



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA
DOTTORATO DI RICERCA IN MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA
CICLO XXI

Studi sull'immunizzazione nei confronti di aflatossine

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. CARLO CHEZZI

Tutor:

Chiar.mo Prof. LUCIANO POLONELLI

Dottoranda:

LAURA GIOVATI

2010

alla mia fantastica famiglia

PREFAZIONE

I prodotti del metabolismo cellulare, in base alla loro essenzialità funzionale, possono essere suddivisi in metaboliti primari e secondari. I metaboliti primari, così come i costituenti delle vie biochimiche del carbonio e dell'azoto, sono coinvolti nella sintesi di composti fondamentali, come zuccheri, aminoacidi e lipidi. Al contrario, i metaboliti secondari sono molecole a basso peso molecolare la cui utilità per l'organismo produttore è spesso ignota (1).

Uno degli aspetti storicamente più interessanti dello studio dei metaboliti secondari prodotti dai microrganismi è l'ordine cronologico delle conoscenze che ha indotto alla percezione di una dualità in questo gruppo di sostanze

Negli anni '30, sono stati scoperti alcuni metaboliti secondari di interesse medico per l'importante proprietà di risultare selettivamente tossici nei confronti di batteri patogeni e relativamente atossici per gli animali, uomo incluso. Tali sostanze sono state definite antibiotici (2) e, dalla loro scoperta, sono stati saggiati migliaia di metaboliti secondari microbici, identificando tanti composti di importanza farmacologica da far definire gli anni seguenti come "l'era degli antibiotici" (3).

Negli anni '60, invece, la tossicità di alcuni metaboliti secondari fungini, definiti micotossine, nei confronti degli animali, uomo incluso, ha assunto un'importanza talmente considerevole da indurre a definire l'attuale periodo "l'era delle tossine microbiche" (4).

Tale considerazione deriva dalla scoperta di un elevatissimo numero di micotossine presenti come contaminanti negli alimenti umani e nei mangimi animali e dalla constatazione delle loro proprietà mutagene, teratogene e cancerogene. Si ritiene che circa un quarto del raccolto agricolo mondiale risulti contaminato da micotossine (5, 6).

Le conoscenze acquisite sui metaboliti secondari microbici, antibiotici e micotossine, hanno avuto un notevole impatto sulla qualità della vita umana, per la possibilità di trattamento di malattie infettive e controllo della sicurezza alimentare.

INDICE

1	INTRODUZIONE	1
1.1	AFLATOSSINE (AF)	2
1.1.1	Scoperta e caratterizzazione di AF	2
1.2	FUNGHI AFLATOSSIGENI E PRODUZIONE DI AF	4
1.2.1	Fisiologia dei funghi aflatossinogenici	4
1.2.2	Biosintesi di AF	6
1.2.3	Condizioni influenti sulla produzione di AF	8
1.2.4	Esposizione umana ad AF	9
1.3	TOSSICOCINETICA DI AF	13
1.3.1	Assorbimento di AF nel tratto gastro-intestinale	14
1.3.1.1	Circolazione entero-epatica di AF	17
1.3.2	Distribuzione di AF nell'organismo e concentrazione in fegato e reni	17
1.3.3	Biotrasformazione di AF	19
1.3.3.1	Reazioni di prima fase (di attivazione) di AF	19
1.3.3.1.1	Epossidazione di AF	21
1.3.3.1.2	Idrossilazione, O-demetilazione e riduzione di AF	24
1.3.3.2	Reazioni di seconda fase (di detossificazione) di AF	25
1.3.4	Modalità di escrezione di AF	26
1.3.4.1	Escrezione fecale di AF	28
1.3.4.2	Escrezione urinaria di AF	29
1.3.4.3	Escrezione mammaria di AF	30
1.3.5	Marcatori biologici di esposizione ad AF	32

1.4	INTERAZIONI MOLECOLARI DI AF	35
1.4.1	Interazioni di AF con DNA.	35
1.4.2	Interazioni di AF con proteine	37
1.5	EFFETTI PATOLOGICI DI AF	39
1.5.1	Aflatossicosi acuta	40
1.5.2	Aflatossicosi cronica	44
1.5.2.1	Cancerogenicità di AF	45
1.5.2.2	Immunodepressione da AF.	47
1.5.2.3	Interferenza nutrizionale di AF.	51
1.6	AFLATOSSINA M ₁	53
1.6.1	Identificazione di AFM ₁	53
1.6.2	Effetti biologici di AFM ₁	54
1.7	CONTAMINAZIONE DA AF NEI PRODOTTI DI ORIGINE ANIMALE	58
1.7.1	Contaminazione da AF in carne, uova e latte	58
1.7.2	Carry-over di AFB ₁ come AFM ₁ nel latte	59
1.7.3	Effetti della lavorazione del latte contaminato con AFM ₁	66
1.7.4	Trasferimento di AFM ₁ nei prodotti derivati dal latte	66
1.7.5	Trattamenti per la decontaminazione del latte da AFM ₁	67
1.8	ASPETTI LEGISLATIVI PER IL CONTROLLO DI AF	69
1.8.1	La normativa per AF in Europa	69
1.8.2	Definizione dei limiti massimi ammissibili per AFM ₁	70
1.8.3	Definizione dei limiti massimi di AF ammissibili nei mangimi.	71
1.8.4	Implicazioni pratiche, etiche e commerciali relative ad AF	73
1.9	STRATEGIE PER LA PREVENZIONE DI AFLATOSSICOSI	75
1.9.1	Strategie applicabili a livello comunitario nei confronti di AF	75

1.9.1.1	Prevenzione dello sviluppo fungino in campo	76
1.9.1.2	Prevenzione dello sviluppo di AF durante lo stoccaggio delle derrate alimentari.	77
1.9.1.3	Tattamento dei prodotti contaminati da AF.	78
1.9.1.3.1	Diluizione	78
1.9.1.3.2	Decontaminazione.	79
1.9.1.3.3	Separazione.	80
1.9.2	Strategie applicabili a livello individuale nei confronti di AF. . .	81
1.9.2.1	Chemioprotezione da AF	81
1.9.2.2	Prevenzione dell'assorbimento entrale di AF	82
1.10	STATO DELL'ARTE	84
1.11	SCOPO DELLA RICERCA	89
2	MATERIALI E METODI.	92
2.1	TERRENI, SOLUZIONI E TAMPONI.	93
2.2	CEPPI BATTERICI	96
2.3	IMMUNIZZAZIONI SPERIMENTALI.	97
2.3.1	Immunizzazione di topi con AFB ₁ coniugata a BSA	97
2.3.2	Immunizzazione di ratti con AFB ₁ coniugata a BSA	97
2.3.3	Immunizzazione di bovini con AFB ₁ coniugata a BSA	98
2.4	INDAGINI SIEROLOGICHE IN ANIMALI IMMUNIZZATI CON AFB ₁ -BSA	100
2.4.1	Saggi immunoenzimatici diretti per la valutazione di anticorpi (Ab) specifici nei confronti di AFB ₁	100
2.4.2	Saggi immunoenzimatici per la valutazione di Ab specifici nei confronti di BSA.	100

2.4.3	Determinazione dell'isotipo di Ab di topo specifici per AFB ₁ . . .	101
2.5	IMMUNOMONITORAGGIO	102
2.5.1	Monitoraggio sierologico di topi immunizzati con AFB ₁ -BSA ed esposti ad AFB ₁	102
2.5.2	Monitoraggio sierologico di ratti immunizzati per via sistemica con AFB ₁ -BSA ed esposti ad AFB ₁	102
2.6	PRODUZIONE DI COSTRUTTI PEPTIDICI FAGICI MIMOTOPI DI AFB ₁	103
2.6.1	Clonaggio di oligonucleotidi in pC89	103
2.6.2	Produzione dei fagi ricombinanti	104
2.6.3	Saggio immunoenzimatico dei fagi ricombinanti.	105
2.6.4	Produzione di cloni fagici per immunizzazione	105
2.6.5	Titolazione fagica.	106
2.7	PRODUZIONE DI IMMUNOGENI GENICI ESPRIMENTI PEPTIDI MIMETICI DI AF	107
2.7.1	Clonaggio di oligonucleotidi in pDisplay	107
2.7.2	Verifica molecolare della presenza dell'inserito in pDisplay-C1 e pDisplay-C2	108
2.7.3	Preparazione e purificazione di plasmidi per immunizzazione	109
2.8	PRODUZIONE DI PROTEINE RICOMBINANTI ESPRIMENTI UN PEPTIDE MIMETICO DI AF	110
2.8.1	Clonaggio di oligonucleotidi in pT7Kan-Trx	110
2.8.2	Clonaggio di oligonucleotidi in pT7Kan-NcCVNH0.	111
2.8.3	Produzione di immunogeni ricombinanti costituiti da mimotopi di AF coniugati a Trx o NcCVNH0.	111
2.8.3.1	Proteine solubili.	112
2.8.3.2	Proteine rinaturate	113

2.8.4	Verifica delle proteine ricombinanti prodotte mediante SDS page	113
2.9	IMMUNIZZAZIONE SPERIMENTALE	114
2.9.1	Immunizzazione di topi con costrutti peptidici fagici mimotopi di AF	114
2.9.2	Immunizzazione di topi con costrutti genici esprimenti peptidi mimetici di AF	114
2.9.3	Immunizzazione di topi con mimotopi di AF espressi in Trx o NcCVNH0	115
2.10	INDAGINI SIEROLOGICHE IN ANIMALI IMMUNIZZATI CON COSTRUTTI MOLECOLARI ESPRIMENTI MIMOTOPI DI AFB ₁ . .	116
2.10.1	Saggi immunoenzimatici diretti per la valutazione di Ab specifici nei confronti di AFB ₁	116
2.10.2	Determinazione dell'isotipo immunoglobulinico di Ab specifici per AFB ₁	116
2.11	PRODUZIONE DI ANAFB ₁	118
2.11.1	Modificazione chimica di AFB ₁	118
2.11.2	Saggio dell'effetto di AFB ₁ e AnAFB ₁ su linee cellulari di carcinoma epatico	118
2.11.3	Saggio di mutagenesi di AFB ₁ e AnAFB ₁ su ceppi di <i>Salmonella typhimurium</i>	119
2.12	PRODUZIONE DELL'IMMUNOGENO ANAFB ₁ -KLH	121
2.12.1	Coniugazione di AnAFB ₁ a KLH	121
2.12.2	Determinazione del rapporto di coniugazione AnAFB ₁ -KLH . .	121
2.13	IMMUNIZZAZIONE SPERIMENTALE DI VACCHE CON ANAFB ₁ -KLH . .	123
2.13.1	Esperimento pilota di immunizzazione	123
2.13.2	Immunizzazione con AnAFB ₁ -KLH e Montanide ISA 563	123
2.13.3	Immunizzazione con AnAFB ₁ -KLH ed adiuvante di Freund . . .	124

2.13.4	Saggi immunoenzimatici indiretti per la titolazione di Ab specifici nei confronti di AFB ₁	124
2.13.5	Saggi immunoenzimatici indiretti competitivi	125
2.14	ANALISI STATISTICA DEI TITOLI ANTICORPALI SPECIFICI PER AFB ₁	125
2.15	VALUTAZIONE DELL'EFFETTO PROTETTIVO DI AB SPECIFICI PER AFB ₁ IN VACCHE IMMUNIZZATE CON ANAFB ₁ -KLH.	126
2.15.1	Trattamento di vacche immunizzate con AFB ₁	126
2.15.2	Determinazione della concentrazione di AFM ₁ nei campioni di latte	127
2.15.3	Monitoraggio sierologico di vacche immunizzate ed esposte ad AFB ₁	128
2.16	ANALISI STATISTICA DEL CONTENUTO DI AFM ₁ NEL LATTE.	129
2.17	VALUTAZIONE DELL'EFFETTO PROTETTIVO <i>IN VITRO</i> DI AB SPECIFICI NEI CONFRONTI DI AFB ₁	130
2.17.1	Preparazione di coniugati AnAFB ₁ con sfere magnetiche	130
2.17.2	Purificazione di Ab specifici per AFB ₁ dal siero di vacche immunizzate.	131
2.17.3	Valutazione della inibizione della citotossicità di AFB ₁ in cellule HepG2	132
3	RISULTATI	133
3.1	VALUTAZIONE DELLA POTENZIALITA' VACCINALE DI UN IMMUNOGENO COSTITUITO DA AFB ₁ CONIUGATA A BSA (AFB ₁ -BSA).	134
3.1.1	Valutazione dell'induzione di Ab specifici per AFB ₁ in topi immunizzati con AFB ₁ -BSA.	134
3.1.2	Determinazione dell'isotipo di Ab di topo specifici per AFB ₁	135

3.1.3	Monitoraggio sierologico di topi immunizzati con AFB ₁ -BSA ed esposti ad AFB ₁	136
3.1.4	Valutazione dell'induzione di Ab specifici per AFB ₁ in ratti immunizzati con AFB ₁ -BSA.	137
3.1.5	Monitoraggio sierologico di ratti immunizzati con AFB ₁ -BSA ed esposti ad AFB ₁	138
3.1.6	Valutazione dell'induzione di Ab specifici per AFB ₁ in vacche immunizzate con AFB ₁ -BSA	139
3.2	COSTRUZIONE E VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA IMMUNOGENA DI PEPTIDI MIMETICI DI AFB ₁	141
3.2.1	Produzione di costrutti peptidici fagici mimotopi di AFB ₁	141
3.2.2	Produzione di costrutti genici codificanti per peptidi mimetici di AFB ₁	142
3.2.3	Realizzazione di un peptide mimetico di AF coniugato a tioredossina	143
3.2.4	Realizzazione di un peptide mimotopo di AF coniugato a cianovirina	144
3.2.5	Valutazione comparativa della specificità immunogena dei costrutti prodotti.	146
3.3	PRODUZIONE E VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA IMMUNOGENA DI ANAFB ₁	148
3.3.1	Modificazione chimica di AFB ₁	148
3.4	PROVE DI TOSSICITÀ IN VITRO PER AFB ₁ E ANAFB ₁	150
3.4.1	Saggio dell'effetto di AFB ₁ e AnAFB ₁ su linee cellulari di carcinoma epatico	150
3.4.2	Saggio di mutagenesi su ceppi di <i>Salmonella typhimurium</i>	151
3.5	PRODUZIONE DELL'IMMUNOGENO ANAFB ₁ -KLH	154
3.5.1	Sintesi del coniugato AnAFB ₁ -KLH.	154
3.5.2	Determinazione del rapporto di coniugazione AnAFB ₁ -KLH.	155

3.6	VALUTAZIONE DELL'INDUZIONE DI AB SPECIFICI PER AFB ₁ IN VACCHE IMMUNIZZATE CON ANAFB ₁ -KLH	158
3.6.1	Esperimento pilota	158
3.6.2	Vacche immunizzate con AnAFB ₁ -KLH e Montanide ISA 563 . .	161
3.6.3	Vacche immunizzate con AnAFB ₁ -KLH ed adiuvante di Freund.	162
3.6.4	Conferma della specificità per AFB ₁ di Ab prodotti con AnAFB ₁	165
3.6.5	Reattività crociata di Ab indotti da AnAFB ₁ -KLH nei confronti di AF.	167
3.7	VALUTAZIONE DELL'EFFETTO PREVENTIVO DI AB SPECIFICI NEL CARRY OVER DI AFB ₁	169
3.7.1	Esperimento pilota	169
3.7.2	Vacche immunizzate con AnAFB ₁ -KLH ed adiuvante di Freund.	171
3.7.2.1	Fase di lattazione medio-iniziale	171
3.7.2.2	Fase di lattazione medio-avanzata	174
3.7.3	Monitoraggio sierologico di vacche immunizzate con AnAFB ₁ -KLH ed esposte ad AFB ₁	176
3.7.4	Valutazione comparativa dell'escrezione di AFM ₁ nelle due fasi di lattazione	178
3.8	VALUTAZIONE <i>IN VITRO</i> DELL'EFFETTO PROTETTIVO DI AB SPECIFICI PER AFB ₁	180
3.8.1	Preparazione di coniugati AnAFB ₁ con sfere magnetiche	180
3.8.2	Purificazione di Ab specifici per AFB ₁ da siero di vacca.	181
3.8.3	Neutralizzazione della tossicità <i>in vitro</i>	182
4	DISCUSSIONE	184
5	BIBLIOGRAFIA	199

1.
INTRODUZIONE

1.1 AFLATOSSINE

Aflatossine (AF) sono state riconosciute quale causa o concausa di numerosi decessi nell'uomo e negli animali. L'importanza sanitaria ed economica in ambito medico umano e veterinario di queste micotossine, comuni contaminanti di alimenti, mangimi e foraggi, è determinata dalle loro proprietà mutagene, teratogene, cancerogene e immunosoppressive che possono causare aflatossicosi, acute e croniche, potenzialmente esitanti in epatomi, danno diretto ad organi vitali, ridotta resistenza alle infezioni, minore efficienza nella risposta alle vaccinazioni, decremento della produttività animale, intesa come minore resa di carni ed uova, riduzione dell'incremento ponderale, minore efficienza dei mangimi (7-11). La complessità dei meccanismi d'azione e la molteplicità degli effetti di AF nell'uomo e in altri animali rendere problematico lo studio di misure profilattiche o terapeutiche per le aflatossicosi.

1.1.1 Scoperta e caratterizzazione di AF

AF sono un gruppo di metaboliti secondari tossici prodotti principalmente da ceppi di due specie di funghi ubiquitari, *Aspergillus flavus* ed *A. parasiticus*, in grado di contaminare molte matrici di origine vegetale utilizzate a scopo alimentare.

La sindrome tossica derivante dall'esposizione ad AF venne riconosciuta per la prima volta nel 1960, quando centinaia di tacchini, anatre e polli morirono a causa di una malattia sconosciuta denominata inizialmente "malattia-X del tacchino". In seguito, la causa dell'epidemia fu individuata in un componente del mangime somministrato agli animali, farina di arachide contaminata da *A. flavus* (12). Studi successivi consentirono l'identificazione di una sostanza fluorescente, caratterizzata dalle stesse proprietà tossiche del mangime da cui era stata isolata, che venne denominata "aflatossina", dall'abbreviazione di "*A. flavus* toxin" (13). Ulteriori ricerche chiarirono che quella che era stata inizialmente definita "aflatossina", comprendeva un gruppo di

metaboliti secondari strettamente correlati che potevano essere distinti in AF di gruppo B o G, a seconda della fluorescenza blu o verde emessa in seguito ad eccitazione con luce UV, ed in AF di gruppo 1 o 2 in base alla mobilità in cromatografia liquida a strato sottile (TLC) (14). Sono state, pertanto, distinte 4 AF: AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ (15), la cui struttura venne definita, nel 1965, da Buche e collaboratori (16) (**Figura 1**). Oltre alle quattro AF principali, prodotte dal metabolismo dei miceti tossinogenici, sono state descritte altre 12 AF derivanti da reazioni di biotrasformazione nei mammiferi (es. AFM₁, AFP₁, AFQ₁ e AFB_{2a}) (17).

La struttura molecolare di AF è caratterizzata da un nucleo cumarinico fuso a un bifurano e a un pentanone (AFB₁, AFB₂) o a un lattone a sei atomi (AFG₁, AFG₂) (**Figura 1**). Un'altra importante differenza tra AF consiste nella porzione terminale dell'anello furanico che può presentare, tra il carbonio 8 e 9, un legame saturo (AFB₂, AFG₂) o insaturo (AFB₁, AFG₁) (17). Il doppio legame presente all'estremità del gruppo furanico di AFB₁ e AFG₁ può essere ossidato dalle ossidasi microsomiali, con trasformazione in veri e propri legami covalenti.

Il gruppo bifuranico, inoltre, assicura una grande rigidità ad una estremità della molecola, che presenta, pertanto, una struttura praticamente piana, che consente interazioni specifiche con costituenti cellulari, in particolare il DNA.

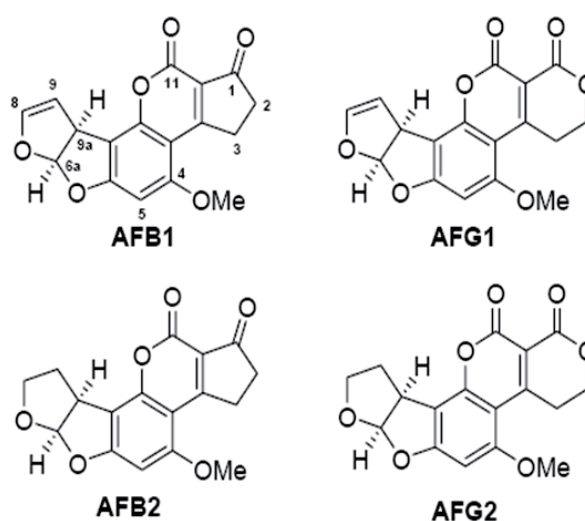


Figura 1. Struttura chimica delle AF

1.2 FUNGHI AFLATOSSIGENI E PRODUZIONE DI AF

1.2.1 Fisiologia dei funghi aflatossinogenici

Le specie *A. flavus* e *A. parasiticus* sono state le prime caratterizzate come aflatossigeniche (18-21) ma, a partire dal 1978, ceppi di *A. nomius* (22), *A. bombycis* (23), *A. ochraceoroseus* (24, 25), *A. pseudotamarii* (26) e *A. tamarisii* (27), sono stati dimostrati in grado di produrre AF. Queste ultime specie sono, tuttavia, meno diffuse in natura e vengono riscontrate raramente quali contaminanti in vegetali di interesse agricolo. *A. flavus*, ubiquitario nell'ambiente e cosmopolita, produce AFB₁ e AFB₂, mentre *A. parasiticus*, più diffuso nei climi tropicali e sub-tropicali e presentante affinità per frutta e semi oleosi, produce AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ (18, 19, 21, 28). Le specie appartenenti al genere *Aspergillus* sono comuni contaminanti ambientali, in grado di colonizzare habitat ecologicamente distinti, particolarmente diffusi in climi temperati, tropicali, sub-tropicali compresi in una zona tra i 26° a nord e i 35° a sud dell'equatore (29). Negli ambienti maidicoli della Pianura Padana, la specie di *Aspergillus* più diffusa è *A. flavus* (30).

La crescita di *A. flavus* può avvenire in un ampio spettro di temperature, con un valore ottimale intorno ai 37°C (31), per quanto una ricerca condotta su sei specie del nord Italia abbia evidenziato condizioni ottimali di sviluppo comprese tra i 25° e i 30°C (30). Condizioni ottimali di crescita per membri del genere *Aspergillus* prevedono un'umidità relativa compresa tra il 13-18%, con un'attività dell'acqua (a_w) maggiore di 0,73 (31). *Aspergillus* spp. sono in grado di colonizzare sia una grande varietà di substrati in campo sia semi e granaglie successivamente alla raccolta (32). Le maggiori contaminazioni aspergillari si riscontrano in mais, semi di cotone, arachidi e loro sottoprodotti (33). In particolare, *A. flavus* appare in grado di contaminare tutti questi vegetali, mentre *A. parasiticus* è particolarmente rilevabile sulle ara-

chidi (34, 35). I principali fattori in grado di influenzare la contaminazione di piante da parte di *Aspergillus* spp. sono temperatura, umidità e presenza di lesioni causate da insetti.

Nel caso di *A. flavus*, il processo di colonizzazione del mais in campo è stato ben caratterizzato (34, 36). *A. flavus* si trova, normalmente, nel terreno, dove vive saprofitariamente a carico dei residui colturali (cariossidi, tutoli, frammenti di stocco o di tessuti fogliari di mais o di altre piante) su cui sviluppa soprattutto micelio e, talvolta, sclerozi, superando in questo modo le avverse condizioni invernali (36). Al sopraggiungere della buona stagione, dal micelio e dagli sclerozi si originano enormi quantità di conidi che danno il via alla fase di diffusione di *A. flavus* nell'ambiente circostante. L'infezione primaria avviene attraverso la disseminazione nell'ambiente dei conidi trasportati da vento, schizzi di pioggia o insetti. In questo modo, i conidi giungono sulle sete e vi germinano originando delle ife che si accrescono fino ad interessare la cariosside in formazione e, in condizioni ambientali favorevoli, a penetrare nel chicco attraverso abrasioni prodotte nel tegumento dagli insetti (37). Per lo sviluppo dell'infezione è necessaria un'umidità del chicco superiore al 32%, anche se, successivamente, AF possono essere prodotte a valori minori (fino al 15%) (34). Elevate temperature e aridità del terreno incrementano, solitamente, la probabilità di contaminazione di piante da parte di *Aspergillus* spp. (37). Il fenomeno è probabilmente riferibile ad uno stress idrico che rende la pianta più debole e, quindi, più facilmente aggredibile da funghi, che invece tollerano la scarsità d'acqua. Nel caso di temperature superiori ai 30°C, che favoriscono la crescita del fungo e sono, al contrario, fonte di ulteriore difficoltà per il mais, l'infezione è maggiormente favorita. Un ulteriore vantaggio per lo sviluppo del fitopatogeno deriva dal fatto che le condizioni di temperatura e umidità tipiche dei periodi di siccità, ben tollerate da *Aspergillus* spp., sono invece meno permissive per la crescita di altri microrganismi eventualmente presenti sul mais e nel terreno. In questa situazione ambientale, *A. flavus* si trova ad essere favorito nella competizione biologica, prevalendo sugli altri micror-

ganismi e riuscendo a colonizzare il substrato. Condizioni di siccità possono, inoltre, causare nelle cariossidi microfessurazioni che rappresentano vie d'ingresso per il fungo, favorendone ulteriormente l'infettività. Tutti i fattori, infatti, che provocano lesioni della superficie della granella, come grandine e attacchi da insetti o di uccelli, diminuiscono la resistenza del mais all'attacco di *A. flavus*. Una volta raccolte, le derrate alimentari sono soggette a contaminazione da AF anche durante lo stoccaggio. In queste fase, le variabili più importanti in grado di influire sulla crescita fungina sono l'umidità del substrato e l'umidità relativa dell'ambiente (34).

Per ridurre la contaminazione successivamente al raccolto, è importante raccogliere il mais ad umidità relative comprese tra il 25,5 e il 25% e, quindi, essiccarlo artificialmente fino a portare la granella ad umidità inferiore al 15% nel giro di 48 ore (34). Se la granella non è propriamente essiccata, infatti, la contaminazione fungina si sviluppa in pochi giorni. Per prevenire lo sviluppo fungino, temperatura ed umidità andrebbero strettamente controllate anche durante il trasporto.

1.2.2. Biosintesi di AF

La via biosintetica di AF, è costituita da una complessa serie di circa quindici reazioni, catalizzate da polichetide sintasi, susseguenti alla formazione di un intermedio, etanolo, a partire da acetato e malonil-CoA mediante una sintasi degli acidi grassi (**Figura 2**). La reazione della prima polichetide sintasi porta alla formazione dell'intermedio acido norsolorinico, che viene convertito enzimaticamente in una serie di metaboliti a tossicità crescente, fino alla sintesi di versicolorina. Questo precursore può essere convertito in demetil-sterigmatocistina, da cui si originano AFB₁ e AFG₁, o in diidrodemetil-sterigmatocistina, da cui derivano AFB₂ e AFG₂ (38).

I geni codificanti per la biosintesi di AF sono organizzati, vicino ai geni codificanti gli enzimi per il metabolismo degli zuccheri, in un cluster di circa 70 kbp (39). È interessante sottolineare come la delezione di alcuni di questi geni in altre *Aspergillus*

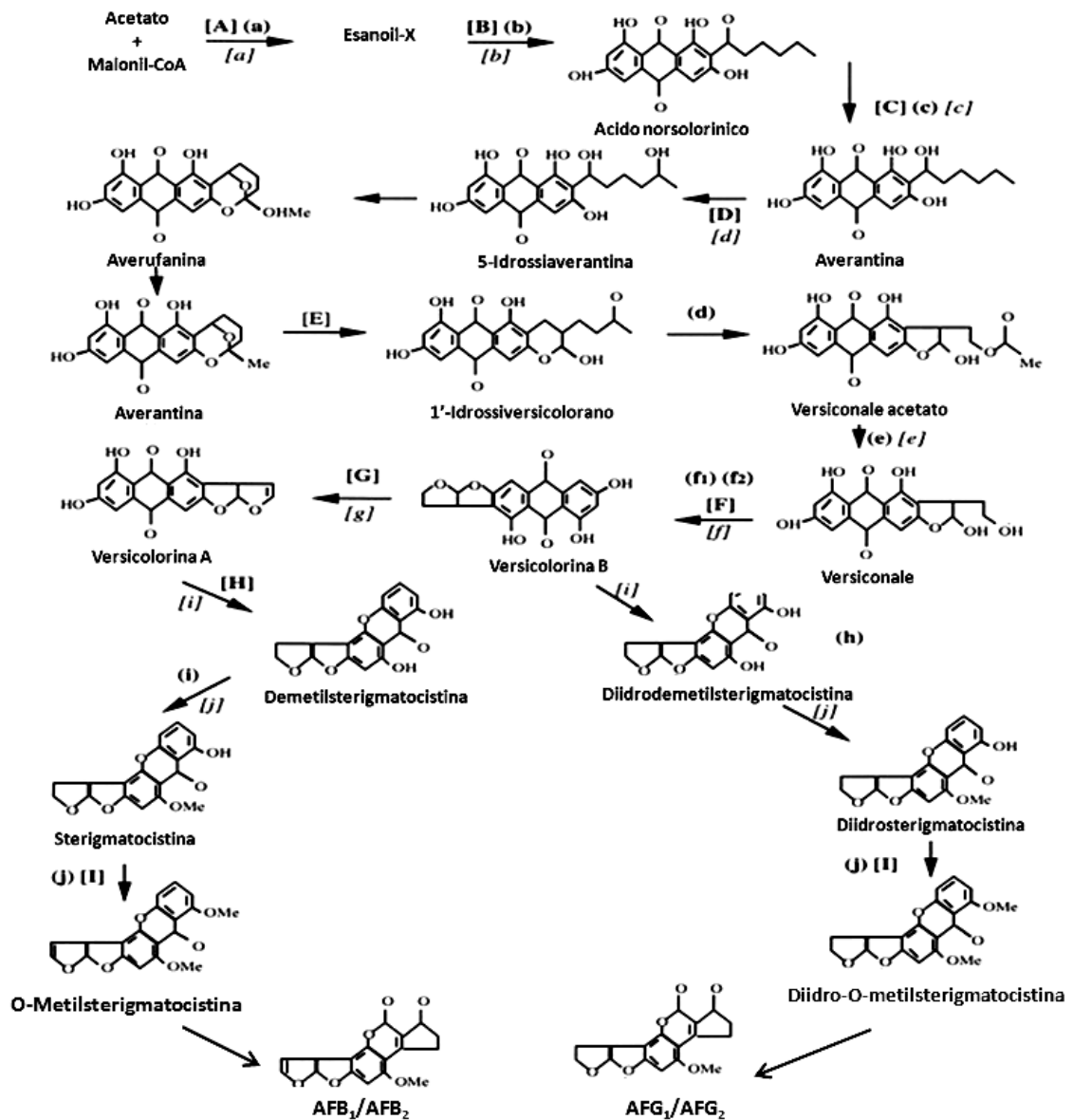


Figura 2. Biosintesi di AF. Enzimi coinvolti: a) acido grasso sintasi; b) polichetide sintasi; c) acido norsolorinico riduttasi; d) emiacetale versiconale acetato riduttasi; e) esterasi; f₁) versicolorina B sintasi; f₂) versiconil ciclasti; g) desaturasi; h) O-metil trasferasi (MT-II); i) O-metil trasferasi; j) O-metil trasferasi (MT-I). Tratta da: Sweenwy and Dobson, 1999 (38).

spp. abbia portato alla soppressione della via biosintetica di AF o ne permetta solo la formazione di precursori. La sterigmatocistina, ad esempio, è un precursore strutturalmente correlato ad AF, prodotto dalle specie *A. versicolor* e *A. nidulans* in particolare, che presenta potere mutageno e tumorigenico, anche se inferiore ad AF (40). Il genoma di *A. oryzae* and *A. sojae*, funghi ampiamente utilizzati per la fer-

mentazione di alimenti in oriente, è in grado di codificare molti enzimi omologhi a quelli funzionali alla sintesi di AF (24). Delezioni ed altri difetti genetici hanno portato, peraltro, al silenziamento della via biosintetica (41, 42) e, pertanto, in nessuna di queste specie è stata mai riscontrata produzione di AF (43).

Non tutti i ceppi di *A. flavus* e *A. parasiticus* posseggono i determinanti genetici per produrre AF. Un ruolo fondamentale è svolto da un gene che codifica una proteina regolatoria della via biosintetica di AF, denominato *aflR*. Nei ceppi in cui *aflR* è deletato dal cluster genico degli enzimi della via biosintetica, non viene prodotto alcun trascritto mentre, al contrario, quando il gene è presente in più copie, si assiste ad una iperproduzione di AF (o suoi intermedi metabolici) (44).

1.2.3 Condizioni influenti sulla produzione di AF

I fattori in grado di influenzare la produzione di AF possono essere distinti in tre categorie: fattori fisici, nutrizionali e biologici. In relazione alla combinazione di questi parametri, la biosintesi di AF può essere attivata o completamente inibita, anche in presenza di crescita fungina (45). I fattori fisici includono temperatura, umidità, attività dell'acqua (A_w), pH, luce ed aerazione. La temperatura ottimale per la produzione di AF è compresa tra i 25° e i 30°C, in presenza di umidità e con a_w maggiore di 0,85, con un valore ottimale di 0,99 e pH compreso tra 3,5-5,5 (4, 46, 47).

Per la formazione di AF sono, inoltre, richieste sostanze nutritive specifiche, come minerali, in modo particolare lo zinco, vitamine, acidi grassi, aminoacidi e fonti di energia (4). L'alta concentrazione di carboidrati, come nel caso del grano e del riso, ed in misura minore dei semi oleosi (cotone, arachidi ecc.), favoriscono la sintesi di AF (48). I maggiori livelli di AF sono prodotti quando il fungo invade l'embrione del seme, ove sono presenti zuccheri semplici (glucosio e saccarosio), piuttosto che altre parti del seme, ove predominano i carboidrati complessi (amido) (49). È stato

bene documentato come l'azoto sia in grado di sopprimere la sintesi di AF ma, se fornito sottoforma di ammonio, può invece stimolarla.

Esiste, inoltre, una forte componente biologica in grado di influire sulla produzione di AF, dovuta in parte al tipo di pianta colonizzata e, in parte, al ceppo di *Aspergillus* infettante. Tra le specie di *A. flavus* e *A. parasiticus* esistono notevoli differenze qualitative e quantitative, di natura genetica, nella produzione di AF. Si ritiene, ad esempio, che circa la metà dei ceppi di *A. flavus* isolati, e una minore quantità di *A. parasiticus*, sia aflatossigenico (50). Il quantitativo di tossina biosintetizzata da uno stesso ceppo fungino, inoltre, varia in base alle condizioni di crescita.

1.2.4 Esposizione umana ad AF

La contaminazione da AF può interessare molti alimenti di origine vegetale, più frequentemente mais, arachidi e semi di cotone, ma anche pistacchi, noci, riso e spezie (21, 33, 50). È inoltre importante considerare che, in cattive condizioni di conservazione, anche altri substrati vegetali possono facilmente essere contaminati da funghi aflatossigenici (25). La proporzione delle quattro AF prodotte da *Aspergillus* spp., inoltre, varia in funzione di fattori ambientali e genetici, per quanto AFB₁ sia la forma prevalente e più tossica (4, 51, 52).

Le condizioni di temperatura richieste per la sintesi di AF, la vulnerabilità alla contaminazione delle derrate alimentari, i sistemi di produzione del cibo, le modalità di conservazione e di commercializzazione e la mancanza di regolamenti alimentari sono fattori indicativi di come il rischio di esposizione cronica ad AF sia maggiore nei paesi in via di sviluppo, compresi tra 40° N e S dall'equatore, per quanto il problema sussista anche nei paesi industrializzati e ad altre latitudini. Specie aflatossigeniche del genere *Aspergillus* sono particolarmente diffuse nelle zone calde umide dell'Africa sub-sahariana e del sudest dell'Asia (**Figura 3**). In queste aree geografiche, la contaminazione delle fonti alimentari primarie è tale per cui l'esposizione

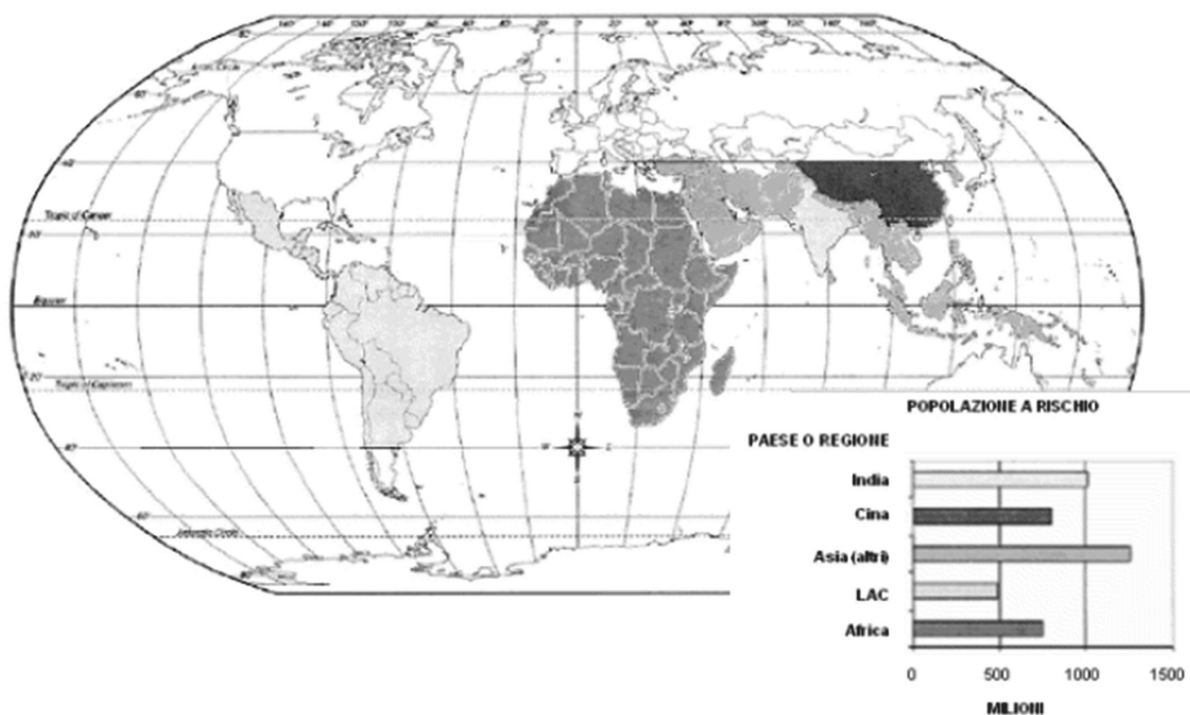


Figura 3. Aree e popolazioni a rischio di esposizione cronica a quantità incontrollate di AF. LAC, America Latina e Carabi. Tratta da: Williams 2004 (62).

umana ad AF può essere considerata cronica (53). I dati sulla contaminazione del cibo, disponibili per molti paesi in via di sviluppo, generalmente mostrano che una grande quantità di derrate alimentari risultano essere contaminate e che una loro significativa proporzione lo è ad un livello superiore a quello consentito dal *Codex Alimentarius* (FAO Codex Alimentarius 2001). Analisi sulla contaminazione di cereali hanno mostrato che, in campioni provenienti da regioni della Cina ad elevato rischio di carcinoma epatico, AFB₁ rappresentava la tossina prevalente per quantità e frequenza, con concentrazioni variabili da 9 a 2496 ppb ed una incidenza di contaminazione dell'85% (54). Tra i campioni saggiati, il 76% evadeva la legislazione cinese, che prevede 20 ppb per AFB₁ nel grano e prodotti derivati per alimentazione umana. La media giornaliera di assunzione di AFB₁ da grano nelle aree ad alto rischio era di 184,1 µg e la probabile assunzione giornaliera era stimabile in 3680 ng/kg di peso corporeo.

Concentrazioni di 271,63 ppb di AF totale e 165,05 ppb di AFB₁ sono state riportate in burro di arachidi fornito, nel 2001, a scolari nell'area di Capo est in Sudafrica, dove la massima concentrazione di AF consentita negli alimenti è di 10 ppb, 5 dei quali possono essere costituiti da AFB₁ (55). Ampie variazioni nell'esposizione ad AF possono sussistere in diversi paesi, particolarmente in relazione ai costumi dietetici. L'esposizione giornaliera ad AF ha mostrato di essere di 3,5-14,8 ng/kg di peso corporeo in Kenya, 11,4-158,6 nello Swaziland, 38,6-183,7 in Mozambico, 16,5 in Sud Africa, 4-115 in Gambia, 11,7-2027 nella provincia dello Guangxi nel Sud della Cina e 6,5-53 in Thailandia, mentre negli Stati Uniti era di 2,7 ng/kg (56). L'esposizione in Ghana, in base al solo consumo di arachidi, è stimata essere 9,9-99,2 ng/kg al giorno, ma altri cibi comunemente consumati, a base di grano, per esempio il kenkey, possono essere contaminati e, pertanto, l'esposizione è presuntivamente maggiore (57, 58).

Negli USA, si calcola che circa il 20% del mais degli stati meridionali sia contaminato da AF. Nelle regioni medio-occidentali, la contaminazione non è considerata un rischio, se non nelle annate caratterizzate da condizioni climatiche estreme. Nel 1988-89, ad esempio, in queste regioni è stato registrato un anno di siccità tale da determinare l'innalzarsi del livello di contaminazione di AF del raccolto all'8% (59).

In Europa, la contaminazione della produzione agricola da parte di AF non è ritenuta una problematica di primaria importanza in quanto considerata tipica delle regioni tropicali. Nei climi caldi dei paesi del sud dell'Europa, tuttavia, in alcune annate si possono creare le condizioni per una massiva contaminazione del mais (60). In Italia, ad esempio, l'estate del 2003 è stata caratterizzata da elevate temperature. Durante giugno, luglio e agosto sono stati raggiunti i 40°C, creando condizioni per la proliferazione delle specie del genere *Aspergillus*. Nell'autunno del 2003 si è verificato, conseguentemente, un aumento significativo della contaminazione da AF nei prodotti destinati all'alimentazione degli animali, ed in particolare

nel mais. Tale aumento ha generato un corrispondente aumento della concentrazione di AFM₁ nel latte delle vacche alimentatesi con il mais pesantemente contaminato, creando una situazione di emergenza tale da indurre il Ministero della Salute italiano ad adottare specifici provvedimenti (51).

Significativamente, l'emergere del problema AF nel continente europeo è strettamente connesso all'incremento delle temperature annuali registrato nelle ultime decadi. L'ulteriore innalzamento previsto per le temperature globali, così come la frequenza e la durata delle ondate di caldo (61), potrebbero presto incrementare ulteriormente il rischio AF in Europa e in altre regioni temperate.

1.3 TOSSICOCINETICA DI AF

Gli effetti sull'organismo degli xenobiotici, sostanze chimiche estranee al sistema biologico, dipendono principalmente da 4 processi tossicocinetici fondamentali: l'assorbimento corporeo dovuto al contatto cutaneo, all'inalazione o all'ingestione, la distribuzione della sostanza all'interno dell'organismo, il metabolismo della sostanza, all'insieme cioè delle biotrasformazioni alle quali è soggetta, l'eliminazione della sostanza o dei suoi metaboliti.

I processi di assorbimento, distribuzione, biotrasformazione ed escrezione coinvolti nella tossicocinetica di AF, sono strettamente correlati ed interconnessi (**Figura 4**).

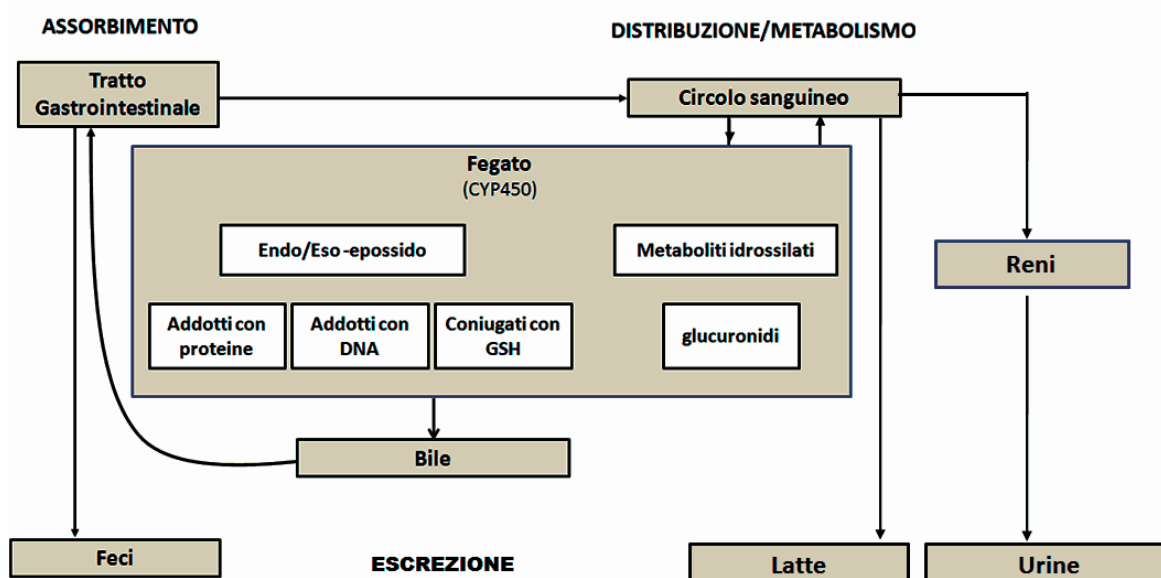


Figura 4. Tossicocinetica delle AF.

La tossicocinetica di AF, è stata definita principalmente in relazione ad AFB₁. A causa della sua elevata tossicità, acuta e cronica, e per la potenziale attività cancerogena che esplica negli animali, uomo incluso, AFB₁ è la micotossina sulla quale si è focalizzato maggiormente l'interesse dei ricercatori. AFB₁, dopo l'assunzione da parte di

un vertebrato superiore, può essere metabolizzata ad altri composti, alcuni dei quali caratterizzati da differente tossicità. Queste trasformazioni comprendono reazioni di fase I/prima fase (riduzione, ossidazione, idrolisi) e di fase II/seconda fase, che consentono, a scopo di detossificazione, la combinazione con un composto naturale prodotto dall'organismo (63).

1.3.1 Assorbimento di AF nel tratto gastro-intestinale

L'assorbimento è il processo che consente ai composti xenobiotici di penetrare nell'organismo dal sito di esposizione. In generale, la frazione di xenobiotico biologicamente attiva in grado di interagire con le macromolecole cellulari al livello dell'organo bersaglio (dose interna) è solo una frazione della dose di esposizione per via dermica, orale o respiratoria (dose esterna) e il grado di assorbimento della sostanza varia significativamente in relazione alla via di esposizione (64). Solo nel caso di sostanze iniettate direttamente per via endovenosa, la dose interna ed esterna coincidono. La tossicità è funzione della dose interna di una sostanza e della sua permanenza a livello dell'organo bersaglio.

L'esposizione ad AF può avvenire, per uomini e animali, secondo diverse vie. Dal momento che le AF sono un comune contaminante delle derrate alimentari, la principale via di esposizione è quella orale (65). Sono stati trovati, tuttavia, quantitativi significativi di AF nelle particelle volatili originate dalla manipolazione di matrici vegetali contaminate (66-68). L'inalazione di polveri derivanti da granaglie contaminate è risultata essere una importante fonte di esposizione occupazionale (69, 70) ed alcuni studi epidemiologici hanno riferito la presenza di AFB₁ ad una maggiore incidenza di tumori delle vie respiratorie in alcune categorie di lavoratori (71). AFB₁ è stata rilevata nei polmoni di un operaio tessile e di due agricoltori deceduti per fibrosi interstiziale polmonare (72), individui probabilmente esposti per motivi occupazionali ad AFB₁ attraverso le vie respiratorie, e nel tessuto polmonare di un ingegnere chimico,

deceduto di carcinoma cellulare alveolare, che aveva lavorato per 3 mesi in un processo di sterilizzazione di farina di arachidi brasiliane contaminate da *A. flavus* (73). AFB₁ è, inoltre, in grado di penetrare l'epidermide umana *in vitro* (74, 75) e studi *in vivo* hanno dimostrato che, in seguito ad applicazione topica di AFB₁ radioattiva in ratti e conigli, un quantitativo significativo veniva assorbito e trasportato dalle proteine plasmatiche in vari organi, incluso il fegato (76, 77). Recentemente, è stato dimostrato come l'esposizione dermica ad AFB₁ sia in grado di determinare la formazione di tumori alla pelle e lesioni pre-neoplastiche in modelli murini (78). Queste osservazioni suggeriscono come una prolungata manipolazione di foraggi e sementi contaminate da AF possa causare una esposizione diretta attraverso la pelle. Questo rischio diventa particolarmente importante nei paesi in via di sviluppo, dove nelle fasi pre- e post-raccolta della produzione agricola viene sfruttato il lavoro manuale e, a livello mondiale, nel settore delle arachidi, dove vi è un elevato impiego di personale che effettua manualmente la selezione e lo scarto dei semi contaminati.

L'assorbimento di AF avviene, comunque, in gran parte a causa di esposizione orale. In seguito ad ingestione, AFB₁ è assorbita efficientemente nel tratto intestinale e, in particolare, il principale sito di assorbimento risulta essere il duodeno (79, 80). In uno dei primi studi sull'assorbimento di AF, eseguito in ratti, è stato descritto come, entro 24 ore dal trattamento, il 20% di AFB₁ era escreta per via urinaria ed il 60% attraverso le feci (81). Un piccolo quantitativo di AFB₁, tuttavia era escreto nell'arco delle prime 8 ore dall'ingestione. È stato osservato che ratte erano in grado di eliminare, attraverso la bile, il 10-30% e il 60-65% di AFB₁ dopo 24 ore dalla somministrazione per via orale o intra-peritoneale, rispettivamente (82). Complessivamente, i risultati suggeriscono un rapido assorbimento di AFB₁ attraverso le mucose intestinali. Recentemente, studi *in vivo* con AF radioattive hanno permesso di chiarire le cinetiche di assorbimento di AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ attraverso la membrana luminale dell'intestino tenue di ratti, confermando che l'assorbimento di tali micotossine sia un processo estremamente rapido caratterizzato da una cinetica del primo ordine (83).

In seguito ad assorbimento, AF sono trasferite dallo strato di cellule epiteliali al sangue della vena mesenterica, da cui vengono trasportate direttamente al fegato (80). A dimostrazione della velocità del processo, in vari esperimenti la presenza di AF nel sangue in seguito ad esposizione è stata riscontrata per periodi brevissimi (84, 85). Poichè AFB₁ è una molecola a basso peso molecolare, è stato ipotizzato che essa venga assorbita negli enterociti tramite diffusione passiva transmembrana attraverso il doppio strato lipidico (80, 86, 87). Questa ipotesi è confermata dal fatto che la lipofilità, direttamente correlata alla velocità di diffusione attraverso le membrane cellulari, sia un fattore determinante nell'influenzare l'assorbimento di AF. La velocità di assorbimento di AFB₁, infatti, è significativamente maggiore di quella dell'analogo meno lipofilo AFG₁ (80, 88). Ulteriore supporto a questa tesi deriva da uno studio che ha mostrato come il trasporto di AFB₁ attraverso un monostato di cellule Caco-2 avvenga a velocità simili dal lato apicale a quello basolaterale e viceversa, suggerendo che, nell'assorbimento e nell'estruzione di AFB₁, non siano coinvolte pompe a trasporto attivo (89).

Sulla base di studi *in vivo* effettuati utilizzando come modello la membrana vaginale di vacche, è stato suggerito che un assorbimento precoce di AF possa avvenire anche attraverso le membrane mucose della bocca e dell'esofago, prima del comparto ruminale (90). Il passaggio di AF attraverso una mucosa non assorbente quale la mucosa vaginale, inoltre, conferma il processo di diffusione passiva come un probabile meccanismo per l'assorbimento (90).

Al fine di simulare l'esposizione ad AF in seguito ad inalazione, è stata analizzata la concentrazione ematica di AFB₁ nel tempo in seguito ad instillazione intratracheale. I risultati hanno evidenziato come l'assorbimento attraverso il tratto respiratorio fosse più rapido che dopo somministrazione orale ma, dopo quattro ore, i valori di concentrazione di AFB₁ nel sangue tendessero ad eguagliarsi (84). Adsorbendo la dose tracheale a polveri prima della somministrazione, la permanenza di AFB₁ in trachea veniva prolungata (91), risultando in un incremento del legame di AFB₁ al DNA di

trachea e polmoni. Il prolungamento del tempo di ritenzione di AFB₁ in relazione all'associazione a polveri potrebbe essere un importante fattore nell'azione cancerogena di questa molecola nel tratto respiratorio.

1.3.1.1 Circolazione enteroepatica di AF

L'assorbimento di AF attraverso il tratto gastrointestinale può avvenire anche attraverso la circolazione enteroepatica (86). Questo processo comprende l'escrezione dei prodotti del metabolismo di AF nel tratto intestinale attraverso la bile, il riassorbimento e il ritorno al fegato attraverso la circolazione portale. Poiché molti metaboliti di AF sono escreti nella bile come glucuronidi idrosolubili, è improbabile che essi vengano riassorbiti come tali. Gli enzimi della popolazione microbica residente intestinale, tuttavia, sono in grado di idrolizzare alcuni glucuronidi coniugati, rilasciando composti meno polari che possono essere riassorbiti (92).

1.3.2 Distribuzione di AF nell'organismo e concentrazione in fegato e reni

La distribuzione è il processo attraverso il quale i composti xenobiotici, come AF, vengono trasferiti, principalmente attraverso il sangue, dal sito di assorbimento ai vari organi e tessuti.

Una volta entrate nel flusso sanguigno, AF vengono trasportate principalmente al fegato, l'organo nel quale subiscono la maggior parte dei processi metabolici. Anche i reni, seppure in misura inferiore, sono in grado di concentrare AF dal sangue (86, 93). Studi in ratto sulla distribuzione di [C¹⁴]-AFB₁ in seguito ad assorbimento, hanno rilevato, 30 minuti dopo una singola dose intra-peritoneale di aflatossina marcata, il 17% della radioattività totale nel fegato, il 5% nei reni e il 27% nella carcassa. Altri organi, come ghiandole surrenali, cervello, cuore, pancreas, milza, timo e testicoli contenevano livelli minori dello 0,5%. La radioattività risultava corrisponde-

re sia ad AFB₁ sia a AFM₁. Durante i successivi 90 minuti, la radioattività dovuta alla presenza di entrambe le tossine nei reni e nel fegato diminuiva rapidamente fino ad arrivare, dopo 2 ore, a meno dell'1% nei reni e meno del 10% nel fegato (81). Esperimenti analoghi, condotti in criceto, hanno mostrato che, dopo alcuni minuti dall'iniezione intra peritoneale di una singola dose di AFB₁ marcata, era possibile rilevare AFB₁ libera nel sangue, nel fegato e nei reni fino ad 8-10 ore dalla somministrazione (94).

AF entrano nel fegato attraverso la vena porta epatica (79) e, data l'elevata efficienza di quest'organo nell'estrarre AFB₁ libera dal flusso sanguigno, probabilmente a causa dell'elevata permeabilità della membrana degli epatociti, il fegato risulta essere il principale organo coinvolto nei processi di biotrasformazione e detossificazione di AF. È stato dimostrato che la permeazione di AFB₁ negli epatociti avviene tramite diffusione non ionica e che l'assorbimento non viene influenzato né da inibitori delle proteasi né dall'energia metabolica, suggerendo che la velocità di permeazione sia determinata dalla composizione dei domini lipidici nelle membrane cellulari (95). Differenze specie specifiche nella composizione di lipidi di membrana potrebbero, quindi, essere un fattore importante nel determinare il grado di assorbimento individuale di AFB₁.

Un altro fattore in grado di influenzare l'assorbimento e il metabolismo di AF da parte delle cellule epatiche è il legame di AFB₁ all'albumina plasmatica. AFB₁, incubata con plasma di ratto o somministrata intra-peritonealmente, si lega principalmente all'albumina, che è probabilmente il suo trasportatore proteico prioritario (96). All'interno del sangue circolante, la porzione di AF libera (non legata a macromolecole) è, quindi, in equilibrio con la porzione legata. Solo la porzione libera, tuttavia, è disponibile per il passaggio attraverso le membrane. Il legame di AFB₁ ad albumina già a livello del sito di assorbimento può essere, quindi, considerato come uno dei maggiori meccanismi di detossificazione, in grado di prevenire l'interazione della micotossina con la cellula (86).

1.3.3 Biotrasformazione di AF

La biotrasformazione, o metabolismo, è il processo mediante il quale un organismo trasforma le sostanze xenobiotiche in nuovi composti chimici, in grado di essere eliminati più facilmente. Negli organismi animali, uomo incluso, sono state identificate diverse vie metaboliche coinvolte nella biotrasformazione, in seguito ad assorbimento, di AFB₁ e altre AF. Come nel caso di altri composti xenobiotici, queste vie metaboliche possono condurre all'attivazione o alla modificazione di AFB₁ (reazioni di prima fase) o alla coniugazione della micotossina per ottenere prodotti meno tossici della molecola parentale (reazioni di seconda fase). La tossicità e la carcinogenicità di AFB₁ per un particolare organismo sono, quindi, determinate da quali vie vengano principalmente attivate per metabolizzare la micotossina in seguito all'assorbimento. L'attivazione di AFB₁, in particolare è, importante per qualsiasi considerazione degli effetti tossici sugli organismi. AFB₁, infatti, non è di per sé cancerogena e, virtualmente, tutti i suoi effetti tossici sono attribuibili all'azione di alcuni suoi metaboliti, in grado di reagire con macromolecole cellulari.

Anche se il sito principale di queste reazioni è il fegato (ed in misura minore i reni), il tratto gastro-intestinale partecipa attivamente a questo processo (97). È stato dimostrato che l'attivazione del meccanismo di conversione epatica di AF è un processo molto veloce: dopo 2 ore dall'ingestione di AFB₁ radioattiva, il quantitativo di radioattività ancora presente nel fegato risultava essere attribuibile ad AFB₁ convertita in molecole polari per il 12%, in metaboliti non polari per il 3% e in addotti legati covalentemente al DNA per più del 70% (98).

1.3.3.1 Reazioni di prima fase (di attivazione) di AF

Le principali reazioni di prima fase di AFB₁ sono mediate dal sistema enzimatico delle citocromo P450 (CYP) monoossigenasi a funzione mista, una famiglia di emoproteine che catalizzano, in presenza di NADP e ossigeno, reazioni di ossidazione di molti composti xenobiotici (99) **(Figura 5)**.

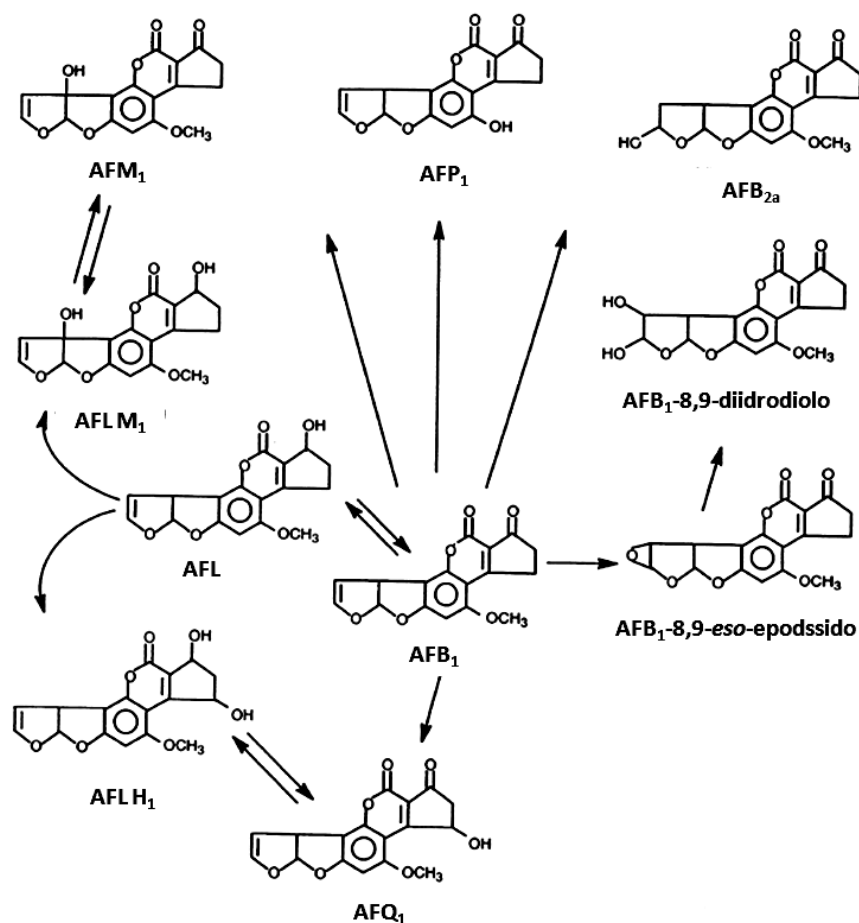


Figura 5. Principali prodotti del metabolismo di prima fase di AFB₁. Tratta da: IARC 2003 (53).

Il complesso enzimatico delle monoossigenasi CYP è presente in vari tessuti dell'organismo in diverse forme. I principali enzimi coinvolti nel metabolismo umano di AF sono le isoforme CYP 3A4 e 1A2 (100, 101). Tali enzimi sono espressi in modo prevalente nel fegato, ma anche in tessuti extra-epatici, come epitelio respiratorio ed intestinale, fornendo alle cellule di tali tessuti la possibilità di bio-attivare AFB₁ e svolgendo un ruolo importante nella modulazione degli effetti tossici e cancerogeni di AF *in vivo* (102). È stato dimostrato che gli enterociti dell'epitelio dell'intestino tenue contengono livelli elevati di enzimi CYP 3A in grado di attivare AF, probabilmente limitandone l'assorbimento a livello sistemico (103). Il metabolismo di AFB₁ nell'epitelio intestinale da parte di CYP 3A4, con formazione di AFQ₁ ed *eso*-epossi-

do, risulta, inoltre, un meccanismo di detossificazione indiretto, dal momento che le cellule intestinali contenenti gli addotti AF/DNA vengono rapidamente esfoliate, senza avere il tempo di trasformarsi, eventualmente, in tessuti neoplastici (102, 104). CYP polmonari possono ossidare AFB₁ (105, 106) e, in particolare, CYP 1A2 e 3A4 sono state isolate in tessuti polmonari umani e in cellule di polmone coltivate *in vitro* (107-109). È stato recentemente dimostrato, inoltre, che CYP 2A13, un enzima espresso in modo predominante nel tratto respiratorio umano, è significativamente attivo nel metabolismo di AFB₁ (110). Questa osservazione suggerisce che l'attivazione metabolica di AFB₁ *in situ* possa svolgere un ruolo critico nella carcinogenesi polmonare umana correlata all'inalazione della micotossina.

1.3.3.1.1 Epossidazione di AF

In seguito al trasporto attraverso la membrana plasmatica degli epatociti, la molecola di AFB₁ è attivata da CYP microsomiali (associate al reticolo endoplasmico tubolare liscio) che ossidano il legame 8,9-vinile etere producendo AFB₁-8,9-epossido (111). AFB₁-8,9-epossido è un intermedio elettrofilo che può attaccare eteroatomi nucleofili quali azoto, ossigeno e zolfo dei costituenti cellulari ed ha, quindi, un ruolo centrale nella carcinogenicità e tossicità mediate da AFB₁ (112). AFB₁-8,9-epossido è uno stereoisomero che può esistere nella conformazione “*eso*” ed “*endo*” (113-115). AFB₁-8,9-*eso*-epossido è una molecola elettrofila in grado di legare DNA in modo covalente con grande affinità (100, 116, 117), causando danni nucleari, o di legarsi a siti specifici del reticolo endoplasmico, provocando il distacco dei ribosomi e la degradazione dei polisomi (118). Al contrario, la reattività di AFB₁-*endo*-epossido con DNA è circa 1000 volte inferiore di quella dell'*eso* isomero (119). La spiegazione più plausibile per questa differenza di reattività è data dal fatto che, prima della formazione del legame covalente, sia necessaria l'intercalazione dell'anello cumarinico dell'epossido tra le basi di DNA con una ben determinata geometria (**Figura 6**).

