

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: aflatossine (AF), fumonisine (FB), ocratossina 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 ocratossina 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 fumonisin 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 ChromQuestTM 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 µl 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. E' stata quindi effettuata una derivatizzazione degli standard con 200 µl 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 µl di standard a concentrazione maggiore in una seconda provetta contenente 500 µl di fase mobile. I campioni da analizzare sono stati derivatizzati in TFA per 15 minuti, essiccati e successivamente risospesi in 500 µl 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 4µ 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 aflatossine 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 aflatossina-TFA, impiegando un autocampionatore termostato. Le aflatossine 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 deossivalenolo (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 Ocratossina®_{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 contenete 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 µl 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.

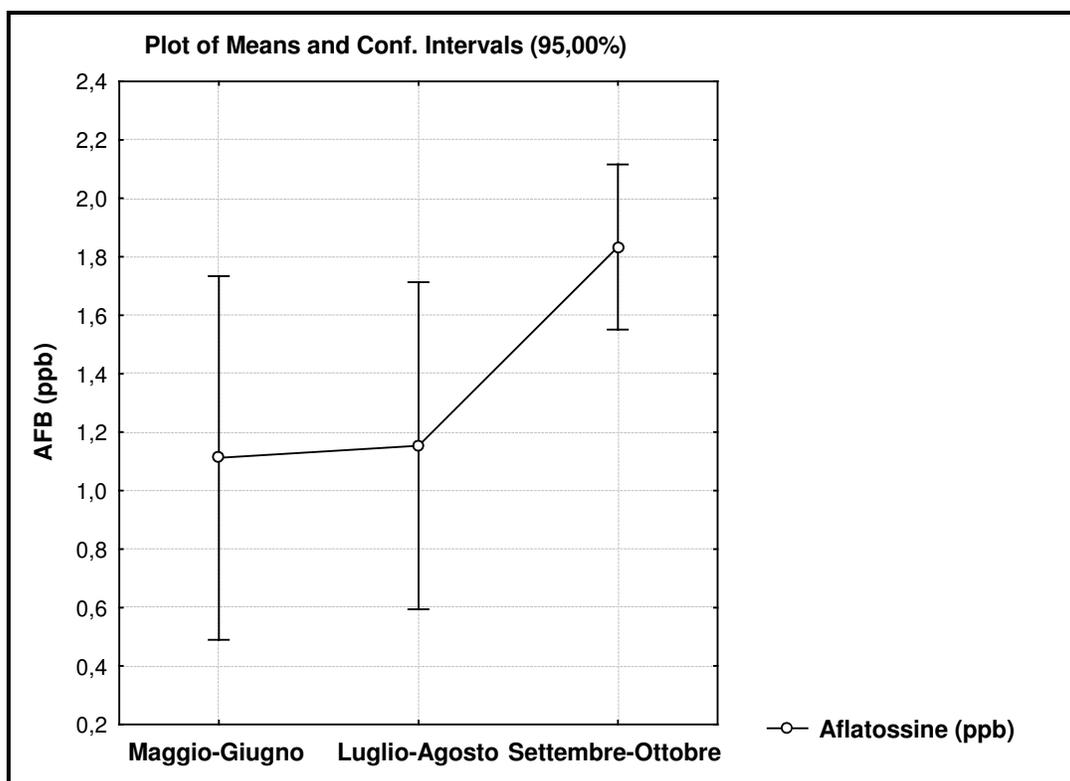


Figura. 1. Plot delle concentrazioni medie e intervallo di confidenza al 95% delle aflatossine (ppb) riscontrate nei campioni di unifeed nei tre periodi di Maggio-Giugno, Luglio-Agosto e Settembre-Ottobre.

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 FB_1 e FB_2 . 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.

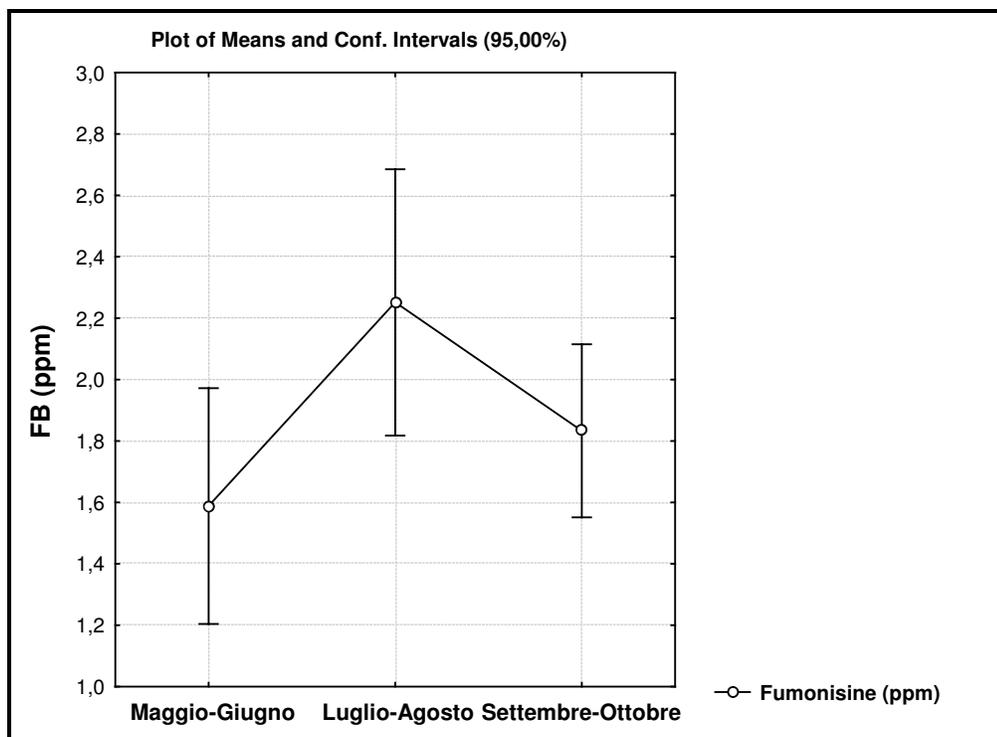


Figura 2. Plot delle concentrazioni medie e intervallo di confidenza al 95% delle fumonisine (ppm) riscontrate nei campioni di unifeed nei mesi di maggio, luglio ed ottobre.

