



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>	<i>2</i>
<i>I.1.2. Fattori fisici.....</i>	<i>3</i>
<i>I.1.3. Fattori chimici.....</i>	<i>4</i>
I.2. Micotossine	6
<i>I.2.1. Aflatossine</i>	<i>6</i>
<i>I.2.2. Fumonisine</i>	<i>11</i>
<i>I.2.2.1. Effetti inibitori causati dalle fumonisine sulla biosintesi dei fosfolipidi</i>	<i>14</i>
<i>I.2.3. Ocratossine.....</i>	<i>16</i>
<i>I.2.4. Tricoteceni.....</i>	<i>19</i>
<i>I.2.5. Zearalenone.....</i>	<i>22</i>
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>	<i>36</i>
<i>II.4.2. DON.....</i>	<i>40</i>
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 Fumonisinina 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