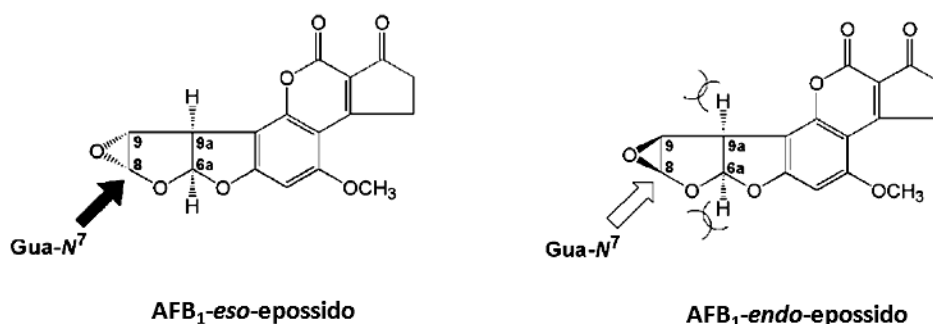


Figura 6. Stereoisomeri “*eso*” ed “*endo*” di AFB₁-8,9-epossido (REF). La maggiore reattività di AFB₁-8,9-*eso*-epossido con la guanina del DNA può essere spiegata dall’impedimento sterico all’attacco nucleofilo dell’atomo N⁷ della guanina causato dagli H6a e H9a di AFB₁-8,9-*endo*-epossido. Tratta da: Bren, 2007 (120).

In particolare, in seguito all’intercalazione dell’*eso*-epossido, l’anello cumarinico è posizionato sotto il piano ed *in cis* con i protoni 5a e 9a, assistendo l’attacco elettrofilo, mediante reazione di tipo S_N2, alle basi degli acidi nucleici (114, 121), con formazione principalmente del composto identificato come trans-8,9-diidro-8-(N⁷-guanil)-9-idrossi-AFB₁, o AFB₁-N⁷-Guanina (AFB₁-N⁷-Gua), addotto al DNA (AFB₁-N⁷-Gua-DNA) (**Figura 7**).

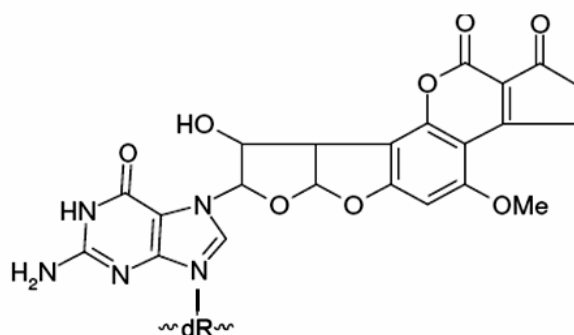


Figura 7. AFB₁-N⁷-Guanina (AFB₁-N⁷-Gua). Tratto da: Essigmann, 1977 (114).

Al contrario, in seguito alla reazione di AFB₁-*endo*-epossido con DNA, sono formate solamente bassissime quantità di addotto perché l’anello ossiranico dell’*endo*-epossido, trovandosi *in trans* in seguito all’intercalazione nel DNA, non facilita la stereochimica richiesta per la reazione S_N2 (122, 123). In accordo con queste osservazioni, l’*endo*-epossido è essenzialmente non genotossico nel test Umu (119).

Entrambi gli epossidi sono altamente instabili in H_2O , ove idrolizzano rapidamente originando un diidrodiole (8,9-diidro-8,9 diidrossi AFB₁) (124). Questa reazione di idratazione è seguita da riarrangiamento a dialdeide fenolato (125), intermedio in grado di dare origine a reazioni di condensazione con gruppi amminici primari delle proteine e di altri costituenti cellulari, formando basi di Schiff (126, 127), un meccanismo probabilmente coinvolto nella tossicità di AFB₁ (128). Il principale addotto proteico ritrovato nell'albumina plasmatica in seguito ad esposizione ad AFB₁ *in vivo*, è l'addotto AFB₁-lisina (AFB₁-Lys) (127) (**Figura 8**).

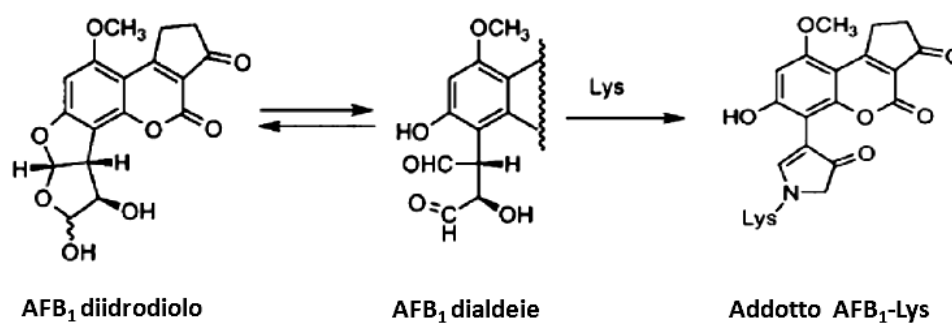


Figura 8. Equilibrio di AFB₁ diidrodiole con AFB₁ dialdeide e reazione di formazione dell'addotto con la lisina (AFB₁-Lys). Tratta da: Guengerich 2002 (125).

Anche se gli studi sulla biotrasformazione di AFB₁ si sono focalizzati principalmente sul metabolismo mediato dalle monoossigenasi CYP450, è noto come altri enzimi siano in grado di catalizzare, negli esseri umani, l'ossidazione extra-epatica di AFB₁ ad AFB₁-epossido. In presenza di prostaglandina H sintasi, ad esempio, può avvenire la co-ossigenazione di AFB₁ accoppiata alla sintesi di acido arachidonico, portando alla formazione della molecola 2,3-diidro-2,3-epossi-AFB₁, reattiva con DNA (129, 130). A dimostrazione dell'importanza di questa via di attivazione, la prostaglandina H sintasi presenta lo stesso grado di attività di CYP nei microsomi renali (Liu and Massey 1992) e, in certi sistemi sperimentali (tessuti polmonari umani e in cellule di polmone coltivate *in vitro*), la bioattivazione di AFB₁ da parte della H sintasi appare addirittura più importante di quella catalizzata da CYP (131).

1.3.3.1.2 Idrossilazione, O-demetilazione e riduzione di AF

Il sistema enzimatico delle monoossigenasi citoplasmatiche è responsabile anche della trasformazione di AFB₁ in molecole polari. Ad opera di questi enzimi, AFB₁ può essere, infatti, idrossilata in AFM₁, AFQ₁ ed aflatossicolo (AFL) (132, 133) o demetilata, con formazione di AFP₁ (132). Queste molecole presentano, generalmente, minore attività biologica della molecola parentale e vengono, quindi, considerate come prodotti di detossificazione (97, 134, 135). I metaboliti idrossilati AFM₁ e AFQ₁, tuttavia, sono stati dimostrati essere in grado di legarsi in modo covalente al DNA, probabilmente a causa di una successiva epossidazione della molecola (136). Al contrario, AFQ₁ non sembra essere un buon substrato per l'eossidazione (97) e diversi studi hanno dimostrato come AFQ₁ presenti minore tossicità acuta, mutagenicità e cancerogenicità della molecola parentale (137, 138). AFP₁ è significativamente meno tossica di AFB₁, con attività mutagena scarsa o nulla (138).

AFM₁ è stata identificata in urine e latte di diverse specie animali esposte ad AFB₁. Questa tossina, mostra una significativa attività cancerogena *in vivo*, seppur minore della molecola parentale (139, 140), e tossicità simile (141). Analogamente a quanto descritto per AFB₁, l'idrossilazione di AFB₂ porta alla formazione di AFM₂, un metabolita riscontrato in vacche in seguito all'ingestione di ingenti quantitativi di AFB₂ (97).

AFB₁ può essere anche convertita reversibilmente ad opera di una NADPH-reduttasi in AFL (142), molecola che presenta la stessa cancerogenicità di AFB₁ e simile mutagenicità (134). Dal momento che la riduzione è reversibile, inoltre, AFL può praticamente agire quale riserva di AFB₁ nell'organismo (143). Il metabolita aflatossicolo M₁ (AFL-M₁) può risultare sia da ossidazione di AFL sia da riduzione di AFM₁ (97). Il processo di idratazione del doppio legame dell'anello furanico di AFB₁ porta alla formazione di AFB_{2a}. Questa reazione avviene in modo non enzimatico in condizioni acide, ad esempio nello stomaco in seguito ad ingestione di AFB₁, o in seguito ad ossidazione microsomiale. AFB_{2a}, nella forma di ione fenolato, è in grado di legare

le proteine formando basi di Schiff, potenzialmente responsabili della tossicità di AFB₁ (144, 145). La minore tossicità di AFB_{2a}, somministrata per via orale, può essere spiegata in termini di non assorbimento attraverso le membrane intestinali (146).

1.3.3.2 Reazioni di seconda fase (di detossificazione) di AF

Il processo di detossificazione di AF aumenta l'idrosolubilità e la polarità dei composti, favorendone l'escrezione attraverso la bile e, in minor misura, le urine e il latte; questa fase si sviluppa, prevalentemente, attraverso due reazioni: legame di AFB₁-8,9-epossido al glutatione (GSH), reazione catalizzata dalla GSH trasferasi (GST) e coniugazione degli altri metaboliti (AFM₁, AFP₁, AFQ₁) con l'acido glucuronico o solfati (87).

I metaboliti idrossilati (AFM₁, AFQ₁) od O-demetilati (AFP₁) di AFB₁ vengono rapidamente coniugati ad acido glucuronico o solfato e, successivamente, escreti nella bile e nelle urine di diverse specie animali, tra cui trota, topo, criceto, coniglio e scimmia (147-149). La reazione di coniugazione avviene negli epatociti ad opera di UDP-glucuronil-trasferasi, sulfotrasferasi e, probabilmente, il sistema delle epossido idrolasi (150). A causa della minore tossicità di questi metaboliti di AFB₁, tuttavia, l'importanza tossicologica di queste vie metaboliche di detossificazione è relativamente scarsa. La principale reazione di detossificazione appare essere la coniugazione di AFB₁-8,9-epossido a GSH ad opera della GST citosolica (87). È stato infatti riconosciuto che differenze in questo meccanismo di detossificazione siano in grado di determinare variazioni significative nella tossicità esercitata da AFB₁ in diverse specie animali (25). Negli esseri umani, ad esempio, i livelli costitutivi di espressione di GST hanno un basso potere di detossificare AFB₁-8,9-epossido, suggerendo che, su basi biochimiche, gli esseri umani possano essere una specie abbastanza sensibile agli effetti di AF (151). Al contrario, specie animali come il topo, che risultano resistenti al potere cancerogeno delle AF, presentano attività della GSH-trasferasi da 3 a 5 volte superiori alle specie animali sensibili (128, 152, 153).

Il coniugato AFB₁-GSH è escreto principalmente attraverso la bile (145), tuttavia, gran parte del coniugato è sottoposto ad ulteriore metabolizzazione nel fegato e nei reni, portando alla formazione del coniugato con l'acido mercapturico AFB₁-N-acetilcisteina (AFB₁-NALC) (154). Questo composto è escreto, principalmente, attraverso la via biliare e, in secondo luogo, attraverso la via urinaria (86) ed è riconosciuto come uno dei maggiori prodotti metabolici di detossificazione di AFB₁ (154, 155). Il livello di escrezione urinaria di AFB₁-NALC correla con la sensibilità delle diverse specie animali ad AFB₁ (156).

Un altro importante enzima di detossificazione, scoperto recentemente, è la AFB₁-aldeide reduttasi (AFAR), isolata inizialmente da fegato di ratto (157). Tale enzima è stato identificato in quanto risultava essere iper-espresso nel fegato in seguito a somministrazione di sostanze chemioprotettive (ditiolotoni). AFAR catalizza la riduzione della forma di AFB₁ reattiva con le proteine, AFB₁ dialdeide, in un dialcol (158). Successivamente, sono state identificate anche AFAR umane, denominate hAFAR1 e hAFAR2, in grado di ridurre AFB₁-dialdeide (159-161). Dal momento che gli addotti formati da AFB₁ con le proteine sono ritenuti i responsabili della tossicità acuta della micotossina (125, 126), l'induzione di AFAR potrebbe rappresentare un enzima detossificante fondamentale per attenuare le sindromi tossiche dovute ad esposizione ad AFB₁.

1.3.4 Modalità di escrezione di AF

Sia le AF non metabolizzate (B₁, B₂, G₁, G₂) che le forme metabolizzate (aflatossicolo, M₁, M₂) vengono escrete principalmente attraverso le feci e, in misura minore, attraverso la via urinaria (97) (**Figura 9**).

In seguito ad iniezione intraperitoneale di AFB₁ marcata, infatti, si registra una maggiore presenza di metaboliti marcati nelle feci che nelle urine (162). È stato riportato che l'escrezione totale di [C¹⁴]-AFB₁ dopo 100 ore dalla somministrazione intra-

venosa in topo, ratto e scimmia era rispettivamente l'80%, il 72% e il 73% (163). L'escrezione totale della radioattività appariva maggiore durante le prime 24 ore, confermando che il assorbimento, distribuzione nell'organismo, bioconversione ed escrezione delle AF siano processi molto rapidi (AFB₁ viene escreta in una settimana e la sua emivita nel plasma è di 36,5 min).

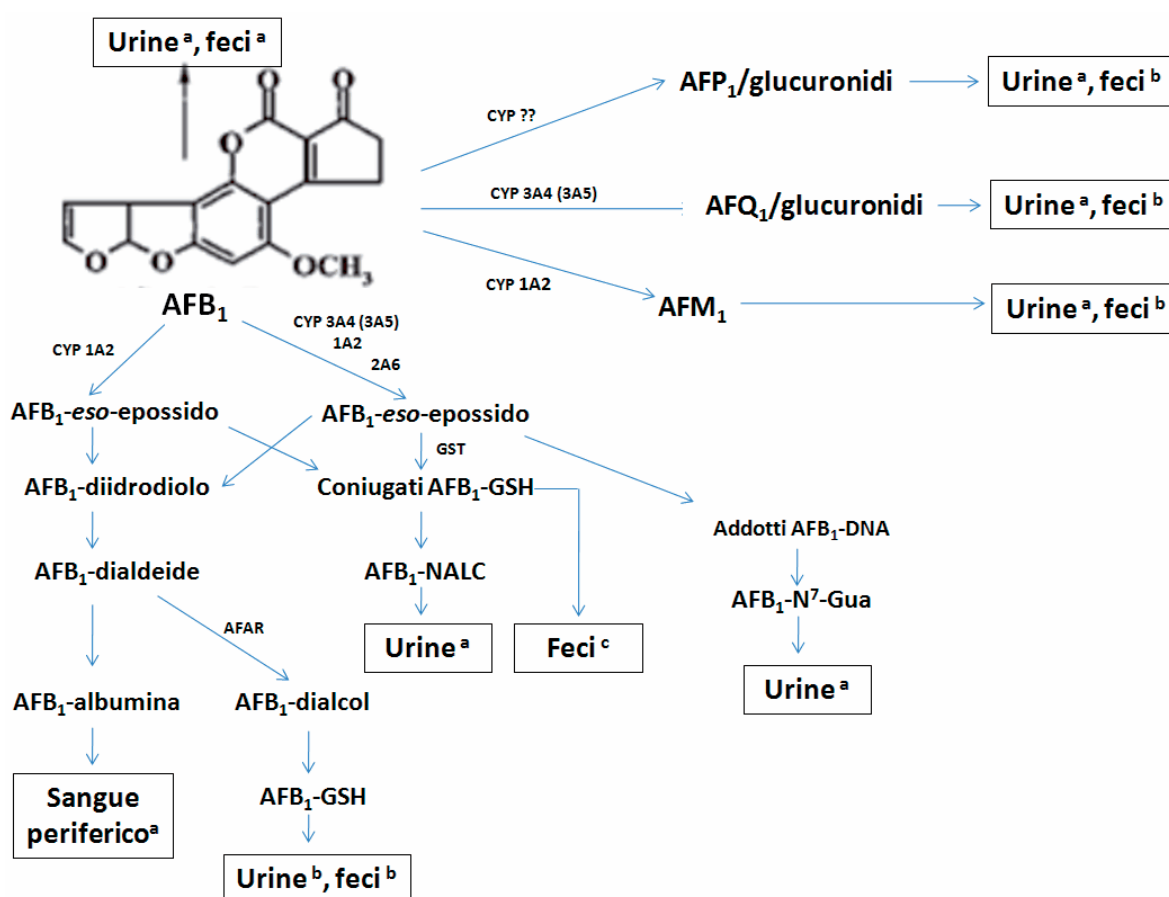


Figura 9. Processi di escrezione di AFB₁ negli esseri umani. Diagramma schematico delle vie metaboliche conosciute per il metabolismo di AFB₁ nell'uomo; a) evidenza certa *in vitro* e *in vivo* dell'escrezione di questo metabolita nell'uomo; b) disponibilità di dati scarsa o insufficiente; c) evidenze sperimentali *in vitro*; GST = glutatione-S trasferasi; mEH = epossido idrolasi micro somale; AFAR = AFB₁-aldeide riduttasi. Tratta da Mykkanen 2005 (164).

Nei mammiferi in fase di lattazione, un piccolo quantitativo di AFB₁ viene escreta come AFM₁ nel latte (165). È importante sottolineare come l'escrezione di AF nel latte, pur essendo quantitativamente poco importante, sia molto rilevante dal punto di vista tossicologico.

È stata riportata, inoltre, la presenza di sette diversi tipi di AF (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁, AFM₂ e AFL) nella saliva umana (166). AF secrete tramite la saliva possono essere riassorbite nel tratto gastrointestinale ed essere nuovamente immesse nel circolo sanguigno. Questo potrebbe spiegare, insieme alla circolazione enteroepatica l'osservazione di un certo grado di ricircolo di AF nell'organismo.

La velocità di eliminazione di AF, sia come molecole parentali sia come derivati metabolici, svolge un importante ruolo nella prevenzione degli effetti cancerogeni. È infatti possibile correlare la velocità di espulsione di AF con la sensibilità di diverse specie animali a tali micotossine (151).

1.3.4.1 Escrezione fecale di AF

AF vengono escrete nelle feci in due modi: non assorbite nel lume del tratto gastrointestinale e nell'intestino attraverso la bile. La via biliare è la principale via di escrezione di AF e dei loro metaboliti.

Questa assunzione è confermata da numerosi dati sperimentali ottenuti *in vivo* con AFB₁ radioattiva. In seguito ad una singola dose orale di [H³] AFB₁ somministrata in ratti, l'escrezione cumulativa di radioattività dopo 23 giorni è risultata essere del 23% nelle feci e del 15% nelle urine (84). Risultati analoghi sono stati acquisiti in esperimenti in cui AFB₁ marcata è stata somministrata per via *i.v.*. In questo caso, l'escrezione cumulativa dopo 4 giorni è risultata essere, nelle feci, pari al 53% della dose somministrata e pari al 19% nelle urine (163). Il picco di escrezione biliare è riscontrabile dopo 30 minuti dalla somministrazione ed inizia a decrescere dopo 2 ore dal trattamento (163).

Il maggiore metabolita di AFB₁ rilevato nella bile è AFB₁-GSH, un prodotto polare e non tossico (25). In esperimenti di rilevazione della radioattività in seguito all'iniezione per via *i.p.* di AFB₁ triziata, il 49-57% della radioattività misurata risultava essere imputabile ad AFB₁-GSH (98). Il secondo metabolita maggiormente presente nella bile era AFP₁-glucuronide, la cui radioattività rilevata nella bile risul-

tava essere del 4-15%. Studi recenti hanno dimostrato la presenza di AFQ₁ nelle feci in forma glucuronidata e l'assenza di tale forma di AFM₁. AFQ₁, essendo un alcol secondario, è, infatti, un buon substrato per la glucuronidazione (167), mentre AFM₁, un alcol terziario, è scarsamente glucuronidato (168).

I due metodi con cui è stata principalmente indagata l'escrezione di AFB₁ e dei suoi metaboliti nelle feci, analisi del contenuto della bile e misura della radioattività totale nelle feci in seguito a somministrazione di AFB₁ radioattiva, non sono in grado di fornire informazioni definitive sulla presenza di AFB₁ non assorbita nel materiale fecale. Data l'efficienza dell'epitelio intestinale nell'assorbire AFB₁, la presenza di AFB₁ non assorbita è tuttavia improbabile, anche se non escludibile a dosi elevate.

1.3.4.2 Escrezione urinaria di AF

La seconda via di escrezione, in ordine di importanza, per l'eliminazione di AFB₁ e dei suoi metaboliti appare essere, in molte specie animali, quella urinaria. Approssimativamente, il 10-20% di AFB₁ somministrata in elevata dose (0,4-1 mg/kg) per via intravenosa a ratti, è escreta nelle urine entro 24 ore dal trattamento (169). I prodotti del metabolismo di AFB₁ escreti attraverso la via urinaria sono AFM₁, AFQ₁, AFP₁ (170) e AFB₁-N⁷-Gua, il prodotto della degradazione degli addotti epatici di AFB₁ con DNA (171, 172). Questi metaboliti solubili di AFB₁ derivano direttamente da AF libere circolanti presenti nel flusso sanguigno (173).

In molte specie animali (ratto, pecora, maiale, vacca), AFM₁ è il principale metabolita di AFB₁ escreto nelle urine, costituente il 2-9% della dose somministrata (53). È stato dimostrato che, sul totale di AF escrete nelle urine di ratto, AFM₁ era il principale metabolita recuperato, costituendo il 40-50% del quantitativo totale, AFP₁ meno del 10%, mentre AFB₁-N⁷-Gua il 16% (169). Anche nell'uomo, i tre principali metaboliti di AFB₁ ritrovati nelle urine sono due prodotti di detossificazione (AFM₁ e AFP₁) e AFB₁-N⁷-Gua. Diversamente da quanto rilevato in ratto, il quantitativo di AF escrete, risulta essere una piccola percentuale di AFB₁ assunta. È stato,

ad esempio, calcolato che il quantitativo di AFM₁ escreta nelle urine sia l'1,2 -2,2% di AFB₁ assunta dagli esseri umani con la dieta (174).

AFM₁ è stata riscontrata nelle urine di abitanti delle Filippine che si erano cibati di burro di arachidi altamente contaminato da AF (175). Questo risultato è in accordo con ricerche precedenti in cui AFM₁ rappresentava il principale metabolita riscontrato, in Cina, nelle urine di esseri umani esposti ad AFB₁ a causa dell'assunzione di cibi contaminati (170, 174). In questi esperimenti, è stata calcolata una escrezione di AFB₁-N⁷-Gua pari allo 0,2% di AF assunta.

Esiste una relazione dose-dipendente tra AFB₁ assunta e AFB₁-N⁷-Gua escreta nelle urine di ratto (176). L'escrezione di AFB₁-N⁷-Gua è rapida, con l'80% di questo prodotto escreto nelle urine durante le prime 48 ore dalla somministrazione, in accordo con la altrettanto rapida escrezione dei metaboliti idrossilati (136).

Uno studio recente (164) ha evidenziato, in seguito ad ingestione di cibo contaminato, la presenza di AFQ₁ nelle urine di essere umani in quantità dieci volte superiore ad AFM₁. Rimane, tuttavia, da chiarire se questo eccesso sia attribuibile ad un maggiore livello di espressione del CYP3A4 nella popolazione oggetto dello studio. L'escrezione dei coniugati di AFB₁-GSH avviene, quasi esclusivamente, attraverso la bile. In ratto, circa il 14% della dose di AFB₁ iniettata intraperitonealmente viene escreta attraverso tale via (177). Gran parte di AFB₁-GSH, tuttavia, va incontro a passaggi metabolici successivi nel fegato e nei reni formando coniugati con l'acido mercapturico (AFB₁-NALC), successivamente escreti nelle urine (178).

Il livello di escrezione di coniugati di AFB₁ con acido mercapturico, insieme ai coniugati con solfato e glucuronidi, correla con la sensibilità specie specifica ad AF (154, 156).

1.3.4.3 Escrezione mammaria di AF

Nei mammiferi, in seguito ai processi di biotrasformazione, una piccola parte dei prodotti del metabolismo di AF vengono escreti, attraverso la via mammaria, nel

latte. In seguito alla somministrazione orale di $[C^{14}]$ -AFB₁ in capre, ad esempio, il quantitativo di carbonio marcato rilevato in urine, feci e latte era pari rispettivamente al 30,9%, 52,3% e 1,05% (179).

Il metabolismo di AFB₁ determina l'escrezione nel latte di AFM₁, mentre il metabolismo di AFB₂ determina l'escrezione di AFM₂. Il principale metabolita escreto nel latte umano ed animale è AFM₁; questa tossina rappresenta, infatti, il 95% del quantitativo totale di AF rilevabili nel latte. Altri metaboliti, come AFM₂, AFL, AFM₄ e AFQ₁ vengono rilevati solo in tracce (179).

Nonostante la via di escrezione di AF nel latte sia minoritaria dal punto di vista del quantitativo di tossine eliminate, l'alimento rappresenta un prodotto di interesse primario quale fattore di rischio per la salute umana. Il latte di bovini ed ovini contaminato da AF può rappresentare una fonte di esposizione per gli esseri umani attraverso l'ingestione diretta dell'alimento o dei prodotti della sua lavorazione (formaggi, yogurt, ecc.). Il rischio aggravato dal fatto che tra i maggiori consumatori di latte sono i bambini, che sono anche più sensibili agli effetti tossici di AF (62). Durante il periodo dell'allattamento, i prodotti del metabolismo di AF sono escreti nel latte di donne che abbiano ingerito cibo contaminato, rappresentando la principale fonte di esposizione per i neonati (180, 181). In quest'ottica, è importante sottolineare che il processo di produzione del latte a livello delle cellule della ghiandola mammaria concentra AFM₁ presente nel sangue contro gradiente (182).

È stato stimato che lo 0,09-0,43% di AF assunte con la dieta siano escrete come AFM₁ nel latte umano (183). I fattori che influenzano il tasso di escrezione di AFM₁ nel latte umano non sono stati studiati in dettaglio e, pertanto, sono disponibili al riguardo solo un numero limitato di informazioni. In generale, l'escrezione delle sostanze chimiche nel latte è influenzata da vari fattori che possono essere suddivisi in fattori chimici e fattori fisiologici o materni. I fattori chimici si riferiscono alle caratteristiche molecolari della sostanza presa in considerazione che influenzano la sua possibilità di essere secreta nel latte a livello delle cellule alveolari mammarie, quali lipo-

solubilità, grado di ionizzazione, peso molecolare e facilità di legarsi ai componenti del sangue e/o latte materno (184). I fattori materni possono essere ulteriormente suddivisi in fattori esterni (esposizione alimentare ed ambientale) e interni (età, peso corporeo, durata del periodo di lattazione, mobilizzazione dei grassi e concentrazione dei lipidi nel latte) (184, 185).

Nel caso di AF, il fattore critico nel determinare la quantità di tossina assunta dal neonato attraverso il latte è sicuramente la durata dell'esposizione materna (184).

Ad esempio l'analisi di campioni di latte raccolto da 73 donne in Australia e Thailandia ha rivelato la presenza di contaminazione da AFM₁ nel latte di 11 donne australiane e 5 thailandesi, con una concentrazione media pari a 0.071 ng/ml e 0.664Hg/ml, rispettivamente. Il latte di donne residenti in zone ad elevato rischio di contaminazione da AF presentava, quindi, una contaminazione da AFM₁ significativamente maggiore (181).

Contrariamente a quanto rilevato per gli esseri umani, sono disponibili un gran numero di studi sull'escrezione di AFM₁ nel latte di animali in seguito ad esposizione ad AFB₁, anche se la maggior parte di essi sono focalizzati sul tasso di conversione di AFB₁ in AFM₁.

1.3.5 Marcatori biologici di esposizione ad AF

Date le numerose fonti di errore che possono intervenire nella valutazione dello stato di contaminazione da AF delle derrate alimentari e in quella dei consumi alimentari, i dati di valutazione del rischio e della assunzione media giornaliera non sempre sono caratterizzati da una sufficiente affidabilità. Per ovviare a questa incertezza, secondo un'ottica più recente e moderna, alle metodologie tradizionali per la valutazione del rischio sono state affiancate quelle basate sui biomarcatori. Attualmente, il metodo principalmente usato per misurare l'esposizione umana ad AF consiste nell'analisi dei fluidi corporei per rilevare la presenza di loro derivati (186, 187).

Ogni processo biochimico origina dei composti derivati con una emivita caratteristica nell'organismo, permettendo di determinare l'esposizione lungo un periodo di giorni, settimane o mesi.

AFM₁ è escreta, nella maggior parte dei casi, entro le 48 ore dall'ingestione ed è quindi possibile ottenere, dalla misura quantitativa del contenuto di AFM₁ nei fluidi biologici, una stima ragionevole dell'ingestione recente di AFB₁ (188). Determinazioni nelle urine hanno dimostrato che AF e loro sottoprodotti sono molto variabili giornalmente, il che riflette il diverso grado di contaminazione negli alimenti e, per questa ragione, la misura singola quotidiana di AFM₁ non può essere un indicatore affidabile di esposizione cronica di una persona (186, 187, 189). L'addotto AFB₁-albumina può essere rilevato nel sangue periferico e ha un'emivita nell'organismo di 30-60 giorni e, quindi, può rappresentare un indicatore più affidabile di esposizione cronica. Poiché la frazione di AF ingerita che viene processata in un particolare metabolita è variabile, la concentrazione di un particolare marcatore biologico non può essere utilizzata per trarre conclusioni sulla quantità di esposizione totale.

I dati che si riferiscono all'esposizione biologica sono relativamente rari, in quanto tali determinazioni sono state effettuate particolarmente in Africa orientale e in Cina. Questi dati mostrano variazioni principalmente in relazione all'esposizione stagionale, il che riflette il naturale sviluppo della contaminazione fungina durante lo stoccaggio (190). I dati raccolti con i marcatori biologici mostrano che, indipendentemente dalle pratiche di preparazione degli alimenti, le popolazioni di questi paesi in via di sviluppo sono significativamente esposte a AF. Parallelamente, i rapporti sulla contaminazione degli alimenti suggeriscono che il tasso di esposizione biologica può essere estrapolato (quantomeno in modo approssimativo) per quei paesi in cui siano disponibili dati sulla contaminazione degli alimenti ma per cui non vi siano dati sui marcatori biologici. Premesso che, nella maggior parte dei paesi in via di sviluppo, viene fatto poco per decontaminare gli alimenti, è probabile che la prevalenza di esposizione cronica sia simile a quella determinata con l'uso di marcatori biologici.

Studi in cui vengono utilizzati i marcatori biologici di esposizione recentemente sviluppati (addotti AF-albumina nel siero, addotti AF-N⁷-guanina nelle mutazioni del gene *p53*) sono ancora in corso. I saggi per individuare la presenza di AFM₁ nel latte e nei prodotti derivati includono metodi radioimmunologici ed immunoenzimatici. Sia i marcatori biologici che i saggi per AFM₁ possono essere utilizzati per determinare l'esposizione umana.

1.4 INTERAZIONI MOLECOLARI DI AF

Le proprietà biologiche di AFB₁ hanno stimolato approfondite ricerche finalizzate alla definizione dei meccanismi molecolari e cellulari attraverso i quali si producono gli effetti tossici e cancerogeni. In seguito ai processi di biotrasformazione, AF attivate, sono in grado di interagire con diverse macromolecole dell'organismo (DNA, RNA, proteine e carboidrati), inducendo fenomeni di mutazione genetica (191, 192), inibizione dei sistemi enzimatici e alterazioni del metabolismo dell'interferone coinvolto nelle risposte immunitarie e nelle reazioni antinfiammatorie (193). AF sono, inoltre, causa di una inibizione della sintesi proteica, operata attraverso l'azione disaggregante su poliribosomi del reticolo endoplastico rugoso epatico e il blocco della trascrizione da parte di RNA polimerasi DNA-dipendente (145, 194). La diminuita sintesi di proteine utili al trasporto dei lipidi generata da AF a livello epatico, causa alterazione della mobilizzazione e del trasporto dei lipidi e degenerazione grassa del fegato (195). AF hanno, inoltre, la capacità di interferire con il metabolismo energetico, inibendo l'attività delle catene di trasporto degli elettroni (196, 197) e di alterare il metabolismo dei carboidrati, con conseguente alterazione del metabolismo del glicogeno epatico (145, 198).

1.4.1 Interazioni di AF con DNA

Gli atomi nucleofili (N, O) delle basi organiche degli acidi nucleici sono suscettibili all'attacco elettrofilo dei metaboliti di AF, come gli epossidi, in grado di formare addotti covalenti. Ogni alterazione degli acidi nucleici (DNA e RNA) ne compromette la funzione di stampo, sia per la sintesi di DNA che di mRNA, determinando, nella maggior parte dei casi, mutazioni puntiformi stabili del genoma, produzione di proteine non funzionali o con funzionalità alterata (199). In relazione alla gravità del-

l'alterazione nella funzionalità degli acidi nucleici, la conseguenza della formazione degli addotti può essere nella trasformazione o nella morte cellulare (199).

Il principale addotto formato in seguito all'esposizione a AFB₁ è AFB₁-N⁷-Gua, ma anche altri metaboliti di AF sono in grado di interagire con gli acidi nucleici, come AFM₁-N⁷-Gua e AFP₁-N⁷-Gua (172). In tal senso, per determinare l'affinità al DNA dell'eossido formato, è importante considerarne la struttura. L'anello ciclopentenone dei metaboliti di AFB₁ e AFB₂ permette un'intercalazione ottimale tra le basi del DNA, mentre l'anello lattone di AFG₁ e AFG₂ riduce l'affinità dell'eossido per il DNA di circa un ordine di grandezza (122). Gli addotti AFB₁-N⁷-Gua sono instabili e possono provocare una depurinazione spontanea, non enzimatica, degli acidi nucleici o essere stabilizzati dall'apertura dell'anello imidazolico, con formazione dell'addotto pirimidilico [2,3-diidro-2-(N⁵-formil-2,3,6-triamino-4-ossopirimidina N⁵-il)-3-rossi AFB₁ (AFB₁-FAPY) (Figura 10).

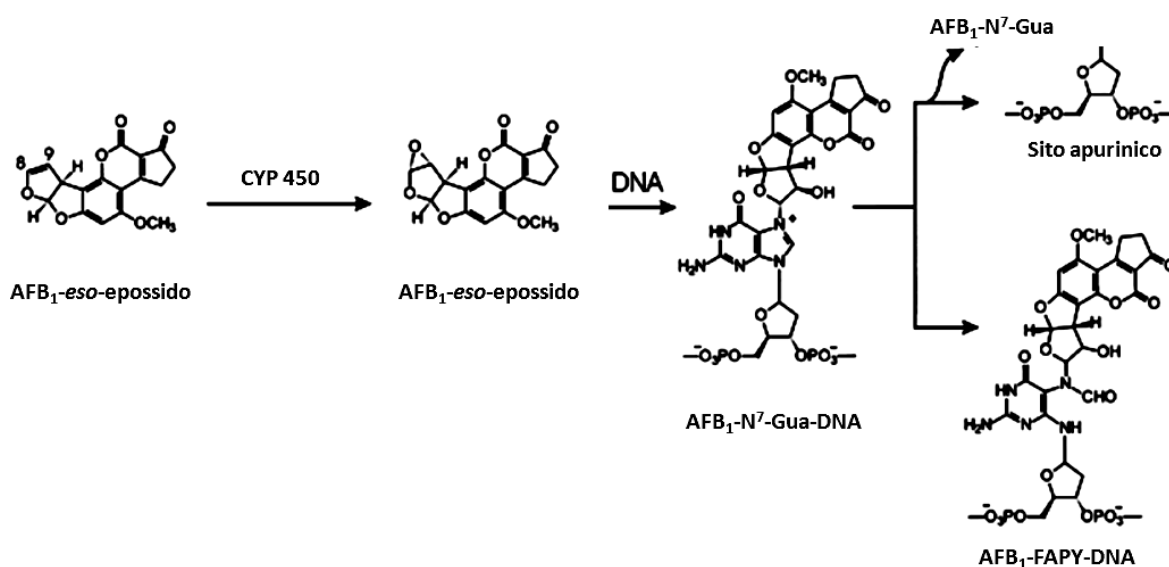


Figura 10. Rappresentazione schematica delle reazioni della via metabolica di attivazione di AFB₁ in esoeossido, con successiva formazione dell'addotto AFB₁-N⁷-Gua con il DNA. Tale addotto, instabile, può essere espulso dal DNA, con formazione di un sito apurinicco, o subire delle reazioni di riarrangiamento, con formazione dell'addotto stabile (AFB₁-FAPY). Tratto da: Smela, 2001 (200).

AFB₁-FAPY è molto resistente ai meccanismi di riparazione del DNA, risultando in mutazioni stabili del genoma (201). Esperimenti *in vitro* condotti in *E. coli* hanno

mostrato come l'inserimento nel genoma del batterio di addotti AFB₁-N⁷-Gua possa dare origine a mutazioni generalmente osservate nel DNA di organismi esposti ad AFB₁ e la mutazione indotta con maggiore frequenza sia la trasversione G/T (202). Esperimenti successivi hanno mostrato come l'addotto AFB₁-FAPY sia in grado di indurre in *E. coli* un frequenza di mutazione circa 6 volte superiore di AFB₁-N⁷-Gua (203).

In generale, la mutazione è una possibile conseguenza del legame di composti cancerogeni al DNA, ed è uno dei primi passaggi della cancerogenesi indotta dagli agenti genotossici (204). In tal senso, è interessante notare come la trasversione G/T nel codone 249 del gene oncosoppressore p53 sia una mutazione tipica osservata nel genoma di pazienti affetti da carcinoma epatico (HCC) provenienti da paesi ad elevato rischio di esposizione cronica ad AF (205, 206).

1.4.2 Interazioni di AF con proteine

Le proteine sono importanti componenti cellulari che presentano un vasto spettro di attività funzionali, strutturali e recettoriali e che possiedono, nei loro gruppi funzionali, molti atomi nucleofili N, O ed S, potenziali siti di attacco per le molecole di AF attivate quali AF-8,9-epossido (199). Le forme attivate AFB₁ dialdeide e AFB_{2a}, il prodotto idrolitico di AFB₁, sono in grado di legarsi in modo covalente alle proteine, formando basi di Schiff. La struttura e l'attività di tali proteine possono risultare compromesse dal legame covalente con AF. Il legame covalente di AF, ad esempio, può determinare una inibizione permanente della funzionalità enzimatica a causa dell'ostruzione del sito attivo o sue alterazioni strutturali. Analogamente, proteine coinvolte nelle vie biosintetiche, nelle funzioni ormonali, di neurotrasmissione, di trasporto e immunitarie, sono proteine la cui perdita di funzionalità può risultare critica per la vita della cellula.

Generalmente, le proteine compromesse nella loro funzionalità possono essere sostituite

tuite in seguito a sintesi *de novo*, tuttavia, AF determinano generalmente una inibizione della sintesi proteica stessa attraverso due meccanismi: inibizione diretta degli enzimi biosintetici e inibizione indiretta in seguito ad alterazione del DNA, inibizione della sintesi di mRNA o della sua maturazione e/o interferenza con il trasporto degli aminoacidi (199). In quest'ottica, è importante sottolineare che, in cellule trattate con AFB₁, è stata spesso riscontrata degranulazione dei ribosomi del reticolo endoplasmatico (ER) (207, 208). In seguito al distacco dei ribosomi è, quindi, probabile che la sintesi proteica mediata da ER sia interrotta. Nel complesso, questi fenomeni lasciano supporre che le cause della tossicità di AF siano strettamente correlate all'inibizione della sintesi proteica.

È stato, inoltre, dimostrato che alcune proteine destinate al nucleo sono in grado di legare AFB₁ a livello citoplasmatico, funzionando praticamente come proteine di trasporto in grado di traslocare la tossina ai microsomi, il sito di attivazione (199, 209, 210). Una porzione di AF attivate sono ulteriormente traslocate ad altri compartimenti cellulari, dove avviene il legame covalente ad altre macromolecole come, ad esempio, i ribosomi di ER.

1.5 EFFETTI PATOLOGICI DI AF

Le AF sono composti tossici, mutageni, cancerogeni e immunosoppressori nell'uomo e negli animali e AFB₁, la forma prevalente delle AF, è stata classificata come cancerogeno di gruppo 1 per l'uomo da parte dell'International Agency for Research on Cancer (IARC). Il suo derivato idrossilato, AFM₁, è stato incluso nel gruppo 2B come possibile cancerogeno per l'uomo (53). Anche se studi di cancerogenicità hanno dimostrato che AFM₁ è circa un ordine di grandezza meno potente di AFB₁, il suo potenziale genotossico *in vitro* è simile a quello di AFB₁ (139, 211, 212) e, in diverse specie, la sua tossicità acuta è simile a quella di AFB₁ (213). L'esposizione ad AFM₁, quindi, può avere importanti conseguenze sullo sviluppo e sull'immunocompetenza.

Le sindromi tossiche derivanti dall'esposizione di esseri umani e animali ad AF, vengono definite aflatossicosi. Sono state caratterizzate due forme di aflatossicosi: la prima è una intossicazione grave acuta che esita in un danno epatico diretto e successiva malattia e morte, mentre la seconda è un'esposizione cronica asintomatica. Gli studi effettuati sulle diverse forme forniscono una chiara evidenza che dose e durata di esposizione ad AFB₁ hanno un effetto diretto sulla tossicità e possono causare varie conseguenze: 1) dosi massicce comportano malattia acuta e morte, solitamente per cirrosi epatica; 2) dosi sub-letali croniche causano conseguenze nutrizionali e immunitarie e, 3) tutte le dosi hanno un effetto cumulativo per il rischio di cancro (62).

La sensibilità ad AFB₁ è maggiore nei giovani e vi sono differenze molto significative tra le specie, tra individui della stessa specie (in relazione alla loro differente capacità di detossificare AFB₁) ed i sessi (in relazione alla concentrazione di testosterone). La tossicità di AFB₁ varia anche secondo svariati fattori nutrizionali, ed il recupero da carenze proteiche viene ritardato dall'esposizione ad AFB₁ (193, 214,

215). Il principale organo bersaglio sia della tossicità acuta sia cronica di AF è il fegato, ma sono state riportate anche lesioni a danno di reni, stomaco e polmoni (53). Non tutta la quantità di AF ingerita risulta biologicamente significativa, in quanto una proporzione variabile viene detossificata. Le differenze nella sensibilità ad AF tra le diverse specie animali, e fra individui della stessa specie, dipendono quindi, in gran parte, dalla frazione della dose interna che viene impegnata nei vari possibili percorsi metabolici, ove il maggiore rischio biologico è connesso alla via di attivazione in epossido con conseguente reazione con DNA e proteine (62) (**Figura 11**).

L'ordine decrescente di tossicità cronica ed acuta delle quattro principali AF ($AFB_1 > AFG_1 > AFB_2 > AFG_2$) rispecchia le caratteristiche chimiche delle quattro molecole. La minore reattività di AFB_2 e AFG_2 , infatti, è determinata dall'assenza del doppio legame insaturo all'estremità dell'anello furanico che determina la possibilità di formare l'eossido, mentre la minore reattività di AFG_1 e AFG_2 è caratterizzata dalla minore reattività dell'anello lattone a sei atomi rispetto al ciclopentenone di AFB_1 e AFB_2 (216).

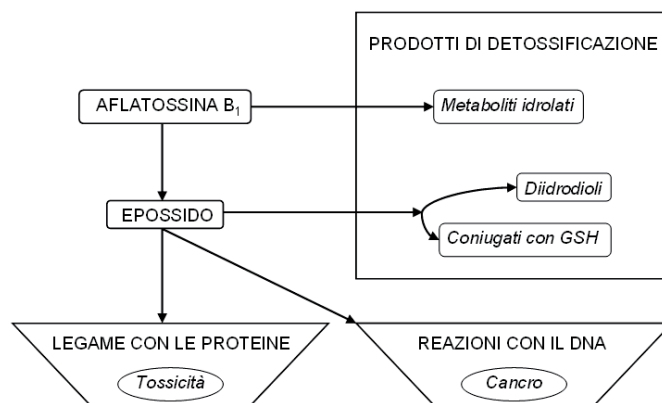


Figura 11. Percorsi metabolici ed effetti patologici di AFB_1 nel metabolismo animale. I metaboliti idrossilati includono AFM_1 , GSH, glutatione. Tratta da Eaton 1994 (217).

1.5.1 Aflatossicosi acuta

I sintomi di aflatossicosi acuta comprendono necrosi emorragica del fegato, proliferazione dei dotti biliari, edema e letargia. La dose letale media di AFB_1 in animali

può differenziarsi anche di due ordini di grandezza; specie sensibili, come i conigli e le anatre, presentano una bassa dose letale media (0,3 mg/kg), mentre polli (18 mg/kg) e ratti sono caratterizzati da una maggiore tolleranza. Generalmente, gli esseri umani adulti presentano maggiore tolleranza ad AF e, solitamente, nei casi riportati di intossicazione acuta il maggior numero di decessi si registra tra i bambini (52). Casi di avvelenamento acuto, il 25% dei quali ha un esito fatale, si manifestano quale risultato di elevati livelli di esposizione (52). Il numero di casi di intossicazione acuta non è rilevante, rispetto alle dimensioni della popolazione a rischio, poichè, ovviamente, gli individui evitano di consumare alimenti palesemente ammuffiti e, inoltre, l'uomo è generalmente una specie relativamente tollerante. In periodi di carestia o in condizioni di povertà, tuttavia, alcune popolazioni non hanno altra scelta che quella di consumare alimenti a basso prezzo e di poca qualità, che risultano spesso contaminati (62). Casi di malattie gravi e morte si manifestano, infatti, in particolare nei paesi in via di sviluppo (7, 9, 11, 218-221)

Nei casi riportati in letteratura, le aflatossicosi sono caratterizzate da danno epatico acuto, come dimostrato dalle alterazioni morfologiche, indicative di epatite tossica, osservate nei materiali autoptici (220). Nel 2004, un caso di intossicazione acuta in Kenya ha portato alla morte di 125 persone per danno epatico acuto, la cui causa è stata identificata nel consumo di mais contaminato da oltre 20 ppm di AFB₁ (222). Nel materiale autoptico prelevato dai deceduti sono stati rilevati elevati livelli di addotti AFB₁-lisina. Anche l'Italia ha dovuto affrontare il problema, come risulta da episodi rilevati dalla fine degli anni '60 (aflatossicosi B₁ da arachidi in tacchini) fino al 2003, anno in cui si verificarono casi di aflatossicosi B₁ e M₁ nell'uomo da mais e latte fortemente contaminati, cui seguirono alcuni casi episodici nel 2004. Come mostrato in **Tabella 1**, altri sintomi di aflatossicosi acuta rilevati includono febbre, edema, letargia, nausea, dolore addominali ed epatite acuta letale (7, 9, 11). In alcuni casi, dai campioni di fegato prelevati da pazienti deceduti è stato possibile rilevare quantità significative di AF (25).

Paese	No. di soggetti	Sintomi e segni	Esposizione			Materiale analizzato	Tossina	Istopatologia del fegato
			Fonte	Durata	Tossina			
Uganda	1; 1 ^a	Dolori addominali, edema alle gambe, fegato palpabile, prolungamento degli intervalli P-R in ECG, blocco di branca destro	Cassava	5-30 giorni	AF 1,7 ppm	–	–	Necrosi centrolobulare, infiltrazione di polimorfonucleati e fibrina nei sinusoidi, cambiamento dei grassi nella zona mediana
India	397;106	Brevi episodi febbrili, vomito, anoressia, itterizia, asciti, edema alle gambe, grave sanguinamento intestinale	Mais	Alcune settimane	AFB ₁ (5/5) ^b 6,25-15,6 ppm	Siero	AFB ₁ (2/7)	Proliferazione dei dotti biliari con fibrosi periduttale, cellule giganti multinucleate, citoplasma schiumoso, stasi della bile nei dotti biliari, canalicoli biliari dilatati
			Mais	–	AFB ₁ (7/70) ^c < 0,1 ppm	–	–	
India	994; 97	Febbre, vomito, edema ai piedi, itterizia, epatomegalia, ascite, splenomegalia	Mais	–	AFB ₁ (13/14) 0,01-1,1 ppm	–	–	Proliferazione colangiolare, collagenosi perivenosa, obliterazione luminale, fibrosi estesa, trasformazione degli epatociti in cellule giganti, colestasi da moderata a severa e proliferazione dei colangiolari
Kenya	20; 12	Brevi episodi febbrili, vomito, disagio addominale, anoressia, itterizia, ascite, edema alle gambe, tachicardia, fegato molle (raramente ingrossato) melena, sanguinamento gastrointestinale	Mais	Alcune settimane	AFB ₁ (2/2) 3,2-12 ppm AFB ₂ (2/2) 1,6-2,7 ppm	Fegato (autopsie)	AFB ₁ (2/2)	Marcata necrosi centrolobulare, leggera infiltrazione di grasso e nessuna proliferazione dei dotti biliari
USA	1; 0	Eruzioni maculari non pruriginose, nausea, emicrania	AFB ₁ pura	2 giorni	AFB ₁ 5,5 mg ^d	–	–	Normale
		Nausea	AFB ₁ pura	2 settimane	AFB ₁ 35 mg ^d	Urine	AFM ₁ (0/1) ^e	Normale

^a I numeri in grassetto indicano il numero dei decessi.

^b I numeri fra parentesi indicano il numero dei positivi/numero campioni analizzati.

^c Campioni di mais prelevati dalle famiglie colpite un anno dopo l'epidemia.

^d Dose totale.

^e Tre giorni dopo l'ingestione di AFB₁ purificata.

Tabella 1. Casi epidemici di aflatossicosi. Tratta da: Peraica M, Radić B, Lucić A, Pavlović M. Toxic effects of mycotoxins in humans.

AF sono state sospettate anche quali agenti eziologici di encefalopatia e degenerazione grassa dei visceri tipiche della sindrome di Reye, comune in paesi con clima caldo e umido (223). Il quadro clinico comprende alterazioni a livello epatico e renale e gravi edemi cerebrali, con riscontro di AF nella fase acuta della malattia nel sangue e nel fegato dei bambini affetti dalla sindrome, per quanto l'uso di aspirina e fenotiazina sia stato implicato nella patogenesi della malattia (224). Nei paesi tropicali è frequentemente riscontrabile uno stato itterico nel periodo neonatale. In un vasto studio epidemiologico, condotto in Nigeria su bambini con itterizia e di controllo, è stata rilevata una deficienza di glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) e contemporanea presenza di AF nel siero, che potevano rappresentare un significativo fattore di rischio per lo sviluppo di ittero neonatale (225).

Kwashiorkor (tipica malattia infantile da malnutrizione) e AF negli alimenti dimostrano una notevole coincidenza di prevalenza geografica e stagionale e, in alcuni paesi tropicali, AF sono state riscontrate più frequentemente, e a maggiori concentrazioni, in campioni epatici di bambini affetti da kwashiorkor rispetto a controlli (226, 227). Significativamente, AF vengono eliminate più lentamente nei bambini con kwashiorkor, e sono state rilevate in vari campioni biologici (228, 229).

AFB₁ è stata rilevata nel tessuto polmonare di un operaio tessile e di due agricoltori, deceduti per fibrosi interstiziale polmonare, e di un ingegnere chimico che aveva lavorato per 3 mesi su un processo di sterilizzazione di farina di arachidi brasiliane contaminate da *A. flavus*, deceduto per carcinoma cellulare alveolare, probabilmente in seguito ad esposizione ad AF, per motivi occupazionali, attraverso la via respiratoria (73, 230).

In Inghilterra, è stato dimostrato che i consumatori di eroina possono essere esposti ad AFB₁ da droga contaminata (231). In seguito a somministrazione parenterale, AFB₁ supera i meccanismi di detossificazione epatica producendo una esposizione sistemica diretta. In Inghilterra ed Olanda, l'analisi di urine raccolte da consumatori di eroina ha mostrato una più elevata proporzione di campioni contaminati con

AFB₁, AFB₂, AFM₁, AFM₂ e AFL (20%), rispetto a campioni prelevati da adulti volontari normali di controllo (2%) (231).

Pazienti sopravvissuti ad intossicazioni acute, dopo un anno, non presentano sintomi itterici e la maggior parte sembra clinicamente guarita (232). Esami clinici effettuati a distanza di tempo (fino a 14 anni) possono non rilevare alcun segno o sintomo di lesioni o malattia (233). Questi rilievi suggeriscono come l'epatotossicità di AFB₁ possa variare individualmente, particolarmente in persone ben nutrite, rispetto agli animali, o che il periodo di latenza della comparsa di neoplasie possa eccedere i 14 anni.

1.5.2 Aflatossicosi cronica

La situazione più frequente, nel caso delle AF, è una esposizione cronica a bassi livelli di contaminazione (25). Per valutare l'esposizione cronica ad AF nell'uomo, sono stati utilizzati due approcci principali. Il primo si basa sul campionamento degli alimenti, prelevando campioni sia da cibi preparati sia da ingredienti presenti sul mercato. La fonte più semplice ed affidabile per la valutazione dell'esposizione è rappresentata dall'analisi di cibi preparati in quanto le materie prime (ingredienti) considerate non idonee possono essere direttamente scartate dal consumatore.

Il secondo approccio si basa sull'analisi di marcatori biologici di esposizione. In questa prospettiva si raccolgono campioni di sangue, latte o urine umani, che vengono analizzati per la presenza di derivati di AF, ciascuno dei quali è caratterizzato da una specifica emivita corporea. La tecnologia è relativamente recente e i casi descritti si riferiscono, particolarmente, ad aree ristrette di paesi in via di sviluppo (62). La prevalenza ed il livello dell'esposizione umana ad AF su scala globale è stata recensita e la conclusione tratta è che circa 4,5 miliardi di persone, soprattutto nei paesi in via di sviluppo, ma anche nei paesi industrializzati, risultano cronicamente esposte a quantità incontrollate di AF. Un ristretto numero di informazioni suggerisce che,

almeno dove sono state condotte indagini approfondite, l'esposizione comune ad AF può riflettersi in alterazioni dell'immunità e della nutrizione, che possono condizionare negativamente lo stato di salute (particolarmente in caso di infezione con HIV) e rendere conto di circa il 40% dei casi di malattia nei paesi in via di sviluppo dove la vita media è breve.

1.5.2.1 Cancerogenicità

Nell'uomo, AF sono generalmente percepite come agenti in grado di causare tumori epatici, sebbene neoplasie polmonari siano spesso frequenti in lavoratori che maneggiano granaglie contaminate (69). L'aumentato rischio di epatomi, e di tumori in genere, dovuti a varie modalità di esposizione ad AF è ben documentato ed è basato sulla dose cumulativa vitalizia. È stata, conseguentemente, prevista una rigida regolamentazione del contenuto di AF nelle derrate alimentari commerciali (20 ppb nelle granaglie e 0,5 ppb nel latte negli Stati Uniti, 4 ppb negli alimenti in alcuni paesi europei) (234, 235). In molti paesi in via di sviluppo, le epidemie da HBV e HCV possono interessare circa il 20% della popolazione ed è stata osservata una forte sinergia tra AF e i rispettivi agenti virali nel causare epatocarcinomi.

Come precedentemente descritto, la via metabolica di AF che appare responsabile degli effetti mutageni di AFB₁ è l'attivazione in AFB₁-*eso*-epossido e la seguente reazione covalente con DNA, con formazione prevalente dell'addotto AFB₁-N⁷-Gua e AFB₁-FAPY, ritenuti essere i precursori delle mutazioni indotte da AFB₁ (200). Esperimenti *in vitro* condotti in *E. coli* hanno mostrato come l'inserimento nel genoma del batterio di addotti AFB₁-N⁷-Gua e AFB₁-FAPY desse origine con maggiore frequenza alla trasversione G/T (202, 203). Questa mutazione è stata, significativamente, riscontrata nel codone 249 del gene oncosoppressore p53 nel genoma di pazienti affetti da carcinoma epatico (HCC), provenienti da paesi ad elevato rischio di esposizione cronica ad AF (205, 206).

Le mutazioni nel gene oncosoppressore codificante per la proteina nucleare p53 so-

no state utilizzate per indagare l'eziologia molecolare di AFB₁ nel carcinoma epatocellulare (HCC). Risultati significativi sono stati ottenuti in studi che hanno interessato pazienti con carcinomi epatici in Cina e Sud Africa; mutazioni sono state osservate particolarmente nel codone 249 del gene p53 di tali pazienti (205, 206). Virtualmente, tutte le mutazioni risultanti da trasversioni da G/C a T/A sono risultate localizzate in un singolo sito nel codone (da AGG a AGT). L'uniformità della natura delle variazioni di base osservate e la loro somiglianza alle mutazioni indotte da AFB₁ in modelli sperimentali hanno avvalorato l'interpretazione che i tumori nei pazienti possano essere il risultato di esposizione ad AF. Non è stata, tuttavia, riscontrata alcuna relazione tra mutazioni nel codone 249 e quantità di addotti AFB₁-DNA nei tessuti epatici (236). È stato ipotizzato che HCC umano abbia un'eziologia multifattoriale, con probabili interazioni sinergiche tra esposizione ad agenti virali (HBV e HCV) ed agenti chimici, come AFB₁ nelle popolazioni esposte ad entrambe le condizioni. Nell'ambito di una popolazione, comunque, esistono differenze di sensibilità alla cancerogenesi da AF che possono essere geneticamente mediate.

In soggetti positivi per HBsAg, AF risulta circa 30 volte più potente che nelle persone non infettate dal virus ed il rischio relativo di cancro per pazienti infettati aumenta da circa 5, nel caso di esclusiva infezione virale, a circa 60, nel caso di associazione tra infezione con HBV ed esposizione ad AF (189, 237). In alcune aree geografiche, dove la contaminazione con AF e infezione con HBV si manifestano insieme, gli epatomi risultano la forma prevalente di cancro, tanto che in Qidong (Cina) il 10% di tutte le morti di adulti risulta riferibile a HCC (238). Per minimizzare il rischio di cancro, pertanto, è fondamentale che persone infettate da HBV e HCV non risultino esposte ad AF. Un fattore significativo determinante la maggiore potenza di AF in pazienti HBV positivi è che l'infezione virale riduce la capacità individuale di detossificare AF (190). Mentre questa sinergia è sicuramente riconosciuta come un fattore di rischio importante di cancro, essa è presumibilmente di notevole rilevanza anche per quanto riguarda aspetti di tossicità nutrizionale ed immunitaria.

1.5.2.2 Immunodepressione da AF

AF sono una ben nota causa di epatocarcinoma, ma sono caratterizzate anche da altri importanti effetti tossici addizionali. In animali da fattoria e da laboratorio, l'esposizione cronica ad AF compromette le difese immunitarie ed interferisce con il metabolismo proteico e l'introito di numerosi micronutrienti critici per la salute. Per quanto non siano stati eseguiti studi approfonditi, le attuali informazioni suggeriscono che almeno alcuni degli effetti osservati negli animali possano riscontrarsi anche nell'uomo.

Molte informazioni su AF derivano da studi in animali da fattoria o modelli animali in cui l'esposizione è cronica ma non abbastanza elevata da causare i sintomi solitamente associati ad aflatossicosi acuta. L'esposizione umana è, probabilmente, più variabile in relazione alla diversa contaminazione degli alimenti. AFM₁ nelle urine riflette l'esposizione nelle precedenti 24 ore e si riscontra abitualmente in un terzo degli individui in campioni di popolazione, mentre addotti AFB₁-albumina, significativi di una esposizione più prolungata, sono presenti in circa il 90% degli individui degli stessi campioni (186, 187, 189). Questa differenza genera perplessità sull'estensione all'uomo di dati desunti da modelli animali, ma alcuni studi hanno mostrato che tali dati possono essere rappresentativi, almeno in generale. La dose soglia per effetti immunotossici nell'uomo non è nota. In esperimenti con animali, AFB₁ ha dimostrato di poter indurre aplasia timica, ridotta funzionalità e decremento in numero dei linfociti T, soppressione dell'attività fagocitaria e ridotta attività del complemento (239-241). Molti studi condotti in polli, maiali e ratti, hanno mostrato che l'esposizione ad AF da alimenti contaminati si traduce in una soppressione della risposta immunitaria cellulo-mediata (193, 242, 243). Involuzione timica e della borsa di Fabrizio, soppressione della linfoblastogenesi, alterazione dell'ipersensibilità cutanea ritardata e reazione di rigetto al trapianto possono osservarsi in animali esposti ad AF (244-246). Numero di CD4 splenici (T helper) e produzione di interleuchina 2 (IL-2) diminuiscono rapidamente quando topi sono trattati con AFB₁ ad un dose di 0,75 mg/kg (247).

Le alterazioni della funzione immunitaria da parte di AF sembrano essere dovute al

loro effetto su fattori quali la produzione di linfocine e presentazione dell'antigene (Ag) da parte dei macrofagi, così come ad un decremento o alla mancanza di fattori stabili sierici coinvolti nella fagocitosi (248). I macrofagi svolgono un ruolo cruciale nelle difese dell'ospite nei confronti delle infezioni, in quanto presentano Ag ai linfociti, fungono da cellule accessorie di supporto ai linfociti stessi, incrementano la propria attività fagocitaria e rilasciano vari prodotti attivi, come le citochine e gli intermedi reattivi, per indurre una risposta immunitaria non specifica (249).

Alcuni studi hanno suggerito che AF possano inficiare la funzione dei macrofagi in varie specie animali (250-252). Oltre agli effetti riconosciuti di riduzione dell'attività fagocitaria in macrofagi alveolari di conigli, AF hanno mostrato di poter inibire *in vitro* la funzione fagocitaria in monociti umani (248, 252). AFB₁, a concentrazioni di circa 100 pg/ml, è risultata tossica per i monociti e a concentrazioni da 0,5 a 1 pg/ml ha mostrato di poter inibire l'attività fagocitaria di monociti e il killing intracellulare di *Candida albicans*; mentre la produzione di superossido e la capacità dei monociti di distruggere il virus herpes simplex a livello intracellulare non risultavano inficiate. AFB₁, somministrata oralmente a concentrazioni di 0,03– 0,07 mg/kg, sopprime la citolisi mediata da cellule natural killer (NK) di cellule bersaglio AC-1 in topi BALB/c, ma non, alla stessa dose, in topi C57B1/6 o in conigli alimentati con 24 ppm di AF nella dieta (247, 253, 254). Maiali che avevano ricevuto 500 ppm di AFB₁ con la dieta hanno mostrato una ridotta attività emolitica complementare del siero per quanto tale attività non fosse inficiata in maiali o in conigli alimentati con 300 ppm o con 95 ppm di AFB₁, rispettivamente (255).

Queste differenze mostrano che le differenti sensibilità tra le specie animali, osservate per i fenomeni di tossicità acuta e la cancerogenesi, si estendono anche alla risposta immunitaria. In ratti alimentati per 90 giorni con una dieta contenente 40 ppb di AFB₁, è stata osservata una risposta mitogena delle cellule mononucleate della milza più elevata, rispetto a quella di animali di controllo alimentati con dieta non contaminata, con produzione minore di IL-2, maggiore di IL-4 ed eguale di IL-

10 da parte di tali cellule degli animali trattati (256). In suinetti lattanti (circa 10 kg di peso) esposti a 140 ppb e 20 ppb di AFB₁ per 4 settimane, la funzione immunitaria umorale e cellulare è risultata alterata, con riduzione della risposta immunitaria primaria e secondaria (257). I titoli anticorpali rilevati in seguito ad immunizzazione con *Mycoplasma agalactiae* (un microrganismo patogeno) risultavano sempre più bassi in animali sottoposti a dieta con AFB₁ che in animali di controllo.