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**).

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

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

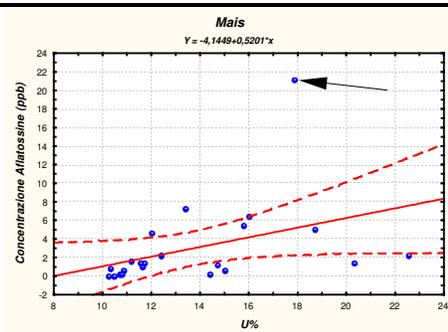


Tabella 5a. Correlazione tra la concentrazione di aflatoxine ($\mu\text{g}/\text{kg}$) e umidità % in campioni di granella e sfarinato di mais. I campioni risultati fuori della retta sono indicati dalle frecce.

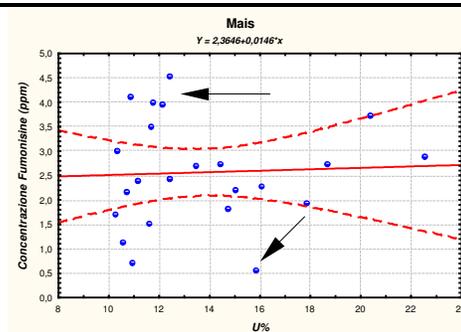


Tabella 5b. Correlazione tra la concentrazione delle fumonisine (mg/kg) e umidità % in campioni di granella e sfarinato di mais. I campioni risultati fuori della retta sono indicati dalle frecce.

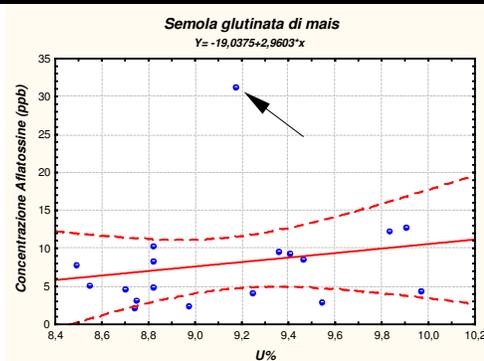


Tabella 5c. Correlazione tra la concentrazione delle aflatoxine ($\mu\text{g}/\text{kg}$) e umidità % in campioni di semola glutinata di mais. I campioni risultati fuori della retta sono indicati dalle frecce.

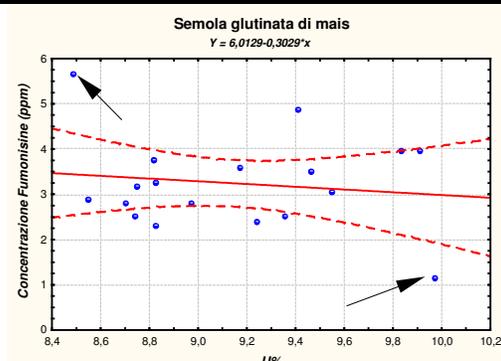
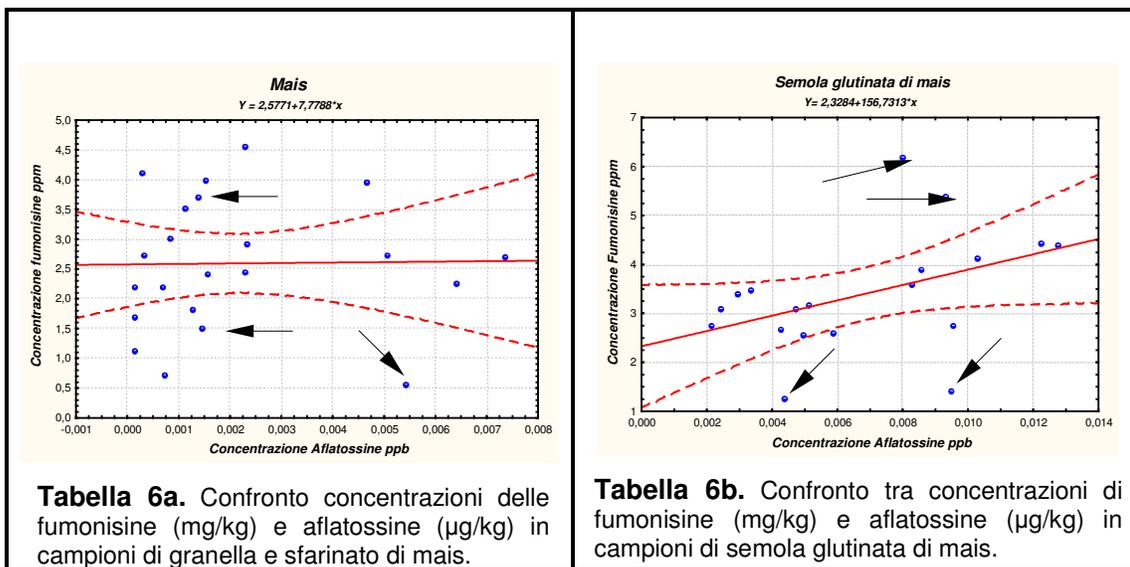


Tabella 5d. Correlazione tra la concentrazione delle fumonisine (mg/kg) e umidità % in campioni di semola glutinata di mais. I campioni risultati fuori della retta sono indicati dalle frecce.

I dati ottenuti mostrano una correlazione positiva tra il contenuto di aflatoxine 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 aflatoxine 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 aflatoxine nel mais analizzato (**Tabella 6a**), mentre nei campioni di semola glutinata le concentrazioni delle aflatoxine e fumonisine sembrano meglio correlate (**Tabella 6b**).



