotter B.A., Thompson B.K., Lessard M., Trenholm H.L. and Tryphonas H. (1994). Influence of low-level exposure to *Fusarium* mycotoxin on selected immunological and hematological parameters in young swine. *Fundam. Appl. Toxicol.* **23**:117-124.
- ❖ Rotter B.A., Prelusky D.B., Petska J.J. (1996a). Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J. Toxicol. Environ. Health* **48**: 1-34.
- ❖ Rotter B.A., Thompson B.K., Prelusky D.B., Trenholm H.L., Stewart B., Miller J.D. and Savard M.E. (1996b). Response of growing swine to dietary exposure to pure fumonisin B₁ during an eight- week period: Growth and clinical parameters. *Nat. Toxins.*, **4**: 42-50.
- ❖ Roy A.K. (1968). Effects of aflatoxin B₁ on polysomal profiles and RNA Synthesis in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* **169**: 206-211.
- ❖ Rotter B.A., Thompson B.K., Prelusky D.B., Trenholm H.L., Stewart B., Miller J.D., Savard M.E. (1996). Response of growing swine to dietary exposure to pure fumonisin B₁ during an eight-week period: growth and clinical parameters. *Nat Toxins* **4**:42–50.
- ❖ Rutqvist L., Björklund N.E., Hult K., Hökby E. and Carlsson B. (1978). Ochratoxin A as the cause of spontaneous nephropathy in fattening pigs. *Applied and Environmental Microbiolog*, **36**: 920-925.
- ❖ Sabbioni G. and Wild C.P. (1991). Identification of an aflatoxin G₁-serum albumin adduct and its relevance to the measurement of human exposure to aflatoxin. *Carcinogenesis*. **12**: 97-103.

- ❖ Sabbioni G., Ambs S., Wogan G.N., and Groopman J.D. (1990). The aflatoxin-lysine adduct quantified by high-performance liquid chromatography from human serum albumin samples. *Carcinogenesis* **11**: 2063-2066.
- ❖ Sabbioni G., Skipper P.L., Büch G., and Tannebaum S.R. (1987). Isolation and characterization of the major serum albumin adduct formed by aflatoxin B₁ *in vivo* in rats. *Carcinogenesis* **vol 8 no. 6**; 819-824.
- ❖ Salhab A.S., and Edwards G.S. (1977). Comparative *in vitro* metabolism of aflatoxin by liver preparations from animals and humans. *Cancer Res.* **37**: 1016-1021.
- ❖ Salunkhe D.K., Adsule R.N. and Padule D.N. (1987). Aflatoxins in foods and feeds. *Metropolitan Book Co., New Delhi*, pp.510.
- ❖ Sargeant, K.C.R.B.A.A.R. (1963). Chemistry and origin of aflatoxins, *Chemical Ind. London*, pp 53-55.
- ❖ Sassahara M., Pontes Netto D., Yanaka E.K. (2005). Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M₁ in raw milk in the North of Paraná State. *Food and Chem. Toxicol.* **43**: 981-984.
- ❖ Saunders F.C., Barker E.A. and Smuckler E.A. (1972). Selective inhibition of nucleoplasmic rat liver-dependent RNA polymerase by aflatoxin B₁. *Cancer Res.* **32**: 2487-2494.
- ❖ Saur, L. (1991). Recherche de géniteurs de résistance a la fusariose de l'épi causée par *Fusarium culmorum* chez le blé et les espèces voisines. *Agronomie* **11**: 535-541.
- ❖ Sawhney D.S.; Vadehra D.V., and Baker R.C. (1973a) Aflatoxicosis in the laying Japanese quail. *Poult. Sci.* **52**: 485-493.
- ❖ Sawhney D.S.; Vadehra D.V. and Baker R.C. (1973b) The metabolism of ¹⁴C aflatoxins in laying hens. *Poult. Sci.* **52**: 1302-1309.
- ❖ Schaafsma, A.W., Miller, J.D., Savard, M.E., Ewing, R.J. (1993). Ear rot development and mycotoxin production in corn in relation to inoculation method, corn hybrid and species of *Fusarium*. *Can. J. Plant Pathol.* **15**: 185-192.
- ❖ Scheuer R., Dietrich R., Maertlbauer E., Gareis M., (1997). Proceedings of the 19th Mycotoxin-Workshop. *Munich June* p.142.
- ❖ Scheuer R., (1989). Untersuchungen zum Vorkommen von Ochratoxin A. *Fleischwirtschaft* **69**: 1400-1404.