Gli effetti immunosoppressivi di AFB₁ si sono mostrati trasferibili attraverso la placenta suina arrivando ad interessare il feto (258). Maiali nati da scrofe alimentate con AFB₁ sensibilizzati con *Mycobacterium tuberculosis*, hanno mostrato una ridotta reazione di ipersensibilità ritardata rispetto ad animali di controllo sensibilizzati con lo stesso microrganismo. Le funzioni cellulari e fagocitarie e, in misura minore, umorali, si sono mostrate ridotte in suini neonati e ratti esposti ad AFB₁ contaminante la loro dieta (242, 258, 259). Embrioni di pollo, inoltre, esposti a singole dosi (0,1 mg) di AFB₁ hanno mostrato una risposta immunitaria depressa nei confronti di fitoemmaglutinina (246). Effetti a lungo termine sul sistema immunitario sono stati osservati in trote in seguito ad esposizione delle uova ad AFB₁ (260). In relazione all'effetto di AFB₁ sul sistema immunitario, non è sorprendente la constatazione della sua influenza sull'efficacia delle vaccinazioni. Significativamente, l'esposizione ad AFB₁ ha mostrato di ridurre la risposta anticorpale ai vaccini. Studi eseguiti in pollame hanno mostrato che l'esposizione quotidiana con la dieta, ad una concentrazione di 200 ppb per 40 settimane, poteva ridurre i titoli anticorpali al vaccino per la malattia di Newcastle e bronchite infettiva (261, 262). In conigli, AFB₁ si è mostrata in grado di ridurre i titoli anticorpali nei confronti di *Mycobacterium bovis*, *Bordetella bronchiseptica* e *Pasteurella multocida* (262-264). È stata osservata, inoltre, una ridotta efficacia nei confronti di vaccinazioni quali febbre suina, setticemia emorragica e malattia del piede e della bocca in vacche da latte (254, 265).

Le evidenze di immunosoppressione da parte di AF nell'uomo sono, peraltro, limitate ed incerte. Gli studi disponibili di esposizione umana si basano, generalmente,

sulla determinazione della concentrazione di addotti AFB₁-albumina, riflesso di un'esposizione a lungo termine. In relazione alla tossicologia di AF ed al recupero dei processi cellulari entro pochi giorni dall'esposizione, tali addotti possono non essere rappresentativi dell'esposizione per variazioni di funzioni immunitarie (266). Nel 93% di bambini del Gambia sono state osservate alterazioni dell'immunità in funzione di addotti AFB₁-albumina, la cui concentrazione risultava significativamente influenzata dal mese di campionamento. In un'analisi multivariata, IgAs sono risultate significativamente ridotte in bambini con concentrazioni determinabili di addotti AFB₁-albumina rispetto a quelli con concentrazioni indeterminabili (267). In un precedente studio, eseguito in Gambia, non è stata osservata alcuna evidente relazione tra concentrazione di AF-albumina e risposte anticorpale o linfoproliferativa *in vitro* nei confronti di agenti della malaria (190). Tuttavia, utilizzando il modello topo-*Plasmodium berghei*, è stato dimostrato che AF diminuisce la morbilità, a causa di un suo effetto diretto sul parassita (268). Diverse componenti e funzioni del sistema immunitario cellulo-mediato risultano significativamente depressi in abitanti Ganesi, con concentrazioni di AFB₁-albumina superiori alla media (0,80 pmol/mg) per la popolazione, rispetto a quelli inferiori dei controlli (62).

La sensibilità ad AF nei bambini risulta essere maggiore che negli esseri umani adulti (62). L'esposizione ad AF può iniziare in utero (269) e AF sono state rilevate nel sangue di donne in gravidanza, nel cordone ombelicale di neonati e nel latte di donne in paesi africani, con significative variazioni stagionali (165, 270). I livelli di AF rilevati nel sangue del cordone ombelicale di alcuni neonati sono tra i più elevati tra quelli registrati in tessuti e fluidi umani. Successivamente, la presenza di AFM₁ nel latte materno può rappresentare una significativa fonte di contaminazione per i neonati (181, 183) e, in seguito allo svezzamento, per i bambini residenti in zone a rischio, il livello di esposizione ad AF può anche aumentare (271, 272). Recentemente, AF sono state associate a ridotto sviluppo (271-273) e modificazioni delle funzioni immunitarie in bambini (267).

1.5.2.3 Interferenza nutrizionale di AF

L'esposizione cronica ad AF ha effetti soprattutto sullo stato nutrizionale degli animali, anche se, come per l'immunotossicità, le caratteristiche di tali effetti non sono state definite per ogni specie.

Il legame covalente di AF a DNA e l'inibizione della sintesi proteica avvengono rapidamente dopo l'esposizione, e perdurano per ≤ 5 giorni (266). L'efficienza di trasformazione degli alimenti è significativamente inferiore negli animali esposti ad AF (7–10% in meno in pollame e maiali) e, insieme alla diminuita crescita, tale osservazione rappresenta un segno significativo di esposizione cronica ad AF (274). È stata osservata una diminuzione dose-dipendente nell'aumento di peso in maialini esposti a 140 e 280 ppb di AF; è ben documentato, quindi, il ruolo che la presenza di AF nella dieta svolge nella riduzione del peso e di altri parametri di produttività (257, 274). Recenti ricerche hanno confermato tali effetti anche nell'uomo: è stata osservata una relazione dose-risposta tra esposizione ad AF ed arresto, o diminuzione, della crescita nei bambini ≤ 5 anni in Benin e Togo, dove tutti i soggetti studiati erano esposti ad AF (addotti AF-albumina tra 5 e 1064 pg/mg di albumina nel 99% dei bambini) (273). Inibendo la sintesi proteica, AF hanno mostrato di interferire con i processi di recupero da malnutrizione proteica (kwashiorkor), pur non essendo direttamente responsabile dello sviluppo di tale condizione (180, 214, 275). È stato dimostrato che l'esposizione ad AF influenza la nutrizione con vitamina A in pollame e cammelli, determinando quasi un dimezzamento delle concentrazioni sieriche di retinolo (276-278). Le concentrazioni di AF in fegato e contenuto del ruminato dei cammelli sono state dimostrate essere di 18,2 and 243,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, rispettivamente. Sono stati studiati gli effetti di 3 diverse concentrazioni (0, 500 e 2000 ppb) di AF su galline da allevamento, dimostrando una diminuzione della vitamina A nel fegato all'aumentare delle dosi di AF (278). In un altro studio simile, invece, tale relazione è stata rilevata per la vitamina C, ma non per la A, riflettendo probabilmente variabilità di specie o individuali, del tipo di esposizione (continua o intermittente) o la possibile ina-

deguatezza di AF-albumina come indicatore delle risposte biologiche a tali fattori nutrizionali (267). Se la presenza di vitamina A nell'uomo fosse modulata dall'esposizione ad AF, la prevenzione a tale esposizione potrebbe rappresentare uno dei modi per ridurre l'incidenza delle sindromi da carenza di tale vitamina (VAD) ed aumentare la risposta a diete implementate con tale nutriente.

In polli da allevamento, la concentrazione di vitamina D è influenzata dalla presenza di AF nella dieta; infatti, AF (1 ppm nella dieta) riduce, infatti, le concentrazioni plasmatiche di 25-idrossi-vitamina D [25(OH)D] e 1,25-diidrossi-vitamina D [1,25(OH)2D] dopo 5 giorni di trattamento (279). Sono possibili effetti sulla competenza del sistema immunitario, in quanto, come la vitamina A, la D è fortemente coinvolta nel mantenimento di tale competenza.

AF nella dieta sembrano influenzare la nutrizione con zinco e selenio, minerali essenziali per l'efficienza del sistema immunitario (280, 281). In maiali, è stato osservato che l'esposizione materna ad AF quasi dimezza la concentrazione sierica di zinco nei maialini (56 µg/dL rispetto a 119,2 µg/dL nei controlli), ma non nelle madri, con conseguente diminuita efficienza dell'immunità cellulo-mediata nei nuovi nati (282). Effetti simili sono stati osservati in ratti (283, 284). In Cina, concentrazioni di selenio nell'uomo sono state inversamente correlate a differenti concentrazioni di addotti AF-albumina (285). In particolare, la concentrazione plasmatica media di selenio si è mostrata pari a $108 \pm 32,4$ µg/L e quella di addotti 20,95 fmol/mg. Nei polli, un effetto simile sul selenio è stato associato ad immunodepressione (286). Ovviamente, saranno necessarie più informazioni, tra cui l'identificazione degli indicatori più appropriati, per valutare in modo corretto e complessivo gli effetti di AF sulla nutrizione umana. Le micotossicosi acute possono causare malattie gravi, a volte fatali; la possibilità di una intossicazione da micotossine deve essere, pertanto, essere presa in considerazione quando una malattia acuta si manifesti in numerose persone, quando non ci siano prove di infezione con un agente eziologico conosciuto e non ci sia nessun miglioramento del quadro clinico in seguito a terapia.

1.6 AFLATOSSINA M₁

1.6.1 Identificazione di AFM₁

L'osservazione iniziale che il latte di vacche alimentate con mangime contaminato da AFB₁ conteneva un fattore in grado di produrre gli stessi effetti patologici di AFB₁ in anatroccoli (287), ha portato all'isolamento e all'identificazione di un composto fluorescente alla luce UV, con un profilo cromatografico (TLC) simile ad AFB₁ (288), che venne inizialmente denominato AFM (Milk toxin). Studi successivi mostrarono che era possibile isolare tale tossina anche da urina di pecore esposte a contaminazione da AFB₁ (289).

L'analisi cristallografica di AFM isolata da urina ha consentito l'identificazione di due molecole di AF, denominate AFM₁ e AFM₂, risultanti dalla idrossilazione in posizione 9a, ad opera degli enzimi epatici di mammiferi cibatisi di alimenti contaminati, rispettivamente da AFB₁ e AFB₂ (290) (**Figura 12**).

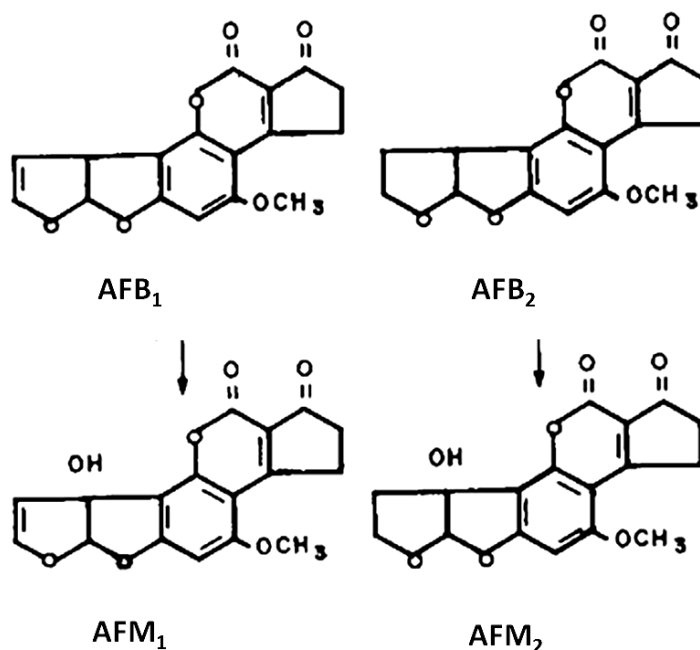


Figura 12. Reazione di idrossilazione di AFB₁ e AFB₂ in AFM₁ e AFM₂ rispettivamente. Strutture tratte da: (16) AFB₁; (291) AFB₂; (290) AFM₁ ed AFM₂.

1.6.2 Effetti biologici di AFM₁

In seguito alla prima osservazione di danni epatici in anatroccoli alimentati con latte ottenuto da vacche esposte ad AFB₁ (287), sono stati condotti altri esperimenti che hanno confermato la tossicità di AFM₁.

Studi di carcinogenicità condotti in trota hanno mostrato che AFM₁ presenta potere cancerogeno minore della molecola parentale AFB₁ (33%) (139, 292).

Analogamente, in vari studi condotti in ratti esposti ad AFM₁ per via orale, comparativamente ad animali esposti ad AFB₁, il potere cancerogeno di AFM₁ è risultato essere circa il 10% di AFB₁ (212, 293). È interessante osservare come ratti esposti a AFM₁ abbiano sviluppato tumore intestinale, lasciando ipotizzare come tale effetto possa essere riferibile alla maggiore polarità di AFM₁ rispetto ad AFB₁. Complessivamente, i risultati sperimentali indicano che AFM₁ esplica un effetto cancerogeno in animali, anche se inferiore di circa un ordine di grandezza rispetto a AFB₁ (213). A causa della carenza di dati epidemiologici relativi alla cancerogenicità umana di AFM₁, diversamente da AFB₁, classificata dallo IARC nel gruppo 1 dei cancerogeni naturali, AFM₁ è stata classificata come possibile cancerogeno per l'uomo (gruppo 2B) (53).

Studi di mutagenicità *in vitro*, condotti mediante test di Ames in *Salmonella typhimurium* TA 98, hanno evidenziato un potere mutageno di AFM₁ pari al 3,3% di quello di AFB₁ (294). Ulteriori studi effettuati con un maggior numero di ceppi di *Salmonella* (TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, TA1538) hanno confermato il risultato ottenuto, evidenziando in *S. typhimurium* TA 98 un potere mutageno di AFM₁, relativamente ad AFB₁, del 3% (191).

Le cancerogenicità relative osservate per AFM₁ e AFB₁ correlano con le costanti di attivazione metabolica relative osservate *in vitro* utilizzando microsomi epatici di ratto (141, 295). Esperimenti *in vitro*, eseguiti esaminando i metaboliti prodotti in seguito ad incubazione di microsomi epatici umani o murini con AFM₁, hanno permesso di verificare che la formazione di metaboliti primari, associati all'attivazione

metabolica di AFB₁ ed AFM₁ nei rispettivi epossidi, riflette le differenze nel potenziale cancerogeno delle due tossine (296). In analogia con quanto precedentemente riportato per microsomi di ratto (295), i microsomi umani mostrano, infatti, una limitata capacità di metabolizzare AFM₁ in epossido (296), la forma in grado di reagire con DNA (115).

A causa della minore cancerogenicità e mutagenicità, relativamente ad AFB₁, AFM₁ viene spesso considerata un prodotto di detossificazione. Esperimenti eseguiti *in vitro* ed *in vivo* sembrano smentire, almeno parzialmente, questo concetto.

Studi recenti dimostrano come, in scoiattoli esposti ad per via orale ad AFB₁, sia possibile riscontrare una maggiore formazione di addotti con DNA da parte di AFM₁ (AFM₁-N⁷-Gua) che di AFB₁ (AFB₁-N⁷-Gua) (297).

Ratti alimentati con una dieta contaminata da AFM₁ marcata, inoltre, hanno mostrato un indice di legame covalente a DNA (CBI) di sole 5 volte inferiore a quello rilevato per AFB₁ (298). Esperimenti condotti con epatociti isolati da trota hanno evidenziato, in seguito ad incubazione con AFB₁ o AFM₁ marcate, un indice di legame a DNA di AFM₁ pari a 0,8 volte quello di AFB₁ (211). I dati ottenuti in entrambi gli esperimenti, se paragonato ai risultati ottenuti nei saggi di mutagenesi *in vitro* e di cancerogenicità *in vivo*, sono considerevolmente alti. In esperimenti successivi di valutazione comparativa della capacità di indurre lesioni nel DNA e della genotossicità *in vivo* di AFB₁ e AFM₁ in larve di *Drosophila melanogaster*, inoltre, è emerso che la genotossicità delle due AF era paragonabile, anche se l'incidenza di danni al DNA è risultata 3 volte inferiore nelle larve trattate con AFM₁ (299). La genotossicità di AFM₁ anche in mammiferi, pertanto, potrebbe non essere esclusa.

In anatre di un giorno esposte ad una singola dose elevata di AFB₁, AFM₁ ed AFM₂ sono state riscontrate lesioni simili di tipo emorragico nel fegato. Esponendo gli animali a dosi intermedie di tossine, è stata osservata induzione di iperplasia dei dotti biliari, necrosi epatocellulare e, solo per AFM₁ ed AFM₂, vacuolizzazione degenerativa dei tubuli convoluti (300). I risultati ottenuti in seguito all'iniezione continuativa

(14 giorni) dello stesso quantitativo di AFM₁ ed AFB₁ in ratti hanno dimostrato che AFM₁ ed AFB₁ agiscono attraverso lo stesso meccanismo nel causare tossicità ed alterazioni subcellulari (141).

Esperimenti condotti successivamente hanno mostrato che AFM₁ e AFB₁ presentano analoga tossicità acuta (213) (**Figura 13**).

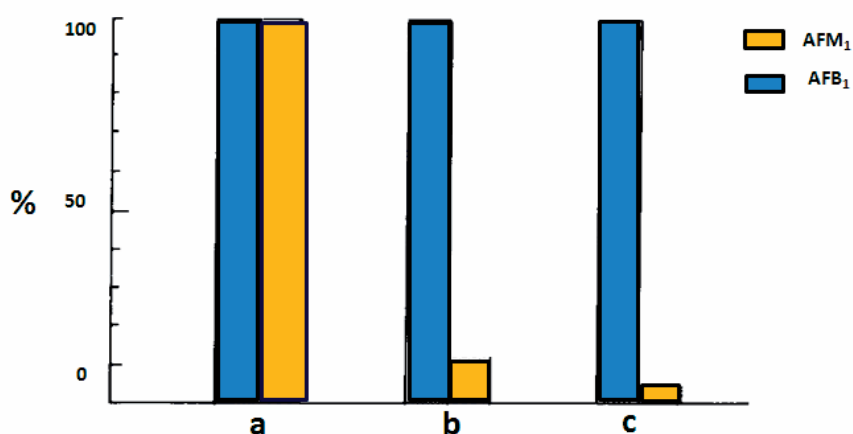


Figura 13. Potere tossico, cancerogeno e mutageno di AFM₁ relativamente ad AFB₁. a) tossicità relativa (141, 213); b) cancerogenicità relativa (139, 213, 292, 301); c) mutagenicità relativa (191, 294).

Mentre nel caso di AFB₁ è comunemente accettato che gli effetti di tossicità acuta e di cancerogenicità siano dipendenti da attivazione metabolica, questo processo non sembra fondamentale per la citotossicità di AFM₁.

Presupponendo che il legame di AFB₁ alle proteine svolga un ruolo importante nella tossicità della molecola (128), in studi sull'attivazione metabolica di AFB₁ e AFM₁ da parte, è stato esaminato *in vitro* il legame di AFM₁ ai microsomi epatici o murini. Mentre il legame di AFB₁ marcata ai microsomi è risultato essere dipendente da attivazione metabolica, un elevato grado di legame di AFM₁ è stato osservato in assenza di attivazione (296). Analogamente, utilizzando linee cellulari umane non esprimenti il citocromo P450 in saggi di citotossicità acuta, è stato osservato per AFM₁, contrariamente a quanto riscontrato per AFB₁, un potenziale citotossico diretto in assenza di attivazione (296).

Essendo stato dimostrato che l'interazione stabile con le proteine presenta una elevata correlazione con gli effetti citotossici di AFB₁ (107), è possibile che la capacità di AFM₁ di legare le proteine in assenza di attivazione metabolica, sia connessa alla elevata citotossicità della molecola.

Tali risultati indicano che bisogna usare estrema cautela nel considerare AFM₁ come un prodotto di detossificazione di AFB₁ nel momento in cui si considerino delle risposte biologiche in cui la citotossicità può svolgere un ruolo importante, come ad esempio per quanto riguarda l'immunosoppressione.

L'esposizione ad AFM₁, sia attraverso la dieta (latte e prodotti lattiero caseari) che attraverso la formazione endogena della molecola in seguito a metabolismo di AFB₁ potrebbe, quindi, contribuire agli effetti tossici acuti dell'esposizione ad AF, inclusa la epatotossicità e, probabilmente, l'immunosoppressione (302).

1.7 CONTAMINAZIONE DA AF NEI PRODOTTI DI ORIGINE ANIMALE

1.7.1 Contaminazione da AF in carne, uova e latte

In ambito zootecnico, il tasso di trasferimento delle micotossine dal mangime contaminato ai prodotti alimentari di origine animale (latte, carne ed altri tessuti edibili), definito “carry-over”, viene generalmente calcolato in modo quantitativo come rapporto fra l’ammontare di micotossina trasferita nel prodotto e quella ingerita dall’animale, esprimendo entrambi i valori in $\mu\text{g}/\text{giorno}$ (o mg/giorno). Diverse ricerche condotte su specie di interesse zootecnico hanno consentito di stabilire quale sia il rischio di trasmissione delle varie micotossine o di loro metaboliti tossici in carne, latte e uova. Nel caso specifico di AF, il carry-over nelle uova e nelle carni risulta essere un fenomeno limitato. Al momento attuale non ci sono evidenze sperimentali che dimostrino un trasferimento delle AF dall’alimento alla carne bovina e suina in dosi ritenute pericolose per la popolazione (303). Nel suino, AF si ritrovano nei tessuti degli animali alimentati con cibi contaminati fino alla macellazione. In particolare, sono rilevabili AFB_1 e AFM_1 nel fegato, AFM_1 nel rene e, solo in piccole tracce, AFB_1 nei muscoli. Un rilievo importante è che non si ritrovano AF nei muscoli di animali precedentemente alimentati con mangime contaminato, sottoposti ad una dieta priva di AF nelle 24 ore prima di essere macellati (304).

Mentre la quantità rilevabile nei tessuti è quasi sempre trascurabile, i risultati di prove condotte da vari autori sul trasferimento di AF dall’alimento all’uovo sono contrastanti (carry-over variabili da 0,0015%, fino a 0%) (305, 306). È stato dimostrato che, alimentando galline con mangime contaminato da diverse concentrazioni (100, 300 e 500 mg/kg) di AFB_1 , è possibile rilevare la presenza di suoi residui solo nelle uova prodotte da quelle esposte alla più elevata concentrazione di AF, con livelli medi di contaminazione delle uova di 0,10 mg/kg (307). Nelle attuali condizione di produ-

zione e lavorazione degli alimenti, l'inquinamento delle carni e delle uova è, quindi, raro ed improbabile.

Al contrario, il carry-over delle AF risulta particolarmente rilevante nel latte e nei suoi derivati. Le concentrazioni medie di AFM₁ nel latte commercializzato, basate su un grande numero di campioni di alimento esaminati, sono state stimate pari a 0,023 µg/kg (area europea), 0,022 µg/kg (area latino-americana), 0,36 µg/kg (estremo oriente), 0,005 µg/kg (medio oriente), 0,002 µg/kg (area africana). L'apporto giornaliero/persona di AFM₁ dal latte nelle varie diete è stato calcolato essere, nelle varie aree, 6,8 ng, 3,6 ng, 12,0 ng, 0,7 ng e 0,1 ng, rispettivamente (308). Il carry-over di AF nel latte costituisce un fenomeno di grande importanza sanitaria ed economica, da sempre molto studiato in ambito zootecnico/produttivo.

1.7.2 Carry-over di AFB₁ come AFM₁ nel latte

La presenza di AF negli alimenti che compongono la razione di bovine da latte preoccupa principalmente per il passaggio nel latte di AFM₁, un idrossiderivato di AFB₁ che si forma a livello epatico nelle lattifere; AFM₁ ("tossina del latte") è stato il primo metabolita di AFB₁ ad essere identificato e tutti i mammiferi che ingeriscono AFB₁ ne eliminano una quota nel latte. Quest'ultima è citotossica, come dimostrato *in vitro* in epatociti umani (296), e in diverse specie animali la sua tossicità acuta è simile a quella di AFB₁ (213). In studi di cancerogenicità, è stato dimostrato che AFM₁ è circa un ordine di grandezza meno potente di AFB₁, anche in specie sensibili come trote e ratti Fischer, mentre il suo potenziale genotossico *in vitro* è simile a quello di AFB₁ (139, 211, 212).

L'assorbimento di AF nel tratto digerente dei ruminanti inizia nel rumine e continua, in maniera più rilevante, nell'intestino tenue. Numerosi studi hanno evidenziato che AFB₁, una volta assorbito dalle pareti intestinali, viene trasferita immediatamente nel fegato attraverso il torrente ematico, probabilmente con intervento delle lipoprotei-

ne sieriche che fungono da carrier (79). La rapidità di trasferimento di AFB₁ nel fegato, e l'immediata azione di idrossilazione, comporta il ritrovamento di AFM₁ nel latte già nella mungitura successiva all'assunzione del pasto contenente alimenti contaminati (309, 310). Studi condotti in bovini ed ovini hanno dimostrato la presenza di AFM₁ nel latte dopo rispettivamente 12 (309) e 6 ore dalla somministrazione dell'alimento contaminato (311).

In tutte le specie animali studiate, la concentrazione di AFM₁ nel latte è risultata direttamente proporzionale alle quantità di AFB₁ assunte dagli animali (311), per quanto siano necessari alcuni giorni di somministrazione continua affinché il livello di escrezione di AFM₁ si stabilizzi.

In particolare, in seguito a somministrazione giornaliera continuativa di quantità costanti di AFB₁, la concentrazione di AFM₁ nel latte prodotto aumenta giornalmente, fino al raggiungimento di un plateau in cui si stabilisce uno stato stazionario di escrezione di AFM₁ (310-314). Il giorno in cui si stabilisce la fase di plateau è variabile. Ad esempio, in vacche sottoposte a somministrazione di 0,100 mg/capo/giorno AFB₁, il plateau si osserva tra il settimo e il dodicesimo giorno di somministrazione di AFB₁ (310) (**Figura 14**).

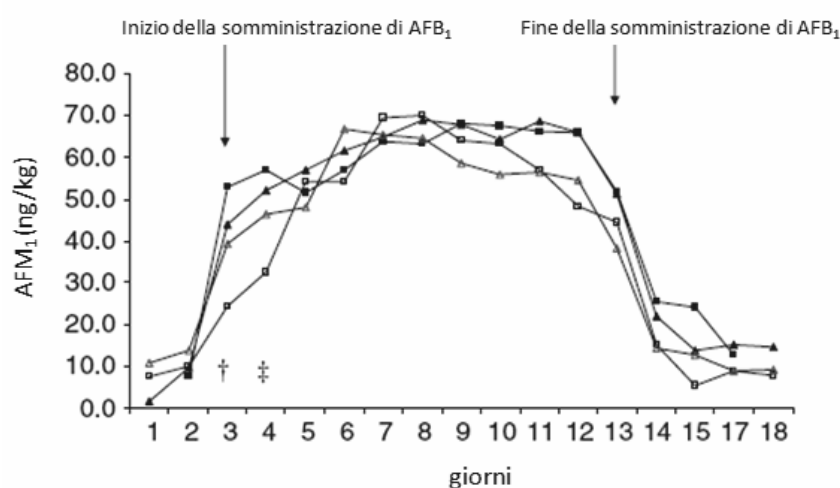


Figura 14. Escrezione di AFM₁ (ng/kg) nel latte di quattro diversi gruppi di vacche in seguito alla somministrazione di 0,100 mg/capo/giorno AFB₁. Ogni punto in figura rappresenta la media di 8 animali. Tratto da: Masoero 2007 (310).

In studi precedenti, il plateau è stato osservato a 24 (313) e 76 ore (309, 312). Studi analoghi, eseguiti in pecora, riportano lo stabilirsi della condizione di plateau tra il nono e il tredicesimo dalla somministrazione di AFB₁ (311). Le dinamiche delle concentrazioni nel latte possono differire, in maniera sostanziale, in relazione al tipo di razione impiegata. Impiegando le medesime dosi di trattamento in ovini, ad esempio, è stato osservato il raggiungimento del plateau di concentrazioni di AFM₁ nel latte a partire dall'undicesimo giorno (311) con una razione più fibrosa di quella usata quando il plateau è stato raggiunto al secondo giorno (315). Questa differenza potrebbe essere attribuita alla minore velocità di transito ruminale delle razioni più ricche in fibra, che consentono una maggiore azione di detossificazione da parte della popolazione microbica residente (316).

La concentrazione AFM₁ misurata allo stato stazionario è influenzata, in modo significativo, dalla dose di AFB₁ somministrata (311) (**Figura 15**).

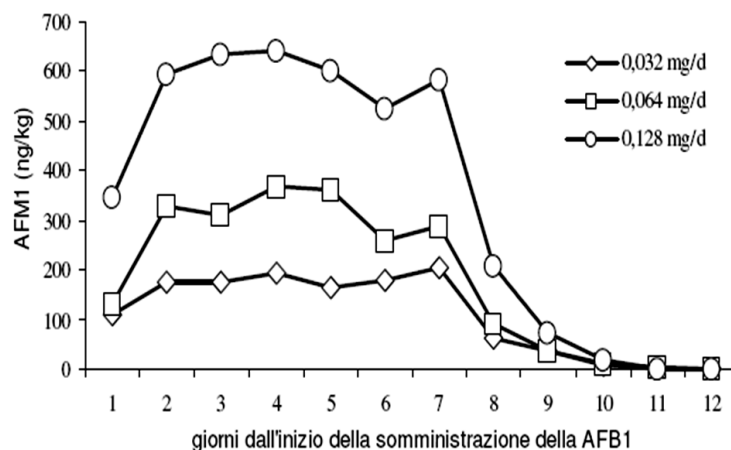


Figura 15. Dinamica delle concentrazioni di AFM₁ escrete nel latte di pecore alimentate per sette giorni con differenti dosi di AFB₁ (0,032;0,064 e 0,128 mg di AFB₁ per capo/giorno). Tratta da Battacone, 2005 (315).

Il passaggio ad una dieta non contaminata, garantisce una rapida riduzione dei livelli di AFM₁ nel latte già a partire dalla mungitura successiva (309, 313) e il raggiungimento di valori vicini allo 0 nell'arco di 3-5 giorni (310, 311).

Fin dall'inizio degli anni '60, studi quantitativi sono stati condotti sulle modalità di trasferimento di AFB₁, presente nelle diete destinate alle vacche in lattazione, ad AFM₁ nel latte. Negli studi sul carry-over antecedenti il 1985, tuttavia, sono stati utilizzati quantitativi di AFB₁ dell'ordine dei milligrammi (un ammontare considerevole in relazione alle norme vigenti sui massimi limiti permessi nei mangimi), somministrati a poche vacche a bassa produzione di latte. Le metodologie di chimica analitica utilizzate per il rilevamento delle tossine nel latte, inoltre, sono risultate poco sensibili. La stima del carry-over, calcolata dal rapporto tra la quantità di AFB₁ consumata e la quantità di AFM₁ nel latte, è stata valutata tra lo 0,18 e il 3,94% della quantità di AFB₁ consumata (312, 317). Sono stati riportati, inoltre, risultati di carry-over molto variabili tra diversi animali della stesse specie e, per lo stesso animale, risultati variabili tra mungiture successive e nei diversi stadi di lattazione (318). Successivamente al 1985, gli studi del tasso di trasferimento di AFB₁ nel latte sono stati condotti somministrando quantitativi di AFB₁ minori (ordine dei microgrammi) in vacche ad elevata produzione di latte, sottoponendo i campioni ad analisi con metodologie molto più avanzate.

Diversi studi, tuttora assunti come riferimento, sono stati condotti con livelli di contaminazione simili ai livelli massimi consentiti legalmente nei mangimi (313, 314, 319-323) mostrando valori di carry-over variabili tra lo 0,32 e il 6,2%. La considerevole variabilità del carry-over osservata può essere attribuita a molteplici fattori, tra cui i principali sono strettamente connessi al quantitativo di latte prodotto. A parità di dose ingerita, infatti, il tasso di trasferimento complessivo di AFB₁ negli alimenti a AFM₁ nel latte risulta più elevato ad inizio lattazione rispetto a una fase avanzata (314, 320, 322) e nelle bovine ad alta produzione rispetto a vacche meno produttive (314, 320). Studi eseguiti in Svezia (314) e in Olanda (320), eseguiti con vacche ad elevata produzione di latte, hanno evidenziato i maggiori livelli di carry-over (2,6% e 2,7-6,2%, rispettivamente). In particolare, in vacche ad elevata produzione di latte ed è stato dimostrato come il carry-over aumenti in relazione ad un

incremento della produzione di latte (320). Tale effetto viene attribuito, principalmente, ad una maggiore permeabilità delle cellule degli alveoli delle ghiandole mammarie (320).

Un altro fattore determinante in grado di influenzare il carry-over AFB₁ sottoforma di AFM₁ nel latte è la fase di lattazione dell'animale (314, 320, 322). A parità di contaminazione di mangime con AFB₁, è possibile rilevare, nella vacca, carry-over pari al 6,2% nelle fasi precoci della lattazione (2-4 settimane) e dell'1,8% nella fase di lattazione tardiva (34-36 settimane) (320). Questo fenomeno è legato alla diversa quantità di latte prodotto, poichè se si considerano le concentrazioni di AFM₁ nel latte, le differenze sono abbastanza limitate. Altri fattori in grado di influenzare il carry-over sono la differenza tra le specie (311) e il tipo di mangime utilizzato. Esistono, ad esempio, evidenze che quando la fonte di AFB₁ nella razione è costituita da semi di cotone contaminati il carry-over sia maggiore che quando la contaminazione sia attribuibile a mais contaminato (313). Risultati sperimentali ottenuti in ovini evidenziano come nel latte delle pecore alimentate con razione meno fibrosa le concentrazioni di AFM₁ siano risultate circa 3-6 volte superiori a quelle rilevate nel latte di pecore alimentate con razione più fibrosa (311, 315). Anche lo stato di salute delle cellule degli alveoli mammari può influenzare il carry-over. È stato suggerito che infezioni della mammella da parte di *Staphylococcus* spp. possano aumentare il carry-over (320). Studi preliminari, infatti, hanno mostrato una relazione tra l'escrezione di AFM₁ nel latte e la conta delle cellule somatiche nel latte indipendente dalla produzione di latte (324) ed è stato dimostrato che la presenza di mastiti aumenta il numero delle cellule somatiche nel latte (325). È stato ipotizzato che la presenza di infezioni della mammella possa influenzare il carry-over aumentando la permeabilità delle membrane delle cellule degli alveoli (326), permettendo maggiore passaggio di metaboliti dal sangue al latte (327), anche se al riguardo si trovano informazioni contrastanti (310). Esiste, inoltre, una elevata componente di variabilità individuale dell'animale (320, 328, 329) probabilmente determinata da differenze nell'induzione dei

sistemi enzimatici in grado di ossidare AFB₁ (329), della permeabilità della ghiandola mammaria (324), dell'attività degradativa di AF (316), di biotrasformazione in AFL e in altri metaboliti differenti da AFM₁ (330) a livello del rumine. Anche se non sono ancora disponibili in letteratura dati conclusivi su questo aspetto, le problematiche relative alla variabilità individuale vengono superate considerando il carry-over a livello di mandria.

Considerando i dati ottenuti in tutti gli studi effettuati, è possibile calcolare un incremento del carry-over dello 0,1% per ogni kg di latte prodotto e, per le vacche ad elevata produzione di latte, un valore di carry-over medio del 3%. È stata proposta una relazione empirica molto significativa tra la produzione di latte e il carry-over, calcolata per 12 vacche a cui sono stati somministrati quantitativi di AFB₁ compresi tra i 5 e gli 80 µg/kg (320):

$$\text{carry-over (\%)} = (0,013 \times \text{kg di latte}) - 0,026 \quad (r = 0,99)$$

Tale equazione mostra come il carry-over di AFB₁ sottoforma di AFM₁ nel latte non sia influenzato dal quantitativo di AFB₁ ingerita, ma sia piuttosto correlato alla produzione di latte. Tali risultati sono in accordo con i risultati acquisiti in numerosi studi condotti in varie condizioni sperimentali (309, 311).

Esiste, tuttavia, una relazione lineare tra la quantità giornaliera di AFB₁ ingerita e la concentrazione di AFM₁ escreta giornalmente nel latte. Ad esempio, se i dati ottenuti dagli studi presi in considerazione in precedenza vengono riportati in grafico ed analizzati mediante regressione lineare (**Figura 16**), si può calcolare che la concentrazione di AFM₁ nel latte aumenta di 0,72 ng ogni µg di AFB₁ consumato, con un coefficiente di correlazione di 0,943.

Dal punto di vista pratico, per stimare il trasferimento di AFM₁ in un'intera mandria è ormai ampiamente diffusa un'equazione proposta per vacche esposte a concentrazioni di AFB₁ tra i 5 e gli 80 µg (320):

$$\text{AFM}_1(\text{ng/kg di latte}) = 1,19 \times \text{AFB}_1(\mu\text{g/capo/giorno}) + 1,9$$

Secondo questa equazione, con un'ingestione di AFM₁ superiore a 40 µg/capo/giorno,

si possono superare i limiti di legge di M_1 nel latte pari a $0,05 \mu\text{g}/\text{kg}$ previsti dalla Comunità Europea (51). Considerando un consumo medio giornaliero di 12 kg magime/capo, il contenuto di AFB_1 nel mangime dovrebbe essere inferiore ai $3,4 \mu\text{g}/\text{kg}$. I limiti imposti dalla Comunità Europea, tuttavia, ammettono fino ad un massimo di $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ mangime (51).

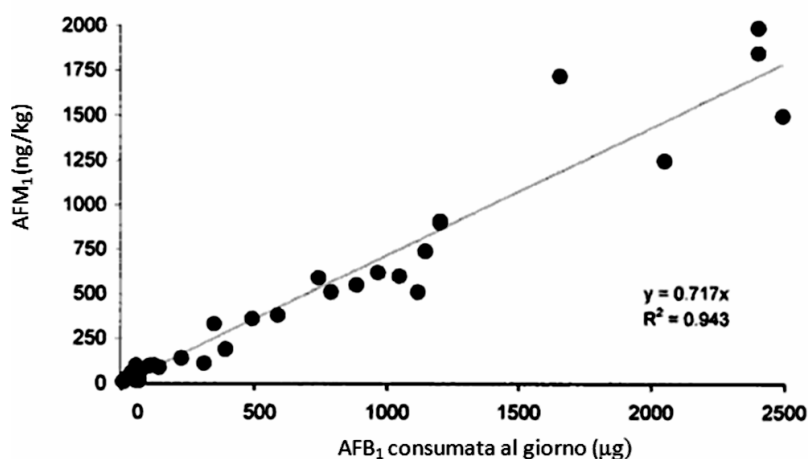


Figura 16. Relazione tra il quantitativo di AFB_1 consumata e la concentrazione di AFM_1 nel latte. (Dati ottenuti dai risultati degli studi pubblicati dal 1985 al 1996).

È tuttavia importante sottolineare che l'utilizzo inappropriato delle equazioni descritte può portare a conclusioni erranee circa i limiti massimi di AFB_1 tollerabili nei mangimi per rientrare in livelli di contaminazione del latte inferiori a quelli previsti dalla legislazione della Comunità Europea.

Le equazioni descritte, infatti, non tengono conto di fattori come la fonte della contaminazione, la variabilità individuale ed altri, limitandone l'affidabilità alle condizioni sperimentali della prova da cui sono state calcolate.

Recentemente, è stato proposto un nuovo modello matematico cinetico per il calcolo del tasso di trasferimento di AFB_1 nel latte allo stato stazionario (331). Nelle vacche in fase di lattazione, il modello correla il quantitativo di AFB_1 assunto giornalmente con lo stato di lattazione dell'animale e l'escrezione di AFM_1 , presupponendo l'esistenza di una correlazione lineare tra lo stato di lattazione e l'assunzione di

cibo. Tale modello è in grado di giustificare risultati simili ottenuti in prove di carry-over condotte in condizioni sperimentali molto diverse tra loro.

1.7.3 Effetti della lavorazione del latte contaminato con AFM₁

I trattamenti comunemente effettuati nell'industria lattiero-casearia possono essere distinti in due categorie di processi: quelli che non implicano la separazione dei componenti del latte (trattamento termico, conservazione a basse temperature, preparazione dello yogurt) e processi che implicano tale separazione (concentrazione, liofilizzazione, produzione di formaggio e burro).

Diversi gruppi di ricerca hanno studiato la stabilità di AFM₁ ai trattamenti termici come la pastorizzazione e il riscaldamento del latte direttamente sulla fiamma, dimostrando che tali trattamenti non sono in grado di ridurre in modo apprezzabile il quantitativo di AFM₁ (332, 333). Analogamente, studi sulla stabilità di AFM₁ effettuati durante la conservazione del latte a basse temperature o congelamento hanno dimostrato che tali trattamenti non sono in grado di alterarne il contenuto (334). Sono stati, inoltre, pubblicati i risultati di diverse ricerche riguardanti lo studio dell'effetto della rimozione dell'acqua sul contenuto di AFM₁, mediante essiccamento a caldo (spray o a rulli) o a freddo (334). I risultati di alcuni di questi studi hanno dimostrato grandi riduzioni di AFM₁, mentre altri hanno suggerito che il processo di concentrazione non modifica apprezzabilmente il contenuto della tossina.

1.7.4 Trasferimento di AFM₁ nei prodotti derivati dal latte

Nei pochi studi condotti sulla ripartizione di AFM₁ durante la produzione di crema e burro, è stato confermato che solamente una minima porzione di AFM₁ si ripartisce nel prodotto finito, mentre la maggior parte della tossina inizialmente presente può essere ritrovata nel latte scremato e nel siero rimasto dopo la produzione del burro (334).

La preparazione di prodotti caseari fermentati, come kefir e yogurt, non diminuisce significativamente il contenuto di AFM₁ (335). La produzione del formaggio comprende diversi passaggi e AFM₁ non sembra essere degradata nella prima fase, la trasformazione del latte nella cagliata pressata, dal momento che il quantitativo di tossina presente nel caglio è essenzialmente lo stesso rilevato originariamente nel latte (334). AFM₁ sembra associarsi prevalentemente con la caseina determinando un contenuto in AF maggiore nel caglio che nel siero e, in ultima analisi, un contenuto in AF nel formaggio maggiore che nel latte da cui questo viene prodotto. È stato definito come fattore di arricchimento il rapporto tra la concentrazione di AFM₁ nel latte divisa per la concentrazione di AFM₁ nel formaggio (334). Sulla base di diverse ricerche è stato considerato che tale fattore di arricchimento può variare tra 2,5 e 3,3 nei formaggi a pasta molle e tra 3,9 e 5,8 nei formaggi a pasta dura. La seconda fase nella produzione del formaggio è la maturazione, nel corso della quale AFM₁ non sembra essere degradata, nonostante alcune discrepanze sui dati di stabilità (336).

1.7.5 Trattamenti per la decontaminazione del latte da AFM₁

L'osservazione che diversi processi non portano a perdita di AFM₁ è di considerevole importanza pratica. Per ovviare a tale problema, sono stati studiati ulteriori tipi di trattamenti chimici e fisici che potessero inattivare o eliminare AFM₁, subordinandoli a quelli permessi come additivi nei cibi: solfiti, bisolfiti e perossido di idrogeno (337, 338). Il latte naturalmente contaminato con AFM₁ trattato con potassio bisolfito 0,4% a 25 °C per 5 ore, presenta un decremento nella concentrazione della tossina del 45%, mentre la concentrazione di AFM₁ non viene influenzata da perossido di idrogeno all'1% a 30 °C per 30 minuti. L'aggiunta di perossido di idrogeno ad una concentrazione dello 0,05-0,1% con lattoperossidasi, tuttavia, può ridurre del 50% il quantitativo di AFM₁ originariamente presente. I processi fisici utilizzati per eliminare AFM₁ nel latte sono l'adsorbimento e l'irradiazione. Il 5% di bentonite aggiunta al

latte è in grado di assorbire l'89% di AFM₁ (337). In uno studio sugli effetti della radiazione UV, è stato dimostrato che la concentrazione di AFM₁ nel latte poteva essere ridotta dal 3,6 al 100%, in relazione alla durata dell'esposizione, al volume del latte trattato e alla presenza di perossido di idrogeno (334). Al momento attuale, peraltro, i trattamenti chimici e fisici menzionati non sono applicabili praticamente nell'industria lattiero-casearia, poichè non si conoscono i loro effetti su parametri quali la sicurezza biologica e il valore nutrizionale dei prodotti trattati. Il costo di tali processi, inoltre, è talmente elevato da risultare proibitivo per applicazioni su larga scala.

Dal momento che AFM₁ non può essere facilmente distrutta o rimossa, si può prevenire la sua presenza nel latte solamente cercando di eliminare AFB₁ dalla dieta degli animali. In numerosi Stati nel mondo, ed in particolare nella Comunità Europea, esistono dei regolamenti precisi per controllare il quantitativo di AF ammissibili nelle derrate zootecniche destinate agli animali da latte.

1.8 ASPETTI LEGISLATIVI PER IL CONTROLLO DI AF

Secondo dati presentati al *World Mycotoxin Forum* del 2005, le popolazioni che vivono nella fascia compresa fra il 42° parallelo nord e sud sono particolarmente esposte ad AF e, significativamente, il 70% dei mangimi per animali risultano contaminati con tali micotossine (51).

Per contrastare i rischi connessi alla tossicità di AF (cancerogenicità, mutagenicità, immunosoppressione), molti governi hanno posto dei limiti rigorosi alle loro quantità tollerabili negli alimenti e nei mangimi, costringendo le industrie ad adottare conseguenti protocolli di produzione e controllo.

1.8.1 La normativa per AF in Europa

In Europa, a partire dal 1976, anno in cui sono stati definiti limiti massimi per AF nei mangimi, sono stati emanati, sia a livello nazionale sia comunitario, provvedimenti legislativi relativi ai livelli massimi ammissibili in molte matrici alimentari, provvedimenti legislativi concernenti metodi per il campionamento, requisiti per l'analisi, condizioni per l'importazione e programmi coordinati da eseguire nell'ambito del controllo ufficiale. Nel 1998, in particolare, l'UE ha iniziato il processo sistematico di definizione di limiti massimi ammissibili negli alimenti per le micotossine, e per AF in particolare, e attualmente il pacchetto normativo, anche se non ancora completo, risulta notevolmente sviluppato. Sono stati, infatti, stabiliti i livelli massimi per AFB₁ e per AF totali (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) in cereali, granaglie, arachidi, frutta secca e spezie (Regolamento della Commissione 2006/1881/EC) sia per alimenti destinati al consumo umano sia per quelli ad uso animale (**Tabella 2**).

Nel 2004 sono stati fissati limiti massimi negli alimenti per l'infanzia per AFB₁ e AFM₁ (Reg. 683/2004) (339).

Matrice	Limite di legge	Riferimento alla normativa
Aflatossina B₁		
Cereali e derivati (escluso il granturco) destinati al consumo diretto/cernita o trattamenti	2 µg/kg	Reg. 2174/2003 (modifica i Reg. 466/2001 e 257/2002)
Mais non destinato al consumo diretto e da sottoporre a cernita/trattamenti fisici	5 µg/kg	
Mais destinato al consumo diretto	4 µg/kg	
Arachidi non destinate al consumo diretto	8 µg/kg	
Altra frutta secca non destinata al consumo diretto	5 µg/kg	
Frutta secca destinata al consumo diretto	2 µg/kg	
Peperoncini rossi, pepe di Caienna, paprica, pepe nero e bianco, noce moscata, zenzero, curcuma	5 µg/kg	
Alimenti per l'infanzia e alimenti a base di cereali destinati a lattanti e prima infanzia	0,10 µg/kg	Reg. 683/2004
Alimenti dietetici a fini medici speciali destinati ai lattanti	0,10 µg/kg	
Aflatossina M₁		
Alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento, compreso il latte per lattanti e il latte per lo svezzamento	0,025 µg/kg	Reg. 683/2004
Alimenti dietetici a fini medici speciali destinati ai lattanti	0,025 µg/kg	
Latte crudo, latte destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte e latte trattato UHT	0,05 µg/kg	Reg. 2174/2003
Aflatossine totali		
Cereali e derivati (escluso il granturco) destinati al consumo diretto/cernita o trattamenti	4 µg/kg	Reg. 2174/2003 (modifica i Reg. 466/2001 e 257/2002)
Mais non destinato al consumo diretto e da sottoporre a cernita/trattamenti fisici	10 µg/kg	
Mais destinati al consumo diretto	2 µg/kg	
Arachidi non destinate al consumo diretto	15 µg/kg	
Altra frutta secca non destinata al consumo diretto	10 µg/kg	
Frutta secca destinata al consumo diretto	4 µg/kg	
Peperoncini rossi, pepe di Caienna, paprica, pepe nero e bianco, noce moscata, zenzero, curcuma	10 µg/kg	

Tabella 2. Limiti di legge in vigore nell'UE per AF in alimenti per l'uomo.

da: Miraglia M, De Santis B, Minardi V, Brera C. Approccio olistico nell'analisi del rischio per le micotossine. Atti 1° Congresso nazionale Le micotossine nella filiera agro-alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma, 29-30 novembre 2004, Rapporti ISTI-SAN 05/42 2005b; 15-28.

1.8.2 Definizione dei limiti massimi ammissibili per AFM₁

Secondo una recente ricerca condotta dal National Institute for Public Health and Environment olandese per conto della FAO, circa 60 nazioni hanno definito dei limiti specifici per AFM₁ nel latte, coinvolgendo dal punto di vista normativo il 90% della popolazione mondiale. I criteri adottati dai vari paesi nel fissare dei parametri sono, tuttavia, piuttosto differenziati.

Su 60 paesi dotatisi di norme specifiche nel 2002, 21 pongono il limite di 0,5 µg/kg, fra questi gli USA, alcuni paesi europei e svariati paesi asiatici. Questo corrisponde anche al limite uniformato MERCOSUR applicato in America Latina ed adottato dal *Codex Alimentarius* (FAO Codex Alimentarius 2001). Diversamente, 36 paesi pongono il limite di 0,05 µg/kg, compresa l'UE (regolamento comunitario n. 1881/2006), i nuovi Stati Membri e i paesi dell'European Free Trade Association (EFTA) [337]. Il livello massimo di AFM₁ nel latte nell'UE, quindi, è tra i più bassi del mondo, ed è basato sul principio ALARA (As Low As Reasonably Achievable).

Per i derivati del latte, i limiti vanno calcolati in base ai fattori di trasferimento. Per i prodotti lattiero-caseari viene solo indicato che devono essere ottenuti da latte con valori di AFM₁ nei limiti sopraindicati. Non è stato possibile fissare limiti specifici per i vari prodotti derivati dal latte a causa della mancanza di informazioni sui fattori di conversione latte-prodotto derivato. In Italia, disposizioni nazionali suggeriscono un metodo di calcolo del contenuto di AF nei formaggi che tenga conto del contenuto ammesso nel latte moltiplicato per il fattore di resa casearia (circolare Ministero della Salute n. 609/1774/3.98 del 12 dicembre 2003). Successivamente, a causa dell'episodio di contaminazione da AFB₁ nel mais verificatosi nel 2003 e della conseguente presenza di AFM₁ nel latte di vacche intossicate, è stato necessario definire quale fosse il valore della tossina nei formaggi a pasta dura e a lunga stagionatura (tipo grana) prodotti a partire da latte contaminato a 0,05 µg/kg. Sulla base del fattore di conversione definito sperimentalmente, è stato possibile stabilire un limite massimo temporaneo di 0,45 µg/kg per questa categoria di formaggi (340).

1.8.3 Definizione dei limiti massimi di AF ammissibili nei mangimi

In considerazione del passaggio nel latte e dei diversi effetti negativi riconosciuti sulla salute animale, circa 45 nazioni hanno stabilito limiti specifici per il livello di AFB₁ nella razione degli animali da latte [338]. Per assicurare il rispetto dei limiti mas-

simi di AFB₁ nel latte destinato all'alimentazione umana, nell'UE sono stati stabiliti limiti rigorosi anche per i livelli massimi nei componenti dei mangimi che potrebbero essere consumati dalle bovine da latte (Direttiva 2003/100/EC) (341). Nei paesi dell'UE, nei nuovi Stati Membri, nei paesi EFTA e in altri pochi paesi al di fuori dell'Europa, viene applicato un limite di 0,005 mg/kg di mangime per vacche, valore che è al di sotto del livello cui non si riscontra alcun effetto in animali da esperimento.

In Italia, la Direttiva 1999/29/CE è stata recepita con il DM 23 Dicembre 2002 N 317, che stabilisce i limiti massimi ammissibili per AFB₁ in varie categorie di mangimi (342, 343) (**Tabella 3**). In **Tabella 4** sono invece riportati i livelli di ingestione tollerabili per il bestiame da carne e da latte.

Matrice	Limite di legge	Riferimento alla normativa
Aflatossina B₁		
Materie prime per mangimi <i>Ad eccezione di: arachidi, copra, palmisti, semi di cotone, babassu, granturco e loro derivati</i>	0,05 mg/kg 0,02 mg/kg	Direttiva 1999/29/CE
Mangimi completi per bovini, ovini e caprini <i>Ad eccezione di: - animali da latte; - vitelli, agnelli e capretti</i>	0,05 mg/kg 0,005 mg/kg 0,01 mg/kg	
Mangimi completi per suini e pollame (salvo animali giovani)	0,02 mg/kg	
Altri mangimi completi	0,01 mg/kg	
Mangimi complementari per bovini, ovini e caprini (ad eccezione dei mangimi complementari per gli animali da latte, vitelli, agnelli e capretti)	0,05 mg/kg	
Mangimi complementari per suini e pollame (salvo animali giovani)	0,03 mg/kg	
Altri mangimi complementari	0,005 mg/kg	
Materie prime per mangimi: arachidi, copra, palmisti, semi di cotone, babassu, granturco e loro derivati	0,2 mg/kg	
Materie prime per mangimi, ad eccezione di: arachidi, copra, palmisti, semi di cotone, babassu, granturco e loro derivati	0,05 mg/kg 0,02 mg/kg	

Tabella 3. Limiti di legge in vigore nell'UE per AFB₁ in alimenti per animali.

da: Miraglia M, De Santis B, Minardi V, Brera C. Approccio olistico nell'analisi del rischio per le micotossine. Atti 1° Congresso nazionale Le micotossine nella filiera agro-alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma, 29-30 novembre 2004, Rapporti ISTISAN 05/42 2005b; 15-28.

Concentrazione in razione	Tipo di bestiame	Effetti
> 100 ppb.	Bovini da ingrasso	Livello Tossico
300/400 ppb.	Vacche da latte adulte	Nessun effetto visibile
600/800 ppb.		Ridotta prod. latte
2400/3100 ppb.		Ridotto consumo cibo e prod. latte
600/800 ppb.	Manze	Ridotti consumi e casi di morte
150/200 ppb.	Vitelli/e	Ridotti consumi e lesioni epatiche
450/600 ppb.		Morte

Tabella 4. Livelli di ingestione di AF tollerabili per bestiame.

da: Marabelli R. Micotossine: un problema per l'alimentazione dell'uomo e degli animali. Atti 1° Congresso nazionale Le micotossine nella filiera agro-alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma, 29-30 novembre 2004, Rapporti ISTISAN 05/42 2005; 61-70.

1.8.4 Implicazioni pratiche, etiche e commerciali relative ad AF

La definizione dei livelli massimi di AF tollerabili nelle materie prime e nei derivati è uno strumento utilizzato a livello mondiale per la salvaguardia del consumatore. Si tratta, peraltro, di uno strumento utile ma con notevoli limiti, considerando che, in molte situazioni, il controllo normativo sulla fase finale della filiera agro-alimentare, vegetale ed animale, rappresenta solo una presa di coscienza del problema e non consente soluzioni immediate. L'approccio legislativo è, inoltre, generalmente parziale, in quanto pone dei limiti per le singole micotossine e non considera le problematiche derivanti da interazioni dovute alla presenza di più micotossine, situazione ulteriormente complicata dalla dinamica dei cambiamenti climatici. I limiti legali, inoltre, non promuovono alcuna azione per ridurre la contaminazione, ma impongono solo vincoli nella commercializzazione dei prodotti.

Un'analisi economica degli effetti della variazione dei limiti di accettabilità dei livelli di AF in prodotti importati dall'Africa ha evidenziato aspetti rilevanti sul piano commerciale. La riduzione del 10% del limite AF per le arachidi nell'Unione Europea (UE), ha determinato una riduzione nell'importazione dell'11%. L'adozione dei nuovi limiti UE per AF (4 µg/kg totali), rispetto ai limiti del Codex Alimentarius (15 µg/kg totali), ha ridotto il flusso commerciale del 63% comportando una perdita di esportazione dell'Africa di 720 miliardi di dollari (dati riferiti al 1998), una cifra veramen-

te rilevante per le economie dei paesi di quel continente. Si tratta di stabilire, inoltre, quanto l'adozione di questi livelli sempre più restrittivi sia un fattore di sicurezza reale. L'allora segretario generale dell'ONU Kofi Annan (2001) ha commentato in un suo intervento: "la Banca Mondiale ha calcolato che questi (limiti UE) possono salvare la vita di un cittadino dell'UE ogni due anni. Ma escludendo dalla commercializzazione cereali, frutta secca, nocciole/noci per 670.000 milioni di dollari si gettano in una situazione di povertà molte migliaia di africani, che soffriranno di morte precoce per malnutrizione e malattie endemiche". Sembra evidente che queste scelte, se tutelano le popolazioni di alcuni paesi, possono avere effetti gravi sulle economie e sulle popolazioni di altri. Viene avanzato anche il dubbio che queste scelte rappresentino una forma di nuove barriere doganali. Aspetti etici si fondono con principi di precauzione che devono essere considerati in una valutazione globale del problema aflatossicosi.

La gestione razionale del problema AF deve, in conclusione, basarsi sulla prevenzione, che risulta tanto più efficace quanto più è completa la base di conoscenze e quanto più sono coinvolti tutti gli operatori della filiera. Solo una visione globale che coinvolga competenze di tipo agronomico, climatologico, fitopatologico, entomologico, chimico, molecolare, zootecnico, nutrizionale (animali da allevamento e uomo), medico e ingegneristico, può consentire un approccio gestionale sistematico per prevenire e controllare il problema.

1.9 STRATEGIE PER LA PREVENZIONE DI AFLATOSSICOSI

Le strategie di intervento attualmente disponibili per la prevenzione di aflatossicosi possono essere suddivise essenzialmente in due categorie: 1) strategie applicabili a livello di comunità e 2) strategie applicabili a livello del singolo (individuo umano o animale).

Alla prima categoria appartengono tutti gli interventi atti a prevenire il consumo di alimenti contaminati e consistono nella prevenzione della formazione di AF, pre o post-raccolta, o nella detossificazione delle derrate contaminate.

Alla seconda categoria appartengono le categorie di interventi che si propongono di prevenire gli effetti dell'ingestione di alimenti contaminati, qualora le strategie preventive sopracitate abbiano fallito. Attualmente, esclusa l'eliminazione dei cibi contaminati dalla dieta, le strategie preventive a livello individuale consistono nella terapia farmacologica e nell'utilizzo di sostanze in grado di prevenire l'assorbimento di AF a livello gastrointestinale.

La complessità dei meccanismi d'azione e la molteplicità di effetti di AF nell'uomo e in altri animali hanno finora reso difficile lo studio di misure profilattiche o terapeutiche per le aflatossicosi.

1.9.1 Strategie applicabili a livello comunitario nei confronti di AF

La maggior parte delle micotossicosi sono conseguenza dell'ingestione di alimenti contaminati da micotossine, per cui la loro prevenzione passa necessariamente attraverso uno stretto controllo della qualità degli alimenti, sia nei paesi industrializzati sia in quelli in via di sviluppo.

Nei paesi sviluppati, questo obiettivo è stato raggiunto, per la popolazione, in gran

parte grazie a regolamenti che impongano basse concentrazioni della tossina nei cibi commercializzati. Poiché la normativa permette maggiori concentrazioni di AF nel cibo per gli animali, le industrie agricole hanno sviluppato approcci alternativi per limitare l'effettiva esposizione biologica senza dover affrontare gli elevati costi della prevenzione della contaminazione (344). In Nord America ed Europa, l'efficiente applicazione della regolamentazione sulle concentrazioni di AF permesse nei vari alimenti animali ha mutato il problema dell'aflatossicosi a problema di grande impatto economico ma di minore impatto sulla salute umana. Per prevenire le perdite economiche associate ad una mancata ottemperanza ai limiti di legge, è stato pubblicato un numero significativo di ricerche riferibili ai tre principali passaggi influenti: produzione, stoccaggio e trattamento delle derrate.

1.9.1.1 Prevenzione dello sviluppo fungino in campo

Anche se inizialmente l'obiettivo di controllare il problema AF è stato focalizzato sulla prevenzione della contaminazione durante lo stoccaggio, nei primi anni '70 è stato considerato che la contaminazione, o quantomeno la colonizzazione delle piante da parte dei funghi tossinogenici, poteva iniziare in campo prima della raccolta. Condizioni ambientali come la siccità durante la fase di crescita del seme, il danneggiamento in campo da parte di insetti, la varietà e le caratteristiche del suolo, sono stati dimostrati essere fattori determinanti nella contaminazione pre-raccolta (345). Per contrastare l'insorgenza di questi fattori è essenziale mettere in opera una serie di processi per garantire la salute delle piante.

A causa dell'importanza della siccità come fattore predisponente le colture alla contaminazione, l'irrigazione è un mezzo fondamentale per assicurare la qualità degli alimenti (346). Altre buone pratiche agronomiche essenziali comprendono il rispetto dei tempi di semina e raccolto, un supplemento delle quantità di azoto necessarie e il controllo dei parassiti (25, 347, 348). Ricerche recenti hanno suggerito che un metodo promettente per minimizzare la contaminazione da AF possa essere la pra-

tica di inoculare in campo ceppi di funghi non aflatossigeni come agenti competitori di bio-controllo (349, 350).

I fattori che favoriscono l'infezione dei funghi aflatossigeni in campo sono stati compresi in modo sufficiente per poter costruire modelli di simulazione al computer utili a descrivere il rischio di contaminazione delle colture più importanti, permettendo una attenta pianificazione per minimizzare la contaminazione e, conseguentemente, evitare ingenti perdite economiche (351). Nei paesi in via di sviluppo, tuttavia, il danno esercitato in campo dagli insetti non viene controllato con pesticidi o pratiche agronomiche; la siccità è un fenomeno comune, e molte produzioni vengono effettuate senza utilizzare l'irrigazione come opzione alternativa. La raccolta viene effettuata senza l'aiuto di macchinari e l'essiccamento viene condotto solitamente in modo molto inefficace, dipendente dalle condizioni meteorologiche. Un tempo sfavorevole durante la raccolta determina un essiccamento lento e inadeguato e comporta concomitanti rischi di contaminazione.

Recenti sviluppi hanno utilizzato le biotecnologie per l'introduzione di geni sia per prevenire la formazione di AF, come risultato del metabolismo fungino, sia per prevenire, o ridurre, la contaminazione fungina. Questi approcci possono offrire considerevoli prospettive a lungo termine, ma perchè tali metodologie possano influenzare la salute umana saranno necessari tempo e investimenti consistenti (62).

1.9.1.2 Prevenzione dello sviluppo di AF durante lo stoccaggio delle derrate alimentari

È noto che gran parte della contaminazione da AF delle derrate alimentari avviene durante lo stoccaggio. Per preservare la qualità durante la conservazione, è necessario prevenire l'attività biologica attraverso adeguato essiccamento (umidità <15%), eliminazione dell'attività degli insetti, che può aumentare il contenuto di umidità attraverso la condensazione risultante dalla loro respirazione, basse temperature e atmosfere inerti (347).

Durante le operazioni di raccolta e stoccaggio bisogna, inoltre, evitare il danno meccanico del raccolto in quanto granelle lesionate presentano siti di ingresso per i funghi aflatossinogenici, facilitando l'infezione e la diffusione del fitopatogeno.

Durante lo stoccaggio del raccolto vengono, inoltre, utilizzati acidi organici (acido propionico, acetico, sorbico e benzoico) che, inducendo variazioni di pH, fungono da inibitori della crescita fungina (352).

Come nel caso della prevenzione dello sviluppo fungino in campo, le condizioni necessarie per prevenire la contaminazione durante lo stoccaggio delle derrate sono note, ma non è sempre facile realizzarle nei sistemi agricoli dei paesi in via di sviluppo. Un fatto che rende lo stoccaggio un problema di grande importanza per questi paesi è la natura di molte produzioni agricole. Nelle aree rurali, molte persone producono e conservano il proprio cibo e, come conseguenza, molti alimenti vengono stoccati in piccoli granai tradizionali dove l'attenzione per il controllo del rischio di contaminazioni è scarso. Studi sulla qualità delle granaglie conservate in queste strutture hanno mostrato un incremento costante del contenuto di AF nel tempo, fenomeno che riflette l'insuccesso nel mantenere condizioni appropriate (353). Raggiungere e mantenere le condizioni che possono prevenire la contaminazione fungina è una sfida notevole per lo stoccaggio di alimenti in piccola scala (a livello familiare e di fattoria), quasi certamente superiore alle possibilità della maggioranza degli interessati, nonostante questi possano essere convinti dell'importanza di affrontare tale sforzo.

1.9.1.3 Trattamento dei prodotti contaminati da AF

Il trattamento dei prodotti contaminati può essere utilizzato per ridurre il contenuto di AF e prevenire, quindi, le perdite economiche conseguenti. Esistono tre approcci principali: diluizione, decontaminazione e separazione.