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

Ripartizione percentuale dei campioni di granella e sfarinati di mais in funzione del tenore di umidità

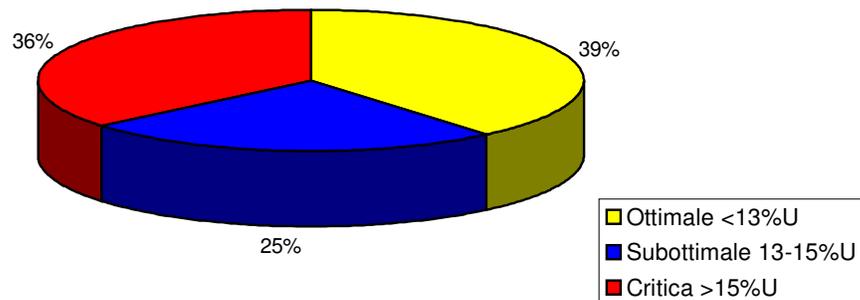
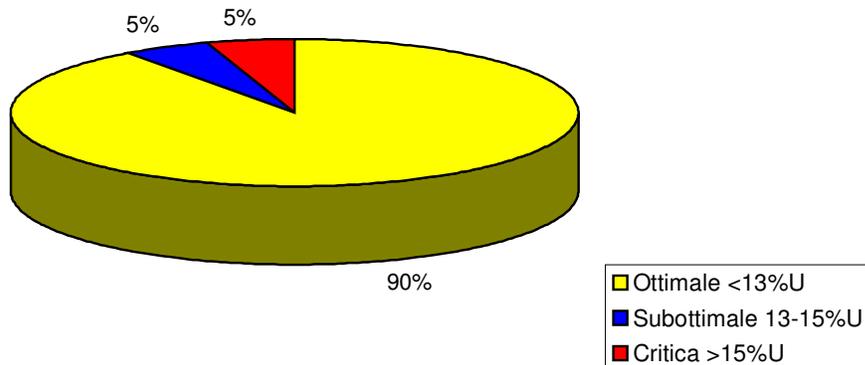


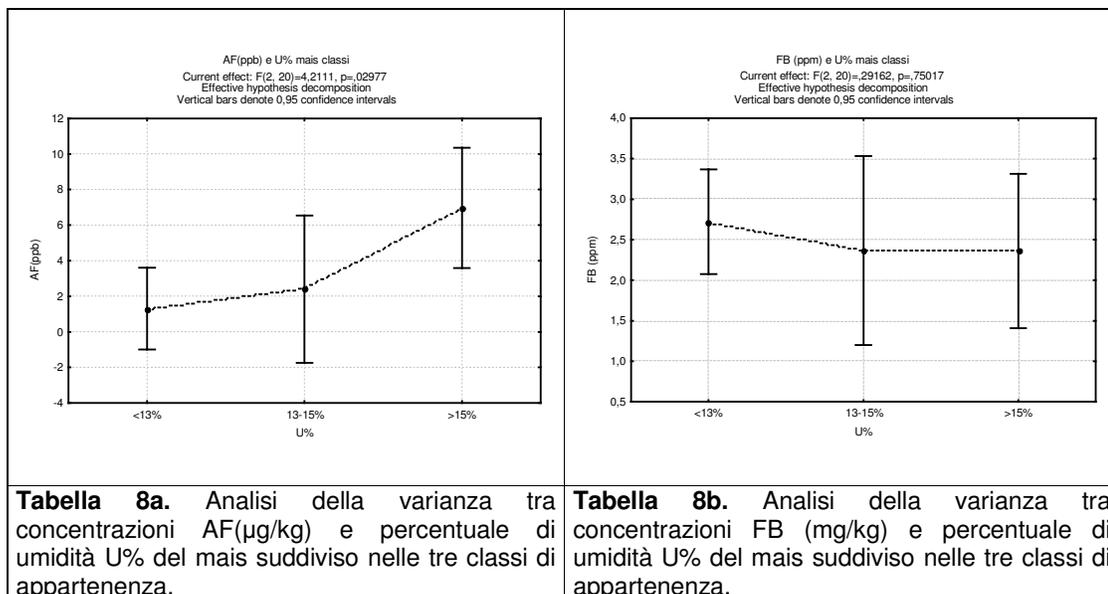
Tabella 7b

Ripartizione percentuale dei campioni di semola glutinata di mais in funzione del tenore di umidità



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**).



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.