- ❖ Schmelz E.M., Dombink-Kurtzman M.A., Roberts P.C., Kozutsumi Y., Kawasaki T., Merrill A.H. (1998). Induction of apoptosis by fumonisin B₁ in HT29 cells is

- mediated by the accumulation of endogenous free sphingoid bases. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **148: 252-260.**
- ❖ Schroeder J.J., Crane H.M., Xia J., Liotta D.C. and Merrill A.H. (1994). Disruption of sphingolipid metabolism and stimulation of DNA synthesis by fumonisin B₁. *J. Biol. Chem.* **269: 3475-3481.**
 - ❖ Schoental R. (1970) Hepatotoxic activity retrorsine, senkirkine and hydroxysenkirkine in newborn rats, and the role of epoxides in carcinogenesis by pyrrolizidine alkaloids and aflatoxins. *Nature* **227: 401-402.**
 - ❖ Schwartz A., Rapaport E., Hirschberg K. and Futerman A.H. (1995). A regulatory role for sphingolipids in neuronal growth. Inhibition of sphingolipid biosynthesis and degradation have opposite effects on axonal braching. *J. Biol. Chem.* **270: 10990-10998.**
 - ❖ Schwerdt G., Freudinger R., Mildenerger S., Silbernagl S., Gekle M. (1999). The nephrotoxin ochratoxin A induces apoptosis in cultured human proximal tubule cells. *Cell Biol. Toxicol.* **15: 405-415.**
 - ❖ Scott, P.M. (1989). The natural occurrence of trichothecenes. In: Beasley, V.D. (Ed), *Trichotecene Mycotoxicosis: Pathophysiologic Effects, Vol I CRC Press, Boca Raton, FL, pp 1-26.*
 - ❖ Scudamore K.A., Hetmanski M.T., Chan H.K., and Colin S. (1997). Occurrence of mycotoxins in raw ingredients used for animal feeding stuffs in the United Kingdom in 1992. *Food and Additives and Contaminants.* **14:157-173.**
 - ❖ Scudamore K.A., Nawaz S. and Hetmanski M.T. (1998). Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: II. determination of mycotoxin in maize and maize products. *Food Additives and Contaminants.* **15:30-55.**
 - ❖ Scudamore K.A., Patel S. (2000). Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom. *Food Additives and Contaminants* **15: 30-55.**
 - ❖ Seefelder W., Humpf H.U., Schwerdt G., Freudinger R. and Gekle M. (2003). Induction of apoptosis in cultured human proximal tubule cells by fumonisins and fumonisin metabolites. *Toxicol. and Applied Pharmacology.* **192: 146-153.**
 - ❖ Seegers J.C., Bohemer L.H., Kruger M.C., Lottering M.L., de Kock M. (1994). A comparative study of ochratoxin A-induced apoptosis in hamster kidney and HeLa cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **129: 1-11.**

- ❖ Sephard G.S., Van der Westhuizen L., Thiel P.G., Gelderblom W.C.A., Marasas W.F.O., Van Schalkwyk D.J. (1996). Disruption of sphingolipid metabolism in non human primates consuming diet of fumonisin-containing *Fusarium moniliforme* culture material. *Toxicon* **34**: 527-534.
- ❖ Sephard G.S., Van der Westhuizen L., (1998). Liquid chromatographic determination of the sphinganine/sphingosine ratio in serum. *J. of Chromatography B.* **710**: 219-222.
- ❖ Shane S.H., (1994). Economic issues associated with aflatoxins. In: Eaton, D.L., Groopman, J.D. (Eds.). *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance. Academic Press, San Diego, pp 53-527.*
- ❖ Sharma R.P., Dugyala R.R., Voss K.A. (1997). Demonstration of in-situ apoptosis in mouse liver and kidney after short-term repeated exposure to fumonisin B₁. *J. Comp. Pathol.* **117**: 371-381.
- ❖ Sharaman M., MacDonald S. and Gilbert J. (1992). Automated liquid chromatographic determination of ochratoxin A in cereals and animal products using immunoaffinity column clean-up. *J. of Chromatography.* **603**: 285-289.
- ❖ Scheuer R., Dietrich R., Maertlbauer E., Gareis M., (1997). Proceedings of the 19th Mycotoxin-Workshop. *Munchen June p.142.*
- ❖ Sheabar F.Z., Groopman J.D., Qian G.S. and Wogan G.N. (1993). Quantitative analysis of aflatoxin-albumin adducts. *Carcinogenesis (Lond.)* **14**: 1203-1208.
- ❖ Shier W.T. (1992). Sphingosine analogues: an emerging new class of toxin that include fumonisins. *J. Toxicol. Toxin Rev.* **11**: 241-257.
- ❖ Shlosberg A.S., Klinger Y., Malkinson M.H. (1986). Muscovy ducklings, a particular sensitive avian bioassay for T-2 toxin and diacetoxyscirpenol. *Avian Disease* **30**:820-824.
- ❖ Shotwell, O.L. (1991). Natural occurrence of mycotoxins in corn: In: Smith, J.U.E., Henderson, R.S., (Eds.), *Mycotoxins and Animal Foods. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 325-340.*
- ❖ Shreeve, B.J., Patterson, D.S.P., and Roberts, B.A. (1979). The carry-over of aflatoxin, ochratoxin and zearalenone from naturally contaminated feed to tissues, urine and milk of dairy cows. *Food Cosmet. Toxicol.* **17**: 151-152.