1.9.1.3.1 Diluizione

Il modo più semplice per rispettare i limiti è, sfortunatamente, quello di diluire il con-

tenuto di AF mescolando cereali a basso contenuto con cereali che eccedano i limiti regolamentari. In questo modo, anche se la concentrazione viene ridotta, i consumatori sono ancora esposti ad AF. Questo approccio risulta fallimentare quando il prodotto non contaminato sia insufficiente a permettere un'adeguata diluizione della partita contaminata, o quando manchino le infrastrutture per conservare le partite in modo adeguato e raggiungere il livello di mescolamento desiderato. L'attuale legislazione comunitaria, peraltro, vieta espressamente di ricorrere alla diluizione per riportare la contaminazione entro i limiti di accettabilità.

1.9.1.3.2 Decontaminazione

Per quanto riguarda la decontaminazione, sono stati intrapresi sforzi considerevoli per sviluppare metodologie con cui trattare derrate alimentari contaminate e ridurre il contenuto di AF. Attualmente, la concentrazione di AF nelle derrate zootecniche può essere ridotta attraverso trattamenti fisici, chimici e biologici.

I trattamenti fisici comprendono calore, microonde, raggi gamma, raggi X, esposizione a raggi UV e adsorbimento (354). L'adsorbimento di AF su alluminosilicati idrati di calcio e sodio o altri materiali inerti, ad esempio, è stato utilizzato nell'industria mangimistica nel tentativo di ridurre il contenuto di AFB₁ nel latte.

I trattamenti chimici sono volti a modificare la struttura chimica di AF, trasformandole in composti vari ordini di grandezza meno tossici o mutageni rispetto ad AFB₁ o non rilevabili in seguito a procedimenti di estrazione, isolamento e purificazione appropriati e completi. Sono state saggiate numerose sostanze chimiche per la loro capacità di decontaminare derrate contaminate da AF: molte di queste hanno tuttavia prodotto effetti modesti (355). Il trattamento con sostanze alcaline e ozono può denaturare AF ma non è chiaro se questo processo sia permanente (356). Il trattamento chimico di maggiore successo per degradare AF nei mangimi animali e nelle merci agricole è quello con ammoniaca, che determina la decomposizione del 95-98% di AFB₁ (308). Questo procedimento viene utilizzato in vari paesi (Brasile,

Messico, Senegal, Sud Africa, Sudan e alcuni stati degli USA), ma non è stato formalmente approvato dall'UE e dal FDA degli USA a causa delle opinioni controverse sulla salubrità per gli animali degli alimenti trattati chimicamente.

È stato dimostrato, ad esempio, che il trattamento del granturco con soda caustica, come si usa nella cucina tradizionale mesoamericana, può ridurre il contenuto di AF, ma esistono evidenze che il fenomeno chimico possa essere reversibile e che, dopo l'assunzione, AF possa essere riformata nelle condizioni acide dello stomaco (357). Teoricamente, alcuni metodi biologici possono essere utilizzati per eliminare AF. Sono state sviluppate, ad esempio, delle procedure per la degradazione di AF nelle derivate alimentari basate sul metabolismo di *Flavobacterium aurantiacum*. Questi studi, tuttavia, non hanno ancora portato ad applicazioni pratiche (358). Risultano di particolare interesse, e in continua evoluzione, le ricerche che mirano a sviluppare metodi biologici sempre più efficaci. La speranza è quella di poter disporre, in un prossimo futuro, di strumenti nuovi per limitare al massimo gli effetti negativi che le micotossine esercitano sull'allevamento. Nel frattempo, molto resta ancora da fare nel settore della prevenzione, che coinvolge inevitabilmente tutta la filiera produttiva.

1.9.1.3.3 Separazione

Per quanto riguarda la separazione, un successo considerevole nel ridurre la contaminazione da AF si può raggiungere separando i semi contaminati dalla massa. Questo approccio dipende dalla forte contaminazione di solo una piccola frazione dei semi, in modo tale che, rimuovendoli, si ottenga una contaminazione totale molto più bassa. Uno studio della distribuzione di AF nelle arachidi ha mostrato che la maggior parte della tossina (80%) è spesso associata con i semi più piccoli e avvizziti (359). Uno screening dimensionale può, pertanto, abbassare il contenuto totale di semi contaminati nella massa. Un'ulteriore rimozione dei semi contaminati con AF può essere ottenuta mediante separazione in base al colore, che, nel caso delle arachidi, risulta particolarmente efficiente. Una conseguenza negativa di questo approc-

cio di separazione è il destino dei semi a concentrazione molto elevata di AF rimossi dalla massa. I produttori ed i lavoratori più poveri spesso consumano quelle arachidi che avrebbero dovuto essere scartate o le utilizzano per alimentare i loro animali. Questa tecnologia è stata utilizzata con successo anche in Italia durante l'emergenza di contaminazione del mais da AF nel 2003 (360).

1.9.2 Strategie applicabili a livello individuale nei confronti di AF

1.9.2.1 Chemioprotezione da AF

Anche se sarebbe fortemente desiderabile che le derrate zootecniche fossero esenti da AF, la realtà è che gran parte dei cereali destinati all'alimentazione animale sono contaminati e questa condizione comporta perdite economiche rilevanti per i produttori nel caso il mangime non venga trattato (274). È anche evidente che, nelle aree in cui non vengano osservate regolamentazioni, le popolazioni sono comunemente esposte ad AF. AF, inoltre, hanno attirato l'attenzione come arma chimica ed esiste un interesse militare nel proteggere la popolazione dalla loro esposizione.

La chemioprotezione nei confronti di AF è stata perseguita con l'uso di numerosi composti in grado di incrementare i processi di detossificazione negli animali o di prevenire la produzione dell'epossido che causa il danno cromosomico. Una soluzione tecnica è la terapia farmacologica perché alcuni composti, come oltipraz e clorofilla, sono in grado di diminuire la dose biologica effettiva di AF (160, 361-363). L'oltipraz è un ditioione sostituito che inibisce il metabolismo di AFB₁ inibendo l'attività di alcuni enzimi del citocromo P₄₅₀ e inducendo glutatione-S-trasferasi (GST), il più importante enzima per la detossificazione (364). In esperimenti in cui epatociti bovini sono stati incubati con AFB₁ e oltipraz, non si è osservata alcuna formazione di AFM₁. Tale osservazione suggerisce che oltipraz possa essere effettivamente attivo nel prevenire la contaminazione del latte prodotto da vacche alimentate con

mangime contaminato con AFB₁. In Cina, oltipraz è in fase di sperimentazione clinica (fase I e II) per la prevenzione del tumore al fegato. I risultati di questi studi saranno utili per chiarire il metabolismo e il modo d'azione di AFB₁ nell'uomo.

Una terapia farmacologica ininterrotta a lungo termine, tuttavia, è costosa, può avere effetti secondari, e non è praticabile, particolarmente in considerazione del finanziamento riservato alla salute nei paesi in via di sviluppo. Per l'industria mangimistica animale, un obiettivo di grande importanza è stato quello di sviluppare additivi per i mangimi in grado di fornire protezione da AF. Un approccio è stato quello di usare glucomannani esterificati ed altri estratti di lievito che forniscono chemioprotezione incrementando la detossificazione di AF (365, 366).

1.9.2.2 Prevenzione dell'assorbimento enterale di AF

Un altro approccio è derivato dalla scoperta che alcune argille minerali, grazie alla polarità di queste molecole, possono adsorbire selettivamente AF in modo tale da determinare una riduzione della bio-disponibilità e prevenendone l'assorbimento a livello gastrointestinale (367-369).

Sono stati proposti diversi agenti adsorbenti, in grado di sequestrare AF in modo stabile, quali gli allumino-silicati di sodio e calcio, zeoliti, carboni attivi, bentonite di sodio, argille e polimeri speciali (83). Queste diverse sostanze adsorbenti presentano efficienza variabile nella prevenzione di aflatossicosi. Dal momento che diversi composti adsorbenti hanno diverse affinità per AF, infatti, essi differiscono nel grado di prevenzione dell'esposizione biologica indotta in animali che consumano cibo contaminato.

Utilizzando AF marcata radioattivamente, è stato dimostrato che l'aggiunta di argilla in proporzione dello 0,5% del volume di mangime contaminato era in grado di ridurre l'esposizione in polli del 95% (356). I carboni attivi (ACs) e gli alumino-silicati idrati di calcio sodio (HSCAS), mescolati al mangime contaminato in proporzione del 2%, sono stati dimostrati ridurre in vacche il carry-over di AF nel latte rispettivamente del

50 e 36% (319). In esperimenti che utilizzavano l'1% di HSACS addizionati al mangime, è stata ottenuta una riduzione dell'escrezione di AFM₁ nel latte pari al 24% (323). L'associazione di alluminosilicati in mangimi contaminati si è dimostrata efficace nel prevenire aflatossicosi in tacchini, polli, agnelli, bovini, suini, pecore ratti e topi (323, 368-377). In esperimenti recenti, eseguiti con polimeri speciali (MPL) (378), l'inclusione di 20 e 50 g MPL/capo/giorno ha portato alla riduzione del carry-over di AFB₁ dal mangime al latte del 31 e 41% rispettivamente.

L'uso di sostanze adsorbenti quali additivi dei mangimi è autorizzato dal Reg. (CE), n. 2439/1999 del 17 novembre 1999) ed è oggi una pratica abbastanza diffusa. Si stima che, nelle industrie di produzione animale a livello mondiale, alluminosilicati siano addizionati al 10% di tutte le derrate zootecniche.

Alcuni ricercatori, tuttavia, raccomandano particolare cautela nell'utilizzo di sostanze adsorbenti come additivi dei mangimi, dal momento che questi materiali potrebbero adsorbire anche micronutrienti diminuendo la disponibilità di nutrienti essenziali (319, 379).

1.10 STATO DELL'ARTE

AFB₁, prodotta da ceppi di *A. flavus* e *A. parasiticus*, è il più potente composto cancerogeno naturale conosciuto. Negli ultimi decenni, a causa dei rischi per la salute umana ed animale connessi alla contaminazione degli alimenti, gli effetti tossici di AFB₁ sono stati approfonditamente studiati (217, 380).

Diversamente dalla maggior parte delle tossine batteriche, AFB₁ ed altre micotossine sono metaboliti secondari a basso peso molecolare con caratteristiche immunologiche di apteni. È possibile rendere immunogene tali micotossine mediante derivazione chimica, con l'introduzione di gruppi funzionali alla coniugazione a proteine carrier (381). È importante tenere in considerazione che, utilizzando coniugati proteici come immunogeni, il disegno strutturale del derivato ha una notevole influenza sulle proprietà degli anticorpi (Ab) inducibili, quali l'affinità per l'aptene originale e reattività crociata, nel caso di molecole strutturalmente simili (382). Al fine di produrre coniugati in grado di indurre Ab ad elevata affinità per la molecola parentale, il processo di derivazione e coniugazione devono essere tali da modificare il meno possibile la struttura dell'aptene originale.

Dalla fine degli anni '70 ad oggi, sono state proposte diverse molecole, fruibili per la coniugazione a proteine, risultanti dalla derivazione di AFB₁ in posizione 1 (383, 384) o in posizione 8,9 (382, 385-387).

In diversi laboratori, immunizzando per via sistemica conigli con coniugati AFB₁-albumina sierica bovina (BSA) (388-392), AFB₁-polilisina (384), AFB₁-tiroglobulina porcina (TG) (393) e AFB₁-istone H1 (H1) (394), sono stati prodotti Ab caratterizzati da elevata affinità per AFB₁. Gli Ab specifici prodotti sono stati ampiamente utilizzati per lo sviluppo di tecniche bio-analitiche basate sia su saggi immunoenzimatici (ELISA e RIA), volti alla determinazione quantitativa del contenuto di AFB₁ in campioni alimentari o biologici (384), sia su cromatografia di affinità preparativa, volta alla puri-

ficazione di AF per successive analisi in cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC), seguita da rivelazione in fluorescenza o in spettrometria di massa (395, 396). L'imposizione, da parte di molti paesi, di limiti al contenuto massimo di AF tollerabili nelle derrate alimentari ha dato notevole impulso allo sviluppo di saggi qualitativi, alcuni dei quali sono stati introdotti nei protocolli ufficiali per il controllo degli alimenti. Ad esempio, i metodi ufficiali di campionamento ed analisi per AF sono regolati dalla Comunità Europea (Regolamento 401/2006) ed il metodo di riferimento per la determinazione di AF nel latte di vacca è HPLC con rivelazione fluorimetrica preceduta da trattamento dei campioni in colonna di immunoaffinità, secondo i dettami dell' International Standards Organisation (ISO), 2007.

Al contrario, esistono dati limitati sulla efficacia protettiva di Ab specifici per AFB₁, indotti in seguito ad immunizzazione con apteni derivati e coniugati a proteine carriers, nei confronti di aflatossicosi.

Ricercatori che, tra i primi, hanno proposto una metodica per la coniugazione di AFB₁ derivata in posizione 8,9 (383), hanno ottenuto una riduzione degli effetti acuti di aflatossicosi immunizzando conigli con piccoli quantitativi di immunogeno costituito dal derivato coniugato a BSA. In seguito alla somministrazione di una elevata dose di AFB₁, gli animali immunizzati presentavano infatti una mortalità inferiore, nessuna anormalità del fegato e un'attività pressoché inalterata dell'enzima sierico isocitrico deidrogenasi, rispetto ad animali di controllo non immunizzati (390).

Evidenze analoghe sono state ottenute in ratti immunizzati con AFB₁-BSA o con l'immunogeno AFB₁-H1, prodotto mediante reazione di H1 con l'intermedio metabolicamente attivo di AFB₁, AFB₁-8,9-epossido. In entrambi i casi, negli animali immunizzati, la somministrazione di una singola dose letale di AFB₁ ha mostrato di indurre una minore mortalità e ridotti effetti epatotossici acuti, comparativamente a quanto osservabile negli animali di controllo (392, 394). In base ai risultati ottenuti, è stata ipotizzata la possibilità di immunizzazione a scopo profilattico nei confronti di aflatossicosi.

In particolare, è stata osservata una riduzione del legame di AFB₁ al DNA di cellule di fegato di conigli immunizzati con AFB₁-BSA (397). L'indice di legame covalente ($\mu\text{mol AFB}_1/\text{mol DNA}$)/($\text{mmol AFB}_1/\text{kg peso corporeo}$), ottenuto in animali immunizzati dopo 6 ore dalla somministrazione di [³H]AFB₁, è risultato essere più di tre volte inferiore a quello determinato in conigli non immunizzati. Anche se alcuni aspetti tossicologici, come la cinetica del legame di AFB₁ al DNA e la possibilità di legame di AFB₁ ad altre cellule, rimangono da chiarire, i risultati ottenuti depongono sulla possibilità d'immunizzazione nei confronti di AFB₁.

A conferma dell'ipotesi che l'induzione di Ab specifici possa essere protettiva nei confronti degli effetti genotossici di AFB₁, saggi *in vitro*, condotti in *Salmonella typhimurium* (test di Ames), hanno evidenziato una sostanziale riduzione della mutagenicità di AFB₁ da parte di antisieri ottenuti da conigli immunizzati con derivati di AFB₁ coniugati a BSA in posizione 1 (antisiero O) o 8 (antisiero C) (391). In particolare, la mutagenicità esercitata da 12.5 ng di AFB₁ è stata ridotta del 50% con 2 μl di antisiero O e 12 μl di antisiero C, mentre quella esercitata da 3.31 μg di AFB₁ è stata ridotta del 50% con 25 μl di antisiero O. Numerose evidenze sperimentali hanno mostrato come l'inibizione sia causata da Ab specifici.

È stato studiato l'effetto di sieri di conigli immunizzati con AFB₁-BSA sull'induzione della lisogenesi in ceppi di *E. coli* K12 da parte di AFB₁ (388). Una netta riduzione del fenomeno è stata osservata aggiungendo i sieri al mezzo di reazione prima dell'attivazione di AFB₁ da parte di enzimi microsomiali. Al contrario, aggiungendo i sieri immuni successivamente all'attivazione di AFB₁ non è stato riscontrato alcun effetto significativo, implicando che un effetto immunoprotettivo da parte di Ab specifici possa essere esercitato solo prima che la tossina sia attivata.

Nel tentativo di generare immunoglobuline A secretorie (sIgA) specifiche per AFB₁, Oliver et al (393, 398) hanno immunizzato conigli, via villi intestinali, con AFB₁-tiroglobulina porcina (TG) somministrata con tossina colerica (CT), un potente adiuvante mucosale (399). Questo protocollo, diversamente da quanto riportato dagli

stessi autori per un altro studio eseguito con coniugati di 2-acetilaminofluorene (399-402), non ha indotto una risposta anticorpale secretoria specifica per AFB₁. Al contrario la produzione di sIgA specifiche per CT o TG era paragonabile a quella di animali di controllo immunizzati con TG somministrata unitamente a CT, suggerendo che la mancata reattività fosse relativa a AFB₁. L'immunizzazione parenterale susseguente a quella delle mucose, ha generato in conigli una risposta sistemica, mediata da IgG, paragonabile a quella di animali immunizzati esclusivamente per via parenterale, dimostrando che la tolleranza nei confronti di AFB₁ in coniglio è specifica del comparto delle mucose (tolleranza orale) e non è associata a soppressione sistemica (393, 398). La stimolazione *in vitro* delle placche di Peyer e dei linfonodi mesenterici di conigli non immunizzati con sostanze mitogene ha rivelato la presenza di cellule B specifiche per AFB₁ in quantità paragonabili a quelle trovate nella milza, indicando che la tolleranza non è il risultato di una deplezione delle cellule B specifiche nella mucosa intestinale.

Nel complesso, i risultati dimostrano che i conigli presentano tolleranza mucosale nei confronti di AFB₁ e che tale fenomeno non è accompagnato da soppressione sistemica, non è causata da deplezione delle cellule B specifiche nella mucosa intestinale e non è annullabile dalla somministrazione di CT. Questa osservazione è in accordo con un precedente rilievo che la tolleranza mucosale non può essere soppressa dalla co-somministrazione di tossina termosensibile (LT) di *E. coli*, funzionalmente e strutturalmente simile a CT (403). Questo fenomeno potrebbe essere l'effetto di una precedente esposizione ad AFB₁ attraverso la dieta.

Esperimenti di immunizzazione nei confronti di AFB₁ sono stati condotti in polli inoculati per via orale, intrarettale o intraperitoneale con AFB₁-BSA, AFB₁-BSA coniugata alla subunità B della tossina termolabile di *E. coli* (AFB₁-BSA-rLT), AFB₁-BSA co-somministrata con rLT e AFB₁-BSA co-somministrata con CT (404). Tutte le vie di somministrazione degli immunogeni sono state in grado di indurre un titolo significativo di IgG sieriche specifiche per AFB₁, anche se la migliore risposta è stata rile-

vata in seguito ad immunizzazione intraperitoneale. La risposta immunitaria sierica mediata da IgG indotte da AFB₁-BSA è risultata essere potenziata dalla co-somministrazione con rLT ma non dalla coniugazione covalente alla rLT stessa. Tuttavia, in tutti gli animali immunizzati è stato possibile rilevare presenza di sIgA specifiche per CT o rLT, ma non sono state rilevate sIgA specifiche per AFB₁.

1.11 SCOPO DELLA RICERCA

La possibile presenza di AF in molti alimenti costituisce un problema sanitario ed economico di dimensioni globali, che assume rilevanza ancora maggiore in quanto le varie AF (B_1 , B_2 , G_1 , G_2 , M_1 , M_2) non vengono completamente distrutte dalle normali operazioni di cottura, né dai diversi trattamenti a cui vengono comunemente sottoposte le derrate durante i processi di preparazione degli alimenti (405-407). Attualmente, l'unico metodo realmente efficace per ridurre il rischio associato all'ingestione di AF è la prevenzione, esercitata attraverso lo stretto controllo delle condizioni di produzione, di raccolta e di stoccaggio dei prodotti alimentari e l'imposizione, da parte degli organi legislativi di molti Paesi, di limiti ai livelli di AF tollerati negli alimenti e nei mangimi (62). Il sistema di controllo di prevenzione convenzionale richiede un notevole sforzo tecnico ed economico, che non può essere affrontato dai Paesi in via di sviluppo i cui sistemi produttivi non si basano su economie di scala (62).

Per limitare l'esposizione ad AF sono attualmente in corso di studio nuove strategie di intervento che non comportino gli elevati costi associati alla prevenzione della contaminazione. Una prima strategia, basata sulla terapia farmacologica, si propone di interferire sui percorsi biochimici di metabolizzazione di AFB_1 per assicurarne la detossificazione o per prevenire la formazione della forma reattiva 8,9-epossidica. Per quanto risultati incoraggianti siano stati ottenuti con farmaci come oltipraz e clorofillina, una terapia a lungo termine è costosa, può presentare effetti collaterali, e non è economicamente praticabile per i paesi in via di sviluppo (65, 408). Un secondo approccio sperimentale, relativo all'industria mangimistica, si occupa della studio di metodologie volte alla detossificazione degli alimenti contaminati mediante metodi fisici, chimici (355, 409) e biologici (410, 411) o alla prevenzione dell'assorbimento gastro-intestinale attraverso l'aggiunta ai mangimi di sostanze in grado di legare selet-

tivamente AF (83, 319, 323, 378). Queste strategie di intervento non hanno, tuttavia, prodotto risultati definitivi, in quanto presentano efficacia variabile e spesso alterano il valore nutritivo dell'alimento trattato.

Sarebbe quindi di grande rilevanza sociale, scientifica ed economica, un approccio innovativo, definitivo ed economicamente sostenibile per la prevenzione e il controllo delle aflatossicosi.

Risultati ottenuti in studi precedenti hanno mostrato come Ab specifici per AFB₁ siano in grado di ridurre gli effetti epatotossici acuti di AFB₁ *in vivo* (390, 392, 394, 397). Esperimenti *in vitro* eseguiti con sieri di animali immunizzati hanno evidenziato, inoltre, come Ab specifici per AFB₁ siano in grado di neutralizzare l'azione mutagena nei confronti di *Salmonella typhimurium* (412) e di abolire l'induzione della lisogenia in ceppi di *E. coli* K12 (388) da parte di AFB₁. Complessivamente, questi risultati suggeriscono che la realizzazione di un vaccino in grado di indurre Ab protettivi nei confronti di AF possa rappresentare una valida soluzione al problema della prevenzione e del controllo delle aflatossicosi.

Nonostante esistano evidenze sperimentali che l'immunizzazione di animali con coniugati proteici di AFB₁ possa indurre la produzione di specifiche Ig sieriche e secretorie in conigli (388, 390-392, 394, 398, 404) e polli (404), l'uso di un composto carcinogeno coniugato come immunogeno sarebbe difficilmente praticabile per la prevenzione di aflatossicosi nell'uomo e susciterebbe perplessità anche per finalità di vaccinazione in alcune specie animali destinate, ad esempio, alla produzione di carni a fini alimentari.

Una possibilità di surrogare composti tossici a scopo vaccinale è rappresentata dall'utilizzo di peptidi mimetici e Ab antiidiotipici in grado di mimare la struttura dell'Ag originario (413-416). Tali surrogati proteici, od i geni per essi codificanti, potrebbero essere utilizzati per la produzione di vaccini, ricombianti o a DNA (417), finalizzati all'induzione di una risposta umorale, sistemica o secretoria, protettiva nei confronti di aflatossicosi primarie e secondarie.

Nel caso di alcune tossine batteriche (difterica, tetanica), un ulteriore approccio per la produzione di immunogeni è rappresentato dalla produzione di tossoidi (o anatoxine), molecole le cui proprietà tossiche siano state ridotte o sopresse con trattamenti chimici o termici, mantenendone le caratteristiche antigeniche (418).

Un'alternativa possibile per la produzione di immunogeni in grado di indurre una risposta anticorpale protettiva nei confronti di aflatossicosi, primarie e secondarie, può consistere, pertanto, nella modificazione chimica di AFB₁, allo scopo di produrre molecole modificate, caratterizzate dalla stessa antigenicità, ma scevre di tossicità della molecola originale (Anaflatossina B₁) (AnAFB₁), da coniugare a carriers proteici per conferire immunogenicità.

Per quanto la presenza di AF venga riscontrata in diversi alimenti di origine vegetale (mais, mandorle, noccioline e pistacchi, caffè, frutta, ecc.) (168), l'introduzione di AF nella catena alimentare umana è in gran parte riferibile al loro trasferimento in prodotti di origine animale, in particolare latte e prodotti lattiero-caseari, causata da ingestione di mangimi contaminati (306, 378). Quando le lattifere ingeriscono mangimi contaminati da AFB₁, infatti, una parte di micotossina viene metabolizzata in AFM₁ ed escreta nel latte (313). AFM₁, ha mostrato, sperimentalmente, di possedere proprietà epatotossiche, mutagene e cancerogene che, sebbene inferiori ad AFB₁, non possono essere considerate trascurabili (419). Inoltre il latte è una importante fonte di nutrimento per i bambini che, come i piccoli di tutte le specie animali, sono maggiormente sensibili degli adulti agli effetti tossici di AF.

Scopo del presente progetto di ricerca è lo sviluppo di un vaccino, sicuro ed efficace, basato sulla produzione di costrutti mimetici, ricombinanti e genici, o di un derivato chimico di AFB₁, coniugato a proteine carrier, da valutare comparativamente, in modelli animali preliminari, topi e ratti, mediante diverse modalità di immunizzazione, parenterale e delle mucose, per l'induzione di Ab specifici per AFB₁ in grado di prevenirne, in vacche, il trasferimento, sottoforma di AFM₁, nel latte.

2.
MATERIALI E METODI

2.1 TERRENI, SOLUZIONI E TAMPONI

Nello studio sono stati utilizzati i seguenti terreni di coltura:

Terreno 2× YT: a 900 ml di H₂O sono stati aggiunti 17 g di triptone, 10 g di estratto di lievito, 5 g di NaCl.

Terreno YT-AG: 2× YT addizionato di ampicillina (100 g/ml) e glucosio al 2%, il glucosio a concentrazioni diverse è indicato (0.1, 1%).

Terreno 2× YT-A: 2× YT addizionato di ampicillina (100 µg/ml).

Terreno 2× YT-AK: 2× YT addizionato di ampicillina (100 µg/ml) e kanamicina (50 µg/ml).

Terreno YT agar: 2× YT addizionato di agar.

Terreno H agar: a 900 ml di H₂O sono stati aggiunti 10 g triptone, 5 g NaCl, 15 g agar; dopo aver sciolto e portato il volume ad un litro, il terreno è stato autoclavato.

Terreno H agar molle: a 900 ml di H₂O sono stati aggiunti 10 g triptone, 5 g NaCl, 6,5 g agar; dopo aver sciolto e portato il volume ad un litro, il terreno è stato autoclavato.

Terreno minimo agarizzato: 15 g agar, 930 ml H₂O distillata; il terreno è stato autoclavato a 121°C per 20 minuti; dopo aver raffreddato a 50°C, sono stati aggiunti sterilmente: 20 ml di soluzione di Vogel Bonner e 50 ml di glucosio al 40% ed il terreno è stato distribuito in capsule di Petri (15 ml/per piastra).

Terreno top agar: 6 g agar, 5 g NaCl; 1000 ml H₂O distillata; il terreno è stato autoclavato a 121°C per 20 minuti.

Terreno brodo nutritivo: 15 g Nutrient Broth N°2 (Fluka), 1000 ml H₂O distillata; il terreno è stato autoclavato a 121°C per 20 minuti.

Terreno nutritivo agarizzato: 15 g agar, 15 g Nutrient Broth N°2 (Fluka), 1000 ml H₂O distillata; il terreno è stato autoclavato a 121°C per 20 minuti e distribuito in capsule di Petri (25 ml/per piastra).

Terreno DMEM completo: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) contenente 10% di siero fetale bovino (FBS), 1% penicillina-streptomicina, 1 mM piruvato di sodio.

Nello studio sono state utilizzate le seguenti soluzioni e soluzioni tampone:

Tampone fosfato (PBS) pH 7,2: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na_2HPO_4 , 0,24 g KH_2PO_4 , H_2O ; dopo soluzione, portato a pH 7,2 con NaOH e ad un volume di 1 litro, il tampone è stato autoclavato.

PEG/NaCl: in un litro di H_2O sono stati sciolti 200 g di glicole polietilenico 6000 (Sigma Aldrich) e 146,1 g di NaCl; il tampone è stato successivamente autoclavato.

Tampone carbonato pH 9,6: a 900 ml di H_2O sono stati aggiunti 1,59 g Na_2CO_3 , 2,93 g NaHCO_3 , il tampone è stato portato a pH 9,6 ed a volume di un litro con H_2O .

Tampone di saturazione (TS): PBS 1× pH 7,4; gelatina porcina 0,1%; (Sigma Aldrich).

Tampone di lavaggio (TL): PBS contenente Tween 20 (0,05%).

Tampone di lisi A: 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,3 M NaCl, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM benzamidina, 1mM leupeptina, 1mM pepstatina in H_2O .

Tampone di lisi B: 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 M NaCl, 2 M Urea, 0,2% Triton™ X-100 pH 8, in H_2O .

Tampone di lisi C: 20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 8M Urea, 10mM β -Mercaptoetanol, in H_2O .

Soluzione di Vogel Bonner: 10 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 100 g acido citrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$), 500 g K_2HPO_4 , 175 g sodio ammonio idrogeno fosfato ($\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$); dopo aver sciolto e portato il volume ad un litro, il terreno è stato autoclavato a 121°C per 20 minuti.

Glucosio 40%: Soluzione al 40% di destrosio in H_2O distillata; la soluzione è stata

filtrata con filtri da 0,45 µm.

Soluzione salina: 0,4 M cloruro di magnesio (MgCl_2), 1,65 M cloruro di potassio (KCl); la soluzione è stata autoclavata a 121°C per 20 minuti.

S9 mix: 3,35 ml H_2O distillata sterile, 5 ml PBS 1X pH 7,4, 0,2 ml soluzione salina, 0,4 ml NADP 50 µl D-glucosio-6-fosfato, 1 ml S9 (Trinova Biochem).

2.2 CEPPI BATTERICI

Per la produzione dei fagi ricombinanti, dei vaccini genici e delle proteine ricombinanti sono stati utilizzati diversi ceppi di *Escherichia coli*:

***E. coli* TG1** (Amersham Pharmacia): K12Δ(lac-pro), supE, thi, hsdD5/F', traD36, proAB, lacI^q, lacZM15; ceppo contenente un tRNA soppressore che consente la produzione di progenie fagica, in presenza di fago M13KO7 come helper.

***E. coli* X11 blue** (Stratagene): recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]; ceppo supercompetente che permette lo screening colorimetrico blu-bianco per la selezione delle colonie contenenti i plasmidi ricombinanti.

***E. coli* Bl21 Star DE3** (Stratagene): F⁻ ompT, gal, dcm, lon, hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻), λ(DE3 [lacI^q, lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]); ceppo competente con ridotta degradazione delle proteine eterologhe espresse nel ceppo a causa dell'assenza della proteasi Lon e la proteasi della membrana esterna OmpT.

Per i saggi di mutazione genica *in vitro* sono stato utilizzati due ceppi di *Salmonella typhimurium* gentilmente forniti dalla Dottoressa Francesca Cassoni dell'Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente (ARPA) dell' Emilia Romagna.

***S. typhimurium* TA98**: *hisD*, *uvrB*, *rfa*, *bio*, pKM101(amp^r); ceppo che reca una mutazione di tipo frameshift in uno dei geni necessari per la sintesi di istidina, permettendo la rilevazione di mutazioni per inserzione o delezione di basi.

***S. typhimurium* TA100**: *hisG*, *uvrB*, *rfa*, *bio*, pKM101(amp^r); ceppo che reca una mutazione di tipo missenso in uno dei geni necessari per la sintesi di istidina, permettendo la rilevazione di mutazioni per sostituzione di basi.

2.3 IMMUNIZZAZIONI SPERIMENTALI

Per la valutazione della potenzialità immunogena del coniugato di controllo sono state effettuate le seguenti modalità di immunizzazione:

2.3.1 Immunizzazione di topi con AFB₁ coniugata a BSA

Gruppi di 6 topi Balb/C (Harlan Nossan Laboratories) di 8 settimane sono stati immunizzati mediante ripetuti inoculi di AFB₁ coniugata a BSA (AFB₁-BSA) (Sigma Aldrich), comparativamente ad un gruppo omogeneo di animali immunizzati con BSA (Sigma Aldrich) utilizzato come controllo. Per ognuno degli animali immunizzati con AFB₁-BSA o BSA sono state iniettate, per via intraperitoneale (*i.p.*), quattro dosi (giorno 0, 14, 28 e 42) costituite ognuna da 50 µg di immunogeno addizionati di adiuvante di Freund completo (primo inoculo) o incompleto (3 inoculi successivi), in un volume finale di 100 µl in PBS pH 7,4. A vari tempi, prima, durante e dopo il periodo di immunizzazione, sono stati eseguiti prelievi di sangue per via retro-orbitale al fine di verificare la presenza nei differenti sieri di Ab specifici per AFB₁.

2.3.2 Immunizzazione di ratti con AFB₁ coniugata a BSA

Gruppi di 7 ratti (Morini) di 8 settimane sono stati immunizzati mediante ripetuti inoculi di AFB₁-BSA, comparativamente ad un gruppo omogeneo di animali immunizzati con BSA utilizzato come controllo.

Immunizzazione sistemica

Per ognuno degli animali immunizzati sono state iniettate *i.m.* quattro dosi (giorno 0, 14, 28 e 42) costituite ognuna da 100 µg di immunogeno addizionati di adiuvante di Freund completo (primo inoculo) o incompleto (3 inoculi successivi), in un

volume finale di 200 µl in PBS pH 7,4. A vari tempi, prima, durante e dopo il periodo di immunizzazione, sono stati eseguiti prelievi di sangue dalla vena caudale al fine di verificare la presenza nei differenti sieri di Ab specifici per AFB₁.

Immunizzazione vaginale

Per ognuno degli animali immunizzati sono state inoculate, per via vaginale (*i.v.g.*), quattro dosi (giorno 0, 14, 28 e 42) costituite ognuna da 50 µg di immunogeno addizionati di 5 µg di tossina colerica (CT), un potente adiuvante mucosale (399), in un volume finale di 100 µl in PBS pH 7.4. A vari tempi, prima, durante e dopo il periodo di immunizzazione, sono stati eseguiti prelievi di sangue, feci e muco vaginale al fine di verificare la presenza nei differenti sieri di Ab specifici per AFB₁.

2.3.3 Immunizzazione di bovini con AFB₁ coniugata a BSA

Due vacche da latte, stabulate presso il Centro Ricerche Zootecniche (CeRZoo) dell'Università Cattolica del S. Cuore di Piacenza, sono state immunizzate mediante ripetuti inoculi di AFB₁-BSA, comparativamente ad una coppia di animali immunizzati con BSA.

Immunizzazione sistemica

Per ognuno degli animali immunizzati sono state iniettate, per via intradermica (*i.d.*), tre dosi (giorno 0, 21 e 42) costituite da 500 µg di immunogeno addizionati di adiuvante di Freund completo (primo inoculo) o da 250 µg di immunogeno addizionati di adiuvante di Freund incompleto (2 inoculi successivi), in un volume finale di 1 ml in PBS pH 7.4. A vari tempi, prima, durante e dopo il periodo di immunizzazione, sono stati eseguiti prelievi di sangue dalla vena giugulare al fine di verificare la presenza nei differenti sieri di Ab specifici per AFB₁.

Immunizzazione intranasale

Per ognuno degli animali immunizzati sono state inoculate, per via nasale (*i.n.*), quattro dosi (giorno 0, 14, 28 e 42) costituite da 500 µg di immunogeno (primo inoculo) o da 250 µg di immunogeno (3 inoculi successivi), addizionati di 100 µg di CT, in un volume finale di 1 ml in PBS pH 7,4. A vari tempi, prima, durante e dopo il periodo di immunizzazione, sono stati eseguiti prelievi di sangue e muco nasale al fine di verificare la presenza nei differenti sieri di Ab specifici per AFB₁.

2.4 INDAGINI SIEROLOGICHE IN ANIMALI IMMUNIZZATI CON AFB₁-BSA

Sui campioni biologici prelevati dagli animali immunizzati con AFB₁-BSA sono state effettuate le seguenti indagini sierologiche:

2.4.1 Saggi immunoenzimatici diretti per la valutazione di Ab specifici nei confronti di AFB₁

I pozzetti di piastre microtiter sono stati adsorbiti con 50 µl di campioni biologici opportunamente diluiti (1:50 sieri; 1:10 feci, muco nasale e muco vaginale) in tampone carbonato pH 9,6, incubando una notte a 4°C in camera umida. Dopo 3 lavaggi con TL, saturazione con 100 µl di TS per 90' ed ulteriori 3 lavaggi, ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 50 µl di una soluzione di AFB₁ coniugata a perossidasi (AFB₁-HRP) (Abraxis) diluita 1:2 in PBS pH 7,4. Dopo 60' a 37°C in camera umida, AFB₁-HRP legata è stata rilevata aggiungendo 50 µl di una soluzione di cromogeno (TMB) (Sigma Aldrich) e substrato (0,02% H₂O₂). La reazione è stata bloccata dopo 30', aggiungendo 25 µl di H₂SO₄ 1 N e l'assorbanza è stata letta a 650 e 450 nm in un lettore per micropiastre (Multiskan Ascent, Labsystems).

2.4.2 Saggi immunoenzimatici per la valutazione di Ab specifici nei confronti di BSA

I pozzetti di piastre microtiter sono stati adsorbiti con 100 µl di una soluzione contenente 0,5 µg di BSA in tampone carbonato pH 9,6, incubando una notte a 4°C. Dopo la saturazione con 200 µl di TS a 37°C per 90' sono stati aggiunti 100 µl di campione biologico, opportunamente diluito in PBS (1:400 sieri, 1:10 feci e fluidi

vaginali). Gli Ab legati sono stati rilevati con Ab polivalenti coniugati a perossidasi, specifici per le Ig della specie considerata, e una soluzione di cromogeno e substrato, come precedentemente descritto. La reazione è stata bloccata dopo 5' con H₂SO₄ 1 N (50 µl per pozzetto) leggendo successivamente l'assorbanza a 650 e 450 nm.

2.4.3 Determinazione dell'isotipo di Ab di topo specifici per AFB₁

I pozzetti di piastre microtiter sono stati adsorbiti con 50 µl di una soluzione di tampone carbonato pH 9.6 contenente 5 µg/ml di ciascuno degli Ab monoclonali di ratto diretti contro le catene γ1, γ2a, γ2b, γ3, µ ed α di topo (AbD Serotec), incubando al buio per una notte a temperatura ambiente. In seguito a saturazione con 100 µl di TS a 37°C per 90' e lavaggio con TL, sono stati aggiunti 50 µl di siero di topo prelevato dopo il periodo di immunizzazione (giorno 50) diluito 50 volte in PBS. Dopo 90' di incubazione a 37°C, le piastre sono state nuovamente lavate ed ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 50 µl di una soluzione di AF-HRP diluita 1:2 in PBS pH 7.4. Il legame degli Ab specifici è stato rilevato dopo 60' a 37°C, aggiungendo in ciascun pozzetto di 50 µl di substrato cromogenico, come precedentemente descritto, ed incubando la piastra a temperatura ambiente al buio per 20'. La reazione è stata bloccata con H₂SO₄ 1 N (25 µl per pozzetto) leggendo successivamente l'assorbanza a 650 e 450 nm.

2.5 IMMUNOMONITORAGGIO

Il monitoraggio sierologico degli animali immunizzati è stato condotto mediante le seguenti modalità:

2.5.1 Monitoraggio sierologico di topi immunizzati con AFB₁-BSA ed esposti ad AFB₁

Dopo 11 mesi dall'inizio del protocollo di immunizzazione, a ciascun topo immunizzato per via parenterale con AFB₁-BSA sono stati somministrati per via intragastrica (*i.g.*) 0,2 µg di AFB₁ per 5 giorni. I sieri ottenuti da campioni di sangue prelevati prima (giorno 0) e dopo (giorno 50) l'immunizzazione, prima dell'esposizione ad AFB₁ (giorno 320) e dopo il 10° giorno dall'inizio del trattamento (giorno 330), opportunamente diluiti, sono stati saggiati mediante saggio immunoenzimatico diretto.

2.5.2 Monitoraggio sierologico di ratti immunizzati per via sistemica con AFB₁-BSA ed esposti ad AFB₁

Dopo 5 mesi dall'inizio del protocollo di immunizzazione, a ciascun ratto immunizzato per via parenterale con AFB₁-BSA sono stati somministrati, per via intragastrica (*i.g.*), 100 µl di una soluzione contenente 1 µg di AFB₁. I sieri ottenuti da campioni di sangue prelevati prima (giorno 0) e dopo (giorno 50) l'immunizzazione, prima dell'esposizione ad AFB₁ (giorno 150) e dopo 14 giorni dal trattamento (giorno 164), opportunamente diluiti, sono stati saggiati mediante saggio immunoenzimatico diretto.

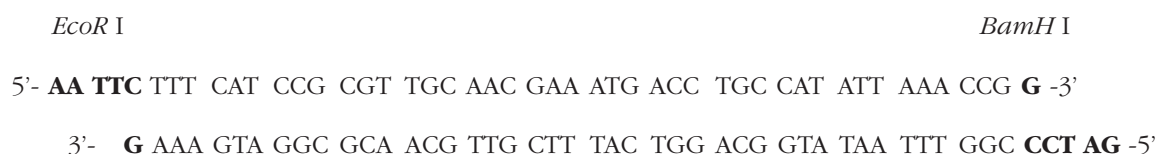
2.6 PRODUZIONE DI COSTRUTTI PEPTIDICI FAGICI MIMOTOPI DI AFB₁

I peptidi fagici mimotopi di AFB₁ sono stati costruiti secondo le seguenti modalità:

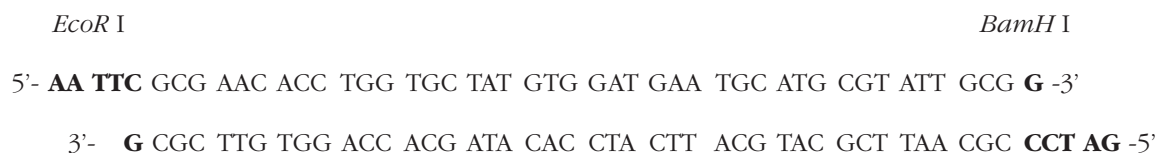
2.6.1 Clonaggio di oligonucleotidi in pC89

Sono stati prodotti immunogeni ricombinanti fagici, basati sul vettore fagemidico pC89 (420), esprimenti in multicopia sul capsido due diverse sequenze di 14 amminoacidi, denominate C1 (FHPRCNEMTCHIKP) e C2 (ANTWCYVDECMRIA), riconosciute come mimotopi peptidici di AFB₁ (421). In particolare, sulla base delle sequenze nucleotidiche di C1 e C2, sono state disegnate due coppie di oligonucleotidi fosforilati introducendo ai lati della sequenza codificante di ciascun peptide il sito di restrizione *EcoR* I al 5' e il sito di restrizione *BamH* I al 3'.

Oligonucleotidi C1 per pC89:



Oligonucleotidi C2 per pC89:



La linearizzazione del vettore fagemidico pC89 (gentilmente fornito dal Professor Franco Felici del Dipartimento di Scienze Microbiologiche, Genetiche e Molecolari

della facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali dell'Università di Messina), attraverso restrizione con *EcoRI* e *BamHI*, ha permesso l'inserimento delle sequenze oligonucleotidiche precedentemente digerite con gli stessi enzimi. La circolarizzazione del costrutto ricombinante è stata ottenuta tramite reazione di ligasi. In tal modo, le sequenze codificanti per C1 e C2 sono state inserite in fase nella regione ammino-terminale della proteina capsidica pVIII del vettore fagemidico pC89, sotto il controllo del promotore Lac. Nel vettore sono presenti, inoltre, le origini di replicazione di *E. coli* (colE1ori) e di f1 (f1 ori) ed i geni per la resistenza all'ampicillina. La miscela di ligazione in cui è avvenuta la circolarizzazione dei costrutti chimerici ottenuti, denominati pC89-C1 e pC89-C2, è stata dializzata contro acqua, per 30' a temperatura ambiente, con membrane da dialisi (Millipore), al fine di eliminare i sali presenti nella soluzione di reazione, preparando il DNA per la trasformazione di cellule rese chimicamente competenti (422) del ceppo di *E. coli* TG1 successivamente selezionate con ampicillina.

2.6.2 Produzione dei fagi ricombinanti

Singole colonie di *E. coli* TG1 trasformate con i fagi ricombinanti sono state trasferite con stuzzicadenti sterili in pozzetti separati di piastre microtiter in polipropilene a 96 pozzetti, contenenti ciascuno 150 μ l di YT-AG 2 \times (1% di glucosio). Dopo 3 ore a 37°C in agitazione (180 rpm), a ciascun pozzetto sono stati aggiunti 25 μ l di YT-AG 2 \times (1% di glucosio) contenente 10^9 u.f.p. di fago helper M13KO7. Dopo incubazione a 37°C per 30', la piastra è stata centrifugata a 1500 \times g per 10', il sopranatante è stato eliminato e sostituito con 200 μ l di YT-AK 2 \times ; dopo ulteriore incubazione a 30°C in agitazione (180 rpm) e successiva centrifugazione, i sopranatanti contenenti i fagi ricombinanti sono stati trasferiti nei pozzetti di una piastra per micro titolazione al fine di verificarne la reattività nei confronti Ab monoclonali specifici per AFB₁, mediante saggio immunoenzimatico.

2.6.3 Saggio immunoenzimatico dei fagi ricombinanti

Ai pozzetti di piastre microtiter, precedentemente adsorbiti con Ab monoclonali specifici per AFB₁ (Biodesign o USBiological) (10 µg/ml, in 100 µl tampone carbonato, pH 9,6, per una notte a 4°C) e saturati con 200 µl di TS, sono stati aggiunti 80 µl dei vari sopranatanti e 20 µl di TS 10%. Come controllo negativo è stato utilizzato il fago pC89 nella sua forma nativa (senza inserto peptidico). Dopo 2 ore e 3 lavaggi con PBS, sono stati aggiunti 100 µl di una soluzione di Ab di cavallo anti-fago M13 coniugati a perossidasi (Amersham Pharmacia Biotech), diluiti 1:5000 in TS. Dopo 1 ora a 37°C e successivi lavaggi, l'eventuale positività della reazione è stata rilevata aggiungendo 100 µl di una soluzione di cromogeno (TMB, Sigma Aldrich) e substrato (H₂O₂). La reazione è stata bloccata dopo 15' aggiungendo 50 µl di H₂SO₄ 1 M e l'assorbanza è stata letta a 650 e 450 nm.

2.6.4 Produzione di cloni fagici per immunizzazione

Per la produzione di fagi dai cloni ricombinanti espressi in pC89 (pC89-C1 e pC89-C2), per ciascuno dei cloni positivi selezionati sono state allestite colture da singola colonia in 10 ml di YT 2×, successivamente incubate per una notte a 30°C in agitazione (180 rpm). A ciascuna sospensione batterica è stato aggiunto YT-AG 2× (1% di glucosio) sino al raggiungimento di una densità ottica (D.O.), misurata a 600 nm, pari a 0,05-0,1. 50 ml di ciascuna coltura sono stati incubati a 37°C in agitazione (180 rpm) fino a raggiungere una D.O. di 0,4/0,5, infettando quindi 10 ml con il fago helper M13KO7 in rapporto 20:1 (fagi:batteri), per 30' a 37°C in bagnetto termostato. Le cellule batteriche infettate sono state centrifugate a 3300×g per 10' ed il pellet è stato risospeso in 500 ml di YT-AK 2×. Dopo incubazione per una notte a 30°C in agitazione (180 rpm), la coltura è stata centrifugata a 10800×g per 10' ed il soprannatante è stato prelevato ed addizionato con 125 ml di PEG/NaCl, per favorire la precipitazione fagica, lasciando per 30' in ghiaccio. Dopo centrifugazione a 10000×g per

30', il pellet è stato risospeso in 50 ml di PBS sterile, addizionato di 10 ml di PEG/NaCl e centrifugato ulteriormente a 10000×g per 30'. Il pellet è stato risospeso in 12 ml di PBS addizionato di 3 ml di PEG/NaCl. Dopo centrifugazione, il pellet, ben asciugato, è stato risospeso in 2 ml di PBS. La sospensione fagica è stata immediatamente centrifugata a 12000×g per 5', al fine di eliminare eventuali detriti cellulari, ed il sopranatante, filtrato con filtri per siringa da 0,45 µm (Millex Millipore) a basso assorbimento proteico, è stato trasferito in una nuova provetta da 1,7 ml e conservato a 4°C fino al momento dell'immunizzazione. Le sospensioni fagiche così ottenute sono state successivamente titolate.

2.6.5 Titolazione fagica

Una sospensione di *E. coli* TG1 in YT 2× è stata lasciata crescere fino a D.O. pari a 0,8, mentre le singole sospensioni fagiche da titolare sono state diluite a 10⁻⁸, 10⁻⁹, 10⁻¹⁰, 10⁻¹¹. In provette di vetro con tappo a vite, mantenute alla temperatura di 45°C in termoblocco, sono stati distribuiti 3 ml di H-agar molle sciolto, 300 µl di TG1 e 100 µl di ciascuna diluizione fagica. Dopo agitazione vigorosa con vortex, il contenuto è stato rapidamente versato in piastre di H-agar precedentemente scaldate in termostato a 37°C. Dopo aver lasciato solidificare l'agar, le piastre sono state incubate a 30°C per una notte, provvedendo quindi alla titolazione mediante conta delle placche.

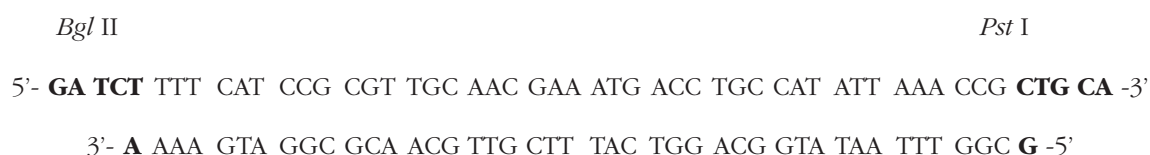
2.7 PRODUZIONE DI IMMUNOGENI GENICI ESPRIMENTI PEPTIDI MIMETICI DI AF

La produzione di immunogeni genici esprimenti peptidi mimetici di AF è stata eseguita secondo le seguenti modalità

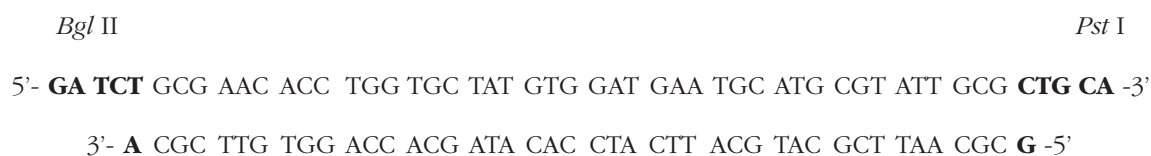
2.7.1 Clonaggio di oligonucleotidi in pDisplay

Sono stati prodotti costrutti genici esprimenti come peptidi transmembrana due diverse sequenze di 14 amminoacidi, denominate C1 (FHPRCNEMTCHIKP) e C2 (ANTWCYVDECMRIA), riconosciute come mimotopi peptidici di AFB₁ (421), inserendo le sequenze nucleotidiche codificanti per C1 e C2 nel vettore pDisplay (Invitrogen, Carlsbad, USA). A questo scopo, sono state disegnate 2 coppie di oligonucleotidi fosforilati, esprimenti rispettivamente C1 e C2, tali che la sequenza codificante per il peptide fosse fiancheggiata dalla sequenze *Bgl* II al 5' e *Pst* I al 3'.

Oligonucleotidi C1 per pDisplay:



Oligonucleotidi C2 per pDisplay:



Dopo l'appaiamento, ciascuno dei due oligonucleotidi a doppio filamento è stato legato al vettore pDisplay precedentemente digerito con *Bgl* II e *Pst* I, inserendo

così le sequenze codificanti per C1 e C2 sotto il controllo del promotore di CMV, in fase con il segnale di secrezione delle catene κ di immunoglobuline (a monte) e con la sequenza segnale di traslocazione in membrana del recettore del fattore di crescita piastrinico (a valle). In questo modo, in cellule eucariotiche superiori, i peptidi ricombinanti risultano espressi come proteina transmembrana. Nel vettore sono inoltre presenti le origini di replicazione di *E. coli* (colE1ori) e di f1 (f1 ori), il promotore T7, inducibile da lattosio o analoghi come l'isopropyl- β -D-tiogalattopiranoside (IPTG), il segnale di poliadenilazione dell'ormone della crescita bovino (efficiente terminatore della trascrizione) ed i geni per la resistenza all'ampicillina, alla kanamicina ed alla neomicina. Come descritto precedentemente, la miscela di ligazione attraverso la quale è avvenuta la circolarizzazione dei costrutti chimerici ottenuti (pDisplay-C1 e pDisplay-C2), dializzata contro acqua, è stata utilizzata per trasformare cellule rese chimicamente competenti (422) del ceppo di *E. coli* TG1, successivamente selezionate con ampicillina. I plasmidi ricombinanti estratti da singole colonie sono stati valutati in relazione alle loro caratteristiche molecolari.

2.7.2 Verifica molecolare della presenza dell'inserito in pDisplay-C1 e pDisplay-C2

I plasmidi ricombinanti, estratti da singole colonie isolate di cloni trasformanti, sono stati valutati in relazione alle loro caratteristiche molecolari mediante restrizione enzimatica con *Pst* I. Successivamente, i DNA digeriti sono stati separati su gel di agaroso all'1% ed i vari profili elettroforetici sono stati analizzati, dopo colorazione con bromuro di etidio, in comparazione a marcatori di peso molecolare noto (FastRuler DNA Ladder, Fermentas) e ad un controllo negativo costituito dal vettore senza inserito. I cloni risultati positivi sono stati utilizzati per la produzione dei costrutti genici per l'immunizzazione.

2.7.3 Preparazione e purificazione di plasmidi per immunizzazione

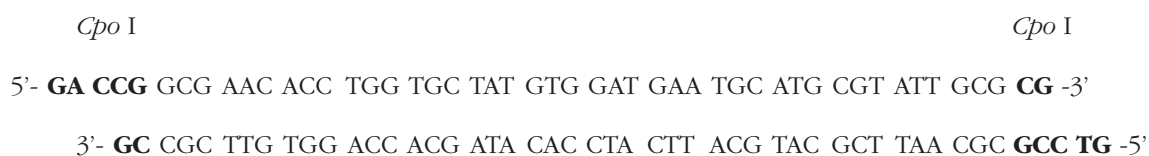
I plasmidi per le immunizzazioni sono stati prodotti inoculando una singola colonia di *E. coli* TG1, trasformato come precedentemente descritto, in 10 ml di YT-AG 2× (0,1% di glucosio). Dopo incubazione di una notte a 37°C in agitazione (180 rpm), 4 ml di questa sospensione sono stati inoculati in 400 ml YT-AG 2× (0,1% di glucosio) con ulteriore incubazione di una notte a 37°C in agitazione (180 rpm). Le cellule sono state, successivamente, centrifugate a 10800×g per 15' e i plasmidi sono stati purificati dal sedimento cellulare utilizzando EndoFree Plasmid Maxi kit (Quiagen). La concentrazione e la purezza della preparazione è stata valutata mediante lettura spettrofotometrica a A_{280} e osservazione del rapporto A_{280}/A_{260} (417) (Spettrofotometro DU 65, Beckman).

2.8 PRODUZIONE DI PROTEINE RICOMBINANTI ESPRIMENTI UN PEPTIDE MIMETICO DI AF

2.8.1 Clonaggio di oligonucleotidi in pT7Kan-Trx

Allo scopo di ottenere costrutti totalmente ricombinanti, in collaborazione con il Prof. Simone Ottonello del Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare dell'Università di Parma, è stato realizzato un costrutto peptidico esprime una sequenza di 14 amminoacidi, denominata C2 (ANTWCYVDECMRIA), riconosciuta come mimotopo peptidico di AFB₁ (421), veicolato da tioredossina. Tale costrutto chimerico è stato costruito utilizzando il plasmide pT7Kan-Trx, una versione di pET28 (Novagen) modificato in modo da contenere la sequenza codificante per la tioredossina batterica e la resistenza alla kanamicina (423). Sulla base della sequenza codificante per C2, è stata disegnata una coppia di oligonucleotidi fosforilati introducendo al 5' e al 3' il sito di restrizione *Cpo* I.

Oligonucleotidi C2 per pT7Kan-Trx:



Dopo l'appaiamento, gli oligonucleotidi a doppio filamento sono stati ligati a livello dell'unico sito di restrizione *Cpo* I presente all'interno della sequenza codificante per la tioredossina. Il costrutto risultante, denominato pT7Kan-Trx/C2, codifica per un polipeptide (Trx/C2: Trx(1-33)gPMANTWCYVDECMRIAGGpTrx(36-109)) in cui C2 (sottolineato) è inserito all'interno dello scheletro della tioredossina. È stato inoltre possibile produrre costrutti chimerici Trx/C2(n) recanti fino a 15 copie di C2 (aptameri) disposte in tandem.

2.8.2 Clonaggio di oligonucleotidi in pT7Kan-NcCVNH0

La sequenza codificante per NcCVNH0 (*Neurospora crassa* Cyanovirin-N Homologous type-0) è stata clonata nel plasmide pET28 (Novagen) con un procedimento analogo a quello precedentemente descritto per Trx. Mentre nel gene codificante per Trx era già presente il sito di restrizione adatto per il clonaggio (*Cpo I*), nel gene NcCVNH0 questo è stato creato *ex-novo* mediante mutagenesi sito-specifica basata sulla reazione di PCR (424). Sono state, quindi, disegnate delle coppie di oligonucleotidi complementari con estremità protrudenti compatibili con il clonaggio nel sito di restrizione *Cpo I* e capaci di originare, in seguito ad appaiamento, il corrispondente frammento genico codificante per il peptide mimotopo C2.

Cpo I

Cpo I

5'- GA CCG GCG AAC ACC TGG TGC TAT GTG GAT GAA TGC ATG CGT ATT GCG CG -3'

3'- GC CGC TTG TGG ACC ACG ATA CAC CTA CTT ACG TAC GCT TAA CGC GCC TG -5'

Il costrutto chimerico risultante in seguito al clonaggio, denominato pT7Kan-NcCVNH0/C2, codifica per un polipeptide in cui la sequenza codificante per C2 è inserita all'interno della sequenza di NcCVNH0 in posizione 96-99, corrispondente ai residui aminoacidici 32-33. È stato possibile ottenere costrutti chimerici recanti un diverso numero di copie del peptide mimotopo (aptameri) disposte in tandem.

2.8.3 Produzione di immunogeni ricombinanti costituiti da mimotopi di AF coniugati a Trx o NcCVNH0

Cellule batteriche di *E. coli* Xl1 blue ed *E. coli* Bl21 Codon Plus (DE3) sono state trasformate, mediante elettroporazione, con i plasmidi pT7Kan-Trx/C2_(n) e pT7Kan-NcCVNH0/C2_(n) contenenti la sequenza codificante per Trx o NcCVNH0 e gli inserti corrispondenti ad (n) ripetizioni in tandem del mimotopo di AFB₁ C2 sotto il con-

trollo del promotore T7, inducibile da lattosio o analoghi, come IPTG. Nonostante i livelli di espressione per tutte le proteine siano stati soddisfacenti, dalle prime prove di induzione è emerso che solo alcune delle proteine ricombinanti erano solubili. Si è osservato, infatti, che, mentre i monomeri mostravano un buon livello di solubilità, le proteine con più copie del mimotopo si presentavano in forma insolubile, nei corpi di inclusione. In relazione alla solubilità della proteina sono stati, quindi, utilizzati due differenti protocolli di purificazione.

2.8.3.1 Proteine solubili

I cloni batterici contenenti i costrutti sono stati indotti a produrre i polipeptidi ricombinanti aggiungendo IPTG 1mM ad un brodo di coltura precedentemente inoculato con le cellule trasformate ed incubato 24h a 37°C. Dopo 4 ore dall'induzione, le cellule batteriche sono state recuperate mediante centrifugazione e quindi sonicate con macropunta in buffer di lisi A per 20' totali, colpi da 3", pause da 6" e 6 Watt di potenza. La soluzione lisata è stata quindi centrifugata, recuperando il supernatante e purificando le proteine ricombinanti mediante cromatografia di affinità. Il vettore pT7Kan-Trx/C2_(n) consente la produzione di proteine con una coda di istidine (6His-tag) sia all'estremità N-terminale che C-terminale, mentre il vettore pT7Kan-NcCVNH0/C2_(n) all'estremità N-terminale. Per la purificazione è stata utilizzata la Talon Metal Affinity Resin (Clontech), che sfrutta l'affinità delle istidine per lo ione Co²⁺ e consente di ottenere, in un unico passaggio cromatografico, un campione puro all'80%. Il campione è stato, quindi, concentrato tramite ultrafiltrazione e scambio del solvente, utilizzando come tampone di scambio PBS 1X pH 7,4. Le proteine sono state quantificate mediante saggio di Bradford (425), misurando l'aumento dell'assorbimento a 595 nm in seguito all'aggiunta del colorante Blue Coomassie e stimando la concentrazione proteica del campione di interesse dalla retta di taratura costruita con soluzioni a concentrazione nota di BSA.

2.8.3.2 Proteine rinaturate

Per purificare le proteine insolubili, contenute nei corpi di inclusione, si sono effettuate due sonicazioni successive, di cui la prima uguale a quella descritta nel paragrafo precedente. Dopo il passaggio di centrifugazione, è stato recuperato il pellet, contenente i corpi di inclusione, che è stato poi risospeso in un diverso buffer di lisi B e sottoposto ad un ulteriore passaggio di sonicazione, secondo le modalità precedentemente descritte. Dopo vari passaggi di centrifugazione, a scopo di lavaggio, il pellet è stato risospeso in tampone C contenente 8M Urea, in grado di solubilizzare le proteine denaturate. La rinaturazione è stata indotta in seguito ad ultrafiltrazione e scambio dal tampone 8M Urea ad un opportuno tampone di rinaturazione, selezionato in seguito a prove di screening di rinaturazione eseguite per ciascuna molecola. Le proteine sono state successivamente quantificate spettrofotometricamente con il metodo di Bradford (425).

2.8.4 Verifica delle proteine ricombinanti prodotte mediante SDS page

La composizione e purezza delle miscele proteiche prodotte è stata verificata facendo migrare aliquote contenenti 15 g di proteine purificate, diluite in un tampone riducente contenente sodio dodecil solfato (SDS), in minigel di poliacrilamide all'11% per 2 ore a 100 Volt in un Minigel Apparatus (BioRad Laboratories). Come controllo per la determinazione dei pesi molecolari sono stati fatti migrare, parallelamente, 5 µl di una miscela di proteine a basso peso molecolare noto (Broad Range Molecular weight standard, BioRad Laboratories), diluita 1:20 in un tampone riducente contenente SDS.

2.9 IMMUNIZZAZIONE SPERIMENTALE

L'immunizzazione sperimentale con i costrutti prodotti è stata eseguita secondo le seguenti modalità:

2.9.1 Immunizzazione di topi con costrutti peptidici fagici mimotopi di AF

Gruppi di 6 topi BALB/c (Harlan Nossan Laboratories) di 6 settimane sono stati immunizzati mediante ripetuti inoculi di particelle fagiche esprimenti inserti peptidici mimotopi di AFB₁ (C1 e C2) sulla pVIII di pC89, comparativamente ad un gruppo omogeneo di animali immunizzati con il vettore pC89, non esprimente alcun peptide esogeno, utilizzato come controllo (426). Per ognuno degli animali immunizzati sono state iniettate *i.p.* quattro dosi (giorno 0, 14, 28 e 42) costituite ognuna da 10¹² u.f.p. del clone fagico selezionato addizionate di adiuvante di Freund completo (primo inoculo) o incompleto (3 inoculi successivi), in un volume finale di 100 µl in PBS pH 7,4. A vari tempi, prima, durante e dopo il periodo di immunizzazione, sono stati eseguiti prelievi di sangue per via retro-orbitale al fine di verificare la presenza nei differenti sieri di Ab specifici per AFB₁.