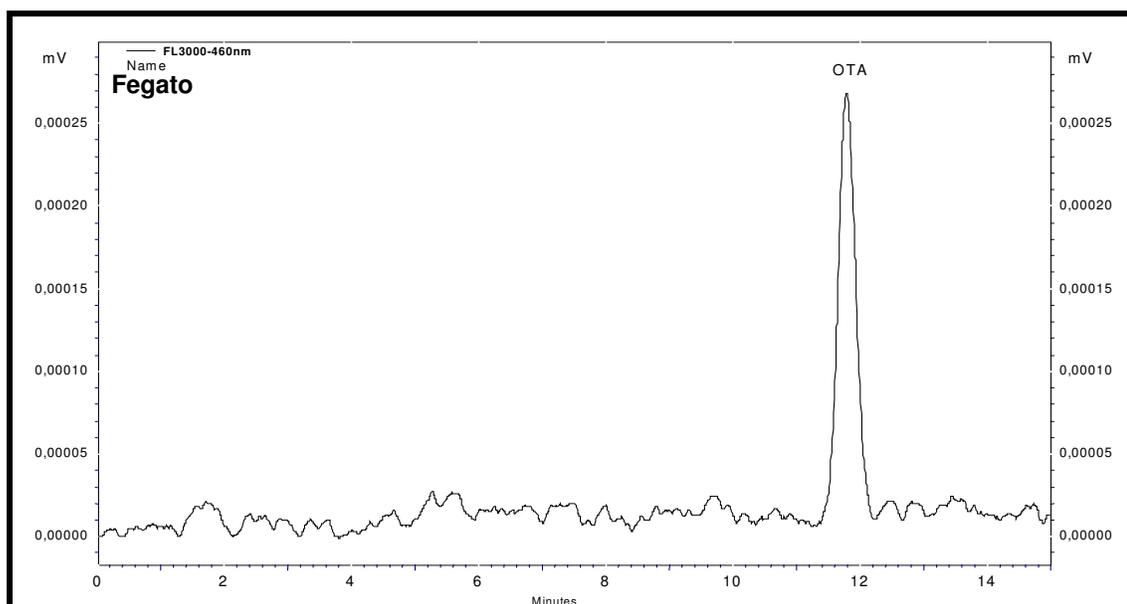


Figura 3. Cromatogramma relativo alla ocratossina (OTA) estratta da campioni di fegato contaminato da spike di 375 ng/ml. 50 μ l di campione sono stati iniettati, il segnale è stato rilevato ad un tempo di ritenzione di 11 minuti. Nessun segnale interferente è stato rilevato in prossimità del tempo di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

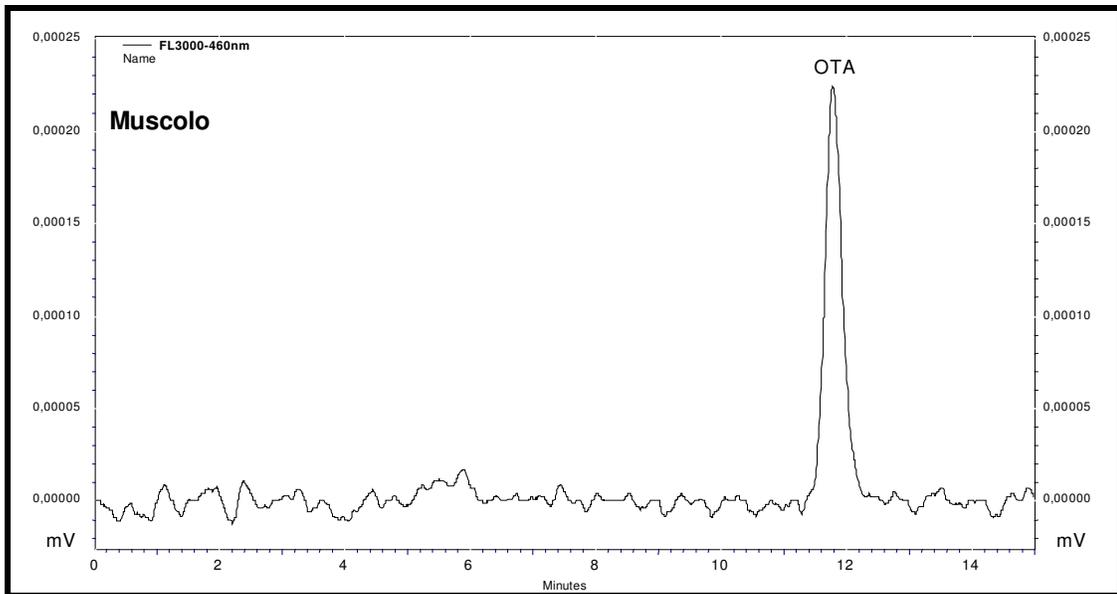


Figura 4. Cromatogramma relativo alla ocratossina (OTA) estratta da campioni di muscolo contaminato da spike di 375 ng/ml. 50 μ l di campione sono stati iniettati, anche in questo caso il segnale è stato rilevato ad un tempo di ritenzione di 11 minuti e privo disegni di impurezze nel medesimo o in vicinanza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

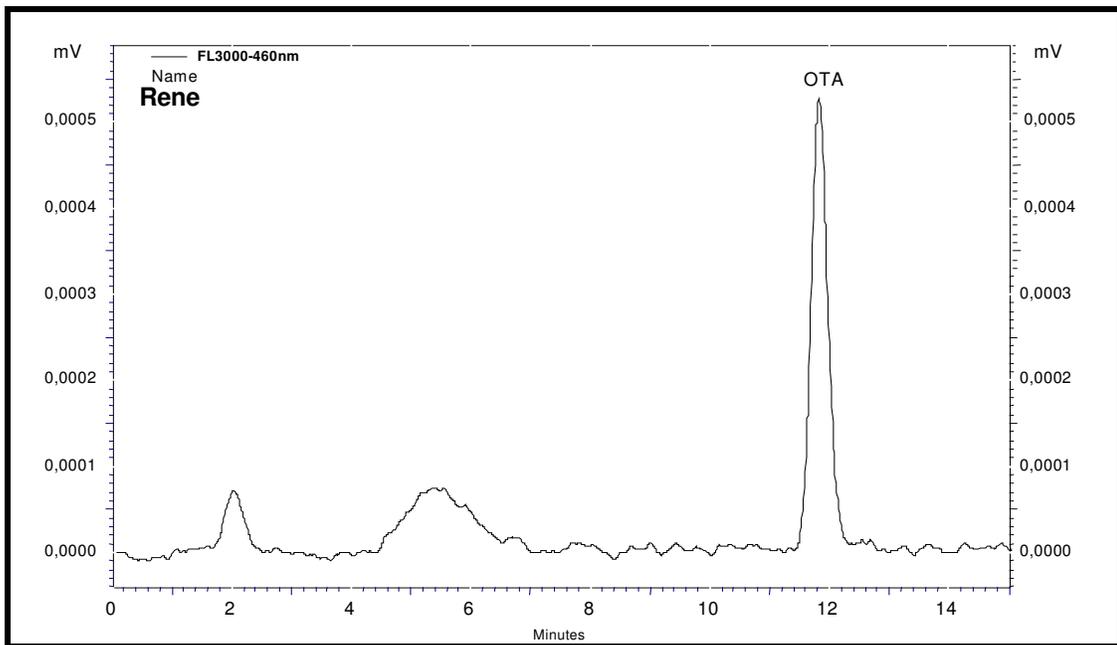


Figura 5. Cromatogramma relativo alla ocratossina (OTA) estratta da campioni di rene contaminato da spike di 375 ng/ml. 50 μ l di campione sono stati iniettati, il segnale è stato rilevato ad un tempo di ritenzione di 11 minuti. Segnali di impurezze sono stati rilevati a 2 e a 5,2 minuti.