- ❖ Skipper P.L., Hutchins D.H., Turesky R.J., Sabbioni G., and Tannenbaum S.R. (1985). Carcinogen binding to serum albumin. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **26**, 356-361.

- ❖ Sklan D., Shelly M., Makovsky B., Geira A., Klipper E., Friedman A. (2003). The effect of chronic feeding of diacetoxyscirpenol and T-2 toxin on performance, health, small intestinal physiology and antibody production in turkey poults. *British Poultry Science* **44: 46-52.**
- ❖ Skipper P.L. and Tannenbaum S.R. (1990). Protein adducts in the molecular dosimetry of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* **11: 507-518.**
- ❖ Smith G.W., Constable P.D., Eppley R.M., Tumbleson M.E., Gumbrecht L.A., Haschek W.M., (2000). Purified fumonisin B₁ decreases cardiovascular function but does not alter pulmonary capillary permeability in swine. *Toxicological Science* **56: 240–249.**
- ❖ Smith G.W., Constable P.D., Tumbleson M.E., Rottinghaus G.E., Haschek W.M. (1999). Sequence of cardiovascular changes leading to pulmonary edema in swine fed fumonisin-containing culture material. *Am J Vet Res* **60:1292–1300.**
- ❖ Smith J.C., Wesselink C., Parr J.M., Sprosen J.M., Fowke E.A., Towers N.R. and Laboyrie D. (1995). Effect of Zearalenone on ewe pregnancy rates. In: Toxicology and Food Safety. *Toxicology and Food Safety Research Group. Ruakura Research Center, Hamilton, New Zealand. pp 41-43.*
- ❖ Smith, J.E., Moss, M.O. (1985). Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance. *John Wiley and Sons, Chichester, pp 36-41.*
- ❖ Smith, J.F., DiMenna M.E. and McGowman L.T. (1986). Effect of fusarium and Zearalenone on the reproductive performance of ewes.” *Proc. New Zealand Soc. Anim. Prod.* **46:255.**
- ❖ Smith J.F., DiMenna M.E., McGowman L.T.(1990). Reproductive performance of Coopworth ewes following oral doses of zearalenone before and after mating. *J. Reprod. Fert.* **89:99-106.**
- ❖ Smith, J.E., Lewis, C.W., Anderson, J.C., and Solomons, G.L. (1994). Mycotoxins in Human health. Report EUR 16048 EN. *European Commission, Directorate-General XII, Brussels.*
- ❖ Smith J.S. and Thakur R.A. (1996). Occurrence and fate of fumonisins in beef. In: Jackson L.S., DeVries J.W., and Bullerman L.B. (Ed.) Fumonisin in Food. *Plenum Press, New York. pp 39-55.*
- ❖ Snijders C.H.A., and Perkowski, J. (1990). Effect of head blight caused by *Fusarium culmorum* on toxin production and weight of wheat kernels. *Phytopathology* **80: 566-570.**

- ❖ Solfrizzo M., Avataggiato G., Visconti A. (1997). Rapid method to determine phinganine/sphingosine in human and animal urine as a biomarker for fumonisin exposure. *J. of Chromatography B.* **692: 87-93.**
- ❖ Solfrizzo M., Visconti A., Avataggiato G., Torres A. and Chulze S. (2000). *In vitro* and *in vivo* studies to asses the effectiveness of cholestyramine as a binding agent for fumonisins. *Mycopathologia* **151: 147-153.**
- ❖ Sporn M.B., Dingam C.W., Phelps H.L. and Wogan G. (1966). Aflatoxin B₁: binding to DNA in vitro and alteration of RNA metabolism in vivo. *Science* **151: 1539-1541.**
- ❖ Sprosen J.M., e Towers N.R. (1995). Urinary zearalenone metabolite concentration in herds with fertility problems. In: Toxicology and Food Safety. *Toxicology and Food Safety Research Group. Ruakura Research Center, Hamilton, New Zealand.* pp **45-46.**
- ❖ Spotti M., Pompa G. and Caloni F. (2001). Fumonisin B₁ metabolism by bovine liver microsomes. *Vet. Res. Com.* **25: 511-516.**
- ❖ Sreemannarayana O., Frohlich A.A., Vitti T.G., Marquardt R.R., Abramson D. (1988). Studies of the tolerance and disposition of ochratoxin A in young calves. *J. Anim. Sci.* **66, 1703-1711.**
- ❖ Stanlei E. (2007). Food engineering applied to accommodate food regulations, quality and testing. *Submitted in February 2007 for CIBIA VI, November.*
- ❖ Steyn P., and Holzapfel, C.W. (1967). The synthesis of ochratoxin A and B metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Tetrahedron* **23: 4449-4461.**
- ❖ Steyn P.S. (1971). Ochratoxin and other dihydroisocoumarins. In Microbial Toxin: Fungal Toxins (A. Cielger, S. Kadis, and S.J. Ajl, Eds), *Academic Press, New York.* Vol. V, **179-205.**
- ❖ Steyn P.S. (1984). Ochratoxin and other dihydroisocoumarins. In Mycotoxin-Production, Isolation, Separation and Purification (V. Betaina, Ed), *Elsevier Amsterdam* pp **183-216.**
- ❖ Stoloff L., Verret M.J., Dantzman J., and Reynaldo E.F. (1972). Toxicological study of aflatoxin P₁ using the fertile chicken egg. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **23: 528-531.**
- ❖ Strange, R.N. (1991). Natural occurrence of mycotoxins in groundnuts, cottonseed, soya, and cassava. In: Smith, J.E., Henderson, R.S., (Eds.), *Mycotoxin and Animal Foods.* *CRC Press, Boca Raton , FL,* pp **341-362.**

- ❖ Sudakin D.L. (2003). Trichothecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicology letters*, **143**: 97-107.