2.9.2 Immunizzazione di topi con costrutti genici esprimenti peptidi mimetici di AF

Gruppi di 6 topi BALB/c (Harlan Nossan Laboratories) di 4 settimane sono stati immunizzati mediante ripetuti inoculi di potenziali vaccini a DNA costituiti dal plasmide pDisplay esprimente peptidi mimotopi di AFB₁ (C1 o C2) come proteina transmembrana, comparativamente ad un gruppo omogeneo di animali immunizzati con

il vettore pDisplay, non esprimente alcun peptide esogeno, utilizzato come controllo. Per ognuno degli animali immunizzati sono state iniettate, per via intramuscolare (*i.m.*), tre dosi (giorno 0, 21 e 42) costituite ognuna da 100 µg di DNA plasmidico pDisplay-C1 o pDisplay-C2, in un volume finale di 100 µl in soluzione fisiologica. A vari tempi, prima, durante e dopo il periodo di immunizzazione, sono stati eseguiti prelievi di sangue per via retro-orbitale al fine di verificare la presenza, nei differenti sieri, di Ab specifici per AFB₁.

2.9.3 Immunizzazione di topi con mimotopi di AF espressi in Trx o NcCVNH0

Topi Balb/C (Harlan Nossan Laboratories) (gruppi di 4 od 8 animali) di 8 settimane sono stati immunizzati mediante ripetuti inoculi di mimotopi di AFB₁ veicolati da Trx o NcCVNH0, comparativamente a gruppi omogenei di animali inoculati con Trx o NcCVNH0 non esprimenti alcun peptide esogeno, utilizzati come controllo. Per ognuno degli animali di ciascun gruppo, immunizzati con Trx-C2_(n) o NcCVNH0-C2_(n), solubili o rinaturate, sono state iniettate *i.p.* quattro dosi (giorno 0, 14, 28 e 42) costituite ognuna da 50 µg di immunogeno addizionati di adiuvante di Freund completo (primo inoculo) o incompleto (3 inoculi successivi), in un volume finale di 100 µl in PBS pH 7,4. A vari tempi, prima, durante e dopo il periodo di immunizzazione, sono stati eseguiti prelievi di sangue per via retro-orbitale al fine di verificare la presenza nei differenti sieri di Ab specifici per AFB₁.

2.10 INDAGINI SIEROLOGICHE IN ANIMALI IMMUNIZZATI CON COSTRUTTI MOLECOLARI ESPRIMENTI MIMOTOPI DI AFB₁

Sui campioni biologici prelevati dagli animali immunizzati con costrutti molecolari esprimenti mimotopi di AFB₁ sono state eseguite indagini sierologiche secondo le seguenti modalità:

2.10.1 Saggi immunoenzimatici diretti per la valutazione di Ab specifici nei confronti di AFB₁

I pozzetti di piastre microtiter sono stati adsorbiti con 50 µl di siero diluito 1:50 in tampone carbonato pH 9,6, incubando una notte a 4°C in camera umida. Dopo 3 lavaggi con TL, saturazione con 100 µl di TS per 90' ed ulteriori 3 lavaggi, ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 50 µl di una soluzione di AFB₁ coniugata a perossidasi (AFB₁-HRP, Abraxis) diluita 1:2 in PBS pH 7,4. Dopo 60' a 37°C in camera umida, AFB₁-HRP legata è stata rilevata aggiungendo 50 µl di una soluzione di cromogeno (TMB, Sigma Aldrich) e substrato (0,02% H₂O₂). La reazione è stata bloccata dopo 30', aggiungendo 25 µl di H₂SO₄ 1 N e l'assorbanza è stata letta a 650 e 450 nm.

2.10.2 Determinazione dell'isotipo immunoglobulinico di Ab specifici per AFB₁

I pozzetti di piastre microtiter sono stati adsorbiti con 50 µl di una soluzione di tampone carbonato pH 9,6 contenente 5 µg/ml di ciascuno degli Ab monoclonali di ratto diretti contro le catene γ_1 , γ_{2a} , γ_{2b} , γ_3 , μ ed α di topo (AbD Serotec), incubando al buio per una notte a temperatura ambiente. In seguito a saturazione con

100 μ l di TS a 37°C per 90' e lavaggio con TL, sono stati aggiunti 50 μ l di siero di topo prelevato dopo il periodo di immunizzazione (giorno 50) diluito 50 volte in PBS. Dopo 90' di incubazione a 37°C, le piastre sono state nuovamente lavate e, ad ogni pozzetto, sono stati aggiunti 50 μ l di una soluzione di AF-HRP diluita 1:2 in PBS pH 7,4. Il legame di Ab specifici è stato rilevato dopo 60' a 37°C, aggiungendo in ciascun pozzetto 50 μ l di substrato cromogenico, come precedentemente descritto, ed incubando la piastra a temperatura ambiente al buio per 20'. La reazione è stata bloccata con H₂SO₄ 1 N (25 μ l per pozzetto), leggendo successivamente l'assorbanza a 650 e 450 nm.

2.11 PRODUZIONE DI ANAFB₁

Per la produzione di AnAFB₁ sono state eseguite le seguenti metodologie:

2.11.1 Modificazione chimica di AFB₁

In collaborazione con il Prof. Sforza del Dipartimento di Chimica Organica ed Industriale dell'Università di Parma, AFB₁ è stata convertita in AFB₁-1-(O-carbossimetil) ossima (AnAFB₁) secondo il metodo di Chu et al. (383), introducendo in posizione-1 della molecola di AFB₁ un gruppo carbossilico libero. A 3 ml di una soluzione di AFB₁ (10 mg, 0.032 mmol) in metanolo/acqua/piridina (2: 0,5: 0,5) sono stati aggiunti 10 mg di carbossimetilidrossilamina HCl (0.046 mmol), ponendo la miscela in refluxo a 60°C per tre ore. La soluzione è stata, quindi, mantenuta una notte a temperatura ambiente e, successivamente, concentrata sotto vuoto. Un'aliquota della soluzione concentrata è stata posta su lastra di gel di silice per cromatografia su strato sottile (Thin Layer Chromatography, TLC) (cloroformio/metanolo 70:30), separando un prodotto fluorescente il cui $R_f = 0,24$ e le cui caratteristiche di fluorescenza (assorbimento massimo a 362 nm, coefficiente di estinzione molare 20,950) sono risultate in accordo con i dati pubblicati per AFB₁-1-(O-carbossimetil) ossima (389, 427). L'identità del prodotto è stata successivamente confermata attraverso analisi UPLC-MS (Aquity, Waters). La separazione UPLC è stata effettuata in colonne C-18 a fase inversa (UPLC BEH Aquity, Waters, 17 µm × 21 mm) con velocità di eluizione 300 µl/min e fase mobile costituita da 0,2% acido formico in H₂O (solvente A) e 0,2% acido formico in acetonitrile (solvente B).

2.11.2 Saggio dell'effetto di AFB₁ e AnAFB₁ su linee cellulari di carcinoma epatico

Cellule di epatoblastoma umano HepG2 (BS-TCL-79, American Type Culture Collec-

tion, Rockville, Md) sono state mantenute in fiasche per colture cellulari in DMEM completo. Le cellule sono state incubate in termostato umidificato a 37°C al 5% di CO₂ e ripassate con frequenza settimanale. Prima dell'utilizzo, AFB₁ (Sigma Aldrich) e AnAFB₁ sono state disciolte in dimetilsolfossido (DMSO) fino alla concentrazione finale di 5 mg/ml.

In ogni pozzetto di una piastra a 96 pozzetti con fondo piatto, sono stati seminati 200 µl di DMEM completo contenenti 5×10^4 cellule HepG2, incubando quindi la piastra per 24 ore a 37°C, 5% CO₂. Le cellule sono state, quindi, trattate con concentrazioni crescenti di AFB₁ o AnAFB₁ (1,1 µg/ml, 5,5 µg/ml, 11 µg/ml, 22 µg/ml) ed incubate per 24 ore a 37°C, 5% CO₂. Nel saggio sono stati eseguiti controlli negativi condotti con il solo solvente DMSO, utilizzato per disciogliere i campioni, in quantità corrispondente alla concentrazione più alta di campione in esame. Trascorso il tempo di incubazione, la piastra è stata lavata con PBS 1X preriscaldato a 37°C, distribuendo successivamente in ciascun pozzetto 100 µl di terreno D-MEM completo contenente il colorante alamar blue (Invitrogen) al 10% v/v. Dopo aver agitato la piastra per alcuni secondi evitando di esporla alla luce, questa è stata incubata nuovamente a 37°C, 5% CO₂ per 2 ore. Si è quindi determinato il grado di riduzione dell'alamar blue misurando l'assorbanza a 570 e 600 nm e rapportando le letture al bianco (terreno DMEM contenente alamar blue). È stata determinata la dose di AFB₁ in grado di inibire il 50% della proliferazione cellulare (IC₅₀), comparativamente a cellule non trattate utilizzate come controllo.

2.11.3 Saggio di mutagenesi di AFB₁ e AnAFB₁ su ceppi di *Salmonella typhimurium*

AFB₁ ed AnAFB₁ sono state sottoposte a test di mutagenesi sui ceppi TA 98 e TA 100 di *Salmonella typhimurium* (metodo di incorporazione in piastra) in accordo con i metodi standard (428, 429). Prima dell'utilizzo sono stati verificati i marcatori

genetici specifici dei ceppi. Per ogni ceppo di *S. typhimurium* (TA 98 e TA 100), sono state allestite colture da singola colonia in 10 ml di Brodo Nutritivo addizionato di ampicillina (25 µg/ml). Le colture sono state, successivamente, incubate per 8-16 ore a 37°C in agitazione (180 rpm), fino al raggiungimento di una concentrazione cellulare di circa 10⁹ cellule/ml. Al termine dell'incubazione delle brodo colture, è stato preparata una miscela di enzimi microsomiali di fegato di ratto S9 (Trinova Biochem), precedentemente trattato con un induttore specifico per stimolare la sintesi di enzimi che consentano l'attivazione metabolica di sostanze promutagene quali AFB₁ (428). La beutina contenente la miscela S9 (3,35 ml H₂O distillata sterile, 5 ml PBS 1X pH 7,4, 200 µl soluzione salina, 400 µl NADP, 50 µl D-glucosio-6-fosfato, 1 ml S9) è stata mantenuta in ghiaccio per tutto il tempo di esecuzione del saggio. Top Agar sciolto, mantenuto alla temperatura di 45°C, è stato addizionato di una miscela di Istidina-Biotina (0,5 mM) nella quantità di 1 ml ogni 10 ml di terreno. In provette di vetro con tappo a vite, mantenute alla temperatura di 45°C in termoblocco, sono stati distribuiti 2 ml di Top Agar con Istidina-Biotina, 100 µl di coltura batterica, 100 µl di campione (AFB₁ o AnAFB₁) e 0,5 ml di S9 mix. Per ogni campione sono state saggiate tre concentrazioni (100 ng, 200 ng e 500 ng per piastra), eseguendo tre repliche indipendenti per ogni concentrazione. Dopo agitazione vigorosa con vortex, il contenuto è stato rapidamente versato in piastre di Terreno Minimo precedentemente scaldate in termostato a 37°C. Dopo aver lasciato solidificare l'agar, le piastre sono state incubate a 37°C per 44-48 ore, provvedendo quindi alla conta delle colonie di *Salmonella* revertanti cresciute. Per ogni test sono stati eseguiti controlli negativi, condotti in presenza della frazione microsomiale epatica di ratto S9 con il solo solvente DMSO, utilizzato per disciogliere i campioni, in quantità corrispondente alla dose più alta di campione saggiato. I controlli negativi sono risultati indicativi dei revertanti spontanei.

2.12 PRODUZIONE DELL'IMMUNOGENO ANAFB₁-KLH

La produzione dell'immunogeno AnAFB₁-KLH è stata effettuata secondo le seguenti modalità:

2.12.1 Coniugazione di AnAFB₁ a KLH

A 2 mg di AnAFB₁ sciolti in 600 µl di diclorometano (DCM) secco a 0°C, sono stati aggiunti *N*-idrossisuccinimide (NHS, 1,1 mg, 47 µmol) e 1,3-dicicloesilcarbodiimide (DCC, 1,18 mg, 45 µmol), seguiti da 4-(dimetilamino)piridina (DMAP, 1 mg, 41 µmol). La miscela è stata posta in agitazione una notte, evaporando quindi il solvente in flusso di azoto e dissolvendo il residuo in 600 µl di dimetilformamide (DMF) secca. L'estere attivo così ottenuto è stato lentamente aggiunto ad una soluzione tampone fredda (31 mM sodio fosfato, pH 7,4), contenente 20 mg di emocianina (KLH), isolata dall'emolinfa del mollusco *Megathura crenulata* (Sigma Aldrich) e non meno del 10% (v/v) DMF, per mantenere la solubilità di AnAFB₁ nella miscela di coniugazione. La miscela è stata posta in agitazione a 4°C una notte e, successivamente, AnAFB₁ non coniugata è stata eliminata mediante estensiva dialisi per ultrafiltrazione, utilizzando filtri da centrifuga con taglio molecolare pari a 10 KDa (Microcon YM-10, Millipore).

2.12.2 Determinazione del rapporto di coniugazione AnAFB₁-KLH

A causa delle elevate dimensioni della proteina KLH (400 KDa per subunità), non è stato possibile determinare direttamente in HPLC-MS la concentrazione di AnAFB₁ coniugata a KLH. Il rapporto di coniugazione AnAFB₁-KLH, è stato, quindi, otte-

nuto calcolando la concentrazione di AnAFB₁ coniugata come differenza tra la concentrazione di AnAFB₁ totale, determinata mediante analisi fluorimetrica, e la concentrazione di AnAFB₁ libera rimasta in soluzione dopo la dialisi, determinata mediante HPLC-MS. In un fluorimetro (Modulus, Promega) è stata registrata, da 390 a 600 nm, l'intensità della fluorescenza emessa da cinque soluzioni standard di AnAFB₁ a concentrazione nota (0,01 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,025 mg/ml o 0,0125 mg/ml), costruendo una retta di calibrazione rappresentante i valori dei picchi dello spettro di fluorescenza degli standard in funzione della concentrazione di AnAFB₁. La concentrazione di AnAFB₁ totale presente nella soluzione di reazione è stata ottenuta misurando il picco di intensità nello spettro di emissione di una diluizione 1:100 del campione e convertendo tale misura in concentrazione tramite retta di calibrazione. In un sistema HPLC-MS (Aquity, Waters) sono stati registrati gli spettri di massa di cinque soluzioni standard di AnAFB₁ a concentrazione nota (0,02 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,005 mg/ml o 0,002 mg/ml), costruendo una retta di calibrazione rappresentante i valori di area ottenuti integrando i picchi corrispondenti ad AnAFB₁ registrati negli spettri di massa di cinque soluzioni standard in funzione della concentrazione di tossina presente. La concentrazione di AnAFB₁ totale presente nella soluzione di reazione è stata ottenuta dal valore di area ottenuto misurando l'area del picco corrispondente ad AnAFB₁ nello spettro di massa della soluzione di reazione e convertendo tale misura in concentrazione tramite retta di calibrazione.

2.13 IMMUNIZZAZIONE SPERIMENTALE DI VACCHE CON ANAFB₁-KLH

Vacche da latte di razza Frisona Italiana alla prima lattazione, stabulate presso il Centro di Ricerche Zootecniche (CeRZoo) dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza, sono state immunizzate per via sistemica, mediante ripetuti inoculi di AnAFB₁-KLH, comparativamente ad animali immunizzati con KLH, utilizzate come controllo.

2.13.1 Esperimento pilota di immunizzazione

Ad ognuna delle vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH o KLH (gruppi di 2 animali ciascuno) sono state iniettate *i.m.* quattro dosi (giorno 0, 21, 42 e 79) costituite, ognuna, da 500 µg di immunogeno addizionati di adiuvante di Freund completo (primo inoculo) o incompleto (3 inoculi successivi), in un volume finale di 1 ml in PBS pH 7,4. A vari tempi, prima, durante e dopo il periodo di immunizzazione, sono stati eseguiti prelievi di sangue dalla vena giugulare, al fine di verificare la presenza nei differenti sieri di Ab specifici per AFB₁.

2.13.2 Immunizzazione con AnAFB₁-KLH e Montanide ISA 563

Ad ognuna delle vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH o KLH (gruppi di 6 animali ciascuno) sono state iniettate *i.m.* quattro dosi (giorno 0, 30, 60 e 90) costituite, ognuna, da 500 µg di immunogeno emulsionato inizialmente in Tween 80 (4,1% v/v) e, successivamente, in un ugual volume di olio minerale Montanide ISA 563 (Seppic Inc.), in un volume finale di 1 ml in PBS pH 7,4. A vari tempi, prima, durante e dopo il periodo di immunizzazione, sono stati eseguiti prelievi di sangue dalla vena giugulare, al fine di verificare la presenza nei differenti sieri di Ab specifici per AFB₁.

2.13.3 Immunizzazione con AnAFB₁-KLH ed adiuvante di Freund

Ad ognuna delle vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH o KLH (gruppi di 6 animali ciascuno) sono state iniettate *i.m.* quattro dosi (giorno 0, 21, 42 e 63) costituite, ognuna, da 500 µg di immunogeno addizionati di adiuvante di Freund completo (primo inoculo) o incompleto (3 inoculi successivi), in un volume finale di 1 ml in PBS pH 7,4. A vari tempi, prima, durante e dopo il periodo di immunizzazione, sono stati eseguiti prelievi di sangue dalla vena giugulare, al fine di verificare la presenza nei differenti sieri di Ab specifici per AFB₁.

2.13.4 Saggi immunoenzimatici indiretti per la titolazione di Ab specifici nei confronti di AFB₁

Pozzetti di piastre microtiter (Costar, Corning) sono stati adsorbiti con 50 µl di una soluzione contenente 50 µg/ml AFB₁-BSA (2,5 mg/ml, 1 mol BSA:8 mol AFB₁, PM BSA 66.410 Da) in tampone carbonato pH 9,6, incubando una notte a 4°C. Dopo la saturazione con 100 µl di gelatina 1% in PBS a 37°C per 90', sono stati aggiunti 50 µl di diluizioni successive di siero raccolto a diversi tempi dall'inizio dell'immunizzazione o siero di controllo (pre-immune), incubando a 37°C per 90'. Ab legati sono stati rilevati con Ab perossidati, specifici per IgG bovine (Sigma Aldrich), una soluzione di cromogeno (TMB, Sigma Aldrich) e substrato (0,02% H₂O₂). La reazione è stata bloccata dopo 7' aggiungendo 25 µl di H₂SO₄ 1 N e l'assorbanza è stata rilevata a 650 e 450 nm in un lettore per micropiastre (Multiskan Ascent, Labsystems). A scopo comparativo, è stata allestita una ulteriore piastra microtiter, adsorbendo i pozzetti con 50 µl di una soluzione (50 µg/ml) di BSA in tampone carbonato pH 9,6, per una notte a 4°C. Il saggio immunoenzimatico è stato eseguito in modo analogo a quanto descritto utilizzando AFB₁-BSA. Durante il periodo di immunizzazione, sono stati determinati, mediante saggi immunoenzimatici, i titoli di Ab specifici per AFB₁ prima e dopo ogni somministrazione di immunogeno. Il titolo di Ab specifici

è stato arbitrariamente definito come la maggiore diluizione di antisiero in grado di determinare una OD₄₅₀ maggiore di 0,1 U, rispetto alla lettura effettuata con il siero pre-immune alla stessa diluizione.

2.13.5 Saggi immunoenzimatici indiretti competitivi

Pozzetti di piastre microtiter sono stati adsorbiti con AFB₁-BSA e saturati come precedentemente descritto. In ogni pozzetto sono stati, quindi, contemporaneamente incubati, per 1 ora a 37°C, quantità crescenti di AFB₁ (o AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁), dissolta 25 µl in PBS, e 25 µl di siero immune (diluito 1:400 in PBS). Ab legati sono stati determinati con Ab perossidati specifici per IgG, come precedentemente descritto. L'affinità relativa di Ab è stata arbitrariamente definita come la concentrazione di tossina in grado di inibire del 50% il legame di Ab specifici per AFB₁ adsorbita alla fase solida.

2.14 ANALISI STATISTICA DEI TITOLI ANTICORPALI SPECIFICI PER AFB₁

Le differenze nelle reattività dei sieri delle vacche immunizzate e di controllo sono state calcolate utilizzando il test *t* di Student, considerando statisticamente significativa una probabilità $P < 0,05$.

2.15 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO PROTETTIVO DI AB SPECIFICI PER AFB₁ IN VACCHE IMMUNIZZATE CON ANAFB₁-KLH

La valutazione dell'effetto protettivo di Ab specifici nei confronti di AFB₁ è stata effettuata secondo le seguenti modalità:

2.15.1 Trattamento di vacche immunizzate con AFB₁

Durante tutto il periodo sperimentale, le vacche sono stati alimentate con una dieta formulata secondo le necessità nutritive del bestiame da latte (431), calcolate per una vacca media del peso di 600 kg, in lattazione da 140 giorni e con una produzione di latte di 35 kg/giorno (3,8% grassi e 3,35% proteine). Il cibo è stato somministrato *ad libitum*, mediante una razione mista totale (TMR) giornaliera distribuita ogni mattina. Le vacche sono state munte due volte al giorno registrando, per ogni animale, la produzione latte giornaliera mediante sistema Affimilk (Affimilk system, Affikim). Durante il periodo di esposizione alla dieta contaminata (11 giorni), prima del pasto mattutino, è stato somministrato ad ogni vacca un bolo di mais contaminato con 99 µg AFB₁/capo al giorno. Analisi gas-cromatografiche hanno evidenziato una contaminazione di base media della TMR pari a 1,8 µg/kg. Considerando una ingestione giornaliera di 21 kg, gli animali sono stati esposti a 136,8 µg AFB₁/capo al giorno. Per ogni animale, sono stati raccolti campioni individuali di latte, ottenuti dalle due mungiture giornaliere, il giorno prima della somministrazione di AFB₁ (giorno 0), durante il periodo di esposizione ad AFB₁ (giorni 1-11) e durante il periodo successivo alla fine del trattamento, definito "periodo di pulizia" o "clearance", necessario per la diminuzione delle concentrazioni di AFM₁ fino a livelli tendenti allo zero (giorni 12-16). I campioni di latte sono stati conservati a -20°C, fino al momento delle

analisi tossicologiche. Prima e dopo il periodo di somministrazione di AFB₁, sono stati raccolti campioni di sangue in provette Vacutainer successivamente centrifugate (1500×g, 15') ottenendo, per ogni animale, campioni di siero conservati a -20°C, fino al momento delle successive indagini immunosierologiche, volte alla determinazione dell'effetto dell'ingestione di AFB₁ sui titoli di Ab specifici.

2.15.2 Determinazione della concentrazione di AFM₁ nei campioni di latte

L'estrazione di AF dai campioni di latte è stata condotta secondo una metodica d'immunoaffinità (432). In breve, 50 ml di latte scremato (ottenuto mediante centrifugazione a 7000 rpm, 10', 4°C) sono stati filtrati in carta da filtro Schleiche & Schuell 585 ½. Successivamente, 20 ml di latte filtrato sono stati trasferiti in colonna di immunoaffinità (Aflatoxin Easy-tract, Rhone Diagnostics) precedentemente lavata con 20 ml di PBS pH 7.4. Dopo aver lavato la colonna con 5 ml di acqua, le tossine legate alla colonna sono state eluite con 2,5 ml di metanolo. L'estratto è stato essiccato in flusso di azoto, ridissolto in 1 ml di una soluzione acetonitrile: acqua (25:75) e filtrato (Millipore Corporation; HV 0.45 mm), prima dell'analisi HPLC, effettuata in un cromatografo LC Perkin Elmer (Perkin Elmer), collegato ad una pompa LC-200 e a un rivelatore a fluorescenza Jasco FP-1520 (Jasco). Il sistema e l'acquisizione dei dati sono stati controllati dal software Jasco Borwin Chromatography PC. AFM₁ è stata separata in colonna C18 a fase inversa LiCospher 100 column (Merck; 5 mm particle size, 12534 mm i.d.) a temperatura ambiente, con fase mobile acqua: acetonitrile (75:25) e flusso 1 ml/min. Il rivelatore a fluorescenza è stato impostato a una lunghezza d'onda di eccitazione 365 nm e 440 nm di emissione. La concentrazione della soluzione di AFM₁ standard è stata verificata secondo il metodo AOAC 970.44 (433, 434), conservando la soluzione a -20°C quando non utilizzata.

2.15.3 Monitoraggio sierologico di vacche immunizzate ed esposte ad AFB₁

Sono stati eseguiti esperimenti al fine di monitorare eventuali variazioni del titolo anticorpale specifico per AFB₁, acquisito in seguito ad immunizzazione con AnAFB₁-KLH, in seguito alla somministrazione di AFB₁. Dopo 10 settimane dall'inizio del protocollo di immunizzazione, a ciascuna vacca immunizzata per via *i.m.* con AnAFB₁-KLH e ai relativi controlli, costituiti da vacche immunizzate con KLH, sono stati somministrati 136,8 µg AFB₁/capo/giorno al giorno per 11 giorni. I sieri ottenuti dai campioni di sangue prelevati dopo l'esposizione ad AFB₁ sono stati saggiati, comparativamente ai sieri raccolti la settimana successiva all'ultima somministrazione di immunogeno (settimana 12 e 10 rispettivamente), per la determinazione del titolo residuo di Ab specifici per AFB₁.

2.16 ANALISI STATISTICA DEL CONTENUTO DI AFM₁ NEL LATTE

Le variabili elaborate nella presente tesi di dottorato sono state sottoposte ad analisi della varianza (ANOVA) mediante la procedura GLM dello Statistical Analysis System Institute (SAS) 2009. Le concentrazioni di AFM₁ dei gruppi degli animali trattati e di controllo, per ogni fase di lattazione (iniziale-media e media-avanzata), sono state confrontate in ogni giorno del periodo sperimentale, e come media dei tre giorni di plateau, utilizzando lo statement LSMEANS (test t di Student) del SAS. Un approccio simile è stato utilizzato per confrontare la concentrazione di AFM₁ nel latte del gruppo trattato fra fase iniziale-media e medio-avanzata di lattazione. Il coefficiente di correlazione di Pearson è stato calcolato mediante procedura CORR del SAS per stimare le relazioni esistenti fra concentrazione di AFM₁ nel latte e risposta all'immunizzazione in ogni fase di lattazione degli animali.

2.17 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO PROTETTIVO *IN VITRO* DI AB SPECIFICI NEI CONFRONTI DI AFB₁

La valutazione dell'effetto protettivo *in vitro* dei Ab specifici per AFB₁ è stata effettuata secondo le seguenti modalità:

2.17.1 Preparazione di coniugati AnAFB₁ con sfere magnetiche

AnAFB₁ è stato coniugato a biglie (Dynabeads M-270 Amine, Dynal) costituite da materiale magnetico equamente ripartito tra i pori di sfere di polistirene ad elevato grado di polimerizzazione. La superficie di tali sfere magnetiche è rivestita da uno strato idrofilico di etere glicidilico ed è attivata con gruppi funzionali amminici primari. Il gruppo carbossilico di AnAFB₁ è stato legato a tali gruppi amminici tramite reazione di coniugazione diretta, mediata da attivazione da parte di carbodiimidi idrosolubili. In particolare, 500 µl di sfere magnetiche, corrispondenti a 1×10^9 sfere, sono state separate dal tampone di conservazione posizionando il tubo contenitore su un magnete per 4 min, raccogliendo le microsfele sulla parete del tubo. Dopo avere aspirato il surnatante con una pipetta, le sfere magnetiche sono state equilibrate in un ugual volume di tampone MES (0.1 M MES (acido 2-[N-morfolino] etan sulfonico), 0.5 M NaCl pH 6,0). In seguito ad un ulteriore passaggio di separazione magnetica, le microsfele sono state risospese in 350 µl del medesimo tampone, aggiungendo quindi 300 µg di AnAFB₁ precedentemente disciolta in 150 µl di MES. Dopo aver opportunamente miscelato i composti, sono stati aggiunti 30 µl di una soluzione acquosa contenente 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimide idrocloride (EDC, 0,3 mg, 1,56 µmol) ed N-idrossisuccinimide (NHS, 0,45 mg, 19 µmol). Dopo 3 ore di incubazione in rotazione a 4°C, la reazione è stata bloccata aggiungendo 10 mM idrossi-

lammina ($\text{NH}_2\text{OH}\times\text{HCl}$) ed incubando per 15 minuti in rotazione a temperatura ambiente. Le sfere magnetiche sono state saturate mediante ripetuti lavaggi in tampone fosfato (PBS: 2 mM NaH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4 , 0,15 M NaCl) contenente lo 0,05% di gelatina e risospese in 500 μl di PBS contenente 0,02% sodio azide (NaN_3).

2.17.2 Purificazione di Ab specifici per AFB₁ dal siero di vacche immunizzate

La purificazione degli Ab specifici per AFB₁ da siero di vacca è stata eseguita in diversi passaggi, incubando microsfele ricoperte da AnAFB₁ con i sieri raccolti successivamente al periodo di immunizzazione. Per ogni passaggio, sono stati utilizzati 250 μl di sfere magnetiche (5×10^8 sfere), incubati per 2 ore a 4°C con 200 μl di siero, applicando una lenta rotazione per inversione. Il tubo di reazione è stato, successivamente, posizionato su un magnete per 4 minuti, raccogliendo le microsfele sulla parete del tubo e aspirando il surnatante con una pipetta. Dopo 3 lavaggi in PBS/0,05% Tween20, gli Ab immobilizzati sulle microsfele sono stati eluiti aggiungendo 60 μl di 3M KCl ed incubando per 2 minuti in agitazione. Le microsfele sono state quindi separate per mezzo di un magnete, trasferendo il surnatante, contenente gli Ab specifici per AFB₁, in un tubo pulito. In seguito ad un ulteriore passaggio di eluizione con 60 μl di 3M KCl, per assicurare il riutilizzo delle microsfele coniugate ad AFB₁ e la funzionalità del target isolato, le microsfele e la soluzione di Ab sono stati portati a pH fisiologico (7,4) aggiungendo tampone di neutralizzazione (1M Tris, 0,05% NaN_3 , pH 8,2). Gli Ab ottenuti sono stati, successivamente, concentrati per ultrafiltrazione in filtri da centrifuga con taglio molecolare pari a 10 KDa (Microcon YM-10, Millipore). La specificità degli Ab purificati è stata verificata mediante saggi immunoenzimatici indiretti, utilizzando come antigeni preadsorbiti sulla fase solida di piastre per microtitolazione il coniugato AFB₁-BSA e l'Ag di controllo, rappresentato dalla sola porzione proteica del coniugato (BSA).

2.17.3 Valutazione della inibizione della citotossicità di AFB₁ in cellule HepG2

Cellule di epatoblastoma umano HepG2 (BS-TCL-79, American Type Culture Collection, Rockville, Md) sono state mantenute in fiasche per colture cellulari in DMEM completo. Le cellule sono state incubate in termostato umidificato a 37°C al 5% di CO₂ e ripassate con frequenza settimanale. Prima dell'utilizzo, AFB₁ (Sigma Aldrich) è stata sciolta in DMSO fino alla concentrazione finale di 5 mg/ml.

In ogni pozzetto di una piastra a 96 pozzetti con fondo piatto, sono stati seminati 200 µl di DMEM completo contenenti 5×10^4 cellule HepG2, incubando quindi la piastra per 24 ore a 37°C, 5% CO₂.

Una soluzione di 50 µl di Ab di vacca specifici per AFB₁ (9 µg/ml), purificati mediante sfere magnetiche, è stata incubata con 50 µl di AFB₁ (15 µg/ml) per 1h a 37°. Le cellule sono state quindi trattate con la soluzione di Ab e AFB₁ ed incubate per 24 ore a 37°C, 5% CO₂. Nel saggio, sono stati eseguiti controlli negativi condotti con il solo solvente DMSO, utilizzato per disciogliere i campioni, in quantità corrispondente alla concentrazione più alta di campione saggiato. Trascorso il tempo di incubazione, la piastra è stata lavata con PBS 1X preriscaldato a 37°C, distribuendo successivamente, in ciascun pozzetto, 100 µl di terreno D-MEM completo contenente il colorante alamar blue (Invitrogen) al 10% v/v. Dopo aver agitato la piastra per alcuni secondi evitando di esporla alla luce, questa è stata incubata nuovamente a 37°C 5% CO₂ per 2 ore. Si è, quindi, determinato il grado di riduzione dell'alamar blue misurando l'assorbanza a 570 e 600 nm e rapportando le letture al bianco (terreno DMEM contenente alamar blue). È stata determinata la dose di AFB₁ in grado di inibire il 50% della proliferazione cellulare (IC₅₀), comparativamente a cellule non trattate utilizzate come controllo.

3. RISULTATI

3.1 VALUTAZIONE DELLA POTENZIALITA' VACCINALE DI UN IMMUNOGENO COSTITUITO DA AFB₁ CONIUGATA A BSA (AFB₁-BSA)

L'immunogeno convenzionale AFB₁-BSA, disponibile come preparato commerciale, è stato utilizzato in prove preliminari di immunizzazione parenterale e/o delle mucose in diversi modelli sperimentali animali allo scopo di valutarne in modo comparativo l'efficienza nell'induzione di Ab, sistemici e secretori, specificamente reattivi nei confronti di AFB₁, il potenziale immunoprotettivo nei confronti dell'ingestione di AFB₁ e l'eventuale applicabilità ai fini del monitoraggio sierologico delle variazioni dei titoli anticorpali negli animali immunizzati.

Per quanto il coniugato AFB₁-BSA, a causa della presenza della molecola di AFB₁, sia difficilmente fruibile ai fini della vaccinazione in animali e sicuramente non utilizzabile nell'uomo, esso è stato adottato come riferimento sierologico e funzionale per la valutazione dell'immunogenicità di costrutti alternativi.

3.1.1 Valutazione dell'induzione di Ab specifici per AFB₁ in topi immunizzati con AFB₁-BSA

Per ognuno degli animali immunizzati con AFB₁-BSA o BSA, prima, durante e dopo il periodo di immunizzazione, sono stati eseguiti prelievi di sangue. I sieri raccolti successivamente al periodo di immunizzazione sono stati saggiati, mediante saggi immunoenzimatici diretti, al fine di verificare la presenza di Ab specifici nei confronti di AFB₁, comparativamente ai sieri pre-immuni ed ai sieri del gruppo di controllo (animali immunizzati con BSA). Il livello degli Ab rilevati è stato espresso come valori di OD registrati a 450 nm. Come mostrato in **Figura 17**, i risultati hanno evidenziato una significativa produzione di Ab specifici per AFB₁ negli animali immunizzati con AFB₁-BSA, mentre i sieri degli animali di controllo non hanno mostrato reattività specifica per AFB₁.

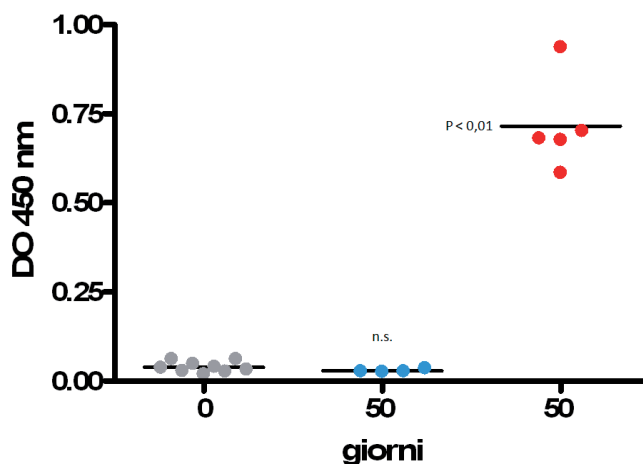


Figura 17. Valutazione comparativa dell'induzione di Ab specifici per AFB₁ in topi immunizzati per via sistemica con AFB₁-BSA o BSA. I sieri raccolti dopo la somministrazione dell'ultima dose di immunogeno (● post-immunizzazione) sono stati saggiati, mediante saggio immunoenzimatico diretto, comparativamente ai sieri raccolti il giorno 0 (● siero pre-immunizzazione) e ai sieri del gruppo di controllo immunizzato secondo la stessa schedula con BSA (● controllo immuni BSA). I punti in figura corrispondono ai valori netti di assorbanza a 450 nm letti per ciascun topo di ogni gruppo. Le linee mostrano il valore di assorbanza medio per ogni gruppo (n.s. = non significativo).

3.1.2 Determinazione dell'isotipo di Ab di topo specifici per AFB₁

La determinazione delle classi di Ig specifiche nei confronti di AFB₁ prodotte in topo in seguito ad immunizzazione con AFB₁-BSA, condotta mediante saggio immunoenzimatico, ha mostrato la presenza prevalente di IgG1, in misura minore di IgG2a e, in quantità irrilevante, di IgG2b, IgG3, IgM o IgA (**Figura 18**).

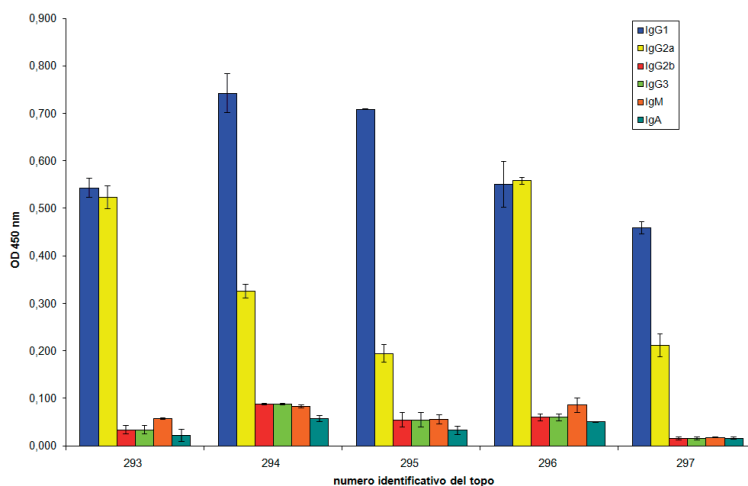


Figura 18. Caratterizzazione del profilo isotipico della risposta umorale indotta in topi in seguito ad immunizzazione sistemica AFB₁-BSA. La cattura di Ab diretti contro AFB₁ presenti nei sieri raccolti dopo il periodo di immunizzazione è stata rivelata, mediante saggi immunoenzimatici con AFB₁ coniugata a perossidasi. I livelli degli Ab rilevati nel siero di ogni topo per ciascuna classe sono stati espressi come valore di OD a 450 nm ± deviazione standard (DS).

3.1.3 Monitoraggio sierologico di topi immunizzati con AFB₁-BSA ed esposti ad AFB₁

Dopo 11 mesi dall'inizio del protocollo di immunizzazione, periodo di tempo in cui gli animali sono stati alimentati con mangime commerciale comune (Harlan Nossan Laboratories), a ciascun topo immunizzato per via parenterale con AFB₁-BSA è stata somministrata AFB₁, per via i.g., per 5 giorni. Sono stati analizzati i sieri ottenuti da campioni di sangue prelevati prima (giorno 0) e dopo (giorno 50) l'immunizzazione, prima dell'esposizione ad AFB₁ (giorno 320) e dopo il 10° giorno dall'inizio del trattamento (giorno 330). I sieri, opportunamente diluiti, sono stati saggiati mediante saggio immunoenzimatico diretto. Come mostrato in **Figura 19a**, il titolo anticorpale dei topi immunizzati per via sistemica con AFB₁-BSA, seppure con una leggera flessione nel tempo, si è mantenuto elevato per 11 mesi. In corrispondenza alla somministrazione di una massiccia dose di AFB₁ per via orale, tale titolo ha subito un netto decremento. Per verificare se tale diminuzione di titolo fosse riferibile ad una inibizione del sistema immunitario, gli stessi sieri sono stati saggiati nei confronti di BSA. I risultati riportati in **Figura 19b** hanno evidenziato come il titolo degli Ab specifici per BSA non venga influenzato dalla somministrazione di AFB₁.

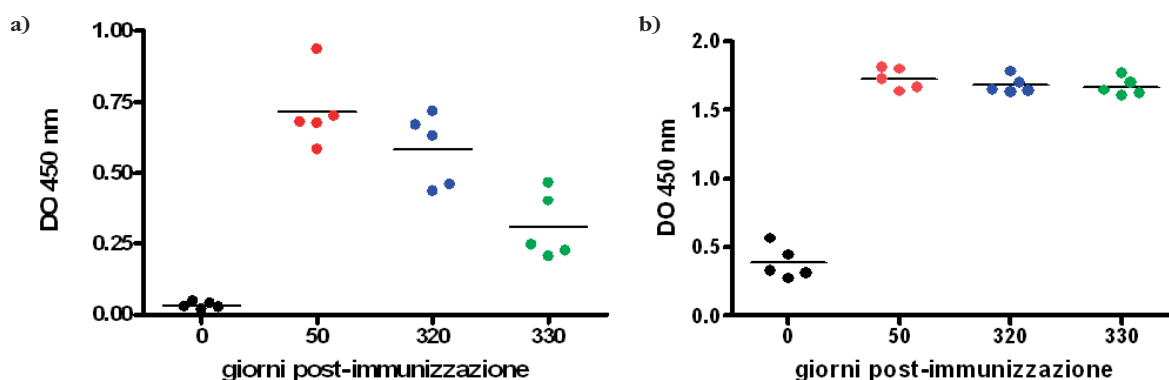


Figura 19. Variazione nel titolo di Ab specifici per AFB₁ (a) e BSA (b) in topi immunizzati con AFB₁-BSA in seguito alla somministrazione di AFB₁. Dopo aver verificato l'induzione di Ab specifici per AFB₁ (giorno 50), ad ogni topo sono stati somministrati *i.g.* 50 μ l di una soluzione contenente 0.2 μ g di AFB₁ per 7 giorni. I sieri prelevati prima dell'esposizione ad AFB₁ (dopo 320 giorni dall'immunizzazione) ed i sieri prelevati dopo il 10° giorno dall'inizio del trattamento sono stati saggiati, mediante saggi immunoenzimatici, comparativamente ai sieri raccolti in seguito all'immunizzazione con AFB₁-BSA (giorno 50) e ai sieri raccolti il giorno 0 (pre immuni). I punti in figura corrispondono ai valori netti di assorbanza a 450 nm letti per ciascun topo di ogni gruppo. Le linee mostrano il valore di assorbanza medio per ogni gruppo (n.s. = non significativo).

La diminuzione nel titolo dei soli Ab specifici per AFB₁ potrebbe essere riferibile alla formazione di immunocomplessi, deponendo per la presenza di Ab sierici potenzialmente protettivi.

3.1.4 Valutazione dell'induzione di Ab specifici per AFB₁ in ratti immunizzati con AFB₁-BSA

Immunizzazione sistemica

Per ognuno dei ratti immunizzati *i.m.* con AFB₁-BSA o BSA, prima, durante e dopo il periodo di immunizzazione, sono stati eseguiti prelievi di sangue. I sieri raccolti successivamente al periodo di immunizzazione sono stati saggiati, mediante saggi immunoenzimatici diretti, al fine di verificare la presenza di Ab specifici nei confronti di AFB₁, comparativamente ai sieri pre-immuni ed ai sieri del gruppo di controllo (animali immunizzati con BSA). Il titolo di Ab rilevati è stato espresso come valori di OD registrati a 450 nm. Come mostrato in **Figura 20**, i risultati hanno evidenziato una significativa produzione di Ab specifici per AFB₁ negli animali immunizzati con AFB₁-BSA, mentre i sieri degli animali di controllo non hanno mostrato reattività specifica per AFB₁.

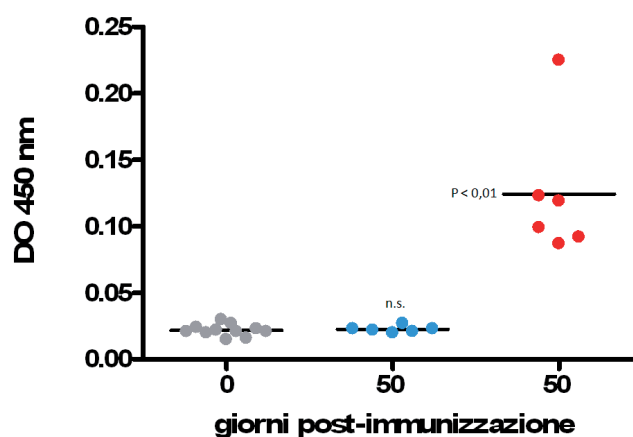


Figura 20. Valutazione comparativa dell'induzione di Ab specifici per AFB₁ in ratti immunizzati per via sistemica con AFB₁-BSA o BSA. I sieri, raccolti dopo la somministrazione dell'ultima dose di immunogeno (● giorno 50 post-immunizzazione AFB₁-BSA), sono stati saggiati, mediante saggio immunoenzimatico diretto, comparativamente ai sieri raccolti il giorno 0 (● pre-immunizzazione) e ai sieri del gruppo di controllo immunizzato secondo lo stesso protocollo con BSA (● giorno 50 post-immunizzazione BSA). I punti in figura corrispondono ai valori netti di assorbanza a 450 nm letti per ciascun ratto di ogni gruppo. Le linee mostrano il valore di assorbanza medio per ogni gruppo (n.s. = non significativo).

Immunizzazione vaginale

Per ognuna delle ratte immunizzate per via *i.v.g.* con AFB₁-BSA o BSA, prima, durante e dopo il periodo di immunizzazione, sono stati eseguiti prelievi di muco vaginale e feci. I campioni raccolti successivamente al periodo di immunizzazione sono stati saggiati, mediante saggi immunoenzimatici diretti, al fine di verificare la presenza di Ab specifici nei confronti di AFB₁, comparativamente ai campioni prelevati prima dell'immunizzazione ed ai sieri del gruppo di controllo. Il titolo di Ab rilevati è stato espresso come valori di OD registrati a 450 nm. Come mostrato in **Figura 21**, in nessuno dei campioni analizzati è stata evidenziata una significativa produzione di Ab specifici per AFB₁.

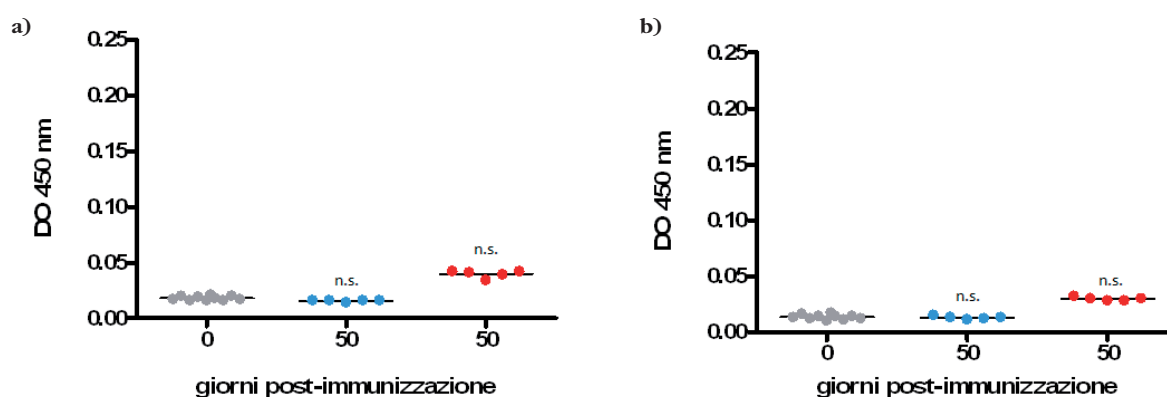


Figura 21. Valutazione comparativa dell'induzione di Ab specifici per AFB₁ in ratte immunizzate per via vaginale con AFB₁-BSA o BSA. Campioni di **(a)** muco vaginale e **(b)** feci raccolti dopo il periodo l'immunizzazione (● giorno 50) sono stati saggiati, mediante saggio immunoenzimatico diretto, comparativamente ai sieri raccolti il giorno 0 (● pre-immunizzazione) e ai sieri del gruppo di controllo (● immunizzato secondo lo stesso protocollo con BSA). I punti in figura corrispondono ai valori netti di assorbanza a 450 nm letti per ciascun ratto di ogni gruppo. Le linee mostrano il valore di assorbanza medio per ogni gruppo (n.s. = non significativo).

3.1.5 Monitoraggio sierologico di ratti immunizzati con AFB₁-BSA ed esposti ad AFB₁

Dopo 5 mesi dall'inizio del protocollo di immunizzazione, a ciascun ratto immunizzato per via parenterale con AFB₁-BSA è stata somministrata, per via intragastrica, AFB₁ (1 µg). Sono stati, quindi, analizzati i sieri ottenuti da campioni di sangue prelevati prima (giorno 0) e dopo (giorno 50) l'immunizzazione, prima dell'esposizione

ad AFB₁ (giorno 150) e dopo 14 giorni dal trattamento (giorno 164). I sieri, opportunamente diluiti, sono stati saggiati mediante saggio immunoenzimatico diretto. Come mostrato in **Figura 22**, dopo 5 mesi dall'inizio del protocollo di immunizzazione non era possibile rilevare Ab specifici per AF. In seguito alla somministrazione *i.g.* della tossina, il titolo di Ab specifici non ha subito significative variazioni.

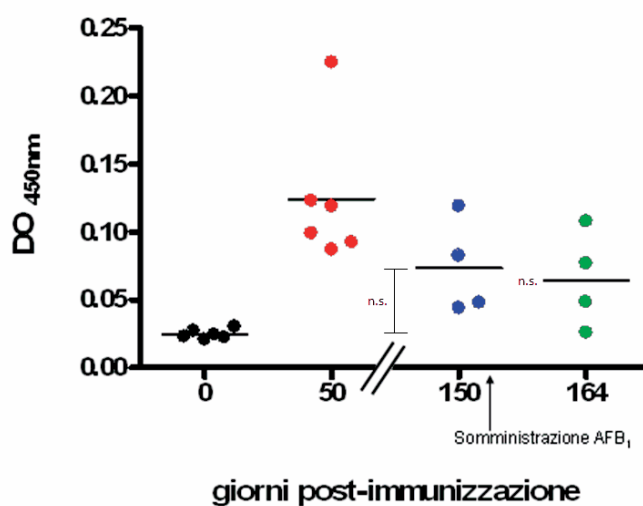


Figura 22. Variazione nel titolo degli Ab specifici per AFB₁ in ratti in seguito alla somministrazione di AFB₁. Dopo aver verificato l'induzione di Ab specifici per AFB₁ in seguito all'immunizzazione sistemica con AFB₁-BSA, ad ogni ratto sono stati somministrati *i.g.* 100 μ l di una soluzione contenente 1 μ g di AFB₁. I sieri prelevati prima dell'esposizione ad AFB₁ (giorno 150) ed i sieri prelevati dopo il 14° giorno dal trattamento (giorno 164) sono stati saggiati, mediante saggio immunoenzimatico diretto, comparativamente ai sieri raccolti dopo 50 giorni (post immunizzazione) e ai sieri raccolti il giorno 0 (pre immunizzazione). I punti in figura corrispondono ai valori netti di assorbanza a 450 nm letti per ciascun ratto di ogni gruppo. Le linee mostrano il valore di assorbanza medio per ogni gruppo (n.s. = non significativo).

3.1.6 Valutazione dell'induzione di Ab specifici per AFB₁ in vacche immunizzate con AFB₁-BSA

Immunizzazione sistemica

Per ognuna delle vacche immunizzate per via *i.m.* con AFB₁-BSA o BSA, prima, durante e dopo il periodo di immunizzazione, sono stati eseguiti prelievi di sangue. I sieri raccolti successivamente al periodo di immunizzazione sono stati saggiati, mediante saggi immunoenzimatici diretti, al fine di verificare la presenza di Ab spe-

cifici nei confronti di AFB₁, comparativamente ai sieri pre-immuni ed ai sieri del gruppo di controllo. Il titolo di Ab rilevato è stato espresso come valore di OD registrati a 450 nm. Come mostrato in **Figura 23a**, in nessuno dei campioni analizzati è stata evidenziata una significativa produzione di Ab specifici per AFB₁.

Immunizzazione vaginale

Per ognuna delle vacche immunizzate per via *i.n.* con AFB₁-BSA o BSA, prima, durante e dopo il periodo di immunizzazione, sono stati eseguiti prelievi di muco nasale. I campioni raccolti successivamente al periodo di immunizzazione sono stati saggiati, mediante saggi immunoenzimatici diretti, al fine di verificare la presenza di Ab specifici nei confronti di AFB₁, comparativamente ai campioni prelevati prima dell'immunizzazione ed ai sieri del gruppo di controllo (animali immunizzati con BSA). Il titolo di Ab rilevato è stato espresso come valore di OD registrati a 450 nm. Come mostrato in **Figura 23b**, in nessuno dei campioni analizzati è stata evidenziata una significativa produzione di Ab specifici per AFB₁.

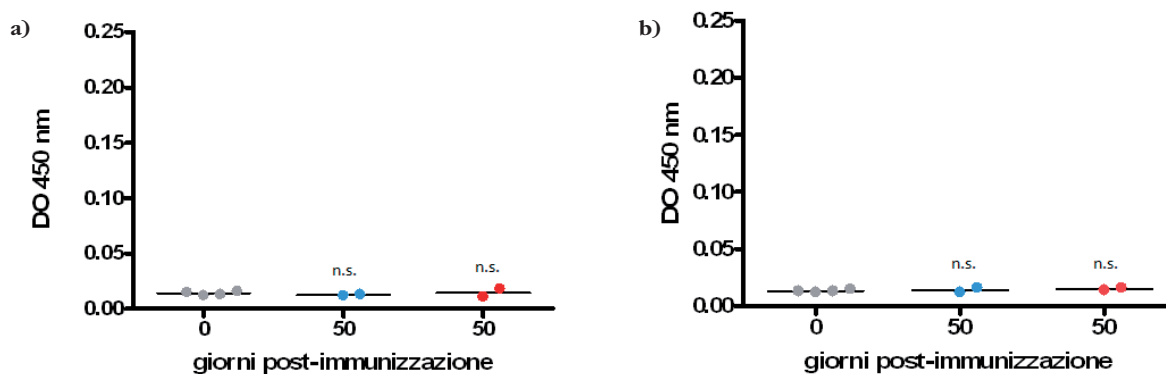


Figura 23. Valutazione comparativa dell'induzione di Ab specifici per AFB₁ in vacche immunizzate per via sistemica (a) o mucosale (b) con AFB₁-BSA. In relazione alla via di immunizzazione, gli opportuni campioni di siero o muco nasale, raccolti dopo la somministrazione dell'ultima dose di immunogeno (● giorno 50 post-immunizzazione AFB₁-BSA), sono stati saggiati, mediante saggio immunoenzimatico diretto, comparativamente ai sieri raccolti il giorno 0 (● pre-immunizzazione) e ai sieri del gruppo di controllo immunizzato secondo lo stesso protocollo con BSA (● giorno 50 post-immunizzazione). I punti in figura corrispondono ai valori netti di assorbanza a 450 nm letti per ciascuna vacca di ogni gruppo. Le linee mostrano il valore di assorbanza medio per ogni gruppo (n.s. = non significativo).

3.2 COSTRUZIONE E VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA IMMUNOGENA DI PEPTIDI MIMETICI DI AFB₁

Sulla base di due diverse sequenze di 14 amminoacidi riconosciute come mimotopi peptidici di AFB₁ (421), denominate C1 (FHPRCNEMTCHIKP) e C2 (ANTWCYV-DECMRIA), sono stati prodotti diversi immunogeni, ricombinanti e genici, che sono stati variamente caratterizzati da un punto di vista molecolare, valutando successivamente, in topo, la loro capacità di mimare l'Ag originario per la produzione di Ab specifici per AFB₁ in seguito ad immunizzazione parenterale.

3.2.1 Produzione di costrutti peptidici fagici mimotopi di AFB₁

Sono stati prodotti due costrutti ricombinanti fagici clonando le sequenze degli oligonucleotidi mimotopi di AFB₁ C1 e C2 all'interno del vettore fagemidico pC89 (**Figura 24**), in modo tale che gli oligonucleotidi vengano espressi come proteine di

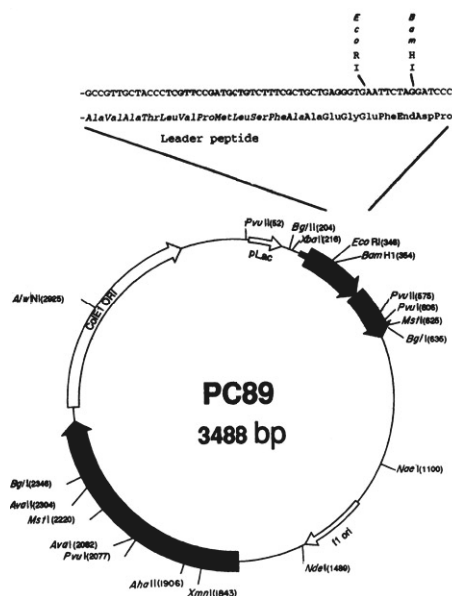


Figura 24. Mappa genica e funzionale del fagemide pC89 utilizzato per la produzione dei costrutti ricombinanti fagici mimotopi di AFB₁ (pC89-C1 e pC89-C2). Nel riquadro in alto sono schematizzate la sequenza leader della proteina capsidica pVIII, ed i siti di restrizione utilizzati per il clonaggio. Tratta da Felici, 1991 (420).

fusione nella regione ammino terminale della proteina capsidica pVIII del fago M13 (**Figura 25**), ottenendo i peptidi ricombinanti fagici denominati pC89-C1 e pC89-C2.

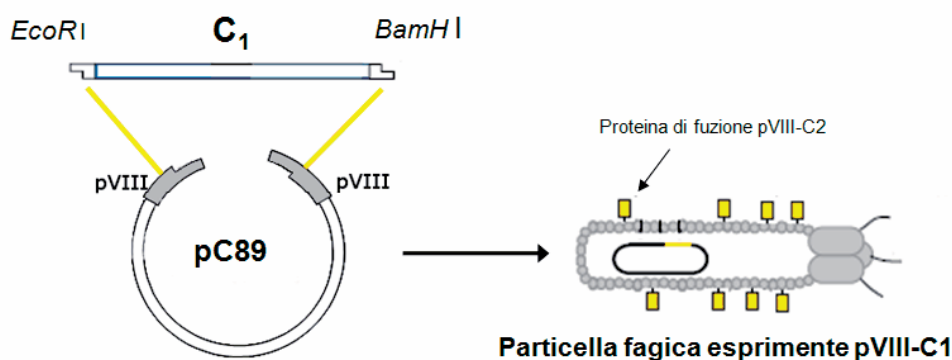


Figura 25. Inserimento ed espressione del peptide C1 mimetico di AFB₁ nel fagemide pC89. Il fagemide esprime C2 è stato costruito in modo analogo, inserendo la sequenza codificante per C2 nella stessa posizione.

3.2.2 Produzione di costrutti genici codificanti per peptidi mimetici di AFB₁

Sono stati prodotti degli immunogeni genici inserendo le sequenze codificanti per C1 e C2 nel vettore pDisplay, in fase con segnali per l'espressione e l'esposizione come peptidi transmembrana in cellule eucariotiche superiori (**Figura 26**). I costrutti genici ottenuti sono stati denominati pDisplay-C1 e pDisplay-C2.

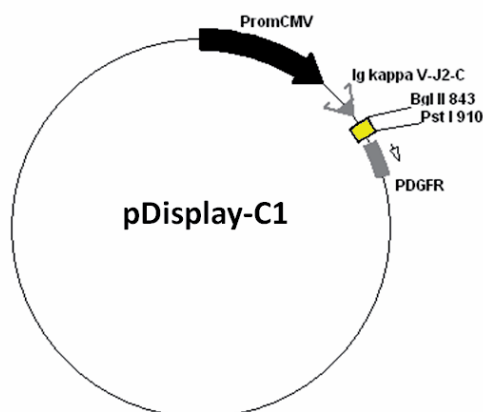


Figura 26. Mappa genica e funzionale di pDisplay-C1. Il costrutto chimero è stato realizzato inserendo la sequenza codificante per C1 (giallo) sotto il controllo del promotore CMV (PromCMV) in fase con la sequenza leader di catene κ di immunoglobuline (IG kappa V-J2-C, a monte) e con la sequenza segnale di traslocazione in membrana del recettore del fattore di crescita piastrinico (PDGFR, a valle). In questo modo, in cellule eucariotiche superiori, l'anticorpo ricombinante risulta espresso come proteina transmembrana. Il costrutto pDisplay-C2 è stato costruito in modo analogo inserendo la sequenza codificante per C2 nella stessa posizione.

3.2.3 Realizzazione di un peptide mimetico di AF coniugato a tioredossina

Allo scopo di ottenere costrutti totalmente ricombinanti, la sequenza codificante per C2 è stata clonata nel plasmide pT7Kan-Trx all'interno della sequenza codificante per la tioredossina batterica. Tale molecola è stata scelta per le sue dimensioni contenute (109 aminoacidi), per l'assenza di fenomeni di tossicità cellulare, per la sua elevata solubilità e per la rigidità strutturale. Inoltre, nella sua sequenza nucleotidica è presente un sito di restrizione conveniente per il clonaggio (*Cpo I*) a livello del suo sito attivo accessibile al solvente.

Il costrutto risultante, denominato pT7Kan-Trx/C2, ha mostrato di esprimere un polipeptide in cui C2 è inserito all'interno dello scheletro della tioredossina (**Figura 27**).

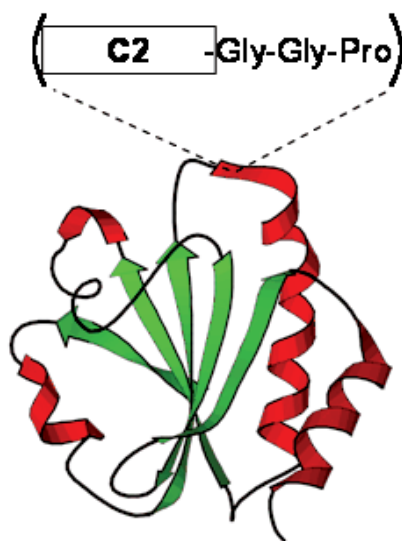


Figura 27. Rappresentazione schematica del peptide C2, mimotopo di AFB₁, coniugato alla molecola della tioredossina, esposto a livello del sito attivo accessibile al solvente. In seguito alla digestione con *Cpo I*, funzionale al clonaggio in questa posizione, un linker Gly-Gly-Pro è stato incorporato nella porzione N-terminale del DNA codificante per C2. Questo ha determinato la possibilità di clonare in tandem copie multiple del gene C2 evitando la formazione di epitopi giunzionali.

In tal modo, la flessibilità conformazionale del peptide C2 in soluzione risulta diminuita e la stabilità alla proteolisi aumentata. In seguito alla digestione con *Cpo I*, funzionale al clonaggio in questa posizione, è stato incorporato, nella porzione N-terminale del DNA codificante per C2, un linker Gly-Gly-Pro. Questo ha determinato la

possibilità di clonare in tandem copie multiple del gene C2, evitando la formazione di epitopi giunzionali. In seguito alla trasformazione di cellule di *E. coli* con il costrutto, sono stati prodotti i polipeptidi ricombinanti solubili Trx/C2₍₁₎, Trx/C2₍₄₎ e Trx/C2₍₇₎, contenenti rispettivamente 1, 4 e 7 ripetizioni del mimotopo C2 all'interno dello scheletro di Trx, e il polipeptide ricombinante purificato da corpi di inclusione Trx/C2₍₇₎, contenente 7 ripetizioni del mimotopo C2.

3.2.4 Realizzazione di un peptide mimotopo di AF coniugato a cianovirina

Al fine di verificare il potere immunogeno di un ulteriore vaccino totalmente ricombinante coniugato ad una molecola proteica diversa dalla tioredossina, la sequenza codificante per C2 è stata clonata nel plasmide pT7Kan-NcCVNH0 all'interno della sequenza codificante per la cianovirina batterica. Questa proteina è stata scelta come carrier in quanto caratterizzata da una struttura globulare e compatta, evidenziata recentemente da una dettagliata analisi strutturale, dimensioni contenute (101 aa) e un loop esposto ed accessibile al solvente, in cui è possibile inserire un peptide esogeno (**Figura 28**).