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.

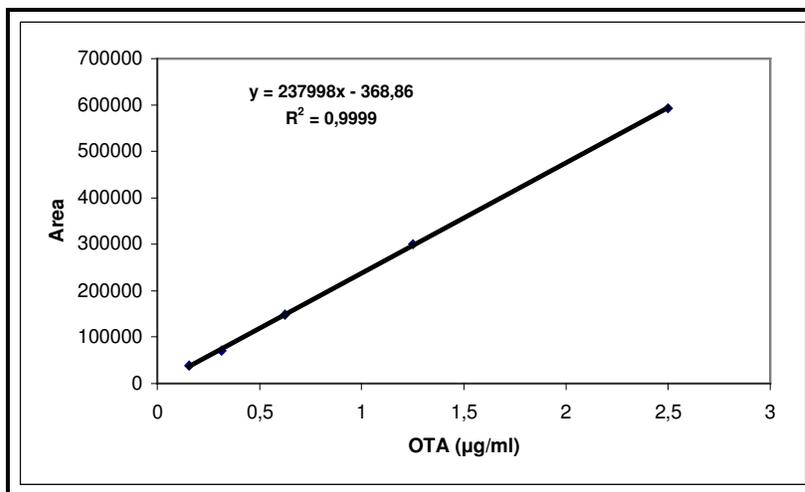


Figura 6. Retta di calibrazione OTA. In ordinate sono indicati i valori dell'area di integrazione di ogni standard, mentre in ascissa è indicata la concentrazione OTA espressa in µg/ml.

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. Recupero 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 Dicovery C18 25cm x 4,6mm ID, 5 µm (Supelco) ha mostrato picchi asimmetrici e con spalle laterali (dati non mostrati).

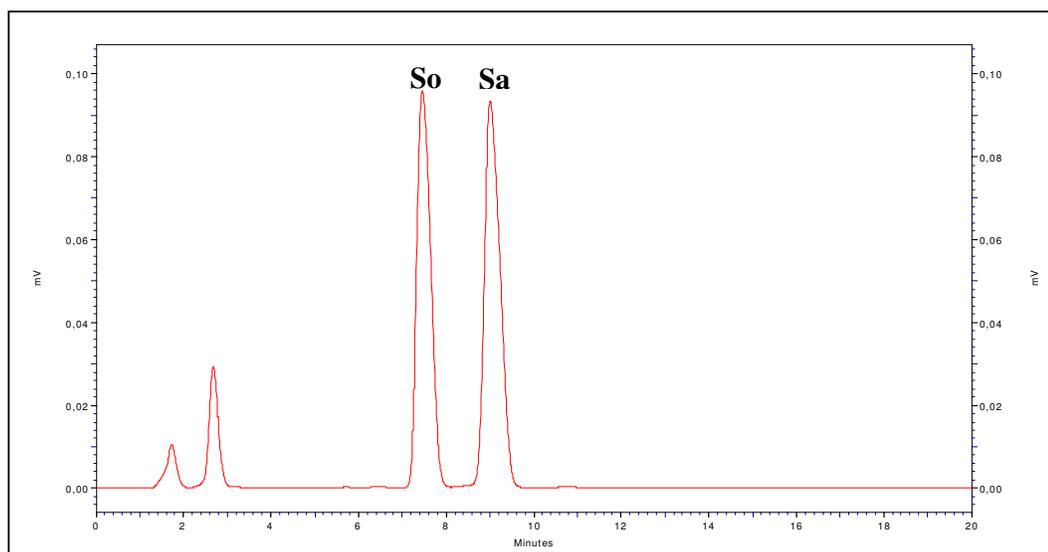


Figura. 7. Cromatogramma relativo alle basi sfingosina (So) sfinganina (Sa) entrambe alla concentrazione di 5 ng/ml. In ordine d'eluizione, la prima base sfingoide sfingosina (So) presenta un tempo di ritenzione di 7,3 minuti, mentre la base sfinganina (Sa) rappresenta un tempo di ritenzione di 8,8 minuti.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

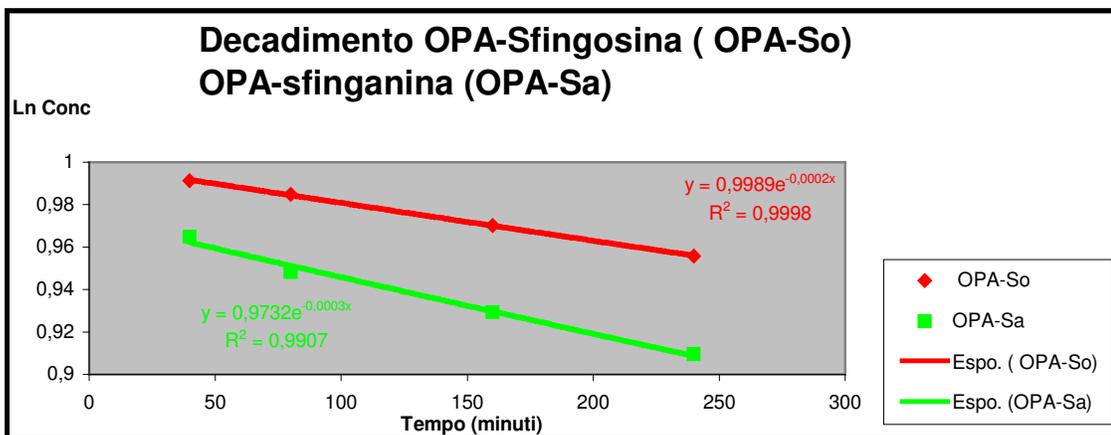


Figura 8. Decadimento dei derivatizzati OPA-sfinganina (OPA-Sa), OPA-sfingosina (OPA-So).