- ❖ Suphakarn V.S., Newberne P.M. and Goldman M. (1983). Vitamin A and aflatoxin: Effect on liver and colon cancer. *Nutr. Cancer* **5**: 41-50.
- ❖ Swanson S.P., Corley R.A. (1989). The distribution, metabolism, and excretion of trichothecene mycotoxins. In: Beasley, V.R. (Ed.), Trichothecene Mycotoxicosis Pathophysiologic Effects, Volume I. *CRC-Press, Boca Rata*, pp 37-61.
- ❖ Swanson S.P., Helaszek C., Buck W.B., Rood Jr. H.D., Haschek W.M. (1988). The role of intestinal microflora in the metabolism of trichothecene mycotoxins. *Food and Chemical Toxicology* **26**: 823-829.
- ❖ Sweeney, M.J., Dobson A.D.W. (1999). Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. Elsevier, *FEMS Microbiology letter* **175**: 149-173.
- ❖ Swenson D.H., Miller E.C. and Miller J.A. (1974). Aflatoxin B₁-2,3-oxide: evidence for its formation in rat liver in vivo and by human liver microsomes in vitro. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **60**: 1036-1043
- ❖ Takeda N., Akiyama Y., Shibasaki S. (1991). Solid-phase extraction and cleanup for liquid chromatographic analysis of ochratoxin A in pig serum. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* **47**, 198-203.
- ❖ Tamm, C., and Breitenstein, W. (1984). The biosynthesis of mycotoxins. In: Steyn, P.S. (Eds.), Mycotoxins: A Study in Secondary Metabolism. *Academic Press, New York*, pp 69-91.
- ❖ Tanchev Y., Dorossiev D. (1991) The first clinical description of Balkan endemic nephropathy (1956) and its validity 35 year later. *IARC Sci Publ* **115**: 21-28.
- ❖ Tannenbaum S.R., and Skipper P.L. (1984). Biological aspects to the evaluation of risk: dosimetry in carcinogens in man. *Fundam. Appl. Toxicol.* **4**, 367- 373.
- ❖ Tarín A. Rosell M.G. Guardino X. (2004). Use of high-performance liquid chromatography to assess airborne mycotoxins aflatoxins and ochratoxin A. *Journal of Chromatography A.* **1047**, 235-240.
- ❖ Turner P.C., Dingley K.H., Coxhead J., Russell S. and Garner C.R. (1998). Detectable levels of serum aflatoxin B₁-albumin adducts in the United Kingdom population: Implications for aflatoxin-B₁ exposure in the United Kingdom. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & prevention.* **7**: 441-447.

- ❖ Tatu C.A., Orem W.H., Finkelman R.B., Feder G.L. (1998). The etiology of Balkan nephropathy: still more question than answers. *Environ Health Perspect* **106**: 689-700.
- ❖ Terao K., Ueno Y. (1978). Morphological and functional damage to cells and tissue. In: *Toxicology Biochemistry and Pathology of Mycotoxins*. pp 189-238.
- ❖ Thiel P.G., Sephard G.S., Sydenham E.W., Marasas W.F.O., Nelson P.E. and Wilson T.M. (1991). Levels of fumonisins B₁ and B₂ in feeds associated with confirmed cases of equine leukoencephalomalacia. *J. Agric. Food Chem.* **39**: 109-111.
- ❖ Thurston J.R., Richard J.L., Cysewski S.J., Pier A.C. and Graham C.K. (1972). Effect of aflatoxin on complement activity in guinea pigs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **138**: 300-303.
- ❖ Thuvander A., Wikman C., and Gadhasson I. (1999). In vitro exposure of human lymphocytes to trichithecenes: Individual variation in sensitivity and effects of combined exposure on lymphocytes function. *Food and Chem. Toxicol.* **37**: 639-648.