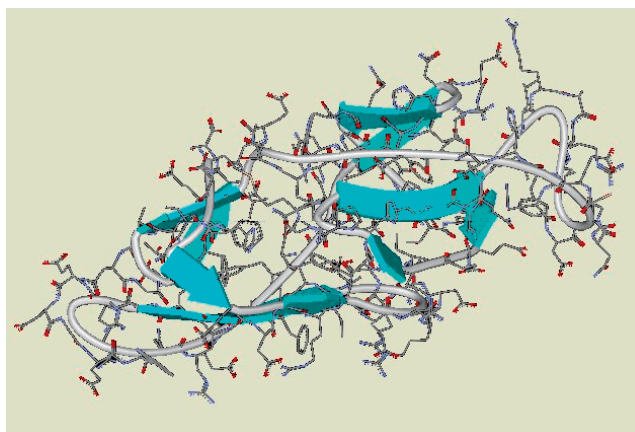


Figura 28. Immagine, realizzata con il programma Rasmol, della cianovirina (NcCVNH0, *Neurospora crassa* CyanoVirin-N Homologous type-0). L'analisi strutturale della NcCVNH0 rivela la presenza di due ripetizioni in tandem (come risultato della duplicazione genica durante l'evoluzione della proteina), ognuna costituita da circa 50aa. Come rivelato da studi NMR, tali ripetizioni si ripiegano in due domini simmetrici, A e B, formati da uno scambio intermolecolare di filamenti. Il dominio A contiene l'estremità N- e C- terminale e comprende i residui 1-39 e 90-101; il dominio B comprende i residui 40-89. Il sito di clonaggio, indicato dalla freccia, si trova a livello di un loop esposto accessibile al solvente corrispondente ai residui aminoacidici 32-33.

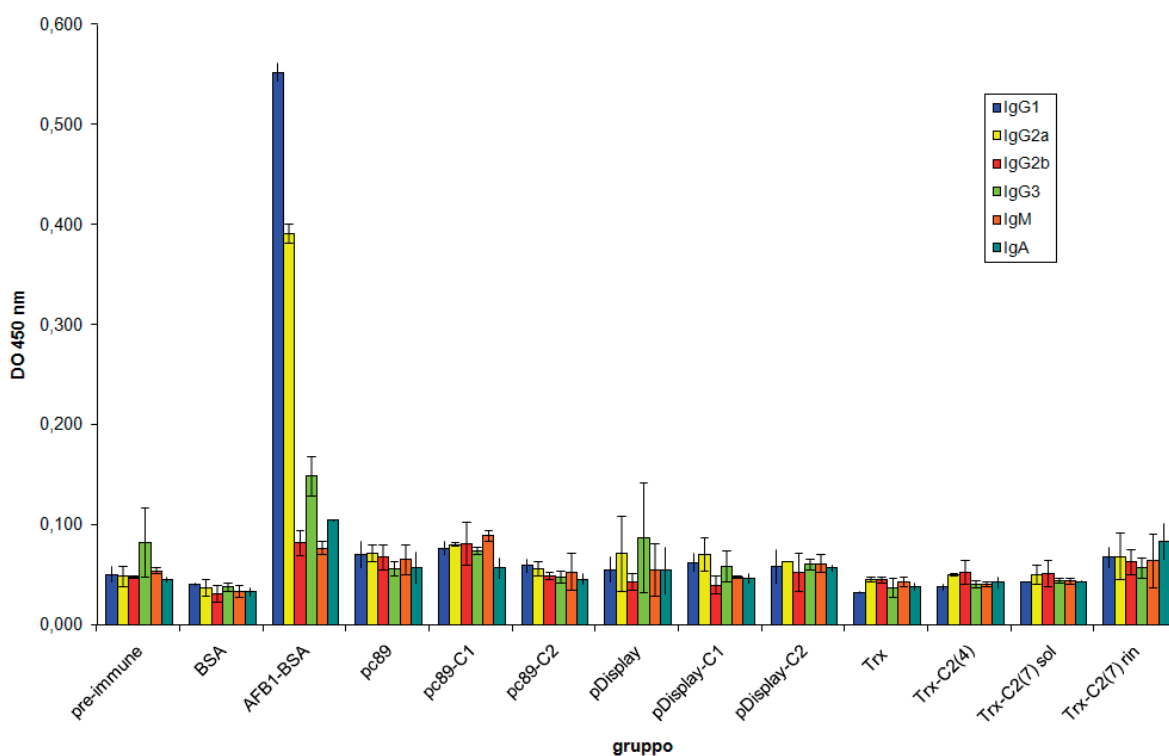
Il costrutto risultante in seguito al clonaggio, denominato pT7Kan-NcCVNH0/C2, ha mostrato di esprimere un polipeptide in cui C2 è inserito all'interno dello scheletro della tioredossina (**Figura 29**). Così come nel caso di Trx, anche per NcCVNH0 è stato possibile ottenere costrutti chimerici recanti un diverso numero di copie del peptide mimotopo (aptameri) disposte in tandem, allo scopo di valutarne l'efficacia nell'induzione di Ab specifici per AFB₁ in relazione al numero degli inserti. In seguito alla trasformazione di cellule di *E. coli* con il costrutto, sono stati prodotti i polipeptidi ricombinanti solubili i NcCVNH0/C2₍₁₎, NcCVNH0/C2₍₂₎, NcCVNH0/C2₍₃₎, NcCVNH0/C2₍₄₎, NcCVNH0/C2₍₆₎, contenenti rispettivamente 1, 2, 3, 4 e 6 ripetizioni del mimotopo all'interno della sequenza aminoacidica della NcCVNH0, ed i polipeptidi ricombinanti purificati da corpi di inclusione NcCVNH0/C2₍₂₎, NcCVNH0/C2₍₃₎ e NcCVNH0/C2₍₄₎, contenenti rispettivamente 2, 3 e 4 ripetizioni del mimotopo all'interno della sequenza aminoacidica della NcCVNH0.



Figura 29. Rappresentazione schematica del peptide C2, mimotopo di AFB₁, coniugato alla molecola della cianovirina, esposto a livello del sito attivo accessibile al solvente. In seguito alla digestione con *Cpo I*, funzionale al clonaggio in questa posizione, un linker Gly-Gly-Pro è stato incorporato nella porzione N-terminale del DNA codificante per C2. Questo ha determinato la possibilità di clonare in tandem copie multiple del gene C2 evitando la formazione di epitopi giunzionali.

3.2.5 Valutazione comparativa della specificità immunogena dei costrutti prodotti

Sono stati eseguiti prelievi di sangue prima e dopo il periodo di immunizzazione degli animali con pC89-C1, pC89-C2, pDisplay-C1, pDisplay-C2, Trx/C2_(n) o NcCVNH0/C2_(n) e con i rispettivi controlli (giorni 0 e 50). I sieri raccolti successivamente al periodo di immunizzazione sono stati saggiati, mediante saggi immunoenzimatici diretti, al fine di verificare la presenza di Ab specifici nei confronti di AFB₁, comparativamente ai sieri pre-immuni ed ai sieri dei gruppi di controllo. Per ogni gruppo, inoltre, i pool dei sieri raccolti il giorno 50 sono stati saggiati, mediante saggio immunoenzimatico di cattura diretto, al fine di determinare il profilo isotipico delle Ig prodotte in seguito ad immunizzazione. Dall'analisi sierologica è emerso che, differentemente dall'immunogeno rappresentato da AFB₁-BSA, i peptidi mimotopi, ricombinanti e genici, espressi nei sistemi di immunizzazione finora esaminati, non sono in grado di indurre livelli apprezzabili di Ab specifici nei confronti di AFB₁ (**Figura 30**).



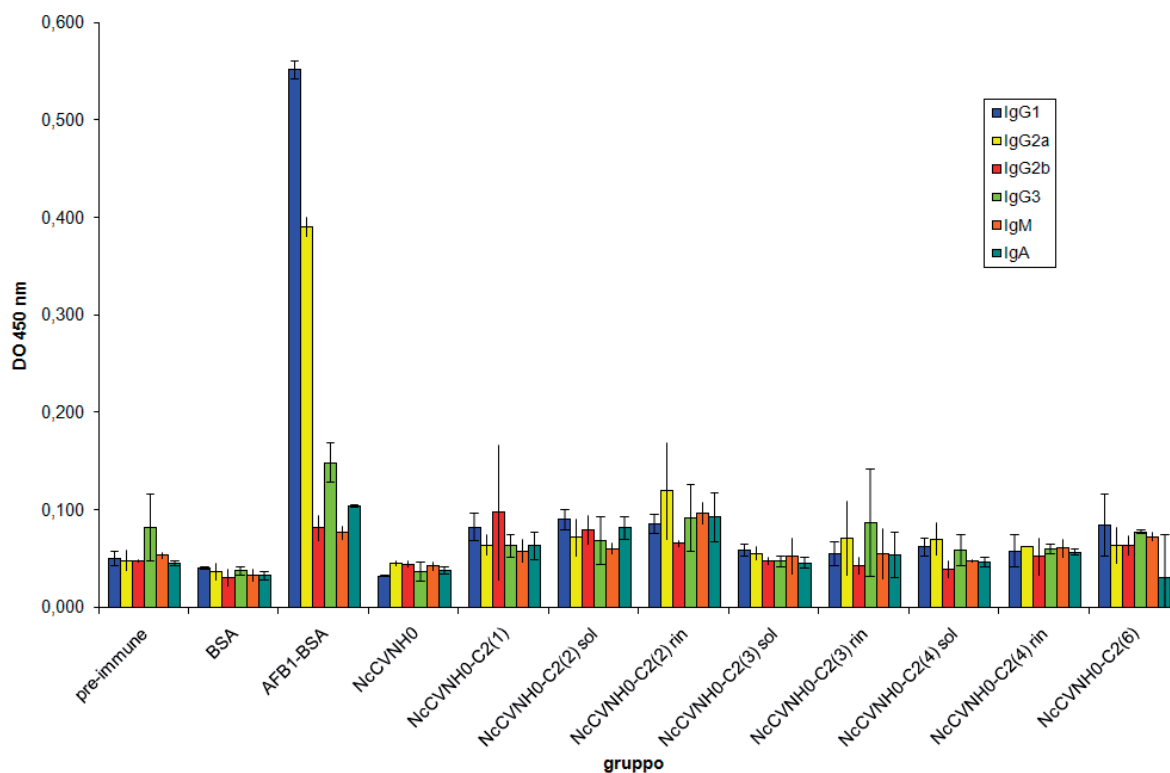


Figura 30. Determinazione isotipica delle immunoglobuline prodotte in seguito all'immunizzazione con diversi costrutti. I pool dei sieri raccolti successivamente al periodo di immunizzazione (giorno 50) sono stati saggati, comparativamente a pool di sieri di topi immunizzati con AFB₁-BSA o BSA, mediante saggio immunoenzimatico di cattura diretto con Ab monoclonali di ratto diretti contro le catene γ_1 , γ_{2a} , γ_{2b} , γ_3 , μ ed α di topo, al fine di determinare l'eventuale risposta specifica per AFB₁.

3.3 PRODUZIONE E VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA IMMUNOGENA DI ANAFB₁

3.3.1 Modificazione chimica di AFB₁

In collaborazione con il Prof. Sforza del Dipartimento di Chimica Organica ed Industriale dell'Università di Parma, AFB₁ è stata convertita in AFB₁-1-(O-carbossimetil) ossima (AnAFB₁) secondo il metodo di Chu et al. (383), introducendo in posizione-1 della molecola di AFB₁ un gruppo carbossilico libero (**Figura 31**).

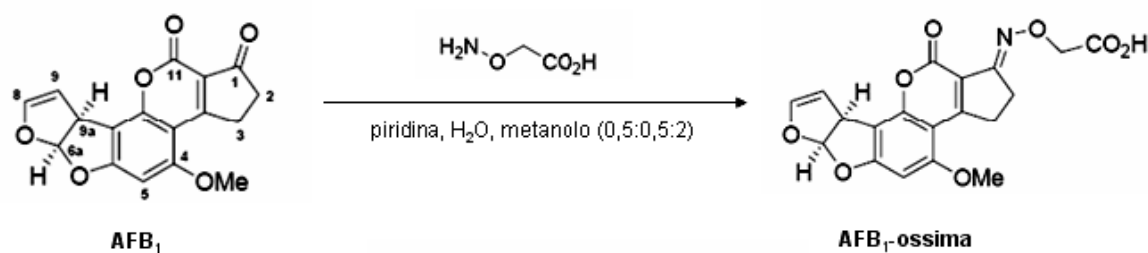


Figura 31. Sintesi di AFB₁-1-(O-carbossimetil) ossima (AnAFB₁). Mediante reazione con carbossimetilidrossilamina (H₂N-O-CH₂-CO₂H) è stato introdotto in posizione-1 di AFB₁ un gruppo carbossilico libero.

L'identità del prodotto è stata, successivamente, confermata attraverso analisi UPLC-MS. I composti presenti in soluzione sono stati prima separati mediante cromatografia liquida ad alta pressione (UPLC) (**Figura 32**), quindi identificati utilizzando uno spettrometro di massa (Mass Spectrometer, MS) (**Figura 33**). Come evidenziato dall'analisi HPLC-MS, la reazione ha avuto una ottima resa in quanto l'80% di AFB₁ è stato convertito in AnAFB₁.

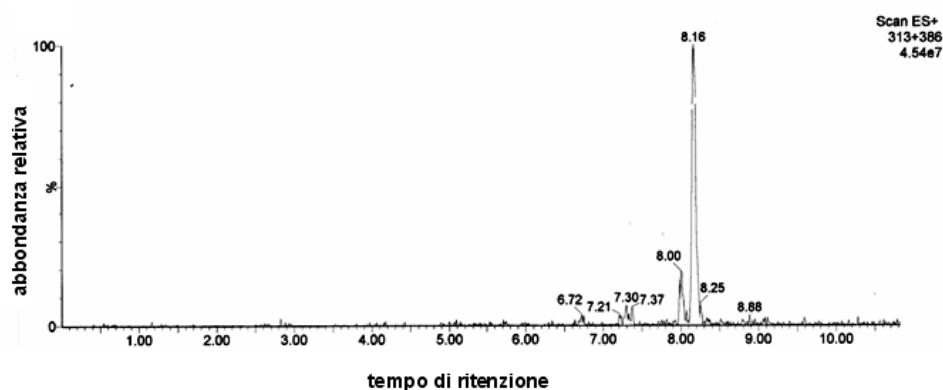


Figura 32. Analisi cromatografica della miscela di reazione per la produzione di AnAFB₁. Il cromatogramma riporta la misura del segnale prodotto dal rivelatore in funzione del tempo di ritenzione e del volume di eluizione. Ciascun picco del cromatogramma corrisponde ad uno specifico analita, con un determinato tempo di ritenzione, separato nel processo cromatografico. Attraverso l'analisi degli spettri di massa relativi a ciascun picco è stato identificato il picco corrispondente ad AFB₁ (tempo di ritenzione 8,0) e ad AnAFB₁ (tempo di ritenzione 8,16). Analizzando l'abbondanza relativa (calcolata in base al volume di eluizione) delle due molecole è stata determinata una resa della reazione pari all'80%.

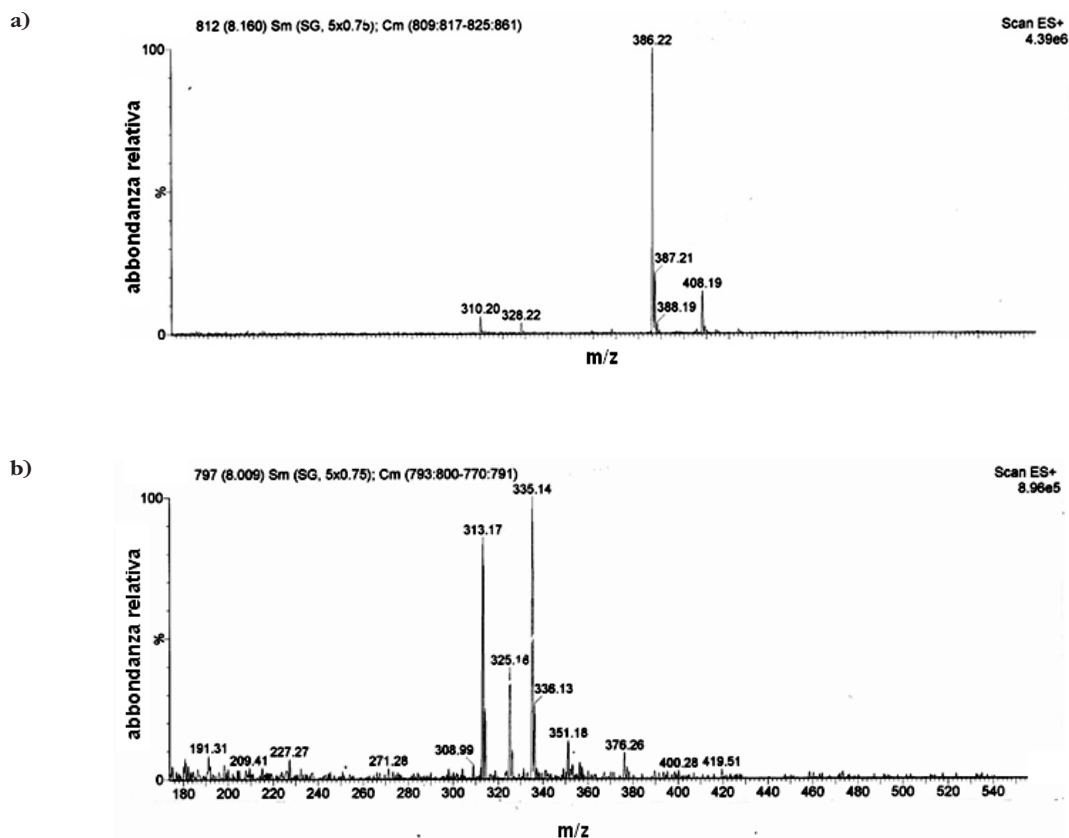


Figura 33. Spettro di massa in corrispondenza del tempo di ritenzione 8,16 (a) e 8,00 (b). Il diagramma riporta l'abbondanza di ogni ione in funzione del rapporto massa/carica (m/z), tipico di ogni composto in quanto direttamente correlato alla sua struttura chimica ed alle condizioni di ionizzazione cui è stato sottoposto. Le abbondanze sono riportate come rapporto percentuale rispetto al picco base, che è il picco più abbondante osservato nello spettro. In Figura (a) il picco base coincide con il picco genitore, corrispondente allo ione molecolare AnAFB₁ (AnAFB₁ + H⁺, peso molecolare 385,22+1). In Figura (b) il picco base corrisponde al peso molecolare di AFB₁ ionizzata (AFB₁ + H⁺, peso molecolare 312.17+1, picco genitore) addizionato al peso atomico dello ione sodio (peso atomico 22).

3.4 PROVE DI TOSSICITÀ *IN VITRO* PER AFB₁ E ANAFB₁

3.4.1 Saggio dell'effetto di AFB₁ e AnAFB₁ su linee cellulari di carcinoma epatico

È stato messo a punto un modello di valutazione *in vitro* degli effetti tossici di AFB₁ su linee cellulari di epatoblastoma umano HepG2. Queste cellule presentano un fenotipo tipico degli epatociti, inclusi molti enzimi inducibili e il recettore degli idrocarburi aromatici (435). Nella prova, sono state saggiate differenti quantità di AFB₁ al fine di definire la concentrazione minima in grado di manifestare un chiaro effetto citotossico su linee cellulari di epatoblastoma umano HepG2. La dose di AFB₁ in grado di inibire il 50% della proliferazione cellulare (IC₅₀), comparativamente a cellule non trattate utilizzate come controllo, è stata determinata mediante saggio di proliferazione cellulare con alamar blue. Tale saggio permette di differenziare le cellule in crescita dalle cellule morte, sfruttando il potere riducente degli intermedi metabolici prodotti dalle cellule in crescita attiva. Quando alamar blue accetta elettroni da questi composti passa dalla forma ossidata, con assorbimento a 600 nm (indigo blue), alla forma ridotta (rosa) con assorbimento a 570 nm. La proliferazione può, quindi, essere monitorata allo spettrofotometro misurando la variazione di assorbanza. Come mostrato in **Figura 34** il valore di IC₅₀ è stato determinato in corrispondenza di 22 µg /ml AFB₁.

Il saggio di proliferazione cellulare con alamar blue per la determinazione della tossicità di AFB₁, messo a punto su linee cellulari di epatoblastoma umano HepG2, è stato utilizzato per esaminare *in vitro* la tossicità di differenti concentrazioni di AnAFB₁. Come mostrato in **Figura 35**, non sono stati riscontrati effetti citotossici significativi per concentrazioni di AnAFB₁ fino a cinque volte maggiori della IC₅₀ determinata per AFB₁ (22 µg/ml).

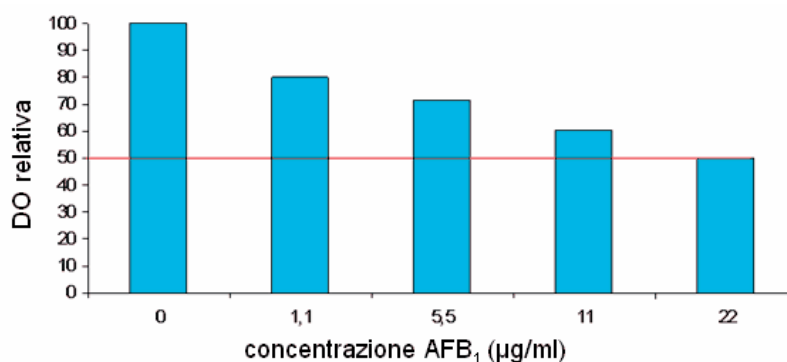


Figura 34. Effetto tossico di quantità crescenti di AFB₁ su linee cellulari di epatoblastoma umano HepG2. La proliferazione cellulare, determinata mediante saggio colorimetrico con alamar blue, è rappresentata come valore di DO relativo, riportato come rapporto percentuale rispetto al valore di DO letto a 570 nm per cellule non esposte ad AFB₁.

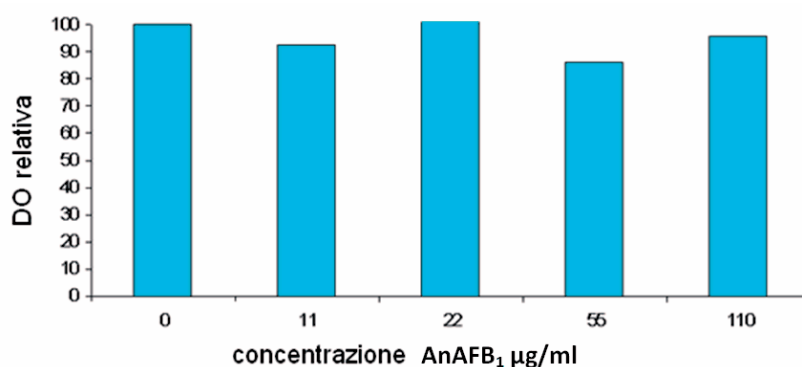


Figura 35. Effetto tossico di quantità crescenti di AnAFB₁ su linee cellulari di epatoblastoma umano HepG2. La proliferazione cellulare, determinata mediante saggio colorimetrico con alamar blue, è rappresentata come valore di DO relativo, riportato come rapporto percentuale rispetto al valore di DO letto a 570 nm per cellule non esposte ad AnAFB₁.

3.4.2 Saggio di mutagenesi su ceppi di *Salmonella typhimurium*

La determinazione della mutagenicità di AFB₁ e AnAFB₁ è stata effettuata mediante il test di Ames (*Salmonella*/microsomi) (428, 429), un saggio di mutagenesi a breve termine su batteri che permette di evidenziare mutazioni puntiformi (sostituzioni, inserzioni o delezioni di basi), in grado di indurre revertanti *his*⁺ in ceppi di *S. typhimurium* auxotrofi per questo aminoacido. La dimostrazione di una elevata correlazione tra la mutagenicità in *Salmonella* ed effetti genotossici e carcinogenici nei mammiferi (436) ha determinato l'ampio utilizzo del test di Ames come saggio preliminare per l'identificazione di sostanze ad attività mutagena (437-439).

Al fine di evidenziare diversi tipi di mutazioni puntiformi, sono stati utilizzati i due ceppi di *S. typhimurium* TA 98 e TA 100, eseguendo i saggi con attivazione metabolica esogena, aggiungendo enzimi microsomiali di fegato di ratto (S9) precedentemente trattato con un induttore specifico per stimolare la sintesi di enzimi che consentono l'attivazione metabolica delle sostanze promutagene (Aroclor 1254).

Con il metodo di incorporazione in piastra, sono state saggiate, in triplo, tre dosi crescenti di AFB₁ e AnAFB₁. Le colonie di revertanti sono state contate dopo 48 ore di incubazione delle piastre in termostato a 37°C, applicando il criterio del raddoppio per stimare la mutagenicità delle tossine: una sostanza viene considerata mutagena quando il rapporto tra il numero dei revertanti da essa indotti e quello dei revertanti spontanei del sistema di controllo negativo risulta maggiore di 2 (440). Le significatività delle differenze nel numero dei revertanti sono state valutate utilizzando il test *t* di Student, considerando statisticamente significativa una probabilità $P < 0,05$.

I risultati riportati in **Tabella 5** mostrano che AFB₁ è stata in grado di indurre una forte risposta mutagena, concentrazione dipendente, in *S. typhimurium* TA98 e TA 100 alla concentrazione di 100 e 200 ng/piastra. In particolare, alla concentrazione di 200 ng/piastra, i campioni di AFB₁ sono risultati positivi per i ceppi TA98 e TA 100, con una risposta di circa 51 e 24 volte maggiore rispetto ai controlli negativi. Per entrambi i ceppi, alla concentrazione di 500 ng/piastra è stata osservata una attenuazione della attività mutagena.

	Dose (ng/piastra)	Revertanti per piastra	
		TA 98	TA 100
AFB ₁	0	6 ± 2	25 ± 22
	100	175 ± 31	133 ± 21
	200	307 ± 49	622 ± 47
	500	50 ± 5	335 ± 35
AnAFB ₁	0	6 ± 2	25 ± 22
	100	2 ± 1	26 ± 14
	200	2 ± 2	5 ± 2
	500	4 ± 2	59 ± 25

Tabella 5. Effetto di AFB₁ e AnAFB₁ sull'induzione di revertanti *bis*⁺ nei ceppi TA 98 e TA 100 di *S. typhimurium* incubati in presenza di enzimi microsomiali di fegato di ratto (S9). Il numero dei revertanti per ogni ceppo è riportato ± DS.

AnAFB₁, al contrario, non ha indotto alcuna risposta mutagenica in *S. typhimurium* TA98 o TA 100 a concentrazioni fino a 200 ng/piastra. Alla concentrazione di 500 ng/piastra è stata osservata, solo nel ceppo TA 100, una debole attività mutagenica (risposta di circa 2,36 volte rispetto ai controlli negativi).

Per l'analisi quantitativa della mutagenicità sono state costruite delle curve dose/risposta, riportando i ng di campione incorporati in piastra in funzione del numero dei revertanti per piastra (**Figura 36**). La mutagenicità è stata valutata come coefficiente angolare della retta di regressione, calcolata nel tratto lineare delle curve al fine di eliminare interferenze dovute all'eventuale presenza di effetti tossici o altri effetti inibenti l'attività mutagenica dei campioni. Ogni punto della curva dose-risposta rappresenta, per ogni concentrazione, la media del numero di revertanti osservato in tre piastre. Il potere mutageno relativo di AnAFB₁, definito come rapporto percentuale tra il coefficiente angolare calcolato per AnAFB₁ e il coefficiente angolare calcolato per AFB₁, risulta essere pari a 2,53% in TA 100 e zero in TA 98.

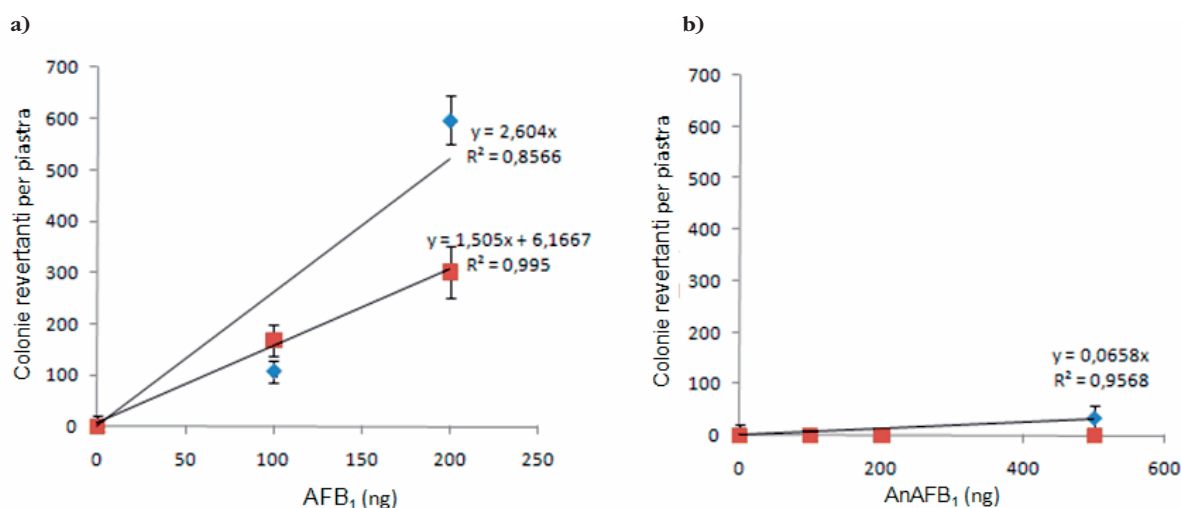


Figura 36. Risposta mutagenica indotta nei ceppi di *S. typhimurium* TA 98 (■) e TA 100 (◆) incubati, in presenza di sistema di attivazione metabolica, con AFB₁ (a) e AnAFB₁ (b). I punti in grafico rappresentano la media ± DS di tre piastre replicate. Il numero di revertanti spontanei di 6 ± 2 e 25 ± 22 , ottenuto rispettivamente per *S. typhimurium* TA 98 e TA 100, è stato sottratto prima del calcolo della curva dose-risposta.

3.5 PRODUZIONE DELL'IMMUNOGENO ANAFB₁-KLH

La produzione del coniugato AnAFB₁-KLH è stata eseguita secondo le seguenti modalità:

3.5.1 Sintesi del coniugato AnAFB₁-KLH

Il processo di conversione di AFB₁ in AnAFB₁, precedentemente descritto, ha portato all'introduzione, in posizione-1 della molecola di AFB₁, di un gruppo carbossilico libero, in grado di reagire in modo covalente con molecole recanti gruppi amminici primari, quali ad esempio le proteine. È stato, quindi, possibile coniugare AnAFB₁ alla proteina carrier KLH, attivando il gruppo carbossilico mediante la sintesi di un estere attivo (**Figura 37**).

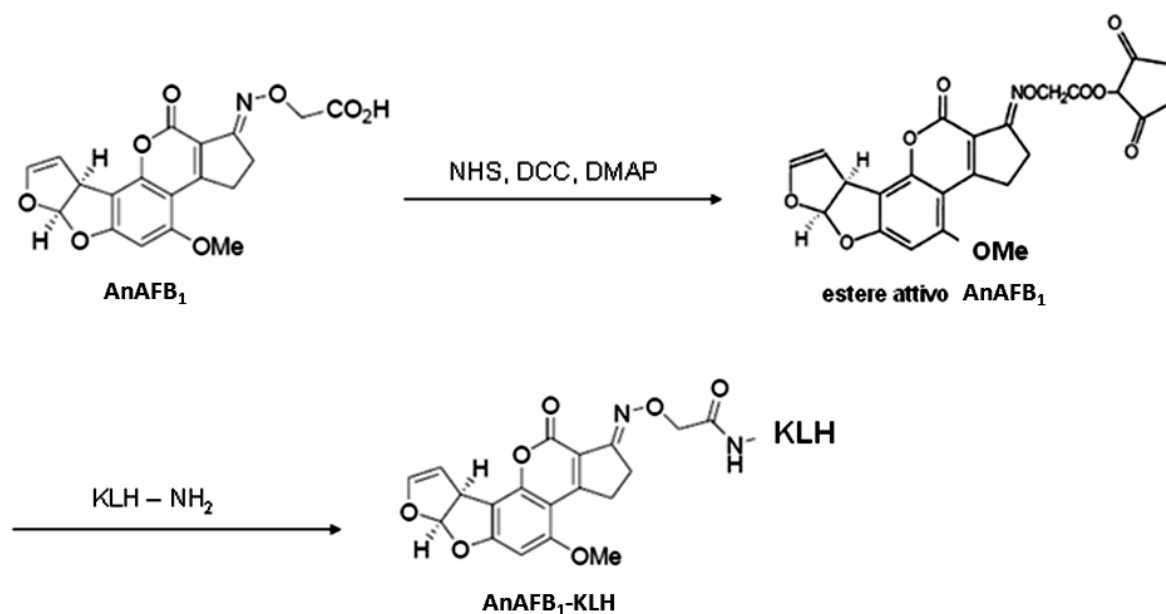


Figura 37. Coniugazione di AnAFB₁ a KLH mediante attivazione del gruppo carbossilico di AnAFB₁, con formazione di un estere attivo. L'acido carbossilico attivato è in grado di reagire con i gruppi amminici primari presenti sulla proteina KLH formando legami amidici, dando origine al coniugato AnAFB₁-KLH. (NHS, *N*-idrossisuccinimide; DCC, 1,3-dicicloesilcarbodiimide; DMAP, 4-(dimetilamino)piridina).

3.5.2 Determinazione del rapporto di coniugazione AnAFB₁-KLH

Il numero di moli di AnAFB₁ coniugata ad ogni mole di KLH (rapporto di coniugazione), è stato ottenuto calcolando la concentrazione di AnAFB₁ coniugata come differenza tra la concentrazione di AnAFB₁ totale, determinata mediante analisi fluorimetrica, e la concentrazione di AnAFB₁ libera, rimasta in soluzione dopo la dialisi, determinata mediante HPLC-MS. Date le elevate dimensioni della proteina KLH (400 KDa per subunità), non è stato infatti possibile determinare direttamente in HPLC-MS la concentrazione di AnAFB₁ coniugata a KLH. Il fluorimetro è stato calibrato registrando, da 390 a 600 nm, l'intensità della fluorescenza emessa da cinque soluzioni standard di AnAFB₁ a concentrazione nota. Dal momento che l'intensità di fluorescenza (I_F) è proporzionale alla concentrazione della specie chimica, è stato possibile ottenere una retta di taratura misurando il valore di I_F massimo registrato nello spettro di fluorescenza delle cinque miscele di AnAFB₁ a concentrazione nota e ponendo i valori ottenuti in grafico in funzione della concentrazione (**Figura 38a**). Il valore ottenuto misurando la I_F corrispondente al picco nello spettro di fluorescenza della soluzione di reazione è stato, quindi, convertito in concentrazione tramite retta di calibrazione. Come mostrato in **Figura 38b**, la concentrazione di AnAFB₁ totale nella soluzione di reazione è risultata essere 0,0673 mg/ml. Si è determinata, quindi, la concentrazione di AnAFB₁ libera presente in soluzione mediante spettrometria di massa. A tale scopo, sono stati registrati gli spettri di massa di cinque soluzioni standard di AnAFB₁ a concentrazione nota.

Dal momento che l'area del picco risultante dalla corrente ionica totale di ogni analita è proporzionale alla concentrazione della specie chimica corrispondente, è stato possibile ottenere una retta di taratura integrando il picco molecolare di AnAFB₁ registrato per gli standard e ponendo i valori ottenuti in grafico in funzione della concentrazione. L'analisi quantitativa di AnAFB₁ non coniugata è stata effettuata integrando il picco risultante dalla corrente ionica totale dell'analita nella soluzione di reazione.

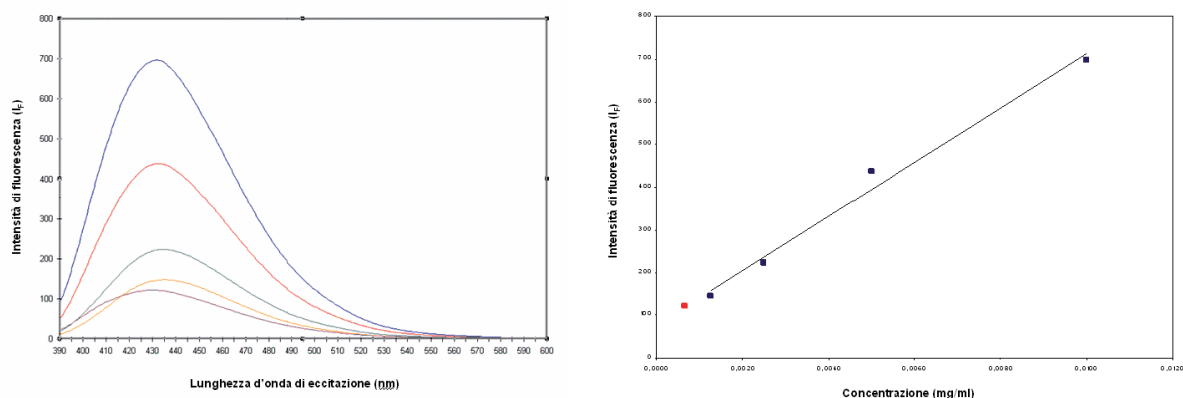


Figura 38. (a) Spettro di fluorescenza di cinque soluzioni standard di AnAFB₁ (0,01 mg/ml, blu; 0,05 mg/ml, rosso; 0,025 mg/ml, grigio; 0,0125 mg/ml, oro) e della soluzione di reazione (viola) eccitate da 390 a 600 nm. Il picco di intensità di fluorescenza (I_F) per AnAFB₁ si trova in corrispondenza della lunghezza d'onda di eccitazione di 432 nm. (b) Retta di calibrazione costruita riportando i valori dei picchi dello spettro di fluorescenza di cinque soluzioni standard in funzione della concentrazione di AnAFB₁ (0,01 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,025 mg/ml o 0,0125 mg/ml) (◆). Dalla regressione lineare dei dati secondo il metodo dei minimi quadrati, si ottiene una retta ($Y = mX + q$) con coefficiente angolare $m = 63430,61$, intercetta $q = 78,37744$ e coefficiente di correlazione $R^2 = 0,9865$. La concentrazione di AnAFB₁ totale presente nella soluzione di reazione, pari a 0,0673 mg/ml, è stata ottenuta misurando il picco di intensità nello spettro di emissione di una diluizione 1:100 del campione e convertendo tale misura in concentrazione tramite retta di calibrazione (■).

Come mostrato in **Figura 39**, il valore di area ottenuto è stato convertito in concentrazione tramite retta di calibrazione. La concentrazione di AnAFB₁ non coniugata rimasta in soluzione dopo la dialisi è risultata essere 0,0039 mg/ml.

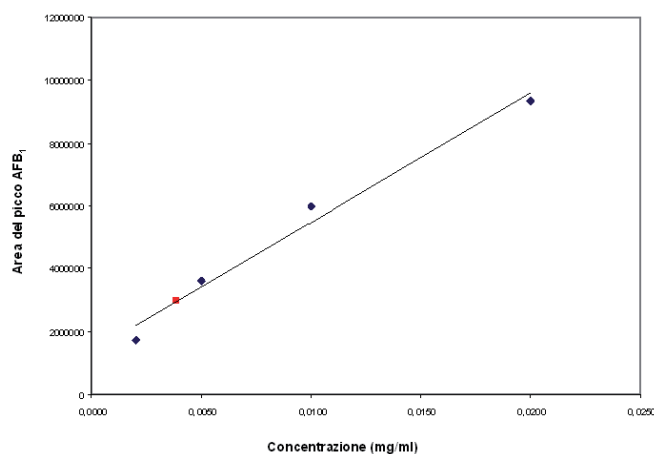


Figura 39. Retta di calibrazione costruita riportando i valori di area ottenuti integrando i picchi corrispondenti ad AnAFB₁ registrati negli spettri di massa di cinque soluzioni standard in funzione della concentrazione di tossina presente (0,02 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,005 mg/ml o 0,002 mg/ml) (◆). Dalla regressione lineare dei dati secondo il metodo dei minimi quadrati, si ottiene una retta ($Y = mX + q$) con coefficiente angolare $m = 4,13 \cdot 10^8$, intercetta $q = 1,3 \cdot 10^6$ e coefficiente di correlazione $R^2 = 0,9821$. Il valore di area ottenuto misurando l'area del picco corrispondente ad AnAFB₁ nello spettro di massa della soluzione di reazione è stato convertito in concentrazione tramite retta di calibrazione (■). La concentrazione di AnAFB₁ calcolata è pari a 0,0039 mg/ml.

Sottraendo il valore della concentrazione di AnAFB₁ libera dal valore di concentrazione di AnAFB₁ totale è stata calcolata la concentrazione di AnAFB₁ legata, da cui è stato derivato il numero di molecole di AnAFB₁ legate (peso molecolare di AnAFB₁ = 386,22). Il rapporto di coniugazione è stato calcolato dal rapporto tra il numero di moli di KLH utilizzate per la reazione e il numero di moli di AnAFB₁ legate, ed è risultato essere pari a 6,4 mol AFB₁: 1 mol KLH.

3.6 VALUTAZIONE DELL'INDUZIONE DI AB SPECIFICI PER AFB₁ IN VACCHE IMMUNIZZATE CON ANAFB₁-KLH

Al fine di suscitare, in bovini, la produzione di Ab specifici per AFB₁, vacche da latte di razza Frisona Italiana alla prima lattazione, stabulate presso il Centro di Ricerche Zootecniche (CeRZoo) dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza, sono state immunizzate per via sistemica, mediante ripetuti inoculi di AnAFB₁-KLH, comparativamente ad animali immunizzati con KLH, utilizzati come controllo. Per ognuno degli animali sottoposti ad immunizzazione per via *i.m.* con AnAFB₁-KLH, i sieri raccolti sono stati saggiati, mediante metodi immunoenzimatici indiretti basati sull'utilizzo di AFB₁-BSA, al fine di verificare la presenza di Ab specifici nei confronti di AFB₁, comparativamente ai sieri raccolti prima dell'immunizzazione (giorno 0) ed ai sieri degli animali del gruppo di controllo. La specificità del legame per AFB₁ è stata valutata saggiando gli stessi sieri nei confronti di BSA per escludere la presenza di Ab diretti contro la porzione proteica del coniugato utilizzato nel saggio immunoenzimatico.

Durante il periodo di immunizzazione, sono stati determinati, mediante saggi immunoenzimatici indiretti, i titoli di Ab specifici per AFB₁ prima e dopo ogni somministrazione di immunogeno. Il titolo di Ab specifici è stato arbitrariamente definito come la maggiore diluizione di antisiero in grado di determinare una OD₄₅₀ maggiore di 0,1 U rispetto alla lettura effettuata con il siero pre-immune alla stessa diluizione.

3.6.1 Esperimento pilota

In un esperimento preliminare, due vacche di razza Frisona Italiana sono state

immunizzate per via *i.m.* con il coniugato AnAFB₁-KLH, addizionato di adiuvante di Freund completo (prima dose) o incompleto (tre richiami successivi), comparativamente al gruppo di controllo, costituito da due vacche immunizzate con KLH non coniugato ed adiuvante di Freund (completo e incompleto). Come mostrato in **Figura 40a**, in seguito alla somministrazione delle quattro dosi di immunogeno, in entrambe le vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH è stato riscontrato un significativo titolo di Ab sierici specifici per AFB₁, che risultavano assenti nei sieri di vacche immunizzate con il solo KLH. A dimostrazione della specificità per AFB₁ degli Ab rilevati mediante saggi immunoenzimatici indiretti nei confronti di AFB₁-BSA, nessuno dei sieri analizzati mostrava reattività con la sola BSA (**Figura 40b**).

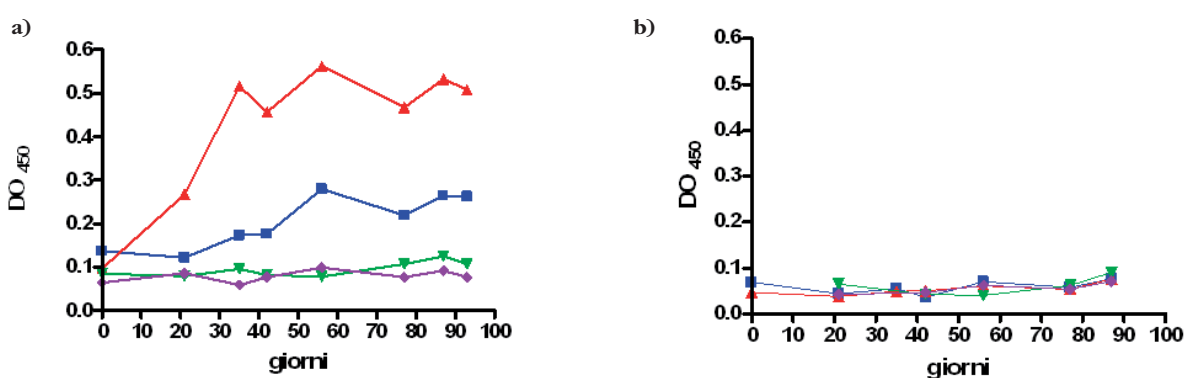


Figura 40. Immunizzazione sistemica di vacche con AnAFB₁-KLH (n. 203 —■—; n. 250 —▲—) o KLH (n. 290 —▼—; n. 293 —◆—) e adiuvante di Freund completo (giorno 0) o incompleto (giorno 21, 42, 63). **a)** Saggio immunoenzimatico indiretto eseguito con il coniugato eterologo AFB₁-BSA come Ag preadsorbito ai pozzetti di piastre per microtitolazione. **b)** Saggio immunoenzimatico indiretto eseguito con BSA come Ag preadsorbito ai pozzetti di piastre per microtitolazione.

I titoli di Ab specifici per AFB₁ rilevati nei sieri delle vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH hanno raggiunto un picco dopo il terzo richiamo (12 settimane dall'inizio dell'immunizzazione). Al contrario, nei sieri raccolti precedentemente all'immunizzazione e nei sieri raccolti in vacche immunizzate con il solo KLH, non è stato possibile rilevare titoli significativi di Ab specifici per AFB₁ (**Figura 41**).

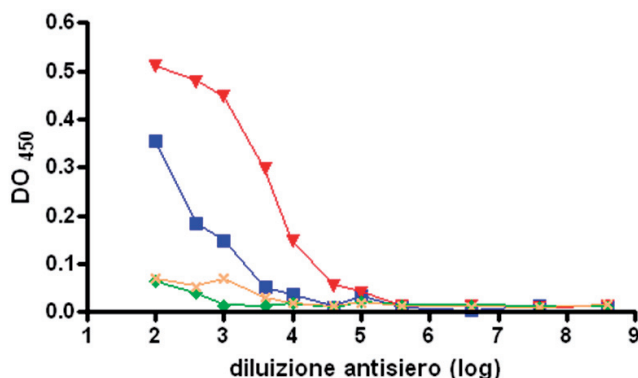


Figura 41. Determinazione dei titoli anticorpali specifici per AFB₁ mediante saggio immunoenzimatico indiretto. I sieri prelevati da vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH dopo il terzo richiamo (dodicesima settimana dall'inizio del processo di immunizzazione) sono stati saggiati comparativamente ai sieri raccolti prima della somministrazione dell'immunogeno dagli stessi animali e ai sieri raccolti alla dodicesima settimana dagli animali del gruppo di controllo, immunizzati con KLH. La titolazione è stata eseguita come descritto nel testo. Le diluizioni dei sieri sono riportate in grafico in scala logaritmica. Simboli: siero ottenuto dalle vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH n. 250 (▲) e n. 203 (■); pool dei sieri raccolti prima dell'immunizzazione dalle vacche n. 250 e 203 (◆); pool dei sieri raccolti dalle vacche immunizzate con KLH (×).

In **Figura 42** sono mostrati i titoli anticorpali degli animali immunizzati con AnAFB₁-KLH rilevati lungo un periodo di 13 settimane dall'inizio del processo di immunizzazione.

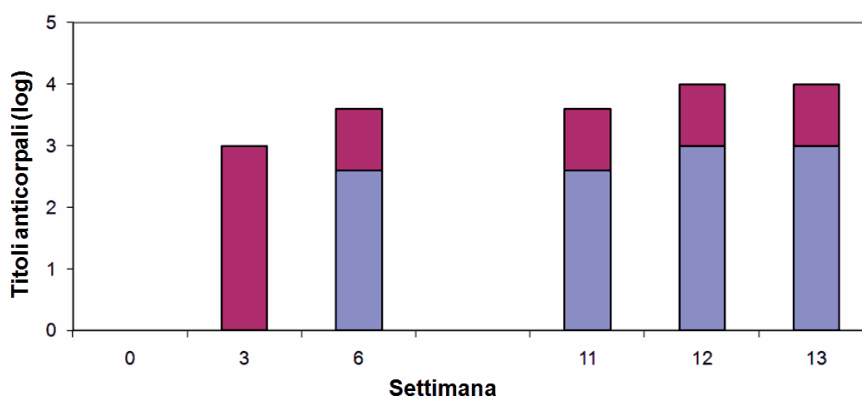


Figura 42. Variazione dei titoli anticorpali specifici per AFB₁ durante il periodo di immunizzazione con AnAFB₁-KLH. Ogni vacca è stata immunizzata inizialmente con 500 µg di AnAFB₁-KLH addizionati di adiuvante (completo) di Freund, eseguendo richiami alla terza, sesta e nona settimana con la stessa quantità di immunogeno addizionato ad adiuvante (incompleto) di Freund. I titoli anticorpali, determinati secondo il metodo descritto nel testo, sono riportati in grafico in scala logaritmica (asse Y). Gli istogrammi blu rappresentano la risposta all'immunizzazione della vacca 203. Gli istogrammi viola rappresentano la risposta della vacca 250.

Il siero della vacca 250, immunizzata con AnAFB₁-KLH, ha mostrato il maggior titolo di Ab specifici per AFB₁. Per questo animale, 12 settimane dopo l'inizio dell'immunizzazione, è stato possibile registrare, secondo la definizione arbitraria precedentemente descritta, un titolo di 10.000, mentre per la vacca 203 un titolo di 1.000.

3.6.2 Vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH e Montanide ISA 563

Sei vacche di razza Frisona Italiana sono state immunizzate *i.m.* con il coniugato AnAFB₁-KLH addizionato di olio minerale Montanide ISA 563, comparativamente ad un gruppo di controllo costituito da sei vacche immunizzate con il solo KLH addizionato di Montanide ISA 563.

Come mostrato in **Figura 43a**, nelle condizioni sperimentali adottate, l'immunizzazione per via *i.m.* di vacche con AnAFB₁-KLH emulsionata ad olio minerale Montanide ISA 563 non è stata in grado di indurre titoli significativi di Ab specifici nei confronti di AFB₁ rilevabili mediante saggi immunoenzimatici indiretti.

Gli stessi campioni sono stati indagati mediante saggi immunoenzimatici indiretti volti a determinare la presenza di Ab specifici nei confronti della proteina carrier KLH. Come mostrato in **Figura 43b**, in tutti i campioni raccolti dopo l'immunizzazione da vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH o KLH, non sono stati rilevati Ab specifici per KLH in quantità statisticamente significativa rispetto ai campioni raccolti prima dell'immunizzazione.

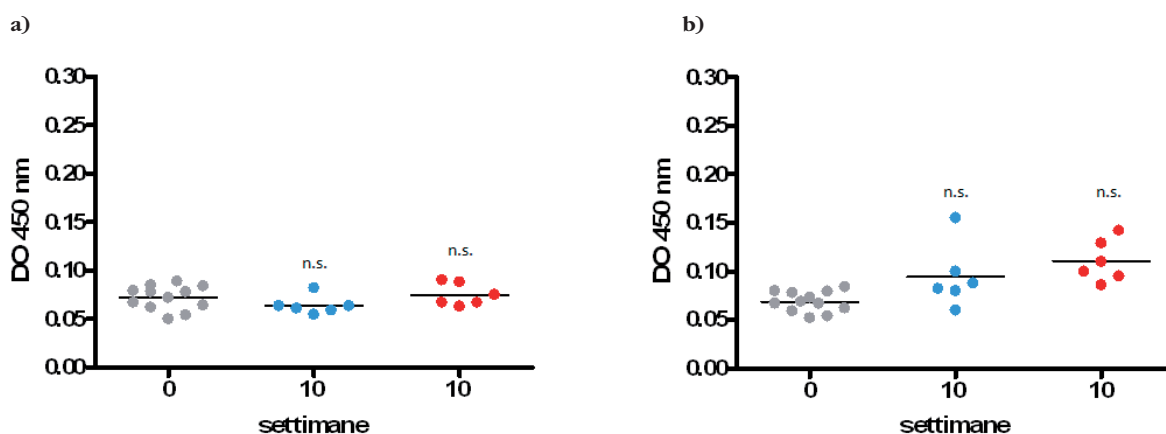


Figura 43. a) Valutazione comparativa dell'induzione di Ab specifici per AFB₁ in vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH (●) o KLH (●) addizionati con Montanide ISA 563. I sieri raccolti prima dell'immunizzazione (●) e dopo una settimana dalla somministrazione dell'ultima dose di vaccino (settimana 10), sono stati saggati, mediante saggio immunoenzimatico indiretto, nei confronti del coniugato eterologo AFB₁-BSA. b) Valutazione comparativa dell'induzione di Ab specifici per KLH in tutte le vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH e KLH addizionati con Montanide ISA 563. I punti in figura corrispondono ai valori di assorbanza a 450 nm letti per ciascun animale di ogni gruppo. Le linee mostrano il valore di assorbanza medio per ogni gruppo (n.s. = non significativo).

3.6.3 Vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH ed adiuvante di Freund

Sei vacche di razza Frisona italiana sono state immunizzate per via *i.m.* con il coniugato AnAFB₁-KLH, comparativamente a vacche di controllo immunizzate con la sola porzione proteica del coniugato (KLH). Durante il corso dell'immunizzazione, sono stati effettuati prelievi di sangue prima dell'iniezione di ogni dose di immunogeno e dopo due settimane, determinando successivamente il titolo di Ab specifici per AFB₁ nel siero mediante saggi immunoenzimatici indiretti, basati sull'utilizzo del coniugato eterologo AFB₁-BSA e, comparativamente, della porzione proteica del coniugato (BSA). I valori medi di OD, misurati per ogni prelievo di ogni animale, sono stati calcolati dai risultati di tre prove ripetute eseguite in doppio. Per compensare gli effetti della variabilità del saggio, i valori di OD sono stati normalizzati rispetto alla media di un opportuno controllo positivo (398). Il titolo anticorpale è stato, arbitrariamente, definito come il reciproco della maggiore diluizione di antisiero in grado di dare un valore di OD maggiore di 0,1 U rispetto al relativo siero preimmune alla stessa diluizione (441). Il risultato della titolazione di Ab specifici per AFB₁ nei sieri prelevati durante il periodo di immunizzazione (10 settimane) per le vacche immunizzate con il coniugato AnAFB₁-KLH, è mostrato in **Figura 44**.

Per ogni vacca, diluizioni seriali del siero raccolto prima del periodo di immunizzazione non hanno mostrato un legame specifico nei confronti di AFB₁-BSA. Nessuno dei sieri raccolti durante il periodo di immunizzazione ha mostrato reattività con BSA non coniugata, a dimostrazione della specificità degli Ab per AFB₁.

Successivamente alla somministrazione di una dose di immunogeno e tre dosi di richiamo (terza, sesta e nona settimana), i titoli di Ab specifici per AFB₁ in vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH hanno mostrato un picco alla decima settimana dall'inizio del processo di immunizzazione. Al contrario, nei sieri di tutte le vacche immunizzate per via *i.m.* con KLH non sono stati rilevati Ab specifici per AFB₁.

Il risultato dei saggi immunoenzimatici indiretti per la titolazione di Ab specifici per

AFB₁ nei sieri raccolti alla decima settimana da tutte le vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH o KLH è mostrato in **Figura 45**.

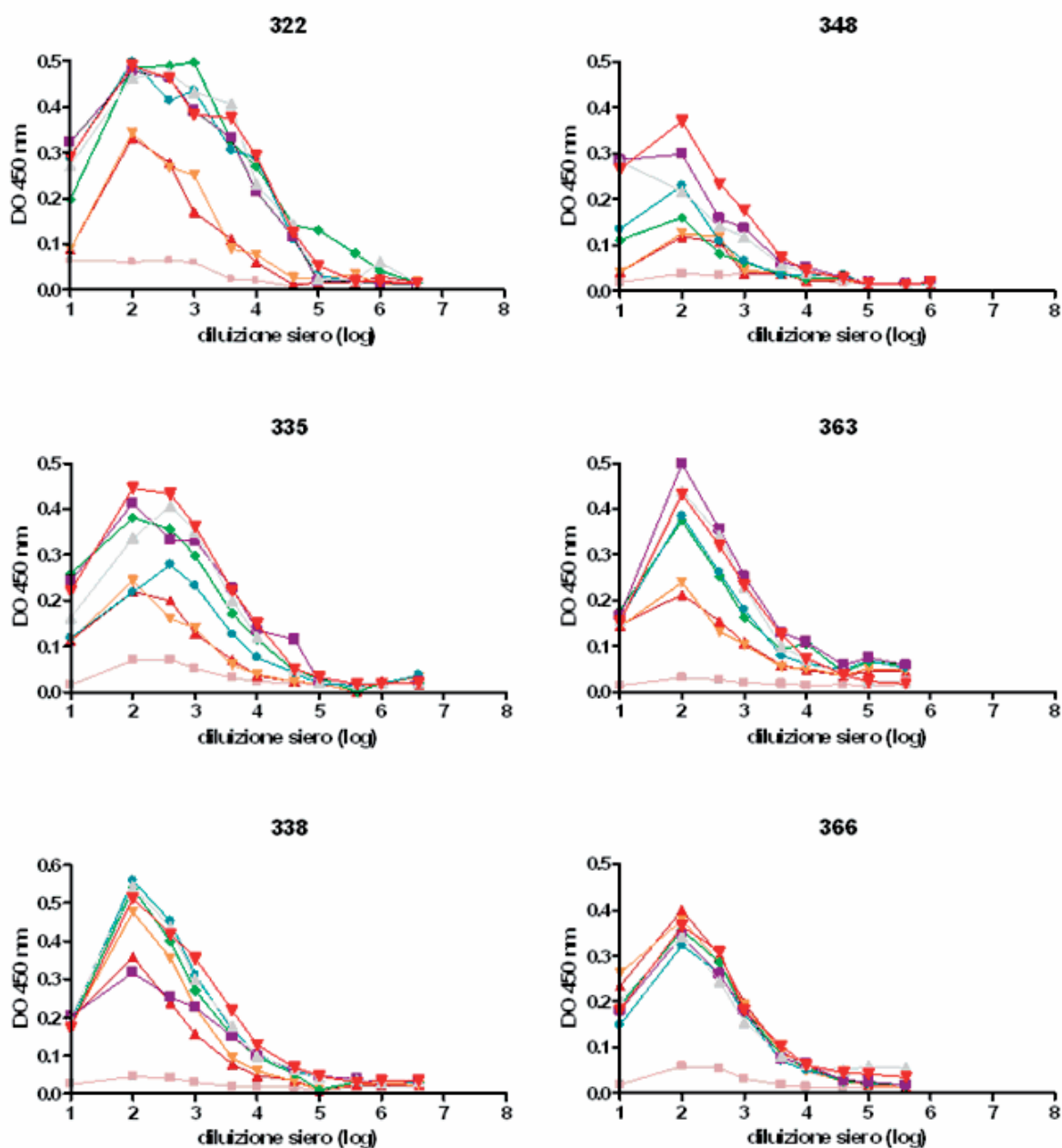


Figura 44. Titolazione di Ab specifici per AFB₁ nel siero raccolto da vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH (n. 322, 335, 338, 348, 363, 366), durante il periodo di immunizzazione di 10 settimane. In seguito alla prima iniezione di immunogeno sono stati effettuati richiami alla terza, sesta e nona settimana. La titolazione è stata eseguita mediante saggi immunoenzimatici indiretti come descritto nel testo. Le diluizioni dei sieri sono riportate in grafico in scala logaritmica. Simboli: siero raccolto prima dell'immunizzazione (□); siero raccolto dopo 2 (▲), 3 (△), 5 (●), 6 (○), 8 (■), 9 (□), 10 (▼) settimane dall'inizio del protocollo di immunizzazione.

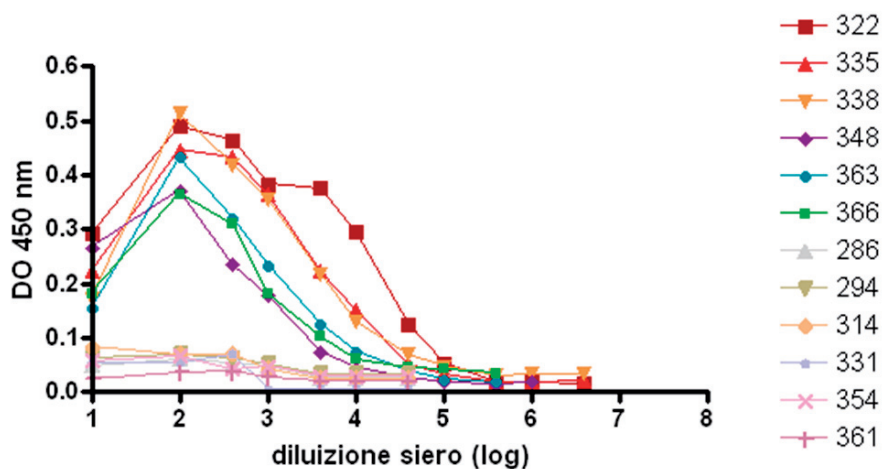


Figura 45. Determinazione del titolo di Ab specifici per AFB₁ mediante saggio immunoenzimatico indiretto, nei sieri raccolti da ogni vacca alla decima settimana dall'inizio dell'immunizzazione. Le diluizioni dei sieri sono riportate in grafico in scala logaritmica. Simboli: siero raccolto da vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH (322; 335; 338; 348; 363; 366); siero da vacche immunizzate con KLH (289; 294; 314; 331; 354; 361).

I risultati della titolazione di Ab rilevati nei sieri delle sei vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH, raccolti durante tutto il periodo di immunizzazione, sono rappresentati in **Figura 46**.

Dopo due settimane dalla prima somministrazione di immunogeno, sono stati ottenuti titoli anticorpali di circa 400-1.000 per 5 vacche. Solo una delle sei vacche (n. 348) ha iniziato a mostrare titoli significativi, anche se deboli (<100), dopo 5 settimane dalla prima somministrazione di immunogeno, successivamente al primo richiamo. Tra le vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH, la n. 322 ha mostrato la migliore risposta umorale. Per questo animale è stato possibile rilevare, alla decima settimana, un titolo di Ab specifici per AFB₁ pari a circa 40.000. Al contrario, nel siero della vacca n. 348 è stato determinato, alla stessa settimana, un titolo di Ab specifici pari a circa 1.000.

In generale, in base alla definizione di titolo anticorpale assunta in questo esperimento, è stato possibile dividere gli animali immunizzati con AnAFB₁-KLH in due gruppi, un gruppo "low responder" ed uno "high responder". Il titolo di Ab specifici per AFB₁ si è mostrato compreso, nel primo gruppo, tra 1.000 e 4.000 e, nel secondo gruppo, tra 10.000 e 40.000.

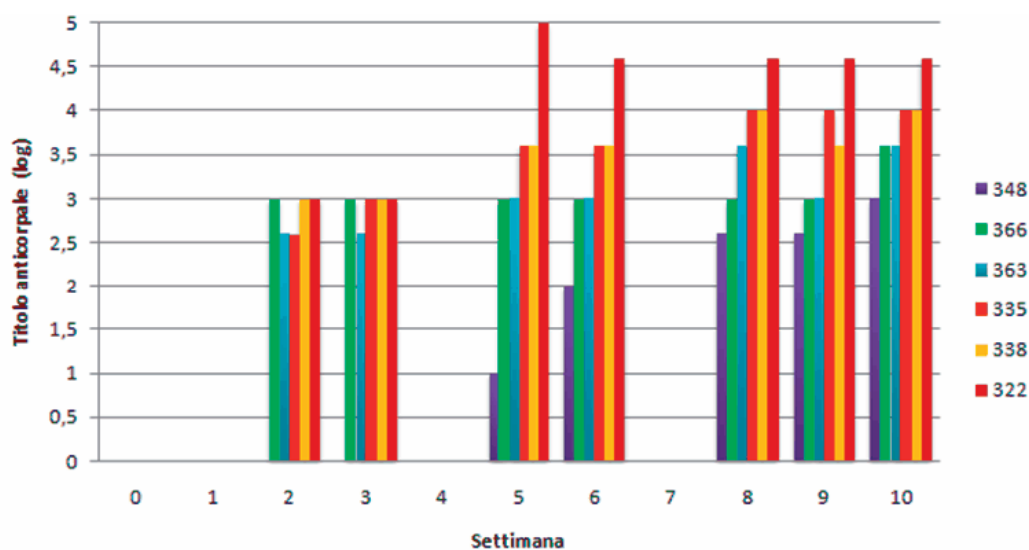


Figura 46. Produzione di Ab specifici per AFB₁ in vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH. Ogni vacca è stata immunizzata con 500 µg di immunogeno addizionato di adiuvante di Freund (completo e incompleto), eseguendo successivamente richiami con la stessa quantità di immunogeno alla terza, sesta e nona settimana. I titoli anticorpali sono rappresentati in grafico in scala logaritmica sull'asse delle ordinate.