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

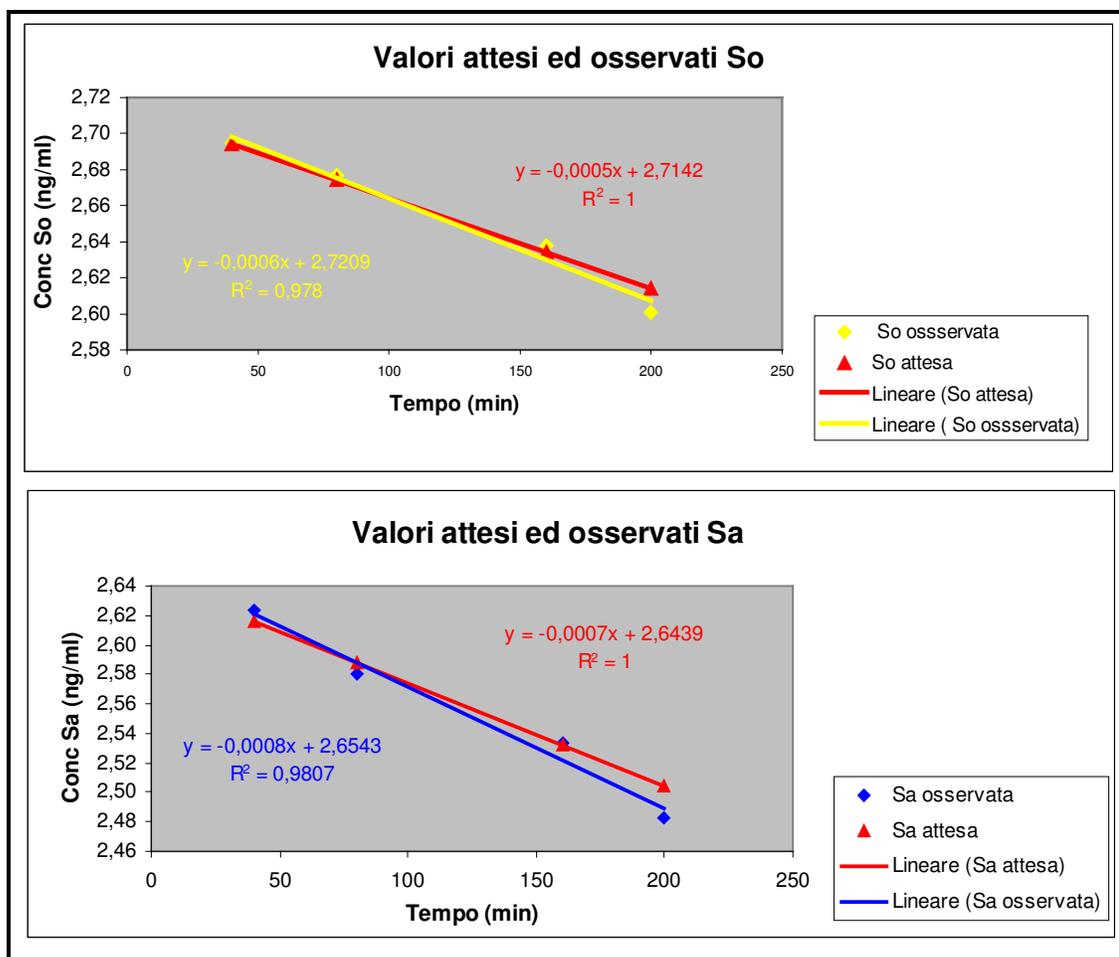


Figura 9. Curve di decadimento osservata ed attesa per le due basi sfingoidi Sa e So. In ordinata per le basi sfingoidi sono indicate le concentrazioni (ng/ml), mentre in ascissa è indicato il tempo (min.).

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.

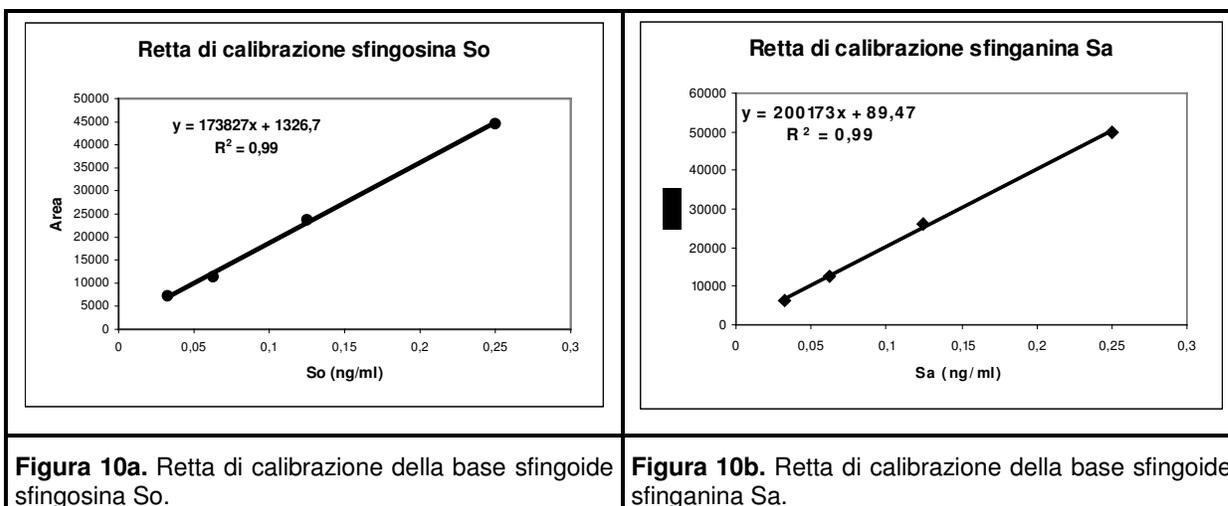
Le analisi di recupero delle basi sfingoidi Sa e So in campioni di sangue bovino hanno mostrato valori medi di recupero accettabili per i tre spike da 4 ng/ml, 2 ng/ml e 1 ng/ml come Sa e So (**Tabella 11**). In particolare gli spike da 1ng/ml mostrano una maggiore percentuale di recupero sui 500 µl 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