- ❖ Tiemann U., Viergutz T., Jonas L., Schneider F. (2003a). Influence of the mycotoxins α - and β -zearalenol and deoxynivalenol on the cell cycle of cultured porcine endometrial cells. *Reproductive Toxicology* **17**: 209-218.
- ❖ Tiemann U., Tomek W., Schneider F., Vanselow J. (2003b). Effects of the mycotoxins α - and β -zearalenol on regulation of progesterone synthesis in cultured granulosa cells from porcine ovaries. *Reproductive Toxicology* **17**: 673-681.
- ❖ Tobias, S., I. Rajic and A. Vanyi, 1992. Effect of T-2 toxin on egg production and hatchability in laying hens. *Acta Vet. Hung.*, **40**: 47-54.
- ❖ Towers N.R., Sposen J.M. (1993). Zearalenone-induced infertility in sheep and cattle in New Zealand, *N.Z. Vet. J.* **41**: 223–224.
- ❖ Towers N.R., Sporsen J.M. and Webber W. (1995a). Zearalanone metabolites in cycling and non-cycling cows. In: Toxicology and Food Safety. *Toxicology and Food Safety Research Group. Ruakura Research Centre, Hamilton, New Zealand.* pp 46-47.
- ❖ Towers N.R., Wesselink C., Fowke E.A. and Sprosen J.M. (1995b). Plasma vs. urinary zearalenone concentration as indicators of zearalenone intake. In: Toxicology and Food Safety. *Toxicology and Food Safety Research Group. Ruakura Research Centre, Hamilton, New Zealand.* pp 41.
- ❖ Trenholm H.L., Cochrane W.P., Cohen H., Elliot J.I., Farnsworth E.R., Friend D.W., Hamilton R.M.G., Neish G.A. and Standish J.F. (1981). Survey of vomitoxin

- contamination of the 1980 white winter wheat crop in Ontario, Canada. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58: 992-994.**
- ❖ Trenholm H.L., Hamilton R.M.G., Friend D.W., Thompson B.K. and Hartin K.E. (1984). Feeding trials with vomitoxin (deoxynivalenolo)-contaminated wheat: Effects in swine, poultry, and dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **185: 527-531.**
 - ❖ Trenholm H.L., Thompson B.K., Standish J.F., Seamen W.L. (1985a). Mycotoxins in feed and feedstuffs. In: Scott, P.M., Trenholm H.L., Sutton M.D. (Eds.), *Mycotoxins: A Canadian Perspective. National research Council of Canada, Ottawa, Ont.* **22848: 43-49.**
 - ❖ Trenholm H.L., Thompson B.K., Hartin K.E., Greenhalgh R. and McAllister A.J. (1985b). Ingestion of vomitoxin (deoxynivalenol)-contaminated wheat by nonlactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **68:1000-1005.**
 - ❖ Trenholm, H.L., Friend, D.W., Hamilton, R.M.G., Thompson, B.K., Hartin, K.E. (1986). Incidence and toxicology of deoxynivalenol as an emerging mycotoxin problem. In: Proc. VI International Conf. On the mycoses. *Pan American Health Organization, Washington, DC.*
 - ❖ Trucker T.L. and Hamilton P.B. (1971). *Poultry Science* **50:1637.**
 - ❖ Trucksess M.W. and Stoloff L. (1979). Extraction, cleanup, and quantitative determination of aflatoxin B₁ and M₁ in liver beef. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **62: 1080-1082.**
 - ❖ Trucksess M.W., Stoloff L., Brumley W.C., Wilson D.M., Hale O.M., Sangster L.T., Miller D.M. (1982). Aflatoxicol and aflatoxins B₁ and M₁ in the tissues of pigs receiving aflatoxin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **65: 884-887.**
 - ❖ Trucksess MW., Richard JL., Stoloff L., McDonald JS., Brumley WC. (1983). Absorption and distribution patterns of aflatoxicol and aflatoxins B₁ and M₁ in blood and milk of cows given aflatoxin B₁. **44 (9):1753-6.**
 - ❖ Uchiyama S., Saito Y., Uchiyama M. (1985). Protein-binding of ochratoxin A and its extractability from proteinaceous *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* **26: 651.**
 - ❖ Ueno Y. (1968). Inhibition of protein synthesis in animal cells by nivalenol and related metabolites; Toxic principles of rice infested with *Fusarium nivale*. *Proc. First U.S.-Japan Conf. Toxic Microorganism.* **pp 76-79.**
 - ❖ Ueno Y., Maki S., Lin J., Furuya M., Sugimura Y., Kawamura O. (1998). A 4-year study of plasma ochratoxin A in a selected population in Tokyo by immunoassay and immunoaffinity column-linked HPLC. *Food Chemical Toxicology* **36: 445-449.**

- ❖ Unglaub W., Holl F. (1990). Bestimmung und Gehalte von ochratoxin A in Schweineblut und -seren. *Fleishwirtschaft* **70**: 406.
- ❖ Valenta H. (1998). Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. *J. of Chromatography*. **815**: 75-92.