3.6.4 Conferma della specificità per AFB₁ di Ab prodotti con AnAFB₁

La specificità di legame per AFB₁ di Ab presenti nei campioni di sangue prelevati alla decima settimana post-immunizzazione con AnAFB₁-KLH, è stata ulteriormente verificata, in saggi immunoenzimatici competitivi indiretti, incubando i sieri, in presenza di AFB₁ libera a varie concentrazioni, in pozzetti di piastre per microtitolazione precedentemente adsorbiti con AFB₁-BSA. I risultati ottenuti hanno mostrato non solo che gli antisieri delle vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH erano in grado di legarsi ad AFB₁-BSA, ma che tale legame poteva essere inibito in modo proporzionale da concentrazioni crescenti di AFB₁ libera. Sono stati calcolati i valori di assorbanza relativa dal rapporto percentuale tra l'assorbanza media letta ad ogni concentrazione e l'assorbanza ottenuta, per gli stessi sieri, in assenza di tossina. Riportando i valori di assorbanza relativa in funzione di AFB₁ libera sono state costruite delle curve standard eseguendo una regressione non lineare a coefficiente variabile.

La concentrazione di AFB₁ necessaria per inibire del 50% il legame degli Ab sierici ad AFB₁-BSA (IC₅₀) è stata quindi calcolata, per ciascun animale, dalle curve standard ottenute elaborando i risultati di almeno due diverse prove, eseguite in doppio (**Figura 47**).

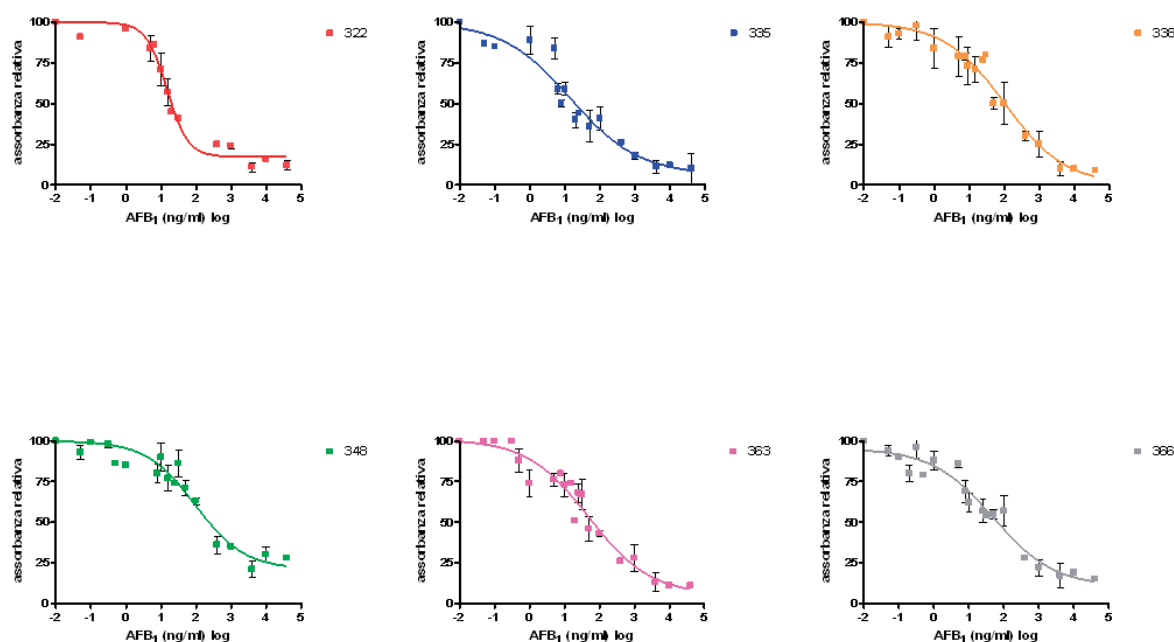


Figura 47. Curve standard per la determinazione della concentrazione di AFB₁ necessaria per inibire del 50% il legame di Ab sierici a AFB₁-BSA (IC₅₀) in vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH (n. 322, n. 335, n. 338, n. 348, n. 363, n.366). I valori di assorbanza rilevati nei sieri raccolti dopo l'immunizzazione (settimana 10) in corrispondenza di ogni concentrazione di AFB₁ sono riportati in grafico in funzione dell'assorbanza ottenuta, per gli stessi sieri, in assenza di tossina. I punti in figura rappresentano il valore medio ottenuto in due prove differenti eseguite in doppio.

La IC₅₀ media per AFB₁, calcolata dai valori ottenuti per ciascun animale è risultata essere pari a 40,74 ng/ml (**Tabella 6**).

IC ₅₀ (ng/ml)	Antisiero vacca n.					
	322	335	338	348	363	366
AFB ₁	14,92	11,13	104,10	95,44	49,86	47,05

Tabella 6. Concentrazione di AFB₁ necessaria per inibire del 50% il legame degli Ab sierici ad AFB₁-BSA (IC₅₀) in saggi immunoenzimatici competitivi, calcolata per ciascun animale.

3.6.5 Reattività crociata di Ab indotti da AnAFB₁-KLH nei confronti di AF

Sono stati eseguiti saggi immunoenzimatici competitivi indiretti per determinare la reattività di Ab presenti nei sieri di vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH nei confronti di altre AF (AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁). Come precedentemente descritto, è stata calcolata, per ciascun animale, la IC₅₀ di ogni tossina da curve standard ottenute elaborando i risultati di almeno due diverse prove, eseguite in doppio. Le concentrazioni di altre AF necessarie per inibire del 50% il legame di Ab ad AFB₁-BSA adsorbita alla fase solida dei saggi immunoenzimatici sono risultate essere mediamente pari a 82,5 ng/ml, 61,5 ng/ml, 5,95 µg/ml e >10 µg/ml per AFB₂, AFG₁, AFG₂ e AFM₁ rispettivamente. La reattività crociata relativa di AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ ed AFM₁ con Ab presenti nei sieri di vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH è stata stimata, per ogni animale, come rapporto percentuale tra la IC₅₀ di AFB₁ e la IC₅₀ di ogni AF. La reattività crociata media (considerando AFB₁ 100%), è risultata essere 65%, 88%, 0,9% e <0,9% rispettivamente per AFB₂, AFG₁, AFG₂ ed AFM₁.

I risultati indicano che gli Ab prodotti hanno i seguenti gradi di affinità: AFB₁ > AFG₁ > AFB₂ > AFG₂ > AFM₁, in accordo con la struttura del coniugato AnAFB₁-KLH utilizzato per l'immunizzazione. È infatti noto che, in generale, utilizzando coniugati proteici come immunogeni, il disegno strutturale dell'aptene derivato ha grande influenza sulle proprietà degli Ab indotti, quali affinità per l'aptene originale e, nel caso di apteni strutturalmente simili come AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ e AFM₁, reattività crociata con altre molecole. È probabile, inoltre, che gli Ab prodotti siano in grado di interagire con la tossina principalmente sul lato opposto a quello impegnato per la coniugazione al carrier proteico (382). La **Figura 1** mostra le differenze strutturali rilevanti tra le AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, essenzialmente riassumibili in differenze tra AFB e AFG in posizione-1 e, dall'altro lato della molecola, differenze tra AF₁ e AF₂ in posizione-8,9. AFM₁ è il derivato metabolico di AFB₁, dal quale differisce per la presenza di un gruppo idrossile sull'anello furanico. Ab prodotti immu-

nizzando con AnAFB₁ coniugata a KLH attraverso l'anello ciclopentenonico della molecola AFB₁ parentale riconoscono, presumibilmente, AFB₁ e AFG₂, che presentano omologia strutturale a livello del doppio legame dell'anello furanico. Ab diretti nei confronti di AFB₁, inoltre, non sono risultati reattivi nei confronti di AFM₁, suggerendo come modificazioni quali l'inserimento del gruppo idrossilico nell'anello difuranico di AF possano prevenire il legame di Ab all'Ag.

La significativa reattività crociata lascia ipotizzare una possibile azione protettiva di Ab indotti da AnAFB₁-KLH anche nei confronti di AFG₁ e AFB₂ eventualmente assunte attraverso mangime contaminato. Questo dato assume particolare rilevanza nel caso di AFG₁ in relazione alla possibilità di attivazione di tale molecola nella forma 8,9 epossidica, reattiva con il DNA.

3.7 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO PREVENTIVO DI AB SPECIFICI NEL CARRY OVER DI AFB₁

Allo scopo di valutare la potenzialità di Ab specifici per AFB₁ prodotti in seguito ad immunizzazione di vacche con AnAFB₁-KLH nel prevenire il carry-over di AFB₁ nel latte, al termine del periodo di immunizzazione, gli animali sono stati sottoposti ad ingestione di mangime ad elevata concentrazione di AFB₁.

3.7.1 Esperimento pilota

Una valutazione preliminare dell'efficacia di Ab specifici per AFB₁ è stata eseguita monitorando, per due giorni, le concentrazioni di AFM₁ nel latte raccolto dalle due vacche dell'esperimento pilota, immunizzate con AnAFB₁-KLH, nelle due mungiture successive alla somministrazione giornaliera 136,8 µg AFB₁/capo/giorno, comparativamente a campioni corrispondenti raccolti dagli animali del gruppo di controllo costituito da due vacche immunizzate con KLH.

Come evidenziato in **Figura 48**, esiste, per AF, un livello basale di carry-over, precedente alla somministrazione sperimentale di AFB₁ (mungitura 0), dovuto alla presenza di contaminazione del mangime a livelli inferiori ai limiti legali, risultante in concentrazioni di AFM₁ inferiori al valore massimo tollerato dalla della Comunità Europea di 50 ng/kg secondo il Regolamento (CE) n. 466/2001 della Commissione. Nel latte raccolto alla mungitura successiva alla prima somministrazione di AFB₁ dalle due vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH (n. 203 e 250), sono state rilevate concentrazioni di AFM₁ inferiori ai controlli (n. 290 e 293). Nelle mungiture successive, mentre nel latte della vacca n. 250 sono state rilevate concentrazioni di AFM₁ sempre inferiori ai limiti legali, e nettamente inferiori ai controlli, i campioni di latte raccolti dalla vacca n. 203 presentavano livelli di contaminazione paragonabili alle

vacche immunizzate con KLH. Significativamente, nel siero della vacca 250, immunizzata con AnAFB₁-KLH, è stato rilevato il maggior titolo di Ab specifici per AFB₁ (**Figura 46**).

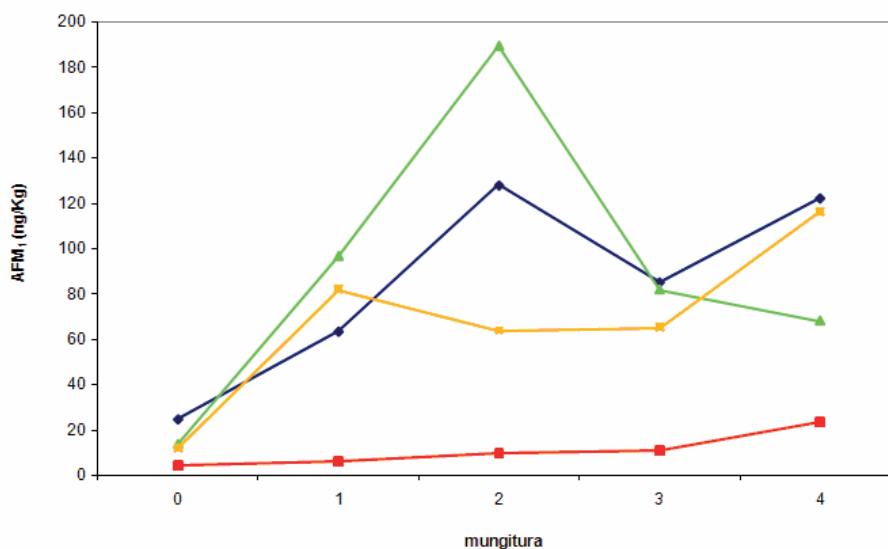


Figura 48. Valutazione dell'escrezione di AFM₁ nel latte di vacche in seguito alla somministrazione di 136,8 µg AFB₁/capo/giorno. AFB₁ è stata somministrata per due giorni, prima delle due mungiture giornaliere, a vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH (vacca n. 250 ■ ; n. 203 ◆) o KLH (n. 290 ▲ ; n. 293 ◻).

Al termine del periodo sperimentale, le vacche sono state alimentate con mangime comune, caratterizzato dalla presenza di concentrazioni di AF inferiori ai limiti legali. Dopo 1 mese, è stata eseguita una ulteriore prova di monitoraggio del trasferimento di AFM₁ nel latte in seguito a somministrazione di AFB₁. A causa di problemi legati allo stato fisiologico degli animali, è stato possibile eseguire la prova solo su una vacca immunizzata con AnAFB₁-KLH (n. 250) e una vacca di controllo immunizzata con KLH (n. 290). Come mostrato in **Figura 49**, nel latte raccolto dalla vacca n. 250, in cui era stato possibile rilevare un elevato titolo di Ab specifici per AFB₁, nelle due mungiture successive alla somministrazione continuativa di 136,8 µg AFB₁/giorno, sono state rilevate concentrazioni di AFM₁ inferiori ai limiti legali. Al contrario, nella vacca di controllo n. 290, le concentrazioni di AFM₁ superavano i limiti legali già alla prima mungitura successiva alla somministrazione di AFB₁.

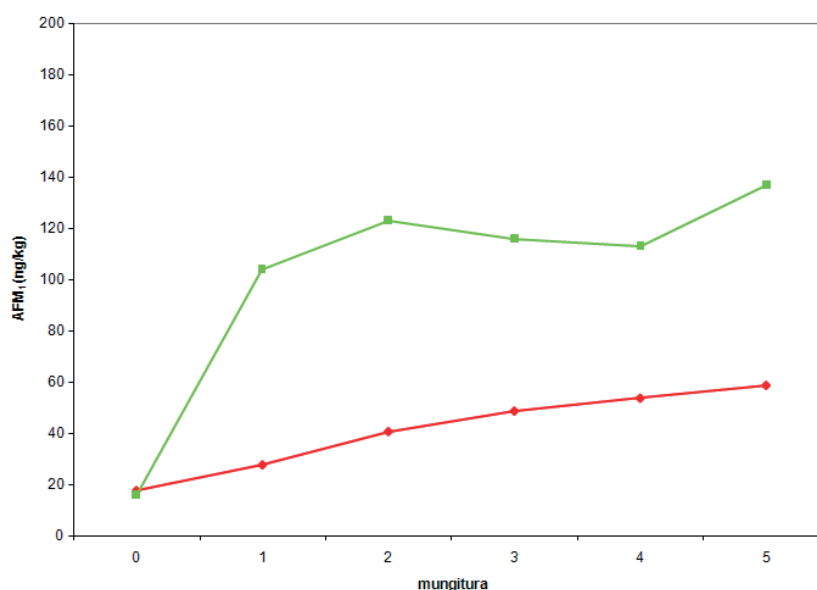


Figura 49. Valutazione dell'escrezione di AFM₁ nel latte di vacche in seguito alla somministrazione di 136,8 µg AFB₁/capo/giorno. AFB₁ è stata somministrata per due giorni, prima delle due mungiture giornaliere, ad una vacca immunizzata con AnAFB₁-KLH (vacca n. 250 ■) e ad una vacca immunizzata con KLH (n. 290 ◆).

3.7.2 Vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH ed adiuvante di Freund

Allo scopo di valutare in modo statisticamente significativo la potenzialità di Ab specifici per AFB₁ nel prevenire il carry-over di AFB₁ nel latte, è stata eseguita, in seguito alla somministrazione giornaliera continuativa di 136,8 µg AFB₁/capo/giorno, la quantificazione dell'escrezione di AFM₁ in sei vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH comparativamente a sei vacche immunizzate con KLH. Entrambi gli immunogeni (coniugato e non) sono stati addizionati con adiuvante di Freund (completo e incompleto).

3.7.2.1 Fase di lattazione medio-iniziale

Come evidenziato in **Figura 50**, in accordo con i dati riportati in letteratura in bovini (310) ed ovini (311) da latte sottoposti ad ingestione giornaliera di quantità costanti di AFB₁, è stata rilevata AFM₁ già alla prima mungitura successiva all'ingestione. Nelle mungiture successive, sono state rilevate concentrazioni di AFM₁ crescenti

linearmente fino al raggiungimento di uno stato stazionario di escrezione (fase di plateau) in corrispondenza del quale, a seguito dell'ingestione di quantità costanti di AFB₁, sono state escrete nel latte quantità costanti di AFM₁. Nelle condizioni sperimentali del saggio, lo stato stazionario è stato raggiunto, mediamente, al settimo giorno. La somministrazione continuativa di 136,8 µg/capo/giorno di AFB₁ per 11 giorni (periodo sperimentale) non ha causato problemi di salute agli animali. In seguito alla cessazione della somministrazione della dieta contaminata, in accordo con quanto riportato in letteratura (310), le concentrazioni di AFM₁ rilevate nel latte sono diminuite, nel periodo di 3 giorni, fino ai livelli minimi di contaminazione costitutivamente presenti.

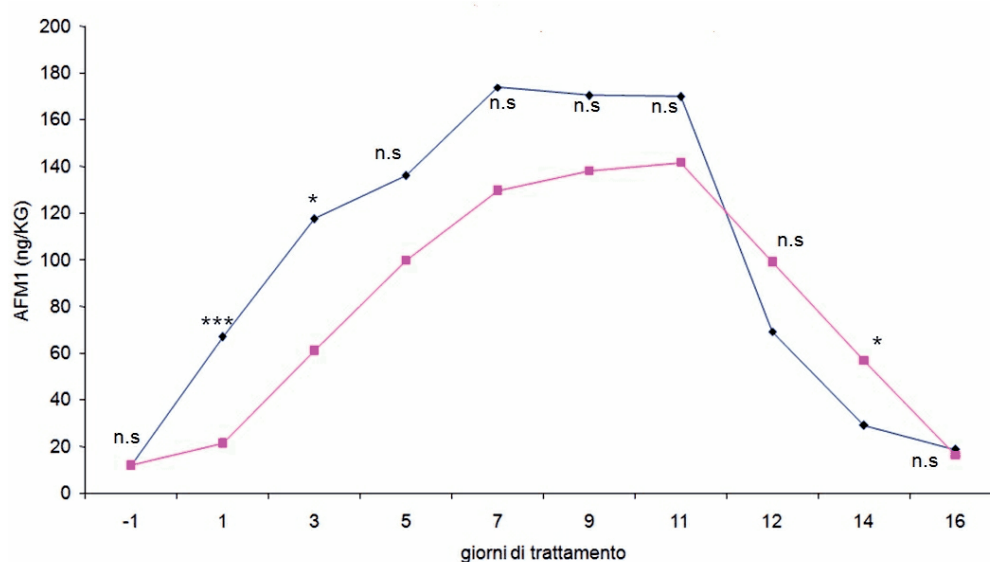


Figura 50. Valutazione della concentrazione media di AFM₁ (ng/kg) escreta nel latte di sei vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH (—■—) e sei vacche immunizzate con KLH (—◆—) in seguito alla somministrazione di giornaliera (11 giorni) di 136,8 µg AFB₁/capo/giorno. Simboli: (n.s.) non significativo; (*) P< 0,05; (**) P< 0,01; (***) P<0,001.

Come mostrato in **Figura 50**, considerando la totalità degli animali immunizzati con AnAFB₁-KLH, la concentrazione media di AFM₁ rilevata nel latte in seguito a somministrazione di AFB₁ si è mantenuta, per due giorni, al di sotto delle concentrazioni massime imposte dalla Comunità Europea (50 ng/kg). Dopo tre giorni di trattamento, le concentrazioni di AFM₁ rilevate nel latte degli animali immunizzati con

AnAFB₁-KLH, pur superando il limite legale, sono risultate inferiori del 50% ($P < 0,05$) alle concentrazioni di AFM₁ rilevate nel latte degli animali di controllo. Allo stato stazionario, a causa della grande variabilità riscontrata nei singoli animali, la differenza tra la concentrazione media di AFM₁ rilevata giornalmente nel latte delle vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH o KLH, non è risultata essere significativa. Tuttavia, considerando la totalità del latte prelevato nei tre giorni di plateau è stato comunque possibile determinare, negli animali immunizzati con AnAFB₁-KLH, una riduzione media del 20% del quantitativo di AFM₁ escreto rispetto ai controlli. Significativamente, per ciascuno dei sei animali immunizzati con AnAFB₁-KLH è stata riscontrata una elevata correlazione ($R = -0,72$, $P < 0,05$) fra la concentrazione media di AFM₁ escreta in fase stazionaria ed il titolo anticorpale specifico per AFB₁ rilevato nel siero (**Figura 51**).

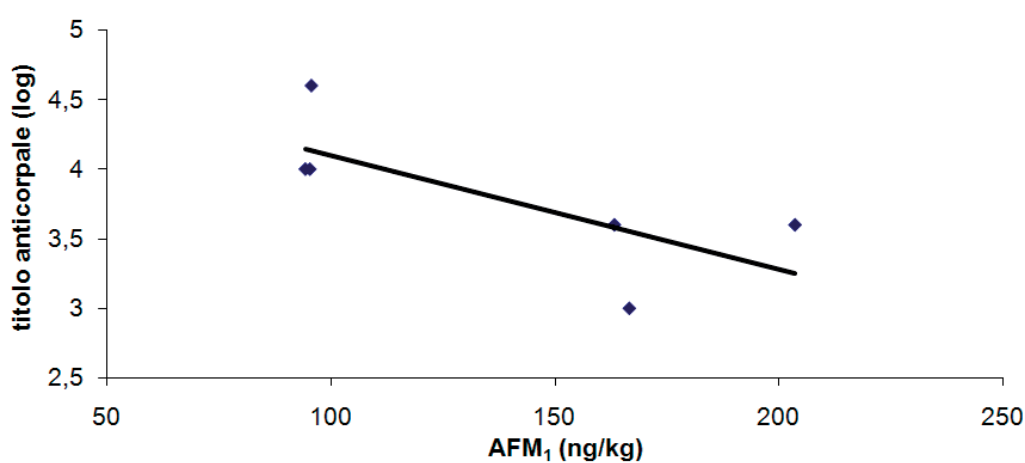


Figura 51. Correlazione tra la concentrazione media di AFM₁ (ng/kg) escreta nel latte al plateau della fase di lattazione medio-iniziale da singole vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH e titolo di Ab specifici per AFB₁ ($R = -0,72$, $P < 0,05$).

Considerando l'escrezione media delle tre vacche "high responder" immunizzate con AnAFB₁-KLH (n. 322, 335, 338, vedi **Figura 46**), caratterizzate dal maggior titolo di Ab specifici per AFB₁, la riduzione dell'escrezione di AFM₁ nel latte è risultata essere statisticamente significativa lungo tutto il periodo di somministrazione sperimentale.

tale di AFB₁ e, in particolare, nello stato di plateau, decrementata del 44% (P < 0,01) rispetto alle vacche di controllo immunizzate con KLH (**Figura 52**).

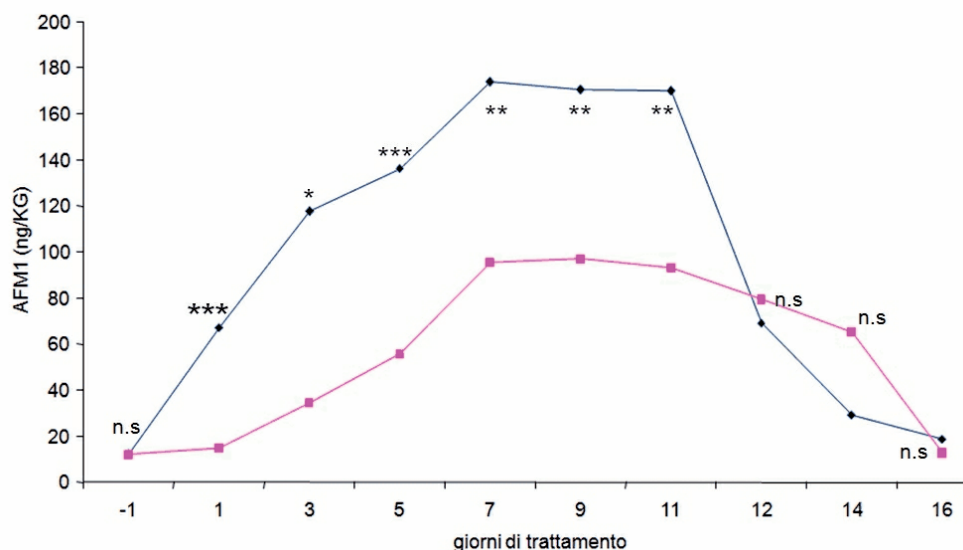


Figura 52. Valutazione della concentrazione media di AFM₁ (ng/kg) escreta nel latte delle vacche “high responder” presentanti un elevato titolo di Ab specifici per AFB₁ (tre di sei) immunizzate con AnAFB₁-KLH (■), comparativamente alle vacche immunizzate con KLH (◆), in seguito alla somministrazione di giornaliera (11 giorni) di 136,8 µg AFB₁/capo/giorno. Simboli: (n.s.) non significativo; (*) P < 0,05; (**) P < 0,01; (***) P < 0,001.

3.7.2.2 Fase di lattazione medio-avanzata

In seguito agli 11 giorni di trattamento con AFB₁, le vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH ed i relativi controlli (vacche immunizzate con KLH) sono state alimentate con mangime conforme ai limiti legali di contaminazione per 10 settimane. Tutti gli animali sono stati successivamente sottoposti ad una ulteriore somministrazione di 136,8 µg AFB₁/capo/giorno per 11 giorni, prelevando giornalmente campioni di latte per ogni animale. Al momento attuale, è stata determinata la concentrazione di AFM₁ solo in alcuni dei campioni di latte prelevati, privilegiando i campioni raccolti al plateau di escrezione di AFM₁, ritenuto essere il momento più significativo per il calcolo del carry-over. Nella prova eseguita in una fase avanzata di lattazione, a causa della grande variabilità riscontrata nei singoli animali, la differenza tra la concentrazione media di AFM₁ rilevata giornalmente nel latte delle vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH o KLH, non è risultata essere significativa. Tuttavia, con-

siderando la totalità del latte prelevato nei tre giorni di plateau è stato comunque possibile determinare, negli animali immunizzati con AnAFB₁-KLH, una riduzione media del 11% del quantitativo di AFM₁ escreto rispetto ai controlli (**Figura 53**).

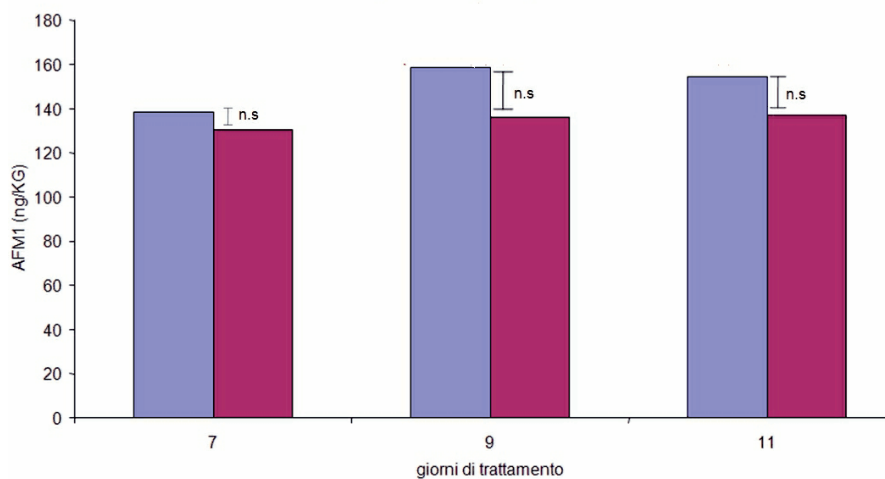


Figura 53. Valutazione della concentrazione media di AFM₁ (ng/kg) escreta, in fase di plateau, nel latte di vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH (rosso) o KLH (blu). La fase di plateau è stata conseguita in seguito alla somministrazione giornaliera, per 7 giorni, di 136,8 µg AFB₁/capo. Simboli: (n.s.) non significativo.

Significativamente, per ciascuno dei sei animali immunizzati con AnAFB₁-KLH è stata riscontrata una buona correlazione ($R = -0,68$, $P < 0,05$) fra la concentrazione media di AFM₁ escreta in fase stazionaria ed il titolo anticorpale specifico per AFB₁ rilevato nel siero (**Figura 54**).

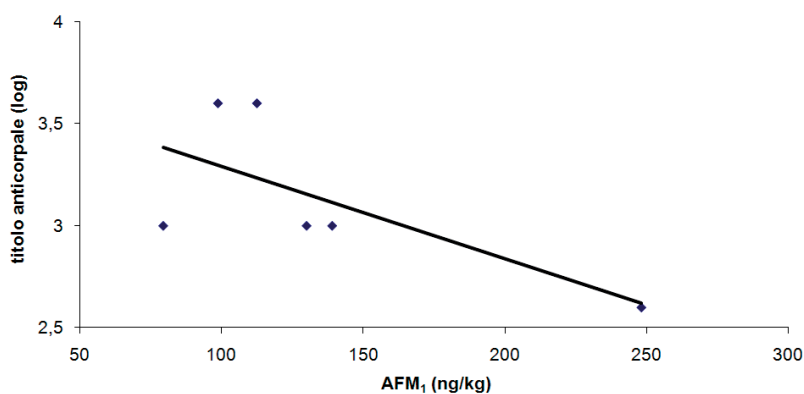


Figura 54. Correlazione tra la concentrazione media di AFM₁ (ng/kg) escreta nel latte al plateau della fase di lattazione medio-avanzata da singole vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH e titolo di Ab specifici per AFB₁ ($R = -0,68$, $P < 0,05$).

Significativamente, considerando l'escrezione media delle tre vacche "high responder" immunizzate con AnAFB₁-KLH (n. 322, 335, 338, vedi **Figura 46**), caratterizzate dal maggior titolo di Ab specifici per AFB₁, la riduzione dell'escrezione di AFM₁ nel latte è risultata essere, nello stato di plateau, decrementata del 36% (P < 0,05) rispetto alle vacche di controllo immunizzate con KLH (**Figura 55**).

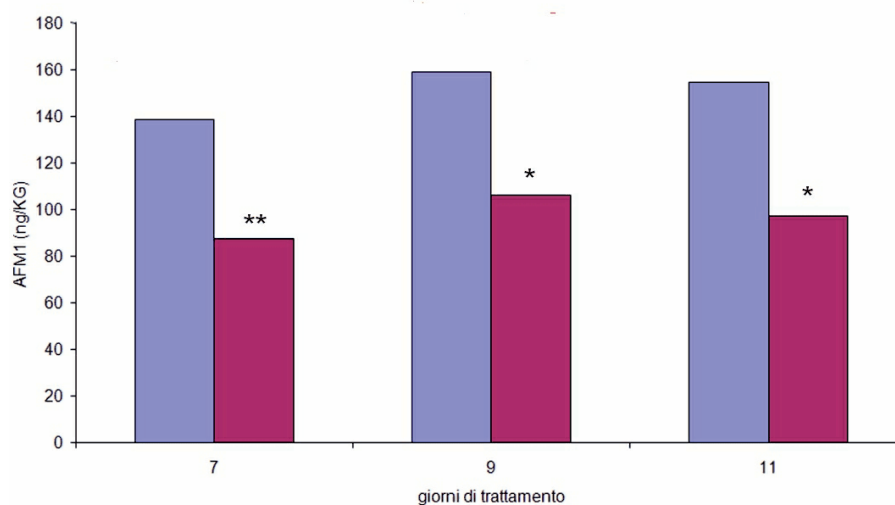


Figura 55. Valutazione della concentrazione media di AFM₁ (ng/kg) escreta, in fase di plateau, nel latte delle vacche "high responder" (tre di sei) immunizzate con AnAFB₁-KLH caratterizzate da un elevato titolo di Ab specifici per AFB₁ (rosso), comparativamente alle vacche KLH (blu). La fase di plateau è stata conseguita in seguito alla somministrazione di giornaliera, per 7 giorni, di 136,8 µg AFB₁/capo. Simboli: (n.s.) non significativo; (*) P < 0,05; (**) P < 0,01; (***) P < 0,001.

3.7.3 Monitoraggio sierologico di vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH ed esposte ad AFB₁

Sono stati eseguiti esperimenti al fine di monitorare eventuali variazioni del titolo anticorpale specifico per AFB₁, acquisito in seguito ad immunizzazione con AnAFB₁-KLH, in seguito alla somministrazione di AFB₁.

Dopo 10 settimane dall'inizio del protocollo di immunizzazione, a ciascuna vacca immunizzata per via *i.m.* con AnAFB₁-KLH e ai relativi controlli, costituiti da vacche immunizzate con KLH, sono stati somministrati 136,8 µg AFB₁/capo al giorno per 11 giorni.

I sieri ottenuti dai campioni di sangue prelevati dopo l'esposizione ad AFB₁ sono stati saggiati, comparativamente ai sieri raccolti la settimana successiva all'ultima somministrazione di immunogeno (settimana 12 e 10 rispettivamente), per la determinazione del titolo residuo di Ab specifici per AFB₁. La titolazione degli Ab è stata eseguita mediante saggi immunoenzimatici, come precedentemente descritto. Come mostrato in **Figura 56**, in corrispondenza alla somministrazione di una massiccia dose di AFB₁ per via orale, il titolo anticorpale di due delle sei vacche "high responder" immunizzate con AnAFB₁-KLH ha subito un netto decremento.

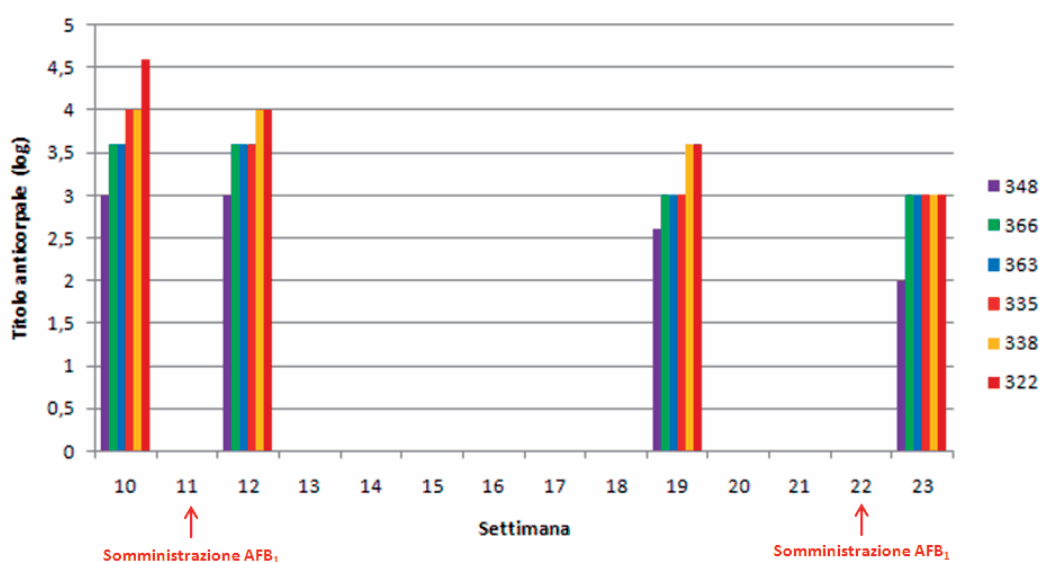


Figura 56. Valutazione dei titoli di Ab specifici per AFB₁ in vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH in seguito a due prove di somministrazione continuativa (11 giorni) di AFB₁ (136,8 µg/capo/giorno). I titoli anticorpali, determinati mediante saggi immunoenzimatici, sono rappresentati in grafico in scala logaritmica sull'asse delle ordinate.

I titoli anticorpali specifici determinati sono stati successivamente valutati comparativamente ai titoli rilevati nei sieri raccolti dopo 2 mesi dalla prima somministrazione di AFB₁ (settimana 19) e dopo un ulteriore periodo di somministrazione di mangime contaminato con AFB₁ (settimana 23).

I sieri ottenuti sono stati titolati mediante saggi immunoenzimatici, come precedentemente descritto. Come mostrato in **Figura 56**, dopo 19 settimane dall'inizio del protocollo di immunizzazione, è stato ancora possibile rilevare nei sieri delle vacche immu-

nizzate con AnAFB₁-KLH un titolo significativo di Ab specifici per AFB₁, seppure inferiore a quello rilevato alla settimana 12. In seguito ad un ulteriore ciclo di somministrazione di AFB₁ (136,8 µg al giorno per 11 giorni) il titolo di Ab specifici per AFB₁ rilevati al termine del periodo sperimentale (settimana 23) è risultato significativamente diminuito per due vacche “high responder” delle sei immunizzate con AnAFB₁-KLH. La diminuzione nel titolo dei soli Ab specifici per AFB₁ potrebbe essere riferibile alla formazione di immunocomplessi, deponendo per la presenza di Ab sierici potenzialmente neutralizzanti.

3.7.4 Valutazione comparativa dell'escrezione di AFM₁ nelle due fasi di lattazione

Significativamente, nelle prove eseguite sulle vacche “high responder”, caratterizzate dal più elevato titolo di Ab specifici per AFB₁, non è stato evidenziato un effetto della fase di lattazione sul trasferimento di AFB₁ sotto forma di AFM₁ nel latte. Per tali animali, non sono state rilevate, infatti, differenze significative tra la concentrazione media di AFM₁ nel latte raccolto al plateau della fase di lattazione medio-iniziale e al plateau della fase medio-avanzata (**Figura 57**). Analogamente, non sono state rilevate differenze significative nella concentrazione media di AFM₁ nel latte raccolto, nelle due fasi, dagli animali del gruppo di controllo.

Per ognuno dei gruppi di animali sottoposti ad immunizzazione con AnAFB₁-KLH o KLH, è stato calcolato, per entrambe le fasi di lattazione, il carry-over, in base al rapporto percentuale tra la quantità di AFM₁ escreta giornalmente nell'intera quantità di latte prodotto (µg/giorno) e la quantità di AFB₁ ingerita (µg/giorno) (**Tabella 7**).

Nelle condizioni sperimentali adottate in fase di plateau, in seguito ad ingestione di 136,8 µg AFB₁/capo/giorno, è stato possibile osservare, nelle vacche “high responder”, una riduzione del carry-over del 37% in fase di lattazione medio-iniziale e del 25% in fase medio-avanzata.

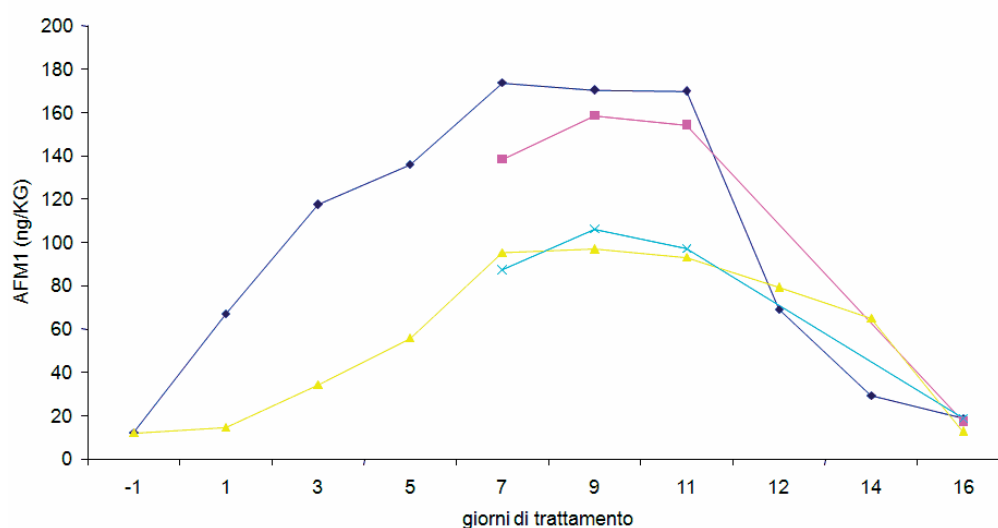


Figura 57. Valutazione comparativa dell'escrezione media di AFM₁ in fase di plateau nelle due fasi di lattazione. Rilevazione in animali "high responder" immunizzati con AnAFB₁-KLH (▲) e KLH (◆) nella fase di lattazione medio-iniziale. Rilevazione in animali "high responder" immunizzati con AnAFB₁-KLH (×) e KLH (■) nella fase di lattazione medio-avanzata.

	Fase di lattazione medio-iniziale			Fase di lattazione medio-avanzata		
	Immunizzazione		Immunizzazione	Immunizzazione		Immunizzazione
	KLH	AnAFB ₁ -KLH	AnAFB ₁ -KLH "high responder"	KLH	AnAFB ₁ -KLH	AnAFB ₁ -KLH "high responder"
AFM ₁ (ng/kg)	171 ± 30	137 ± 47	95 ± 13	150 ± 27	134 ± 57	96 ± 18
AFM ₁ totale escreta (µg/capo/giorno)	5,49 ± 1,44	4,15 ± 1,06	3,45 ± 6,32	4,58 ± 0,91	4,32 ± 1,56	3,42 ± 0,76
Carry-over %	3,97 ± 1,04	3,10 ± 0,76	2,50 ± 0,46	3,31 ± 0,66	3,13 ± 1,13	2,48 ± 0,75

Tabella 7. Concentrazione di AFM₁ (ng/kg), escrezione totale di AFM₁ (µg/capo/giorno) e carry-over (%) calcolati in fase di plateau (giorni 7, 9, 11) in gruppi di vacche con produzione media giornaliera di 33 kg di latte sottoposte all'ingestione di 136,8 µg AFB₁/capo/giorno.

3.8 VALUTAZIONE *IN VITRO* DELL'EFFETTO PROTETTIVO DI AB SPECIFICI PER AFB₁

3.8.1 Preparazione di coniugati AnAFB₁ con sfere magnetiche

Il derivato carbossilato AnAFB₁ è stato coniugato a biglie (Dynabeads M-270 Amine, Dynal) costituite da materiale magnetico equamente ripartito tra i pori di sfere di polistirene ad elevato grado di polimerizzazione. La superficie di tali sfere magnetiche è rivestita da uno strato idrofilico di etere glicidilico ed è attivata con gruppi funzionali amminici primari. Il gruppo carbossilico di AnAFB₁ è stato legato a tali gruppi amminici tramite reazione di coniugazione diretta, mediata da attivazione da parte di carbodiimidi idrosolubili (**Figura 58**).

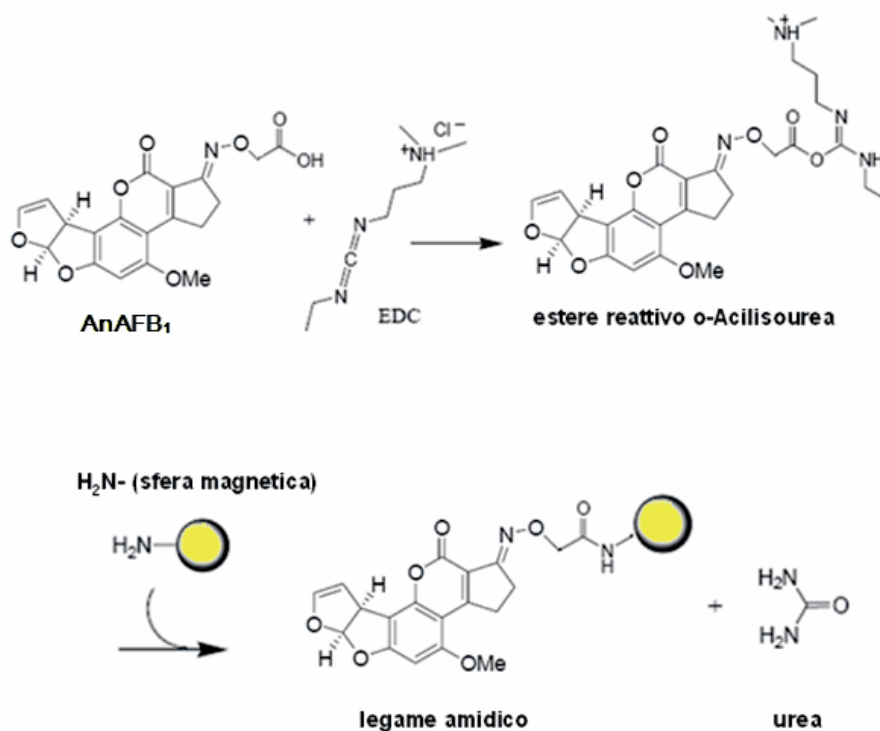


Figura 58. Reazione di coniugazione di AnAFB₁ a sfere magnetiche derivate con gruppi amminici primari (Dynabeads M-270 Amine, Dynal). EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimide idrocloride) reagisce con il gruppo carbossilico introdotto nella molecola AFB₁ formando l'intermedio amino-reattivo O-acilisourea. Tale intermedio reagisce rapidamente con il gruppo amminico primario presente sulle sfere magnetiche per formare un legame amidico con la liberazione di isourea. L'intermedio O-acilisourea, instabile in soluzione acquosa, è stato stabilizzato introducendo NHS (N-idrossisuccinimide).

3.8.2 Purificazione di Ab specifici per AFB₁ da siero di vacca

Al fine di purificare Ab specifici per AFB₁ presenti nei sieri di vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH, AnAFB₁ è stata legata covalentemente a microsfele magnetiche derivatizzate con gruppi amminici primari sulla superficie. La purificazione di Ab specifici per AFB₁ è stata quindi eseguita in diversi passaggi, incubando le microsfele ricoperte da AnAFB₁ con i sieri raccolti successivamente al periodo di immunizzazione.

La specificità di Ab purificati è stata verificata mediante saggi immunoenzimatici indiretti, utilizzando, come Ag preadsorbiti sulla fase solida di piastre per microtitolazione, sia il coniugato AFB₁-BSA sia il rispettivo Ag di controllo, rappresentato dalla sola porzione proteica del coniugato (BSA). Come mostrato in **Figura 59**, la soluzione di Ab purificati ha mostrato, anche ad elevate diluizioni, elevata reattività con AFB₁-BSA, mentre è stata osservata scarsa reattività con la sola BSA, a dimostrazione del fatto che nel processo di purificazione erano stati separati Ab diretti contro l'aptene AFB₁.

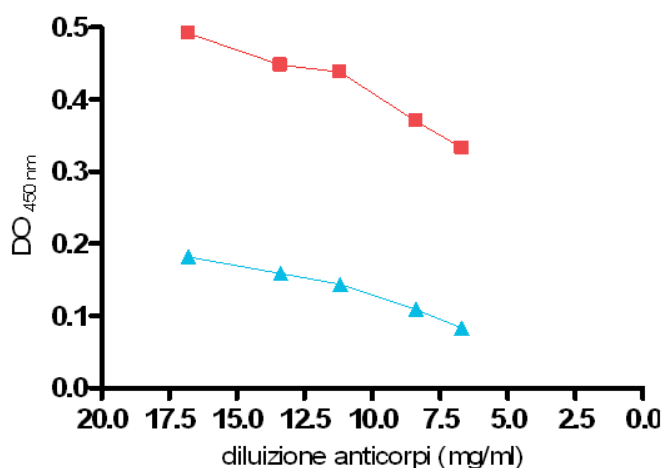


Figura 59. Curve di legame ad AFB₁-BSA (rosso) o BSA (blu) della soluzione di Ab purificati, mediante separazione con sfere magnetiche coniugate ad AnAFB₁, da siero di vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH. Il legame degli Ab all'Ag, preadsorbito a piastre per microtitolazione, è stato rilevato mediante saggi immunoenzimatici indiretti ed è rappresentato in grafico come DO a 450 nm registrata per differenti diluizioni della soluzione di Ab.

La specificità del riconoscimento Ag-Ab è stata ulteriormente confermata tramite saggi immunoenzimatici competitivi indiretti. Ab purificati sono stati pre-incubati con soluzioni a concentrazioni variabile di AFB₁ e, in seguito, fatti reagire con il coniugato AFB₁-BSA. Come mostrato in **Figura 60**, i risultati ottenuti hanno evidenziato che AFB₁ esercita una fortissima inibizione sul legame fra Ab serici purificati ed Ag adsorbito alla piastra, dimostrando la presenza di Ab specifici per AFB₁. Ab diretti contro l'aptene hanno mostrato di essere neutralizzati da concentrazioni molto basse di AFB₁ libera: il legame di Ab sierici all'Ag adsorbito alla piastra ha mostrato, infatti, di essere già fortemente inibito a concentrazioni di AFB₁ nelle miscele di preincubazione pari a 0,1 ng/ml.

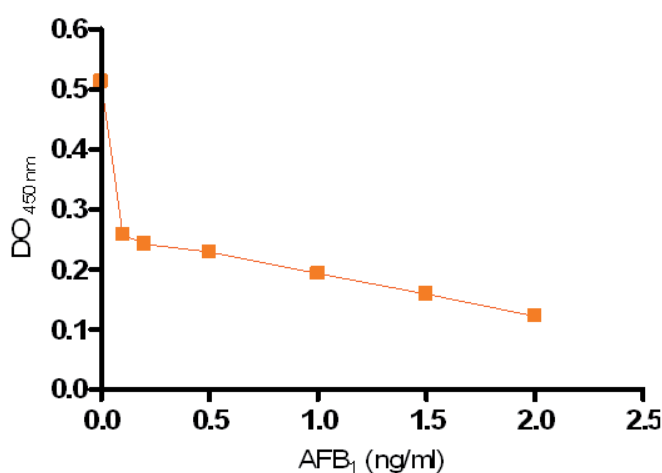


Figura 60. Curva di inibizione del legame ad AFB₁-BSA di Ab specifici per AFB₁ purificati mediante separazione con sfere magnetiche coniugate ad AnAFB₁ da siero di vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH. Il legame di Ab (concentrazione 8,4 µg/ml) con il coniugato AFB₁-BSA, adsorbito a piastre per microtitolazione, è stato rilevato mediante saggio immunoenzimatico indiretto in competizione con diverse diluizioni di AFB₁ ed è rappresentato in grafico come DO a 450 nm.

3.8.3 Neutralizzazione della tossicità *in vitro*

Per una valutazione qualitativa del potenziale immunoprotettivo della risposta umorale in animali vaccinati, il saggio di valutazione della tossicità *in vitro* su cellule di epatocarcinoma umano HepG2 è stato effettuato con Ab purificati da sieri di vacche immunizzate per via sistemica con AnAFB₁-KLH mediante sfere magnetiche coniugate ad AFB₁.

Ab di vacca purificati sono stati preventivamente complessati con AFB₁, quindi saggiati in cellule HepG2 analogamente a quanto descritto per AFB₁. Come mostrato in **Figura 61**, Ab purificati specifici per AFB₁ alla concentrazione di 9 µg/ml, si sono mostrati in grado di ridurre del 20% gli effetti citotossici indotti 15 µg/ml AFB₁.

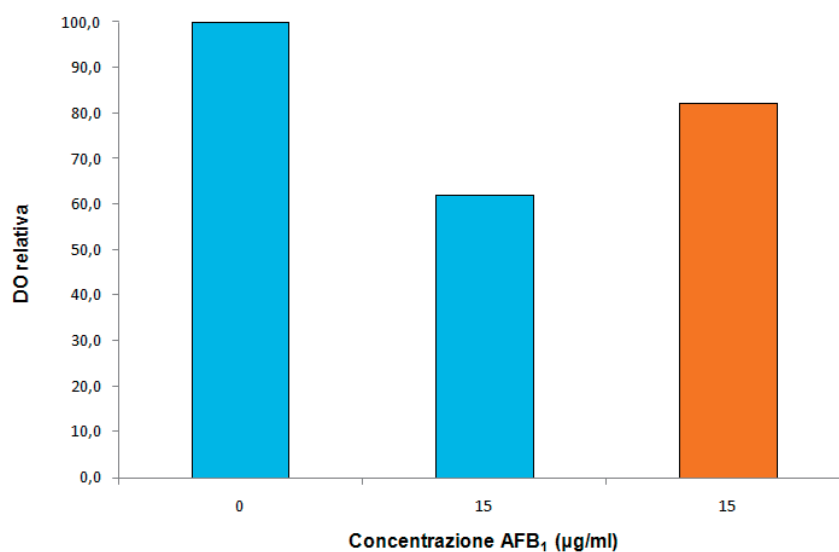


Figura 61. Neutralizzazione della tossicità di AFB₁ su linee cellulari di epatoblastoma umano HepG2 da parte di Ab specifici per AFB₁ purificati da siero di vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH. La proliferazione cellulare, determinata mediante saggio colorimetrico con alamar blue, è rappresentata come valore di DO relativo, riportato come rapporto percentuale rispetto al valore di DO letto a 570 nm per cellule non esposte ad AFB₁. Simboli: ■ DO relativa letta per cellule incubate in presenza di Ab specifici per AFB₁ (9 µg/ml); ■ DO relativa letta per cellule incubate in assenza di Ab specifici per AFB₁.

4.
DISCUSSIONE

AF, prodotte principalmente da ceppi di *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, rappresentano le più importanti micotossine di interesse medico. AFB₁, la prevalente e più tossica tra le AF, è stata classificata nel gruppo 1 dei cancerogeni naturali dall'International Agency for Research on Cancer (IARC), mentre il suo derivato idrossilato AFM₁ è stato incluso nel gruppo 2B (53). Le aflatossicosi si distinguono in primarie, causate da ingestione di cibi direttamente contaminati da AF, e secondarie, causate da carni o prodotti derivati da animali alimentati con mangimi o foraggi contaminati. Per quanto la presenza di AF venga riscontrata in diversi alimenti di origine vegetale (mais, mandorle, noccioline e pistacchi, caffè, frutta, ecc.) (168), l'introduzione di AF nella catena alimentare umana è, in gran parte, determinata dal trasferimento in prodotti di origine animale, a seguito di ingestione di mangimi contaminati (306, 378). In ambito zootecnico, il tasso di trasferimento di micotossine dal mangime contaminato ai prodotti alimentari di origine animale (latte, formaggi, carni, uova, ecc.), definito "carry-over", viene generalmente calcolato come rapporto percentuale fra la quantità giornaliera di micotossina trasferita nel prodotto e quella ingerita dall'animale. Nel caso specifico di AF, il carry-over assume notevole rilevanza nel caso del latte e dei prodotti lattiero caseari, con importanti conseguenze in campo sanitario ed economico. Le principali AF trasferite nel latte sono AFM₁ e AFM₂, originate, rispettivamente, dal metabolismo epatico di AFB₁ e AFB₂. Nel latte della maggior parte dei mammiferi esposti a livelli di contaminazione naturali, tuttavia, solo AFM₁ è riscontrabile a livelli significativi. La riconosciuta tossicità di AFM₁ ha portato gli organi legislativi dell'Unione Europea a definire, nel Regolamento (CE) n. 466/2001 della Commissione, i limiti massimi (0,05 µg/kg) ammissibili di tale contaminante nel latte, sia crudo sia destinato alla produzione di derivati, e negli alimenti per lattanti (0,025 µg/kg) nel Regolamento (CE) n. 683/2004 della Commissione. A scopo preventivo, inoltre, è stato definito il limite massimo ammissibile di AFB₁ per i mangimi destinati alle lattifere, pari a 0,01 mg/kg per i mangimi completi e di 0,005 mg/kg per i mangimi complementari (Direttiva 2003/100/CE della Commissione).

La produzione di alimenti e mangimi conformi ai limiti legali, comporta l'adozione di stringenti protocolli di prevenzione e controllo, che richiedono un notevole impegno tecnico ed economico, che non può essere, peraltro, affrontato dai paesi in via di sviluppo i cui sistemi produttivi non si basano su economie di scala. L'introduzione di limiti restrittivi sulle massime concentrazioni di AF legalmente ammissibili per diversi tipi di alimenti, inoltre, non può escludere che piccole quantità di tossine, inferiori ai limiti legali, vengano cumulativamente ingerite con una dieta variegata causando nel tempo effetti cronici anche irreversibili.

Nonostante siano attualmente in corso di studio trattamenti farmacologici potenzialmente in grado di prevenire il raggiungimento dei siti bersaglio di AF o di impedirne l'attivazione metabolica e l'interazione con macromolecole cellulari (442-444), le misure attualmente a disposizione per contrastare i rischi connessi alla tossicità di questi composti si basano essenzialmente sulla prevenzione della contaminazione e, relativamente all'industria mangimistica, sulla detossificazione degli alimenti contaminati (355, 409-411) o sull'eventuale associazione nella dieta con sostanze in grado di legare AF inibendone l'assorbimento intestinale (83, 319, 323, 378). Nessuna delle strategie proposte, tuttavia, ha prodotto risultati definitivi, in quanto i trattamenti presentano efficacia variabile, costi elevati e alterano spesso il valore nutritivo dell'alimento trattato.

Sarebbe quindi di grande rilevanza, scientifica e sociale, un approccio innovativo, definitivo ed economicamente sostenibile, per la prevenzione e il controllo delle aflatossicosi.

In tale prospettiva è stata condotta questa ricerca, finalizzato alla valutazione comparativa del potenziale vaccinale di diversi immunogeni, convenzionali, ricombinanti e genici, nell'induzione di Ab specificamente reattivi nei confronti di AFB₁, eventualmente fruibili per l'immunoprotezione nei confronti di aflatossicosi, primarie e secondarie, in modelli sperimentali animali (topi e ratti preliminarmente a vacche) e, potenzialmente, nell'uomo.

In accordo con gli obiettivi della ricerca sono state eseguite delle prove preliminari di immunizzazione, allo scopo di valutare l'efficienza nell'induzione di Ab specificamente reattivi nei confronti di AFB₁ da parte di un immunogeno convenzionale, disponibile come preparato commerciale, costituito da AFB₁ coniugata a BSA (AFB₁-BSA). Per quanto tale immunogeno sia difficilmente fruibile ai fini della vaccinazione in animali e sicuramente non utilizzabile nell'uomo, a causa della possibilità di rilascio della molecola attiva AFB₁, esso si pone come riferimento sierologico e funzionale per la valutazione dell'immunogenicità di costrutti alternativi.

L'immunogeno di riferimento AFB₁-BSA è stato, pregiudizialmente, utilizzato in prove di immunizzazione parenterale in topi. Per la rilevazione di Ab specifici per AF nei sieri degli animali immunizzati, è stato messo a punto un saggio immunoenzimatico diretto, basato sull'utilizzo di AFB₁ coniugata a perossidasi. Tale metodo ha permesso di dimostrare, in seguito ad immunizzazione parenterale di topi con AFB₁-BSA, l'induzione di Ab sierici specificamente reattivi nei confronti di AFB₁, appartenenti prevalentemente alla sottoclasse IgG1 e, in subordine, a IgG2a. Ab sierici specifici per AF si sono mantenuti ad elevato titolo nel tempo (11 mesi) e, in seguito alla somministrazione intragastrica di AFB₁, è stato osservato un netto decremento. Tale effetto non è risultato riferibile ad una depressione immunitaria indotta da AFB₁, non essendosi evidenziato alcun decremento nel titolo di Ab specifici per la proteina carrier (BSA). Queste osservazioni hanno permesso di presumere che Ab sierici possano interagire con AFB₁ somministrata per via orale, lasciando ipotizzare che tale interazione possa svolgere un ruolo immunoprotettivo.

Il coniugato AFB₁-BSA è stato, successivamente, utilizzato in prove di immunizzazione parenterale e delle mucose di ratti/ratte al fine di valutarne in modo comparativo l'efficienza nell'induzione di Ab, sistemici o secretori. Nel caso dell'immunizzazione parenterale di ratti, scopo dell'esperimento era anche quello di confermare i risultati ottenuti nell'esperimento di monitoraggio sierologico di topi immunizzati per via sistemica con AFB₁-BSA ed esposti ad AFB₁. Nel caso dell'immunizzazione delle

muose di ratte, inoltre, lo scopo era di verificare se una somministrazione massiva di AFB₁ attraverso la stessa via di immunizzazione fosse in grado di esercitare un effetto di richiamo fruibile al fine di monitoraggio per il rischio di esposizione ad AF. Mediante saggi immunoenzimatici diretti, è stata riscontrata una significativa induzione di Ab specifici per AFB₁ nei ratti immunizzati per via sistemica con AFB₁-BSA. Il livello di Ab rilevati con questo tipo di saggio è risultato, tuttavia, inferiore al livello di Ab rilevati nei sieri corrispondenti raccolti, nel corso dell'esperimento preliminare di immunizzazione sistemica intraperitoneale di topi con AFB₁-BSA. Dopo 5 mesi dall'inizio del protocollo di immunizzazione, inoltre, non era possibile rilevare Ab specifici per AFB₁ e, in seguito alla somministrazione intragastrica di AFB₁, il titolo di Ab specifici non mostrava significative variazioni. Il medesimo saggio immunoenzimatico diretto applicato a campioni di muco vaginale e feci di ratte immunizzate per via *i.v.g.* con AFB₁-BSA non ha permesso di rilevare Ab specifici per AFB₁.

Per verificare l'effettiva possibilità di immunoprotezione (quantità di AFM₁ escreta nel latte o trattenuta nei tessuti) e monitoraggio nei confronti di AFB₁, sono stati condotti esperimenti preliminari in vacche vaccinate per via sistemica e/o intranasale con l'immunogeno di riferimento AFB₁-BSA. Il coniugato adottato, che pure aveva mostrato una buona immunogenicità a livello sistemico in modelli sperimentali murini, e di topo particolarmente, non è risultato in grado, nelle condizioni sperimentali adottate, di indurre in vacche un livello significativo di Ab specifici per AFB₁. Tale comportamento non risulta presumibilmente attribuibile a caratteristiche intrinseche dell'aptene AFB₁, in quanto non si riscontravano parimenti Ab specifici prodotti nei confronti della porzione proteica del coniugato (BSA). L'esito negativo dell'immunizzazione potrebbe essere da attribuire all'inadeguatezza del carrier proteico utilizzato. BSA potrebbe presentare infatti, nel caso delle vacche, una presumibile non estraneità.

I risultati ottenuti in seguito ad immunizzazione delle muose con AFB₁-BSA sono in accordo con i risultati ottenuti precedentemente in conigli e polli (393, 398, 404). In

conigli è stato dimostrato, infatti, che la tolleranza nei confronti di AFB₁ è specifica del comparto delle mucose e non è associata a soppressione sistemica (tolleranza orale), non è causata da deplezione delle cellule B specifiche nella mucosa intestinale e non è annullabile dalla somministrazione di CT (393, 398). Tale fenomeno potrebbe essere il risultato di una precedente esposizione ad AFB₁ attraverso la dieta.

Sulla base dei risultati ottenuti si è ritenuto opportuno produrre costrutti alternativi per una valutazione della possibilità di immunizzazione in vacche, parenterale e delle mucose, per una valutazione della possibilità di acquisizione di un vaccino potenzialmente fruibile anche nell'uomo. A tale scopo, stati perseguiti la costruzione e lo studio di immunogeni, ricombinanti e genici, derivati da due peptidi di 14 aminoacidi, denominati C1 (FHPRCNEMTCHIKP) e C2 (ANTWCYVDECMRIA), ottenuti da librerie fagiche di espressione (421). C1 e C2 si sono posti come ottimi candidati di mimotopi di AFB₁ in quanto in grado di competere con esse per il sito combinatorio di un Ab monoclonale specifico nei confronti di AFB₁ (mAb AFB₁).

In particolare, sono stati inizialmente prodotti peptidi ricombinanti fagici (pC89-C1, pC89-C2), esprimenti i mimotopi peptidici C1 e C2 come proteine di fusione con la proteina capsidica pVIII del fagemide pC89, derivato dal fago M13 (420).

L'utilizzo di particelle fagiche ricombinanti esprimenti peptidi di interesse a livello del capsido (phage display) ha assunto notevole interesse in ambito vaccinale in quanto immunogeni ricombinanti fagici sono generalmente di facile costruzione (445) ed efficaci nell'indurre una forte risposta anticorpale, anche in assenza di adiuvante (446).