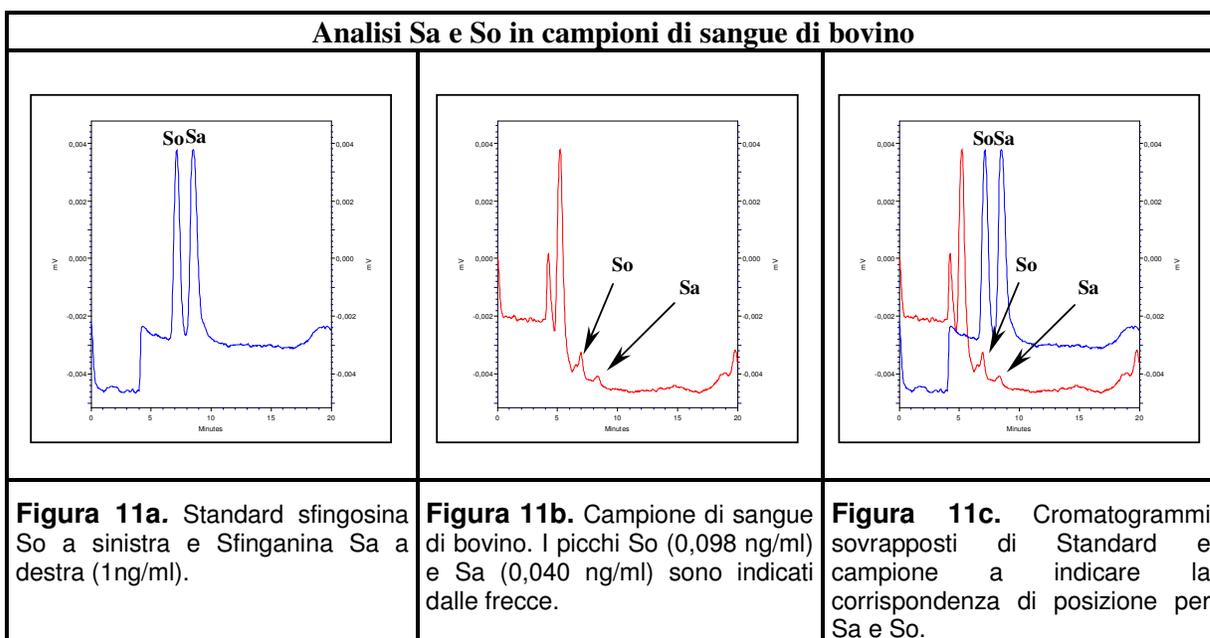
Tabella 11. Recuperi percentuali delle basi sfingoidi sfingosina (So) e sfinganina (Sa) per diverso livello di fortificazione (durata dell'estrazione 30 min.).

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).

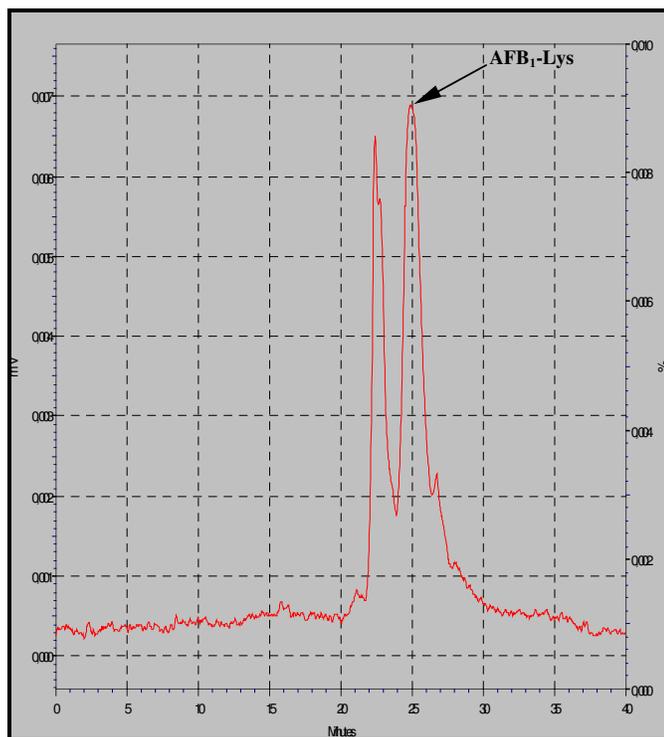


Figura 12. Standard AFB₁-BSA (4,88 moli/moli). In ascissa è indicato il tempo (minuti), mentre in ordinata è indicato il valore del segnale rilevato dal fluorimetro (mV). L'addotto AFB₁-Lys è indicato dalla freccia con un tempo di ritenzione di 25 min.