- ❖ Valenta H., Goll M. (1996). Determination of ochratoxin A in regional samples of cow's milk from Germany. *Food Addit. Contam.* **13**: 669-676
- ❖ Valenta H., Khün I., Rhor K. J. (1993). Determination of ochratoxin A in urine and faeces of swine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **613**: 295-302.
- ❖ Van der Merwe, K.J., Steyn P.S., Fourie, L., Scoot, D.B., Theron, J.J. (1965 a). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Will. *Nature* **205**: 112-113.
- ❖ Van der Merwe, K.J., Steyn P.S., and Fourie, L. (1965 b). Mycotoxin II. The constitution of ochratoxin A, B and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Will. *J. Chem. Soc.* pp 7083-7088.
- ❖ Vasanthi, S. and Bhat, R.V. (1998). Mycotoxins in foods-occurrence, health & economic significance & food control measures. *Ind. J. Med. Res.* **108**: 212-224.
- ❖ Vincelli P and Paker G (2003). Fumonisin, Vomitoxin and other Mycotoxins in corn produced by *Fusarium* fungi. ID -121- Copyright© 2003 for materials produced by University of Kentucky Cooperative extension, Frankfort.
- ❖ Vudathala D.K., Prelusky D.B., Ayround M., Trenholm H.L., Miller J.D. (1994). Pharmacokinetic fate and pathological effects of ¹⁴C-fumonisin B1 in laying hens. *Nat. Toxins* **2**: 81-88.
- ❖ Waldman T.A. (1977). Albumin catabolism. In: Rosenoer V.M., Oratz M., and Rothschild A (eds.) Albumin structure, function and uses. Oxford, United Kingdom: Pergamon Press. 257-273.
- ❖ Wafa E.W., Yahya R.S., Sobh M.A., Eraky I., El Baz M., El Gayar H.A., Betbeder A.M., Creppy E.E. (1998). Human ochratoxicosis and nephropathy in Egypt: a preliminary study. *Human Experimental Toxicology* **17**: 124-129.
- ❖ Wang E., Norred W.P., Bacon C.W., Riley R.T. and Merrill A.H. Jr. (1991). Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J. Biol. Chem.* **266**: 14486-14490.
- ❖ Wang E., Ross P.F., Wilson T.M., Riley R.T. and Merrill A.H. Jr. (1992). Increases in serum sphingosine and sphinganine and decreases in complex sphingolipids in

- ponies given feed containing fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *J. Nutr.* **122: 1706-1716.**
- ❖ WHO/FAO (World Health Organization/Food and Agriculture Organization) (2001).Ochratoxin A. In: ‘Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. Prepared by the Fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives(JECFA)’. *WHO Food Additives Series 47; FAO Food and Nutrition Paper 74, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.*
 - ❖ Wild C.P., Garner R.C., Montesano R. and Tursi F. (1986). Aflatoxin B₁ binding to plasma albumin and liver DNA upon chronic administration to rats. *Carcinogenesis* **7: 853-858.**
 - ❖ Wild C.P., Jiang Y.Z., Sabbioni G., Chapot B. and Montesano R. (1990). Evaluation of methods for quantitation of aflatoxin-albumin adducts and their application to human exposure assessment. *Canc. Res.* **50: 245-251.**
 - ❖ Wild C.P., Hasegawa R., Barraud L., Chutimataewin S., Chapot B., Ito N and Montesano R. (1996). Aflatoxin-albumin adducts: A basis for comparative carcinogenesis between animals and human. *Cancer Epidemiol Biomarkers* **5:179-189.**
 - ❖ Wilken C., Baltes W., Mehlitz I., Tiebach R., Weber Z. (1985). Ochratoxin A in pork kidneys--description of a method.*Lebensm Unters. Forsch.* **180, 496-497**
 - ❖ Wilkins P.A., Vaala W.E., Zivotofsky D. and Twitchell E.D. (1994). A herd outbreak of equine leukoencephalomalacia. *Cornell Vet.* **84: 53-59.**
 - ❖ Wilson B.J. and Maronpot R.R. (1971). Causative fungus agent of leukoencephalomalacia in equine animals. *Vet. Rec.* **88: 484-486.**
 - ❖ Wilson B.J., Maronpot R.R. and Hildebrandt P.K. (1973). Equine leukoencephalomalacia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **163: 1293-1294.**
 - ❖ Wilson T.M., Nelson P.E., and Knep C.R. (1985a). Hepatic neoplastic nodules, adenofibrosis and cholangiocarcinomas in male Fisher 344 rats fed corn naturally contaminated with *fusarium moniliforme*. *Carcinogenesis* **6: 1155-1160.**
 - ❖ Wilson T.M., Nelson P.E., Ryan T.B., Rouse C.D., Pittman C.W., Neal T.P., Porterfield M.L., and Saunders G.K. (1985b). Linking leukoencephalomalacia to commercial horse rations. *Vet. Med. November* **pp 63-69.**
 - ❖ Wilson T.M., Ross P.F., Rice L.G., Osweiler G.D., Nelson H.A. Owens D.L., Plattner R.D., Reggiardo C., Noon T.H. and Pickrell J.W. (1990). Fumonisin B1 levels

- associated with epizootic of equine leukoencephalomalacia. *J. Vet. Diagn. Invest.* **2**: 213-221.