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

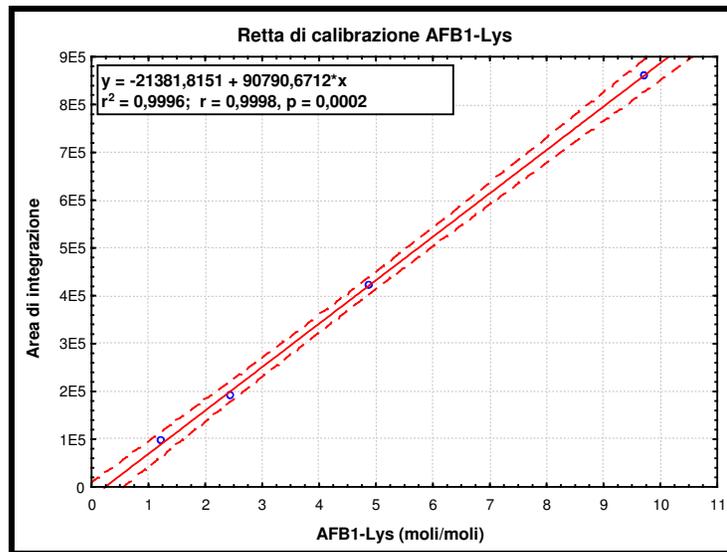


Figura 13. Retta di calibrazione AFB₁-Lys.

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

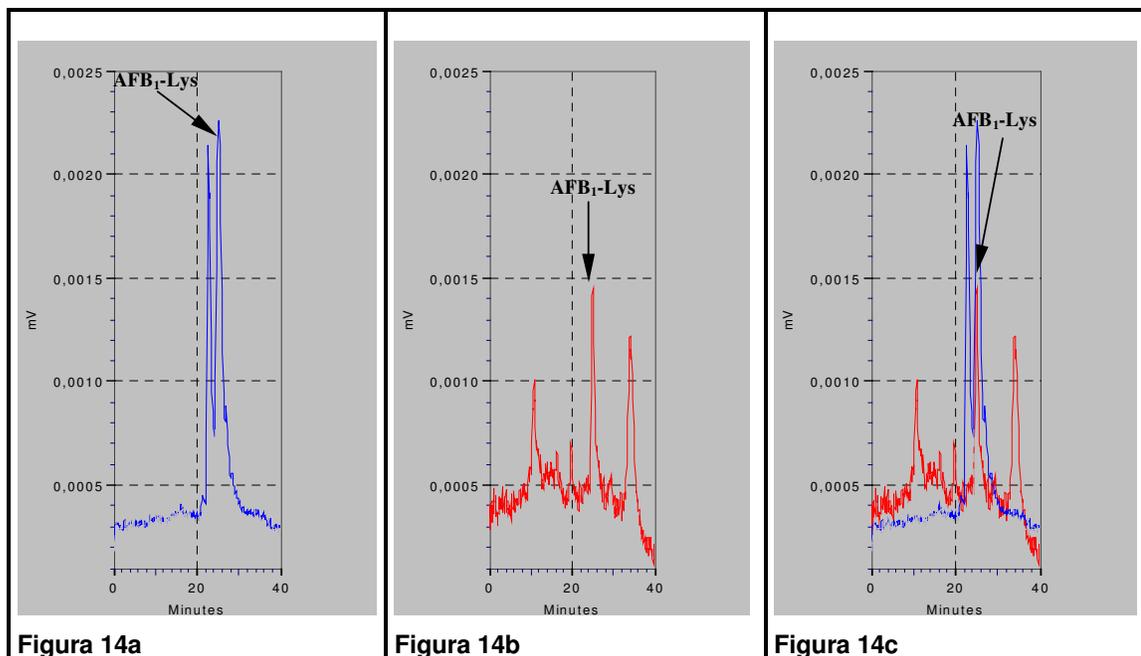


Figura 14. AFB₁-Lys in un campione di sangue bovino e standard. **Figura 14a.** Cromatogramma Standard AFB₁-Lys. **Figura 14b.** Cromatogramma AFB₁-Lys in campione di sangue bovino (AFB₁-Lys 1,41 moli). **Figura 14c.** Cromatogramma AFB₁-Lys standard e campione di sangue bovino.

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).

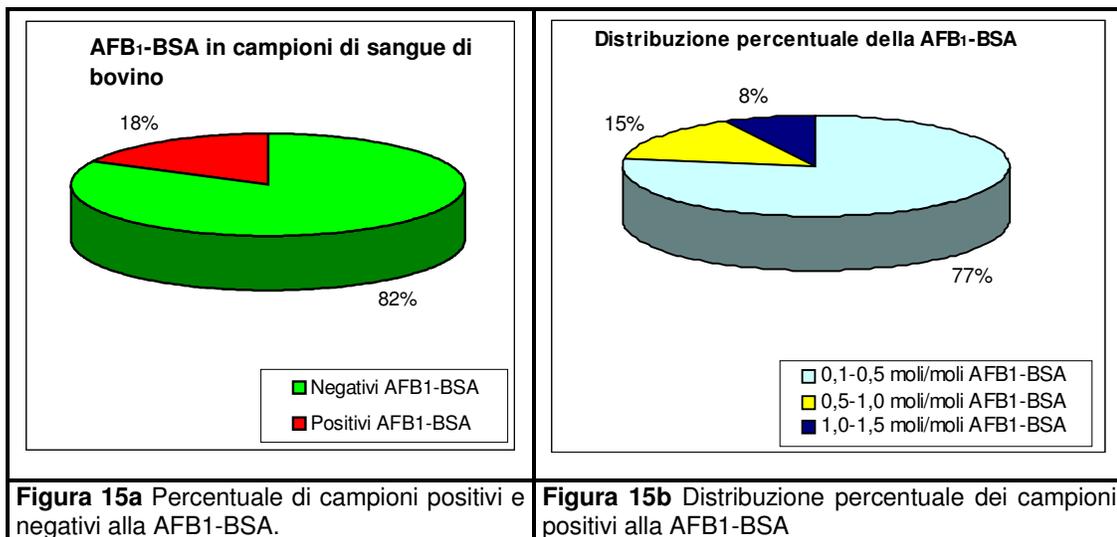


Figura 15. Campioni di sangue di bovino contenenti AFB₁-BSA.

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; Stanley 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 rendono 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 carbosipeptidasi (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 MgCl₂ 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 fumonina 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 formatasi, 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-Lysina, 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.