- ❖ Wilson T.M., Ross P.F., and Nelson H.A. (1991). Fumonisin mycotoxins and equine leukoencephalomalacia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **198**: 1104-1105.
 - ❖ Wilson T.M., Ross P.F., Owens D.L., Rice L.G., Green S.A., Jenkins S.J., and Nelson H.A. (1992). Experimental reproduction of ELEM. A study to determine the minimum toxic dose in ponies. *Mycopathologia* **117**: 115-120.
 - ❖ Wolf G. (1994). Mechanism of the mitogenic and carcinogenic action of fumonisin B₁ on isolated chondrocytes and on bone formation. *Poul. Sci.* **74**: 1431-1436.
 - ❖ Voss K.A., Norred W.P., Plattner R.D. and Bacon C.W. (1989). Hepatotoxicity and renal toxicity in rats of corn samples associated with field cases of equine leukoencephalomalacia. *Food Chem. Toxicol.* **27**: 89-96.
 - ❖ Voss K.A., Howard P.C., Riley R.T., Sharma R.P., Bucci T.J., Lorentzen R.J. (2002). Carcinogenicity and mechanism of action of fumonisin B₁: a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* (*F. verticillioides*). *Cancer Detection and prevention* **26**: 1-9.
 - ❖ Wang E., Norred W.P., Bacon C.W., Riley R.T. and Merrill A.H. (1991). Inhibition of sphingolipid biosynthesis with fumonisins. *J. Biol. Chem.* **266**: 14480-14490.
 - ❖ Wang E., Ross F.P., Wilson T.M., Riley R.T., Merrill A.H. Jr. (1992). Increases in serum sphingosine and sphinganine and decreases in complex sphingolipids in ponies given feed containing fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *J. Nutr.* **122**: 1706-1716.
 - ❖ Wang H., Jones C., Ciacci-Zanella J., Holt T., Gilchrist D.G. (1996). Fumonisin and *Alternaria alternata lycopersici* toxins: Sphinganine analog mycotoxins induce apoptosis in monkey kidney cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA Biochem.* **93**: 3461-3465.
 - ❖ Wang Y.Z., and Miller J.D. (1988). Screening techniques and sources of resistance to fusarium head blight. In *Wheat Production: Constraints in Tropical Environments* (Edited by Khatt R.D), CIMMYT, Mexico, D.F pp 239-250.
 - ❖ Wannemacher, R.W., Bunker, D.L., Neufeld, H.A. (1991). Toxicity of thricothecenes and other related mycotoxins in laboratory animals. In: *Smith, J.E., Anderson, R.A. (Eds.), Mycotoxin and animal foods. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 499-552.*
 - ❖ Wei C.M., McLaughlin C.S. (1974). Structure-function relationship in the 12,13-epoxytrichothecenes. Novel inhibitors of protein synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **57**: 838-844.

- ❖ Wei Y.H., Lu C.Y., Lin T.N. and Wei R.D. (1985). Effect of ochratoxin A on rat liver mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation. *Toxicology*. **36: 119-130.**
- ❖ Weibking, T. S., D. R. Ledoux, A. J. Bermudez, and G. E. Rottinghaus, E. Wang, and A. H. Merrill, Jr., 1993a. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B₁, on the young broiler chick. *Poultry Sci.* **72:456-466.**
- ❖ Wicklow, D.T. (1994). The mycology stored grain: an ecological perspective. In *Mycology of Stored Grain Ecosystems* (Edited by Javas D.S., White, N.D.G. and Muir W.E.). *Dekker, New York. In press.*
- ❖ Wild C.P., Garner R.C., Montesano R. and Tursi F. (1986). Aflatoxin B₁ binding to plasma albumin and liver DNA upon chronic administration to rats. *Carcinogenesis* **7, 853-858.**
- ❖ Windels C.E., Windels, M.B. and Khommedhal T. (1976). Association of *Fusarium* species with picnic beetles on corn ears. *Phytopathology* **66: 328-331.**
- ❖ Wogan G.N., and Newberne P.M. (1967). Dose-response characteristics of aflatoxin B₁ carcinogenesis in the rat. *Cancer Res.* **27: 2370-2376.**
- ❖ Wogan G.N., Paglialunga S. and Newberne P.M. (1974). Carcinogenic effects of low dietary levels of aflatoxin B₁ in rats. *Food Chem. Toxicol.* **12: 681-685.**
- ❖ Wong Z.A., Decad G.M., Byard J.I., and Hsich D.P.H. (1979). Conversion of aflatoxicol to aflatoxin B₁ in rats in vivo and in primary hepatocyte culture. *Food Cosmet. Toxicol.* **17: 481-486.**
- ❖ Wong Z.A., and Hsich D.P.H. (1980). The comparative metabolism and toxicol to aflatoxin B₁ in rats in vivo and in primary hepatocyte culture. *Food Cosmet. Toxicol.* **17: 481-486.**
- ❖ World Health Organization, I.P.C.S., 1990. Trichothecenes. In: Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot. *World Health Organization. Geneva.*
- ❖ Xiao H., Marquiardt, R.R., Frohlich A.A., and Ling Y.Z. (1995). Synthesis and structural elucidation of analogs of ochratoxin A. *J. Agric. Food Chem.* **43: 524-530.**
- ❖ Xiao H., Madhyasta, S., Marquiardt, R.R., Li. S., Vodela J.K., Frohlich A.A., and Kempainen, B.W. (1996). Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: Structure-activity relationships. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **137: 182-192.**

- ❖ Xiao H., Marquardt R.R., Frohlic A.A., Philips G.D., Vitti T.G. (1991). Effect of hay and grain diet on the rate of hydrolysis of ochratoxin A in the rumen of sheep. *J. Anim. Sci.* **69**: 3706-3714.
- ❖ Yagen B., Bialer M. (1993). Metabolism and pharmacokinetics of T-2 toxin and related trichothecenes. *Drug. Metab. Rev.* **154**: 139-152.
- ❖ Yarom R., Sherman Y., More R., Ginsburg I., Borinski R., and Yagen B. (1984). T-2 toxin effect on bacterial infection and leukocyte functions. *Toxicology and Applied Pharmacology* **75**: 60-68.
- ❖ Yiannikouris A. e Jouany J.P. (2002). Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Anim. Res.* **51**: 81-99.
- ❖ Yoo H.S., Norred W.P., Wang E., Merrill A.H. and Riley R.(1992). Fumonisin inhibition of de novo sphingolipid biosynthesis and cytotoxicity are correlated in LLC-PK1 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **114**: 9-15.
- ❖ Yoshizawa, T., Mirocha, C.J., Behrens, J.C. & Swanson, S.P. (1981) Metabolic fate of T-2 toxin in a lactating cow. *Food Cosmet. Toxicol.*, **19**: 31-39.
- ❖ Yoshizawa T., Takeda H., Ohi T. (1983). Structure of a novel metabolite from deoxynivalenol, a trichothecene mycotoxins, in animals. *Agricultural and Biological Chemistry* **47**: 2133-2135.
- ❖ Yoshizawa T., Cote L.M., Swanson S.P., Buck W.B., (1986). Confirmation of DOM-1, a depoxidation metabolite of deoxynivalenol, in biological fluids of lactating cows. *Agricultural and Biological Chemistry* **50**: 227-229.
- ❖ Yoshizawa, T. (1991). Natural occurrence of mycotoxins in small grain cereals (wheat, barely, rye, oats, sorghum, millet, rice). In Smith, J.E., Henderson, R.S. (Eds.), *Mycotoxins and Animal Food*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 301-324.
- ❖ Young L.G., McGier L., Valli E., Lumsden J.H. and Lun A. (1983). Vomitoxin in corn fed to young pigs. *J. Anim. Sci.* **57**: 665-664.
- ❖ Yu F.L. (1977). Mechanism of aflatoxin B₁ inhibition of rat hepatic nuclear RNA synthesis. *J. biol. Chem.* **252**: 3245-3251.
- ❖ Yu F.L. (1981). Studies on the mechanism of aflatoxin B₁ inhibition of rat liver nucleolar RNA synthesis. *J. biol. Chem.* **256**: 3292-3297.
- ❖ Yu F.L. (1983). Preferential binding of aflatoxin B₁ to the transcriptionally active regions of rat liver nucleolar chromatin in vivo and in vitro. *Carcinogenesis* **4**: 889-893.

- ❖ Zhou H.R., Harkema J.R., Yan D., Pestka J.J. (1999). Amplified proinflammatory cytokine expression and toxicity in mice coexposed to lipopolysaccharide and the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol). *J. Toxicol. Environ. Health A* **57**: 115-136.
- ❖ Zimmerli B. Dick R. (1995). Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data. *J. of Chromatography B*. **666**: 85-99.
- ❖ Zomborszky-Kovács M., Kovács F., Vetési F., Repa I., Tornyoş G. and Toth A. (2002a). Investigations into the time- and dose-dependent effect of fumonisin B-1 in order to determine tolerable limit values in pigs. *Livestock Production Science* **76**: 251-256.
- ❖ Zomborszky-Kovács, M., Vetési, F., Horn, P., Repa, I. and Kovács, F. 2002b. Effects of prolonged exposure to low dose Fumonisin B1 in pigs. *Journal of Veterinary Medicine series B* **49**:197-201.