Paragonati alla sintesi chimica dei peptidi con successiva coniugazione a proteine carriers, i fagi rappresentano un metodo più semplice ed economico per la produzione di vaccini (447). Tuttavia, la non completa omologia tra i singoli cloni fagici rende questi immunogeni di difficile standardizzazione.

Al fine di prescindere dall'utilizzo di vettori fagemidici quali componenti immunogene e di disporre di costrutti ricombinanti completamente standardizzati, sono stati prodotti

degli immunogeni proteici ricombinanti in grado di esprimere un diverso numero di copie (aptameri) del mimotopo peptidico C2 all'interno della sequenza aminoacidica delle proteine batteriche tioredossina (Trx/C2_(n)) e cianovirina (NcCVNH0/C2_(n)), al fine di valutarne comparativamente l'efficacia nell'induzione di Ab specifici per AFB₁, anche in relazione al numero degli inserti (423).

Le sequenze codificanti per i peptidi mimotopi C1 e C2, inoltre, sono state clonate nel vettore per immunoterapia genica pDisplay, già sperimentato con successo a scopo vaccinale (448), al fine di produrre costrutti genici da utilizzare in esperimenti di immunizzazione a DNA (pDisplay-C1 e pDisplay-C2). Le modalità di vaccinazione genica hanno dimostrato di essere potenzialmente in grado di implementare la risposta anticorpale grazie alla aumentata persistenza *in vivo* dell'Ag e alla proprietà di adiuvante esplicita dal DNA plasmidico stesso (449). È stato, inoltre, ipotizzato che l'inserzione di sequenze segnale, omologhe od eterologhe, in vettori per la vaccinazione genica possa dirigere gli Ag codificati verso il reticolo endoplasmico delle cellule trasfettate e, quindi, alle vie di secrezione, garantendo, pertanto, un'aumento della disponibilità dell'immunogeno per le cellule presentanti l'Ag (450).

Tutti gli immunogeni prodotti sulla base dei peptidi C1 e C2, mimotopi di AFB₁, sono stati utilizzati in prove preliminari di immunizzazione parenterale di topi, allo scopo di valutarne comparativamente l'efficienza nell'induzione di Ab sierici specificamente reattivi nei confronti di AFB₁. Per la valutazione della risposta umorale suscitata da immunizzazione con i diversi costrutti, e relativi controlli, è stato utilizzato il metodo immunoenzimatico diretto, rivelatosi efficace per la determinazione di Ab specifici per AFB₁ in topi immunizzati con AFB₁-BSA.

I risultati hanno evidenziato che i peptidi C1 e C2, nonostante siano riconosciuti quali mimotopi di AFB₁, non sono in grado di indurre un livello sufficiente di Ab specifici nei confronti di AFB₁ quando espressi nei sistemi di immunizzazione finora utilizzati.

Poiché l'approccio di immunizzazione con mimotopi peptidici di AFB₁, ricombinan-

ti e genici, si è dimostrato scarsamente efficace nelle condizioni sperimentali adottate, in accordo con il programma di ricerca, è stata perseguita la realizzazione di un nuovo immunogeno convenzionale, costituito da una molecola di AFB₁ resa atossica mediante modificazione chimica, coniugata ad un differente carrier proteico, KLH, riportato in letteratura come efficace immunogeno in diverse specie animali (447, 451-453) e nell'uomo (454).

Allo scopo di selezionare molecole di AFB₁ modificate, caratterizzate dalla stessa antigenicità ma scevre di tossicità, sono stati eseguiti saggi *in vitro* per la valutazione dell'azione epatotossica e mutagenica esplicata da tali molecole, comparativamente ad AFB₁, rispettivamente in cellule di epatocarcinoma umano HepG2 e *S. typhimurium* TA 98 e TA 100 (test di Ames).

Tali saggi *in vitro* hanno permesso di individuare una molecola di AFB₁, modificata mediante introduzione di un gruppo carbossilico in posizione-1 (AFB₁-ossima), non inducente effetti tossici significativi in epatociti a concentrazioni fino a cinque volte maggiori della IC₅₀ determinata per AFB₁ e caratterizzata da mutagenicità inferiore del 98-100% rispetto ad AFB₁ nel test di Ames. In seguito ai risultati ottenuti, e da dati bibliografici che riportano la atossicità di AFB₁-ossima in embrioni di pollo (383), la molecola prodotta è stata definita AnaflatossinaB₁ (AnAFB₁).

Il gruppo carbossilico introdotto durante il processo di conversione di AFB₁ in AnAFB₁ è stato, successivamente, utilizzato per la sintesi del coniugato AnAFB₁-KLH, attraverso la formazione di un legame covalente con i gruppi amminici primari presenti sulla proteina KLH.

È stata, quindi, perseguita la valutazione della potenzialità vaccinale di AnAFB₁-KLH, utilizzando il coniugato quale immunogeno in prove di immunizzazione sistemica di vacche allo scopo di indurre una risposta umorale nei confronti di AFB₁ e verificare il potenziale di Ab specifici eventualmente prodotti nella prevenzione del carry-over di AFB₁ nel latte.

Dati gli elevati costi di gestione della sperimentazione in animali di grossa taglia, le

prove sono state effettuate inizialmente su un gruppo “pilota” costituito da quattro animali, di cui due immunizzati con AnAFB₁-KLH e due animali di controllo immunizzati con KLH. I risultati preliminari ottenuti hanno permesso di verificare come AnAFB₁-KLH, somministrata per via *i.m.* unitamente ad adiuvante di Freund (completo e incompleto), possa essere in grado di indurre livelli significativi di Ab sierici specifici per AFB₁. L'entità della risposta all'immunizzazione, tuttavia, è risultata essere influenzata dalla variabilità del singolo animale in quanto, al termine del periodo di immunizzazione, in una delle due vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH è stato rilevato un titolo di Ab specifici per AFB₁ nettamente maggiore, in base alla definizione di titolo anticorpale assunta (10.000 vs 1.000).

Una valutazione preliminare dell'efficacia protettiva di Ab specifici per AFB₁ è stata eseguita monitorando, per due giorni, le concentrazioni di AFM₁ nel latte raccolto dalle vacche dell'esperimento pilota in seguito alla somministrazione di mangime contaminato con quantità anomale di AFB₁ (136,8 µg al giorno). In tali esperimenti, è stata presunta una relazione tra il titolo rilevato di Ab specifici per AFB₁ e la riduzione del carry-over di AFB₁ nel latte. Già alla mungitura successiva all'ingestione di AFB₁, infatti, la concentrazione di AFM₁ nel latte delle vacche del gruppo di controllo, immunizzate con KLH, è risultata elevata e superiore al limite massimo tollerabile dalla legislazione della Comunità europea (50 µg/kg). Al contrario, nella vacca che presentava un elevato titolo di Ab specifici, la concentrazione di AFM₁ nel latte è rimasta inferiore ai 30 µg/kg durante i due giorni del periodo sperimentale di somministrazione di AFB₁. Nel latte della vacca immunizzata con AnAFB₁-KLH e caratterizzata da un basso titolo di Ab specifici per AFB₁ sono state rilevate concentrazioni di AFM₁ paragonabili ai controlli. Significativamente, in esperimenti analoghi eseguiti ad un mese di distanza, nella vacca che presentava i titoli maggiori, Ab specifici per AFB₁ si sono dimostrati in grado di mantenere la concentrazione di AFM₁ escreta nel latte a livelli decisamente inferiori a quelli massimi tollerabili per legge. Sulla base dei risultati positivi ottenuti, le prove successive sono state condotte, a

scopo statistico, su gruppi numericamente superiori di animali, valutando l'efficienza della vaccinazione con AnAFB₁-KLH ed adiuvante di Freund (completo e incompleto) comparativamente alla vaccinazione con AnAFB₁-KLH e Montanide ISA 563, un adiuvante approvato per la produzione di vaccini commerciali in ambito veterinario, precedentemente utilizzato con successo per l'immunizzazione di ovini da latte nei confronti di *Mycoplasma agalactiae* (455).

L'immunogeno AnAFB₁-KLH, somministrato congiuntamente a Montanide ISA 563, non è risultato in grado, nelle condizioni sperimentali adottate, di indurre in vacche un livello significativo di Ab sierici specifici per AFB₁.

Al contrario, è stata riscontrata una significativa induzione di Ab sierici specifici per AFB₁ in tutte le vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH ed adiuvante di Freund (completo e incompleto). In base alla definizione assunta di titolo anticorpale, è stato possibile dividere gli animali immunizzati con AnAFB₁-KLH in due gruppi: un gruppo costituito da tre vacche "low responder" (titolo di Ab specifici 1.000 - 4.000) ed uno costituito da tre vacche "high responder" (titolo di Ab specifici 10.000 - 40.000). La valutazione dell'efficacia di Ab specifici per AFB₁ nel prevenire il carry-over di AFB₁ nel latte è stata condotta quantificando AFM₁ rilasciata nel latte di vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH e sottoposte ad ingestione di anomale quantità di AFB₁, comparativamente a vacche di controllo immunizzate con KLH.

La valutazione è stata eseguita tenendo in considerazione alcuni importanti parametri zootecnici che sono noti influenzare la quantità di AFM₁ trasferita nel latte, quali la fase di lattazione e la durata del periodo di ingestione di mangime contaminato. La fase di lattazione dell'animale è un fattore determinante in grado di influenzare il carry-over (314, 320). Nelle vacche, a parità di contaminazione di mangime con AFB₁, è possibile rilevare carry-over pari al 6,2% nelle fasi precoci della lattazione (2-4 settimane) e dell'1,8% nella fase di lattazione medio-avanzata (34-36 settimane) (320). Questo risultato è riferibile, in gran parte, alla diversa quantità di latte prodotto, maggiore all'inizio della lattazione e progressivamente decrescente con il pro-

gredire del periodo di lattazione. In vacche è stato dimostrato che il carry-over aumenta in relazione all'incremento della produzione di latte (320). Tale effetto viene attribuito, principalmente, ad una maggiore permeabilità delle cellule degli alveoli. È noto, inoltre, che, in seguito a somministrazione giornaliera continuativa di quantità costanti di AFB₁, la concentrazione di AFM₁ nel latte prodotto da bovini ed ovini aumenta, giornalmente, fino al raggiungimento di un plateau in cui si stabilisce uno stato stazionario di escrezione di AFM₁ (310-314). A causa di questo fenomeno, gli studi quantitativi di carry-over devono essere condotti in seguito al raggiungimento della fase stazionaria di escrezione.

Nella nostra esperienza, e in accordo a quanto riportato in altri studi, lo stato stazionario, nei diversi esperimenti effettuati, è stato raggiunto mediamente al settimo giorno (310). In seguito alla cessazione della somministrazione della dieta contaminata, e in accordo con quanto noto, le concentrazioni di AFM₁ rilevate nel latte sono diminuite, in 3 giorni, fino ai livelli minimi di contaminazione costitutivamente presenti.

In fase di lattazione medio-iniziale, il trasferimento di AFB₁ dall'alimento al latte sotto forma di AFM₁ nelle sei vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH, calcolato allo stato stazionario di escrezione, è risultato, per quanto non statisticamente significativo a causa della grande variabilità riscontrata nei singoli animali, mediamente inferiore del 20% rispetto alle vacche di controllo immunizzate con KLH, a testimonianza di un effetto neutralizzante di Ab specifici per AFB₁. È stata riscontrata, infatti, una elevata correlazione ($R = -0,72$, $P < 0,05$) fra la concentrazione media di AFM₁ escreta in fase stazionaria dalle vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH ed il titolo anticorpale rilevato nel siero. Considerando solo le tre vacche immunizzate "high responder" (titolo di Ab specifici per AFB₁ 10.000 - 40.000), la concentrazione di AFM₁ rilevata nel latte è risultata inferiore del 44% ($P < 0,01$) rispetto a quella rilevata nel latte delle vacche di controllo immunizzate con KLH.

Esperimenti analoghi, effettuati dopo due mesi in fase di lattazione medio-avanzata,

hanno permesso di calcolare una escrezione media di AFM₁ nel latte delle sei vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH inferiore dell'11% rispetto all'escrezione rilevata mediamente negli animali di controllo immunizzati con KLH. Nonostante tale riduzione non fosse statisticamente significativa, a causa della grande variabilità riscontrata nei singoli animali, è stato possibile riscontrare una correlazione ($R = -0,68$, $P < 0,05$) fra la concentrazione media di AFM₁ escreta in fase stazionaria dalle vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH ed il titolo anticorpale rilevato nel siero. Considerando le tre vacche "high responder", che hanno mostrato elevata risposta umorale specifica, delle sei immunizzate con AnAFB₁-KLH, l'escrezione di AFM₁ latte è risultata del 36% inferiore ai controlli.

Per le vacche "high responder", sono stati ottenuti risultati paragonabili nelle prove di carry over effettuate nella fase di lattazione medio-iniziale e medio-avanzata nonostante il titolo di Ab sierici specifici per AFB₁ fosse diminuito nel tempo. Una possibile spiegazione per tale fenomeno potrebbe essere riferibile al minore livello di carry-over di AFB₁, causato dalla diminuita produzione di latte in fase tardiva, che potrebbe essere più facilmente inibito da quantità minori di Ab specifici. È importante sottolineare che esiste, inoltre, una elevata componente di variabilità individuale nel carry-over di ogni animale (320, 328), probabilmente determinata da differenze in termini di induzione dei sistemi enzimatici in grado di ossidare AFB₁, differenze di permeabilità della ghiandola mammaria (324), differenze nell'attività degradativa delle AF (316) e di biotrasformazione in altri metaboliti differenti da AFM₁ (330). È quindi possibile ipotizzare che il titolo di Ab specifici per AFB₁ necessari per impedire il carry-over nel latte sia diverso da animale ad animale.

Nonostante i molteplici fattori di variabilità determinati dalla risposta di ogni singolo animale all'immunizzazione, differenze tra le vacche nel metabolismo di AFB₁ e differenze nel singolo animale in relazione alla fase di lattazione, i risultati ottenuti lasciano ipotizzare un ottimo potenziale del vaccino AnAFB₁-KLH. Ab sierici specifici per AFB₁ si sono dimostrati, infatti, in grado di neutralizzare AFB₁ impedendo-

ne in modo significativo il carry-over nel latte, anche se gli elevati livelli di contaminazione iniziale hanno impedito il mantenimento dei livelli di AFM₁ al di sotto dei limiti legali imposti dalla Comunità Europea. In proposito, è utile considerare che l'ingestione giornaliera di 136,8 µg/capo/giorno corrisponde ad un quantitativo, calcolato sulla quantità di mangime consumato giornalmente, di 11,5 µg/kg, quantità largamente eccedente i limiti di AFB₁ imposti dalla Comunità Europea per i mangimi (5 µg/kg). Considerando, inoltre, l'equazione empirica, ampiamente utilizzata a scopo predittivo in ambito zootecnico, che correla in modo lineare il contenuto di AFM₁ nel latte e l'ingestione di AFB₁ (320):

$$\text{AFM}_1 \text{ (ng/ kg di latte)} = 1.19 \times \text{AFB}_1 \text{ ingerita (}\mu\text{g/capo/giorno)} + 1.9$$

si calcola che l'ingestione media di AFB₁ massima per produrre latte contaminato con AFM₁ a livelli inferiori a 50 µg/kg debba essere inferiore ai 40 µg/capo/giorno. In queste prove, pur essendo il quantitativo di AFB₁ ingerita superiore di 3,5 volte a questo valore, il latte prodotto dalle vacche "high responder" eccedeva di sole 1,9 volte il limite fissato dalla Comunità europea (concentrazione di AFM₁ media 94 ng/kg). A conferma della validità dell'equazione proposta (320) nelle nostre condizioni sperimentali, la concentrazione di AFM₁, calcolata in base alla concentrazione di AFB₁ ingerita (164,7 ng/kg) è in accordo con la concentrazione rilevata nel gruppo di controllo (171,44 ng/kg).

Nel corso degli anni, sono stati sviluppati e riportati in letteratura svariati metodi fisici, chimici e biologici per la neutralizzazione di AF, ma nessuno di tali metodi sembra rispettare completamente tutti i criteri di efficacia, sicurezza, salvaguardia degli elementi nutritivi e costi contenuti, richiesti da un metodo di detossificazione praticamente applicabile (355). L'approccio più recente al problema è l'utilizzo di materiali adsorbenti inerti, come gli allumino-silicati di sodio e calcio, zeoliti, carboni attivi, bentonite di sodio, argille, polimeri speciali (il cui uso è autorizzato dal Reg. (CE), n. 2439/1999 del 17 novembre 1999), in grado di sequestrare le AF in modo stabile, riducendone conseguentemente l'assorbimento a livello del tratto gastro-intestinale (83).

I carboni attivi (ACs) e i gli alumino-silicati idrati di calcio sodio (HSCAS), mescolati al mangime contaminato in proporzione del 2%, sono stati dimostrati ridurre in vacche il carry-over di AF nel latte rispettivamente del 50 e 36% (319). In esperimenti che utilizzavano l'1% di HSACS addizionati al mangime, è stato ottenuta una riduzione dell'escrezione di AFM₁ nel latte pari al 24% (323). In esperimenti recenti, eseguiti con polimeri speciali (MPL) (378), l'inclusione di 20 e 50 g MPL/capo/giorno ha portato alla riduzione del carry-over di AFB₁ dal mangime al latte del 31 e 41% rispettivamente.

La riduzione del trasferimento di AFB₁ nel latte sotto forma di AFM₁, ottenuta per gli animali immunizzati con AnAFB₁-KLH ad elevato titolo di Ab specifici per AFB₁, è quindi paragonabile alla riduzione ottenuta con i migliori adsorbenti.

A differenza dell'approccio vaccinale da noi proposto, le metodologie che prevedono l'utilizzo di adsorbenti per la riduzione del trasferimento di AFB₁ nel latte sotto forma di AFM₁, dipendono dalla costante aggiunta giornaliera di composti che presentano costi generalmente elevati.

Nonostante esperimenti *in vitro* abbiano mostrato risultati promettenti, a riprova della possibilità di utilizzare HSCAS come sostanze effettivamente in grado di adsorbire AFB₁ (379), alcuni ricercatori raccomandano particolare cautela nell'utilizzo di ACs e HSCAS come additivi dei mangimi, dal momento che non sono noti gli effetti di questi materiali sull'utilizzo dei nutrienti essenziali (319, 379).

È inoltre importante tenere in considerazione che la riduzione del carry-over di AFB₁ nel latte, ottenuta con l'approccio vaccinale potrebbe risultare cumulabile all'azione espletata dagli adsorbenti e implementata ottimizzando le procedure di immunizzazione, utilizzando, ad esempio, adiuvanti più efficienti e/o carriers più immunogeni. Tra gli adiuvanti da valutare sarebbe importante includere quelli di possibile utilizzo umano (ad esempio il tossoide difterico o tetanico). La possibile vaccinazione nell'uomo potrebbe estendere la protezione dagli effetti tossici causati non solo da AFM₁ (nel latte e suoi derivati) ma anche da altre AF (in altri alimenti).

A supporto di questa ipotesi, la potenzialità di Ab specifici per AFB₁, prodotti in seguito ad immunizzazione con AnAFB₁-KLH al fine della immunoprotezione nei confronti di aflatossicosi primarie, è stata valutata pregiudizialmente *in vitro* in saggi di neutralizzazione della tossicità di AFB₁ nei confronti di cellule di epatocarcinoma umano. L'effettiva riduzione della tossicità rilevata in tali saggi, insieme a precedenti evidenze di una sostanziale neutralizzazione dell'azione mutagenica esplicata da AFB₁ in *S. typhimurium* (391) e di una netta riduzione della lisogenesi indotta da AFB₁ in *E. coli* (388) da parte di antisieri specifici per AFB₁, avvalorano l'ipotesi formulata sulla formazione di immunocomplessi tra gli Ab sierici prodotti in seguito ad immunizzazione con AnAFB₁-KLH e somministrazione orale di AFB₁. La reattività crociata di Ab specifici per AFB₁ indotti nei confronti di altre AF (AFG₁ e AFB₂), riscontrata nei saggi immunoenzimatici, permette di ipotizzare che tali Ab possano esercitare effetti immunoprotettivi anche in seguito ad ingestione di alimenti contaminati da diverse AF.

La verifica sperimentale di queste ipotesi *in vivo*, potrebbe rappresentare la prova di concetto per la risoluzione definitiva del problema aflatossicosi, estensibile concettualmente a tutte le altre micotossicosi, primarie e secondarie, di interesse umano.

5.
BIBLIOGRAFIA

1. Bu'Lock, J. D. 1961. Intermediary metabolism and antibiotic synthesis. *Adv Appl Microbiol* 3:293.
2. Waksman, S. A. 1947. What is an antibiotic or an antibiotic substance? *Mycologia* 39:565.
3. Demain, A. L. 1999. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:455.
4. Maggon, K. K., S. K. Gupta, and T. A. Venkitasubramanian. 1977. Biosynthesis of aflatoxins. *Bacteriol Rev* 41:822.
5. Mannon, J., and E. Johnson. 1985. Fungi down on the farm. *New Sci.* 195:12-16.
6. Fink-Gremmels, J. 1999. Mycotoxins: their implications for human and animal health. *Vet Quart* 21:115-120.
7. Shank, R. C. 1977. Metabolic activation of mycotoxins by animals and humans: an overview. *J Toxicol Environ Health* 2:1229.
8. Lewis, L., M. Onsongo, H. Njapau, H. Schurz-Rogers, G. Lubber, S. Kieszak, J. Nyamongo, L. Backer, A. M. Dahiye, A. Misore, K. DeCock, and C. Rubin. 2005. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. *Environ Health Perspect* 113:1763.
9. Krishnamachari, K. A., R. V. Bhat, V. Nagarajan, and T. B. Tilak. 1975. Hepatitis due to aflatoxicosis. An outbreak in Western India. *Lancet* 1:1061.
10. Krishnamachari, K. A., R. V. Bhat, V. Nagarajan, and T. B. Tilak. 1975. Investigations into an outbreak of hepatitis in parts of western India. *Indian J Med Res* 63:1036.
11. Ngindu, A., B. K. Johnson, P. R. Kenya, J. A. Ngira, D. M. Ocheng, H. Nandwa, T. N. Omondi, A. J. Jansen, W. Ngare, J. N. Kaviti, D. Gatei, and T. A. Siongok. 1982. Outbreak of acute hepatitis caused by aflatoxin poisoning in Kenya. *Lancet* 1:1346.
12. Sargeant, K., A. Sheridan, J. O'Kelly, and R. B. A. Carnaghan. 1961. Toxicity Associated with Certain Samples of Groundnuts. *Nature* 192.
13. Nesbitt, B. F., J. O'Kelly, K. Sargeant, and A. Sheridan. 1962. *Aspergillus flavus* and turkey X disease. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature* 195:1062.
14. Sargeant, K., R. Carnaghan, and R. Allcroft. 1963. Toxic products in groundnuts- chemistry and origin of aflatoxins. *Chem Ind (London)*:153.
15. Carnaghan, R. B., R. D. Hartley, and J. O'Kelly. 1963. Toxicity and Fluorescence Properties of the Aflatoxins. *Nature* 200:1101.
16. Asao, T., G. Buechi, M. M. Abdel-Kader, S. B. Chang, E. L. Wick, and G. N. Wogan. 1965. The Structures of Aflatoxins B and G. *J Am Chem Soc* 87:882.
17. Cole, R. J., and R. H. Cox. 1981. *Handbook of toxic fungal metabolites*. Academic Press, New York.
18. Schroeder, H. W., and R. A. Boller. 1973. Aflatoxin production of species and strains of the *Aspergillus flavus* group isolated from field crops. *Appl Microbiol* 25:885.

19. Dorner, J. W., R. J. Cole, and U. L. Diener. 1984. The relationship of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* with reference to production of aflatoxins and cyclopiazonic acid. *Mycopathologia* 87:13.
20. D'Mello, J., and M. AMC. 1997. Mycotoxins. *Animal Feed Sci. Technol.* 69.
21. Pitt, J. I. 2000. Toxigenic fungi and mycotoxins. *Br Med Bull* 56:184.
22. Kurtzman, C. P., B. W. Horn, and C. W. Hesseltine. 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 53:147.
23. Peterson, S. W., Y. Ito, B. W. Horn, and T. Goto. 2001. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia* 93:689.
24. Klich, M. A., E. J. Mullaney, C. B. Daly, and J. W. Cary. 2000. Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *Aspergillus tamarii* and *A. ochraceo-roseus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:605.
25. CAST. 2003. Mycotoxins: Risk in plant, animal and human system, Vol. Task Force Report No. 139. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, USA.
26. Ito, Y., S. W. Peterson, D. T. Wicklow, and T. A. Goto. 2001. *Aspergillus pseudotamarii* a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycol. Res.* 15.:233–239.
27. Goto, T., D. T. Wicklow, and Y. Ito. 1996. Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a sclerotium-producing *Aspergillus tamarii* strain. *Appl Environ Microbiol* 62:4036.
28. D'Mello, J., and A. McDonald. 1997. Mycotoxins. *Animal Feed Sci. Technol.* 69:155.
29. Klich, M. A., L. H. Tiffany, and G. Knaphus. 1992. Ecology of the aspergilli of soils and litter. In *Aspergillus: Biology and Industrial Applications*. J. W. Bennett, and M. A. Klich, eds. Boston, Butterworth-Heinemann, p. 328.
30. Giorni, P., N. Magan, A. Pietri, T. Bertuzzi, and P. Battilani. 2007. Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. *Int J Food Microbiol* 113:330.
31. Klich, M. A., L. H. Tiffany, and G. Knaphus. 1992. Ecology of the aspergilli of soils and litter. In *Aspergillus: Biology and Industrial Applications*. J. W. Bennett, and M. A. Klich, eds. Boston, Butterworth-Heinemann, pp. 329-353.
32. Scheidegger, K. A., and G. A. Payne. 2003. Unlocking the secrets behind secondary metabolism: a review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *J Toxicol* 22:423.
33. Wilson, D. M., and G. A. Payne. 1994. Factors affecting *Aspergillus flavus* group infection and aflatoxin contamination. In *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*. D. L. Eaton, and J. D. Groopman, eds. Academic Press Inc., San Diego, California, USA, p. 309.
34. Payne, G. A., and M. P. Brown. 1998. Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. *Annu Rev Phytopathol* 36:329.
35. Payne, G. A. 1992. Aflatoxin in maize. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10:423.

36. Scheidegger, K. A., and G. A. Payne. 2003. Unlocking the secrets behind secondary metabolism: a review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *J. Toxicol.-Toxin. Rev.* 22:423.
37. Widstrom, N. W. 1996. The aflatoxin problem with corn grain. In *Advances in Agronomy*. D. Sparks, ed. Academic Press, New York, p. 219.
38. Sweeney, M. J., and A. D. Dobson. 1999. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett* 175:149.
39. Bhatnagar, D., J. W. Cary, K. Ehrlich, J. Yu, and T. E. Cleveland. 2006. Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. *Mycopathologia*. 162:155.
40. Bennett, J. W., and M. Klich. 2003. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 16:497.
41. Takahashi, T., P. K. Chang, K. Matsushima, J. Yu, K. Abe, D. Bhatnagar, T. E. Cleveland, and Y. Koyama. 2002. Nonfunctionality of *Aspergillus sojae* aflR in a strain of *Aspergillus parasiticus* with a disrupted aflR gene. *Appl Environ Microbiol* 68:3737.
42. Watson, A. J., L. J. Fuller, D. J. Jeenes, and D. B. Archer. 1999. Homologs of aflatoxin biosynthesis genes and sequence of aflR in *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*. *Appl Environ Microbiol* 65:307.
43. Wei, D. L., and S. C. Jong. 1986. Production of aflatoxins by strains of the *Aspergillus flavus* group maintained in ATCC. *Mycopathologia* 93:19.
44. Hsieh, D. 1988. Potential human health hazards of mycotoxins. Mycotoxins and phytotoxins. In *Third Joint Food and Agriculture Organization/W.H.O./United Nations Program International Conference of Mycotoxins*. S. Natori, K. Hashimoto, and Y. Ueno, eds. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, p. 69.
45. Schmidt-Heydt, M., A. Abdel-Hadi, N. Magan, and R. Geisen. 2009. Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. *Int J Food Microbiol* 135:231.
46. Bennett, J. W., J. J. Dunn, and C. I. Goldsman. 1981. Influence of white light on production of aflatoxins and anthraquinones in *Aspergillus parasiticus*. *Appl Environ Microbiol* 41:488.
47. Bhatnagar, D., J. W. Cary, K. Ehrlich, J. Yu, and T. E. Cleveland. 2006. Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. *Mycopathologia* 162:155.
48. Davis, N. D., and U. L. Diener. 1968. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* from various carbon sources. *Appl Microbiol* 16:158.
49. Woloshuk, C. P., J. R. Cavaletto, and T. E. Cleveland. 1997. Inducers of Aflatoxin Biosynthesis from Colonized Maize Kernels Are Generated by an Amylase Activity from *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 87:164.
50. Bennett, J. W., S. Kale, and Y. J. 2003. Aflatoxins: Background, Toxicology, and Molecular Biology. In *Infectious Disease: Foodborne Diseases*. S. Simjee, ed. Humana Press Inc., Totowa, NJ.

51. EFSA. 2004. EFSA: European Food Safety Agency. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. *EFSA J* 39:1.
52. Cullen, J. M., and P. M. Newberne. 1994. Acute hepatotoxicity of aflatoxins. In *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*. D. L. Eaton, and J. D. Groopman, eds. Academic Press, p. 1.
53. IARC. 1993. Some naturally occurring substances - food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. In *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, Vol. 56. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, p. 245.
54. Li, F. Q., T. Yoshizawa, O. Kawamura, X. Y. Luo, and Y. W. Li. 2001. Aflatoxins and fumonisins in corn from the high-incidence area for human hepatocellular carcinoma in Guangxi, China. *J Agric Food Chem* 49:4122.
55. Medical Research Council 2001. Aflatoxin in peanut butter, P. b. T., South Africa: PROMEC Unit, 2001. Internet: <http://www.mrc.ac.za/policybriefs/polbrief3.htm>. (accessed 10 March 2004).
56. Hall, A. J., and C. P. Wild. 1994. Epidemiology of aflatoxin-related disease. In *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*. J. D. Groopman, ed. Academic Press, p. 233.
57. Awuah, R. T., and K. A. Kpodo. 1996. High incidence of *Aspergillus flavus* and aflatoxins in stored groundnut in Ghana and the use of a microbial assay to assess the inhibitory effects of plant extracts on aflatoxin synthesis. *Mycopathologia* 134:109.
58. Jolly, P., Y. Jiang, W. Ellis, R. Awuah, O. Nnedu, T. Phillips, J. S. Wang, E. Afriyie-Gyawu, L. Tang, S. Person, J. Williams, and C. Jolly. 2006. Determinants of aflatoxin levels in Ghanaians: sociodemographic factors, knowledge of aflatoxin and food handling and consumption practices. *Int J Hyg Environ Health* 209:345.
59. Russell, L., D. F. Cox, G. Larsen, K. Bodwell, and C. E. Nelson. 1991. Incidence of molds and mycotoxins in commercial animal feed mills in seven midwestern states, 1988-1989. *J Anim Sci* 69:5.
60. Pietri, A., T. Bertuzzi, L. Pallaroni, and G. Piva. 2004. Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in Northern Italy. *Food Addit Contam* 21:479.
61. European Environment Agency. 2005. Subject: Global and European temperature assessment. http://themes.eea.europa.eu/IMS/ISpecs/Specification20041006175027/IAssessment1116322231704/view_content Accessed Jul. 27, and 2006.
62. Williams, J. H., T. D. Phillips, P. E. Jolly, J. K. Stiles, C. M. Jolly, and D. Aggarwal. 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr* 80:1106.
63. IUPAC. 2004. Compendium of Chemical Terminology. 74:1064.
64. Miraglia, N., G. Assennato, E. Clonfero, S. Fustinoni, and N. Sannolo. 2004. [Biologically effective dose biomarkers]. *G Ital Med Lav Ergon* 26:298.

65. Sudakin, D. L. 2003. Dietary aflatoxin exposure and chemoprevention of cancer: a clinical review. *J Toxicol Clin Toxicol* 41:195.
66. Burg, W. A., O. L. Shotwell, and B. E. Saltzman. 1981. Measurements of airborne aflatoxins during the handling of contaminated corn. *Am Ind Hyg Assoc J* 42:1.
67. Sorenson, W. G., W. Jones, J. Simpson, and J. I. Davidson. 1984. Aflatoxin in respirable airborne peanut dust. *J Toxicol Environ Health* 14:525.
68. Sorenson, W. G., J. P. Simpson, M. J. Peach, 3rd, T. D. Thedell, and S. A. Olenchock. 1981. Aflatoxin in respirable corn dust particles. *J Toxicol Environ Health* 7:669.
69. Kelly, J. D., D. L. Eaton, F. P. Guengerich, and R. A. Coulombe, Jr. 1997. Aflatoxin B1 activation in human lung. *Toxicol Appl Pharmacol* 144:88.
70. Jakab, G. J., R. R. Hmielecki, A. Zarba, D. R. Hemenway, and J. D. Groopman. 1994. Respiratory aflatoxicosis: suppression of pulmonary and systemic host defenses in rats and mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 125:198.
71. Hayes, R. B., J. P. van Nieuwenhuize, J. W. Raatgever, and F. J. ten Kate. 1984. Aflatoxin exposures in the industrial setting: an epidemiological study of mortality. *Food Chem Toxicol* 22:39.
72. Dvorackova, I., C. Stora, and N. Ayraud. 1981. Evidence of aflatoxin B1 in two cases of lung cancer in man. *J Cancer Res Clin Oncol* 100:221.
73. Dvorackova, I., and V. Pichova. 1986. Pulmonary interstitial fibrosis with evidence of aflatoxin B1 in lung tissue. *J Toxicol Environ Health* 18:153.
74. Riley, R. T., B. W. Kemppainen, and W. P. Norred. 1985. Penetration of aflatoxins through isolated human epidermis. *J Toxicol Environ Health* 15:769.
75. Riley, R. T., B. W. Kemppainen, and W. P. Norred. 1988. Quantitative tritium exchange of [3H] aflatoxin B1 during penetration through isolated human skin. *Biochem Biophys Res Commun* 153:395.
76. Joffe, A. Z., and H. Ungar. 1969. Cutaneous lesions produced by topical application of aflatoxin to rabbit skin. *J Invest Dermatol* 52:504.
77. Wei, R. D., G. X. Liu, and S. S. Lee. 1970. Uptake of aflatoxin B1 by the skin of rats. *Experientia* 26:82.
78. Rastogi, S., R. K. Dogra, S. K. Khanna, and M. Das. 2006. Skin tumorigenic potential of aflatoxin B1 in mice. *Food Chem Toxicol* 44:670.
79. Wilson, R., R. Ziprin, S. Ragsdale, and D. Busbee. 1985. Uptake and vascular transport of ingested aflatoxin. *Toxicol Lett* 29:169.
80. Kumagai, S. 1989. Intestinal absorption and excretion of aflatoxin in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 97:88.
81. Wogan, G. N., and P. M. Newberne. 1967. Dose-response characteristics of aflatoxin B1 carcinogenesis in the rat. *Cancer Res* 27:2370-2376.
82. Degan, G. H., and H. G. Neumann. 1978. The major metabolite of aflatoxin B1 in the rat is a glutathione conjugate. *Chem Biol Interact*:239.

83. Ramos, A. J., and E. Hernandez. 1996. In situ absorption of aflatoxins in rat small intestine. *Mycopathologia* 134:27.
84. Coulombe, R. A., Jr., and R. P. Sharma. 1985. Clearance and excretion of intratracheally and orally administered aflatoxin B1 in the rat. *Food Chem Toxicol* 23:827.
85. Trucksess, M. W., J. L. Richard, L. Stoloff, J. S. McDonald, and W. C. Brumley. 1983. Absorption and distribution patterns of aflatoxicol and aflatoxins B1 and M1 in blood and milk of cows given aflatoxin B1. *Am J Vet Res* 44:1753.
86. Hsieh, D., and J. J. Wong. 1994. Pharmacokinetics and Excretion of Aflatoxins. In *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural Significance*. D. L. Eaton, and J. Groopman, eds. New York: Academic Press, p. 73.
87. Yiannikouris, A., and J. Jouany. 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research* 51: 81.
88. Moschini, M., F. Masoero, D. E. Diaz, A. Gallo, A. Pietri, and G. Piva. 2006. Plasma aflatoxin concentrations over time in bolus fed lactating dairy cows. *J Animal Sci Suppl.*1:84.
89. Mata, J. E., Z. Yu, J. E. Gray, D. E. Williams, and R. Rodriguez-Proteau. 2004. Effects of chlorophyllin on transport of dibenzo(a, D)pyrene, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridine, and aflatoxin B(1) across Caco-2 cell monolayers. *Toxicology* 196:117.
90. Gallo, A., M. Moschini, and F. Masoero. 2008. Aflatoxin absorption in the gastro-intestinal tract and in the vaginal mucosa in lactating dairy cows. *Ital J Anim Sci* 7:53.
91. Coulombe, R. A., J. M. Huie, R. W. Ball, R. P. Sharma, and D. W. Wilson. 1991. Pharmacokinetics of intratracheally administered aflatoxin B1. *Toxicol Appl Pharmacol* 109:196.
92. Humblot, C., M. Murkovic, L. Rigottier-Gois, M. Bensaada, A. Bouclet, C. Andrieux, J. Anba, and S. Rabot. 2007. Beta-glucuronidase in human intestinal microbiota is necessary for the colonic genotoxicity of the food-borne carcinogen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in rats. *Carcinogenesis* 28:2419.
93. Hayes, J. R., C. E. Polan, and T. C. Campbell. 1977. Bovine liver metabolism and tissue distribution of aflatoxin B1. *J Agric Food Chem* 25:1189.
94. Petr, T., I. Barta, and B. Turek. 1995. n vitro effect of mutagenic activity of aflatoxin B1. *Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 34:123.
95. Muller, N., and E. Petzinger. 1988. Hepatocellular uptake of aflatoxin B1 by non-ionic diffusion. Inhibition of bile acid transport by interference with membrane lipids. *Biochim Biophys Acta* 938:334.
96. Dirr, H. W., and J. C. Schabort. 1986. Aflatoxin B1 transport in rat blood plasma. Binding to albumin in vivo and in vitro and spectrofluorimetric studies into the nature of the interaction. *Biochim Biophys Acta* 881:383.
97. Eaton, D. L., H. S. Ramsdell, and G. E. Neal. 1994. Biotransformation of Aflatoxins. In *Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*. Eaton DL and Groopman JD. San Diego, Academic Press, Inc., p. 45.

98. Holeski, C. J., D. L. Eaton, D. H. Monroe, and G. M. Bellamy. 1987. Effects of phenobarbital on the biliary excretion of aflatoxin P1-glucuronide and aflatoxin B1-S-glutathione in the rat. *Xenobiotica* 17:139.
99. Vermeulen, N. P. E. 1996. Role of metabolism in chemical toxicity. In *Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects*. C. Ioannides, ed. CRC Press, New York, pp. 29-53.
100. Ueng, Y. F., T. Shimada, H. Yamazaki, and F. P. Guengerich. 1995. Oxidation of aflatoxin B1 by bacterial recombinant human cytochrome P450 enzymes. *Chem Res Toxicol* 8:218.
101. Gallagher, E. P., K. L. Kunze, P. L. Stapleton, and D. L. Eaton. 1996. The kinetics of aflatoxin B1 oxidation by human cDNA-expressed and human liver microsomal cytochromes P450 1A2 and 3A4. *Toxicol Appl Pharmacol* 141:595.
102. Larsson, P., and H. Tjalve. 1996. Bioactivation of aflatoxin B1 in the nasal and tracheal mucosa in swine. *J Anim Sci* 74:1672.
103. Kolars, J. C., P. Benedict, P. Schmiedlin-Ren, and P. B. Watkins. 1994. Aflatoxin B1-adduct formation in rat and human small bowel enterocytes. *Gastroenterology* 106:433.
104. Guengerich, F. P., W. W. Johnson, T. Shimada, Y. F. Ueng, H. Yamazaki, and S. Langouet. 1998. Activation and detoxication of aflatoxin B1. *Mutat Res* 402:121.
105. Liu, L., and T. E. Massey. 1992. Bioactivation of aflatoxin B1 by lipoxygenases, prostaglandin H synthase and cytochrome P450 monooxygenase in guinea-pig tissues. *Carcinogenesis* 13:533.
106. Daniels, J. M., L. Liu, R. K. Stewart, and T. E. Massey. 1990. Biotransformation of aflatoxin B1 in rabbit lung and liver microsomes. *Carcinogenesis* 11:823.
107. Mace, K., F. Aguilar, J. S. Wang, P. Vautravers, M. Gomez-Lechon, F. J. Gonzalez, J. Groopman, C. C. Harris, and A. M. Pfeifer. 1997. Aflatoxin B1-induced DNA adduct formation and p53 mutations in CYP450-expressing human liver cell lines. *Carcinogenesis* 18:1291.
108. Van Vleet, T. R., P. J. Klein, and R. A. Coulombe. 2001. Metabolism of aflatoxin B1 by normal human bronchial epithelial cells. *J Toxicol Environ Health* 63:525.
109. Wei, C., R. J. Caccavale, J. J. Kehoe, P. E. Thomas, and M. M. Iba. 2001. CYP1A2 is expressed along with CYP1A1 in the human lung. *Cancer Lett* 171:113.
110. He, X. Y., L. Tang, S. L. Wang, Q. S. Cai, J. S. Wang, and J. Y. Hong. 2006. Efficient activation of aflatoxin B1 by cytochrome P450 2A13, an enzyme predominantly expressed in human respiratory tract. *Int J Cancer* 118:2665.
111. Swenson, D. H., E. C. Miller, and J. A. Miller. 1974. Aflatoxin B1-2,3-oxide: evidence for its formation in rat liver in vivo and by human liver microsomes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 60:1036.
112. Guengerich, F. P., W. W. Johnson, Y. F. Ueng, H. Yamazaki, and T. Shimada. 1996. Involvement of cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase in the metabolism of aflatoxin B1 and relevance to risk of human liver cancer. *Environ Health Perspect* 104 Suppl 3:557.

113. Baertschi, S. W., K. D. Raney, T. Shimada, T. M. Harris, and F. P. Guengerich. 1989. Comparison of rates of enzymatic oxidation of aflatoxin B1, aflatoxin G1, and sterigmatocystin and activities of the epoxides in forming guanyl-N7 adducts and inducing different genetic responses. *Chem Res Toxicol* 2:114.
114. Essigmann, J. M., R. G. Croy, A. M. Nadzan, W. F. Busby, Jr., V. N. Reinhold, G. Buchi, and G. N. Wogan. 1977. Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B1 in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:1870.
115. Raney, K. D., B. Coles, F. P. Guengerich, and T. M. Harris. 1992. The endo-8,9-epoxide of aflatoxin B1: a new metabolite. *Chem Res Toxicol* 5:333.
116. Swenson, D. H., J. K. Lin, E. C. Miller, and J. A. Miller. 1977. Aflatoxin B1-2,3-oxide as a probable intermediate in the covalent binding of aflatoxins B1 and B2 to rat liver DNA and ribosomal RNA in vivo. *Cancer Res* 37:172.
117. Shimada, T., M. Iwasaki, M. V. Martin, and F. P. Guengerich. 1989. Human liver microsomal cytochrome P-450 enzymes involved in the bioactivation of procarcinogens detected by umu gene response in *Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK1002. *Cancer Res* 49:3218.
118. McLean, M., and M. F. Dutton. 1995. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmacol Ther* 65:163.
119. Iyer, R. S., B. F. Coles, K. D. Raney, R. Thier, F. P. Guengerich, and T. M. Harris. 1994. DNA Adduction by the Potent Carcinogen Aflatoxin B1: Mechanistic Studies. *Journal of the American Chemical Society* 116:1603.
120. Brown, K. L., U. Bren, M. P. Stone, and F. P. Guengerich. 2009. Inherent Stereospecificity in the Reaction of Aflatoxin B(1) 8,9-Epoxyde with Deoxyguanosine and Efficiency of DNA Catalysis. *Chem Res Toxicol*.
121. Croy, R. G., J. M. Essigmann, V. N. Reinhold, and G. N. Wogan. 1978. Identification of the principal aflatoxin B1-DNA adduct formed in vivo in rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:1745.
122. Raney, K. D., S. Gopalakrishnan, S. Byrd, M. P. Stone, and T. M. Harris. 1990. Alteration of the aflatoxin cyclopentenone ring to a delta-lactone reduces intercalation with DNA and decreases formation of guanine N7 adducts by aflatoxin epoxides. *Chem Res Toxicol* 3:254.
123. Gopalakrishnan, S., T. M. Harris, and M. P. Stone. 1990. Intercalation of aflatoxin B1 in two oligodeoxynucleotide adducts: comparative 1H NMR analysis of d(ATCAFBGAT).d(ATCGAT) and d(ATAFBGCAT)2. *Biochemistry* 29:10438.
124. Guengerich, F. P., and W. W. Johnson. 1999. Kinetics of hydrolysis and reaction of aflatoxin B1 exo-8,9-epoxide and relevance to toxicity and detoxication. *Drug Metab Rev* 31:141.
125. Guengerich, F. P., M. Voehler, K. M. Williams, Z. Deng, and T. M. Harris. 2002. Structure of the aflatoxin B(1) dialdehyde adduct formed from reaction with methylamine. *Chem Res Toxicol* 15:793.
126. Guengerich, F. P., K. O. Arneson, K. M. Williams, Z. Deng, and T. M. Harris. 2002. Reaction of aflatoxin B(1) oxidation products with lysine. *Chem Res Toxicol* 15:780.

127. Sabbioni, G., P. L. Skipper, G. Buchi, and S. R. Tannenbaum. 1987. Isolation and characterization of the major serum albumin adduct formed by aflatoxin B1 in vivo in rats. *Carcinogenesis* 8:819.
128. Neal, G. E., D. J. Judah, F. Stirpe, and D. S. Patterson. 1981. The formation of 2,3-dihydroxy-2,3-dihydro-aflatoxin B1 by the metabolism of aflatoxin B1 by liver microsomes isolated from certain avian and mammalian species and the possible role of this metabolite in the acute toxicity of aflatoxin B1. *Toxicol Appl Pharmacol* 58:431.
129. Battista, J. R., and L. J. Marnett. 1985. Prostaglandin H synthase-dependent epoxidation of aflatoxin B1. *Carcinogenesis* 6:1227.
130. Massey, T. E., R. K. Stewart, J. M. Daniels, and L. Liu. 1995. Biochemical and molecular aspects of mammalian susceptibility to aflatoxin B1 carcinogenicity. *Proc Soc Exp Biol Med* 208:213.
131. Donnelly, P. J., R. K. Stewart, S. L. Ali, A. A. Conlan, K. R. Reid, D. Petsikas, and T. E. Massey. 1996. Biotransformation of aflatoxin B1 in human lung. *Carcinogenesis* 17:2487.
132. Roebuck, B. D., and G. N. Wogan. 1977. Species comparison of in vitro metabolism of aflatoxin B1. *Cancer Res* 37:1649.
133. Raney, K. D., T. Shimada, D. H. Kim, J. D. Groopman, T. M. Harris, and F. P. Guengerich. 1992. Oxidation of aflatoxins and sterigmatocystin by human liver microsomes: significance of aflatoxin Q1 as a detoxication product of aflatoxin B1. *Chem Res Toxicol* 5:202.
134. Yiannikouris, A., and J. P. Jouany. 2001. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research* . 51:81.
135. Riley, R. T., and J. Pestka. 2005. Mycotoxins: metabolism, mechanisms and biochemical markers. In *The Mycotoxin Blue Book*. D. Diaz, ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK., p. 279.
136. Essigmann, J. M., C. L. Green, R. G. Croy, K. W. Fowler, G. H. Buchi, and G. N. Wogan. 1983. Interactions of aflatoxin B1 and alkylating agents with DNA: structural and functional studies. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 47 Pt 1:327.
137. Hsieh, D. P. H., A. S. Salhab, J. J. Wong, and S. L. Yang. 1974. Toxicity of AFQ1 as evaluated with the chicken embryo and bacterial auxotrophs. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 30:237.
138. Coulombe, R. A., D. W. Shelton, R. O. Sinnhuber, and J. E. Nixon. 1982. Comparative mutagenicity of aflatoxins using a Salmonella/trout hepatic enzyme activation system. *Carcinogenesis* 3:1261.
139. Canton, J. H., R. Kroes, M. J. van Logten, M. van Schothorst, J. F. Stavenuiter, and C. A. Verhulsdonk. 1975. The carcinogenicity of aflatoxin M1 in rainbow trout. *Food Cosmet Toxicol* 13:441.
140. Cullen, J. M., B. H. Ruebner, D. P. Hsieh, and E. J. Burkes, Jr. 1987. Odontogenic tumors in Fischer rats. *J Oral Pathol* 16:469.
141. Pong, R. S., and G. N. Wogan. 1971. Toxicity and biochemical and fine effects of synthetic AFM1 and B1 in rat liver. *J nat cancer inst* 47:585.

142. Detroy, R. W., and C. W. Hesseltine. 1970. Aflatoxicol: structure of a new transformation product of aflatoxin B 1. *Can J Biochem* 48:830.
143. Wong, Z. A., and D. P. Hsieh. 1978. Aflatoxicol: major aflatoxin B1 metabolite in rat plasma. *Science* 200:325.
144. Hsieh, D. P. H., Z. A. Wong, J. J. Wong, C. Michas, and B. H. Ruebner. 1977. Comparative metabolism of aflatoxin. In: Mycotoxins in Human and Animal Health. In *Pathotox Publishers, Park Forest South, Illinois*. J. V. Rodricks, C. W. Hesseltine, and M. A. Mehlman, eds, p. 37.
145. Hsieh, D. P. H. 1987. Mode of action of mycotoxins. In *Mycotoxins in Food*. P. Krogh, ed. Academic Press, Cambridge, p. 149.
146. Thompson, M., S. N. Bye, and M. F. Dutton. 1992. An investigation into the passage of natural toxins across the digestive tract wall using the everted sac technique. *J Nat Tox* 1:9.
147. Ball, R. W., and R. A. Coulombe, Jr. 1991. Comparative biotransformation of aflatoxin B1 in mammalian airway epithelium. *Carcinogenesis* 12:305.
148. Valsta, L. M., J. D. Hendricks, and G. S. Bailey. 1988. The significance of glutathione conjugation for aflatoxin B1 metabolism in rainbow trout and coho salmon. *Food Chem Toxicol* 26:129.
149. Raj, H. G., M. S. Clearfield, and P. D. Lotlikar. 1984. Comparative kinetic studies on aflatoxin B1-DNA binding and aflatoxin B1-glutathione conjugation with rat and hamster livers in vitro. *Carcinogenesis* 5:879.
150. Hayes, J. D., D. J. Judah, L. I. McLellan, and G. E. Neal. 1991. Contribution of the glutathione S-transferases to the mechanisms of resistance to aflatoxin B1. *Pharmacol Ther* 50:443.
151. Eaton, D. L., and E. P. Gallagher. 1994. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 34:135.
152. Monroe, D. H., and D. L. Eaton. 1988. Effects of modulation of hepatic glutathione on biotransformation and covalent binding of aflatoxin B1 to DNA in the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* 94:118.
153. Ramsdell, H. S., and D. L. Eaton. 1990. Mouse liver glutathione S-transferase isoenzyme activity toward aflatoxin B1-8,9-epoxide and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide. *Toxicol Appl Pharmacol* 105:216.
154. Scholl, P. F., S. M. Musser, and J. D. Groopman. 1997. Synthesis and characterization of aflatoxin B1 mercapturic acids and their identification in rat urine. *Chem Res Toxicol* 10:1144.
155. Wang, J. S., X. Shen, X. He, Y. R. Zhu, B. C. Zhang, J. B. Wang, G. S. Qian, S. Y. Kuang, A. Zarba, P. A. Egner, L. P. Jacobson, A. Munoz, K. J. Helzlsouer, J. D. Groopman, and T. W. Kensler. 1999. Protective alterations in phase 1 and 2 metabolism of aflatoxin B1 by oltipraz in residents of Qidong, People's Republic of China. *J Natl Cancer Inst* 91:347.
156. Raj, H. G., and P. D. Lotlikar. 1984. Urinary excretion of thiol conjugates of aflatoxin B1 in rats and hamsters. *Cancer Lett* 22:125.
157. Judah, D. J., J. D. Hayes, J. C. Yang, L. Y. Lian, G. C. Roberts, P. B. Farmer, J. H. Lamb, and G. E. Neal. 1993. A novel aldehyde reductase with activity towards a metabolite of aflatoxin B1 is

- expressed in rat liver during carcinogenesis and following the administration of an anti-oxidant. *Biochem J* 292 (Pt 1):13.
158. Ellis, E. M., D. J. Judah, G. E. Neal, and J. D. Hayes. 1993. An ethoxyquin-inducible aldehyde reductase from rat liver that metabolizes aflatoxin B1 defines a subfamily of aldo-keto reductases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10350.
 159. Knight, L. P., T. Primiano, J. D. Groopman, T. W. Kensler, and T. R. Sutter. 1999. cDNA cloning, expression and activity of a second human aflatoxin B1-metabolizing member of the aldo-keto reductase superfamily, AKR7A3. *Carcinogenesis* 20:1215.
 160. Hayes, J. D., D. J. Judah, and G. E. Neal. 1993. Resistance to aflatoxin B1 is associated with the expression of a novel aldo-keto reductase which has catalytic activity towards a cytotoxic aldehyde-containing metabolite of the toxin. *Cancer Res* 53:3887.
 161. Primiano, T., J. A. Gastel, T. W. Kensler, and T. R. Sutter. 1996. Isolation of cDNAs representing dithiolethione-responsive genes. *Carcinogenesis* 17:2297.
 162. Wogan, G. N. 1969. Metabolism and biochemical effects of aflatoxins. In *Aflatoxin. Scientific Background, Control and Implications*. L. A. Goldblatt, ed. Academic Press, New York, p. 151.
 163. Wong, Z. A., and D. P. Hsieh. 1980. The comparative metabolism and toxicokinetics of aflatoxin B1 in the monkey, rat, and mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* 55:115.
 164. Mykkanen, H., H. Zhu, E. Salminen, R. O. Juvonen, W. Ling, J. Ma, N. Polychronaki, H. Kemilainen, O. Mykkanen, S. Salminen, and H. El-Nezami. 2005. Fecal and urinary excretion of aflatoxin B1 metabolites (AFQ1, AFM1 and AFB-N7-guanine) in young Chinese males. *Int J Cancer* 115:879.
 165. Coulter, J. B., S. M. Lamplugh, G. I. Suliman, M. I. Omer, and R. G. Hendrickse. 1984. Aflatoxins in human breast milk. *Ann Trop Paediatr* 4:61.
 166. Verma, R. J., and S. B. Chaudhari. 1998. Aflatoxins in human saliva. *Indian J Toxicol* 5.
 167. Rohrig, T. P., and D. M. Yourtee. 1983. In vitro metabolism of aflatoxin Q1 by rat liver post-mitochondrial homogenates. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 40:457-464.
 168. Busby, W. F., and G. N. Wogan. 1985. Aflatoxins. In *Chemical Carcinogens, 2nd ed.* C. E. Searle, ed. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 945-1136.
 169. Groopman, J. D., L. G. Cain, and T. W. Kensler. 1988. Aflatoxin exposure in human populations: measurements and relationship to cancer. *Crit Rev Toxicol* 19:113.
 170. Groopman, J. D., P. R. Donahue, J. Q. Zhu, J. S. Chen, and G. N. Wogan. 1985. Aflatoxin metabolism in humans: detection of metabolites and nucleic acid adducts in urine by affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:6492.
 171. Groopman, J. D., P. DeMatos, P. A. Egner, A. Love-Hunt, and T. W. Kensler. 1992. Molecular dosimetry of urinary aflatoxin-N7-guanine and serum aflatoxin-albumin adducts predicts chemoprotection by 1,2-dithiole-3-thione in rats. *Carcinogenesis* 13:101.
 172. Essigmann, J. M., R. G. Croy, R. A. Bennett, and G. N. Wogan. 1982. Metabolic activation of

- aflatoxin B1: patterns of DNA adduct formation, removal, and excretion in relation to carcinogenesis. *Drug Metab Rev* 13:581.
173. Jouany, J. P., Diaz, D.E. 2005. Effects of mycotoxins in ruminants. In *The Mycotoxin Blue Book*. D. E. Diaz, ed. Nottingham University Press, Thrumpron, Nottingham, p. 295.
174. Zhu, J. Q., L. S. Zhang, X. Hu, Y. Xiao, J. S. Chen, Y. C. Xu, J. Fremy, and F. S. Chu. 1987. Correlation of dietary aflatoxin B1 levels with excretion of aflatoxin M1 in human urine. *Cancer Res* 47:1848.
175. Campbell, T. C., J. P. Caedo, Jr., J. Bulatao-Jayme, L. Salamat, and R. W. Engel. 1970. Aflatoxin M1 in human urine. *Nature* 227:403.
176. Bennett, R. A., J. M. Essigmann, and G. N. Wogan. 1981. Excretion of an aflatoxin-guanine adduct in the urine of aflatoxin B1-treated rats. *Cancer Res* 41:650.
177. Emerole, G. O. 1981. Excretion of aflatoxin B1 as a glutathione conjugate. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 6:265.
178. Moss, E. J., G. E. Neal, and D. J. Judah. 1985. The mercapturic acid pathway metabolites of a glutathione conjugate of aflatoxin B1. *Chem Biol Interact* 55:139.
179. Helferich, W. G., R. L. Baldwin, and D. P. Hsieh. 1986. [14C]-aflatoxin B1 metabolism in lactating goats and rats. *J Anim Sci* 62:697.
180. Househam, K. C., and H. K. Hundt. 1991. Aflatoxin exposure and its relationship to kwashiorkor in African children. *J Trop Pediatr* 37:300.
181. el-Nezami, H. S., G. Nicoletti, G. E. Neal, D. C. Donohue, and J. T. Ahokas. 1995. Aflatoxin M1 in human breast milk samples from Victoria, Australia and Thailand. *Food Chem Toxicol* 33:173.
182. Helferich, W. G., W. N. Garrett, D. P. Hsieh, and R. L. Baldwin. 1986. Feedlot performance and tissue residues of cattle consuming diets containing aflatoxins. *J Anim Sci* 62:691.
183. Zarba, A., C. P. Wild, A. J. Hall, R. Montesano, G. J. Hudson, and J. D. Groopman. 1992. Aflatoxin M1 in human breast milk from The Gambia, west Africa, quantified by combined monoclonal antibody immunoaffinity chromatography and HPLC. *Carcinogenesis* 13:891.
184. Clewell, R. A., and J. M. Gearhart. 2002. Pharmacokinetics of toxic chemicals in breast milk: use of PBPK models to predict infant exposure. *Environ Health Perspect* 110:A333-A337.
185. JECFA. 2001. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food (WHO Food Additives, Series n. 47) 56th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Geneva, International Programme on Chemical Safety, World Health Organization.
186. Makarananda, K., U. Pengpan, M. Srisakulthong, K. Yoovathaworn, and K. Sriwatanakul. 1998. Monitoring of aflatoxin exposure by biomarkers. *J Toxicol Sci* 23 Suppl 2:155.
187. Wild, C. P., and P. Pisani. 1998. Carcinogen DNA and protein adducts as biomarkers of human exposure in environmental cancer epidemiology. *Cancer Detect Prev* 22:273.
188. Hendrickse, R. G. 1991. Clinical implications of food contaminated by aflatoxins. *Ann Acad Med Singapore* 20:84.

189. Groopman, J. D., G. N. Wogan, B. D. Roebuck, and T. W. Kensler. 1994. Molecular biomarkers for aflatoxins and their application to human cancer prevention. *Cancer Res* 54:1907s.
190. Allen, S. J., C. P. Wild, J. G. Wheeler, E. M. Riley, R. Montesano, S. Bennett, H. C. Whittle, A. J. Hall, and B. M. Greenwood. 1992. Aflatoxin exposure, malaria and hepatitis B infection in rural Gambian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86:426.
191. Wong, J. J., and D. P. Hsieh. 1976. Mutagenicity of aflatoxins related to their metabolism and carcinogenic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:2241.
192. Smith, J. E., and M. O. Moss. 1985. *Mycotoxins. Formation, Analysis and Significance*. John Wiley and Sons, Chichester.
193. Pier, A. C., and M. E. McLoughlin. 1985. Mycotoxic suppression of immunity. In *Tricothecenes and other mycotoxins*. J. Lacey, ed. John Wiley, New York, p. 507.
194. Terao, K., and Y. Ueno. 1978. Morphological and functional damage to cells and tissues. In *Toxicology. Biochemistry and Pathology of Mycotoxins*. K. Uraguchi, and M. Yamazaki, eds. Kodansha Press, Tokyo.
195. Hamilton, P. B. 1975. Lipid and vitamin metabolism during mycotoxicoses. In *Microbiology*. D. Schlessinger, ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C, p. 381.
196. Doherty, W. P., and T. C. Campbell. 1973. Aflatoxin inhibition of rat liver mitochondria. *Chem Biol Interact.* 7:63.
197. Doherty, W. P., and T. C. Campbell. 1972. Inhibition of rat liver mitochondria electron transport flow by aflatoxin B 1. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 3:601.
198. Kiessling, K. H. 1986. Biochemical mechanisms of action of mycotoxins. *Pure appl. Chem.* 58:327.
199. Hsieh, D. P. H., Z. A. Wong, J. J. Wong, C. Michas, and B. H. Ruebner. 1977. Comparative metabolism of aflatoxin. In *Mycotoxins in Human and Animal Health*. J. V. Rodricks, C. W. Hesseltine, and M. A. Mehlman, eds. Pathotox Publishers, Park Forest South, Illinois, p. 37.
200. Smela, M. E., S. S. Currier, E. A. Bailey, and J. M. Essigmann. 2001. The chemistry and biology of aflatoxin B(1): from mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis* 22:535.
201. Croy, R. G., and G. N. Wogan. 1981. Temporal patterns of covalent DNA adducts in rat liver after single and multiple doses of aflatoxin B1. *Cancer Res* 41:197.
202. Bailey, E. A., R. S. Iyer, T. M. Harris, and J. M. Essigmann. 1996. A viral genome containing an unstable aflatoxin B1-N7-guanine DNA adduct situated at a unique site. *Nucleic Acids Res* 24:2821.
203. Smela, M. E., M. L. Hamm, P. T. Henderson, C. M. Harris, T. M. Harris, and J. M. Essigmann. 2002. The aflatoxin B(1) formamidopyrimidine adduct plays a major role in causing the types of mutations observed in human hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6655.
204. Sharma, R. A., and P. B. Farmer. 2004. Biological relevance of adduct detection to the chemoprevention of cancer. *Clin Cancer Res* 10:4901.

205. Bressac, B., M. Kew, J. Wands, and M. Ozturk. 1991. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 350:429.
206. Hsu, I. C., R. A. Metcalf, T. Sun, J. A. Welsh, N. J. Wang, and C. C. Harris. 1991. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 350:427.
207. Simsek, N., L. Ergun, E. Ergun, B. Alabay, and D. Essiz. 2007. The effects of experimental aflatoxicosis on the exocrine pancreas in quails (*Coturnix coturnix japonica*). *Arch Toxicol* 81:583.
208. Nishiyama, S., and M. Kurebe. 1981. Prevention by estradiol of aflatoxin-induced cytotoxicity in cultured chick embryo liver cells. *J Toxicol Sci* 6:159.
209. Ch'ih, J. J., and T. M. Devlin. 1984. The distribution and intracellular translocation of aflatoxin B1 in isolated hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 122:1.
210. Ch'ih, J. J., J. I. Ewaskiewicz, P. Taggart, and T. M. Devlin. 1993. Nuclear translocation of aflatoxin B1 - protein complex. *Biochem Biophys Res Commun* 190:186.
211. Loveland, P. M., J. S. Wilcox, J. D. Hendricks, and G. S. Bailey. 1988. Comparative metabolism and DNA binding of aflatoxin B1, aflatoxin M1, aflatoxicol and aflatoxicol-M1 in hepatocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Carcinogenesis* 9:441.
212. Cullen, J. M., B. H. Ruebner, L. S. Hsieh, D. M. Hyde, and D. P. Hsieh. 1987. Carcinogenicity of dietary aflatoxin M1 in male Fischer rats compared to aflatoxin B1. *Cancer Res* 47:1913.
213. Van Egmond, H. P. 1994. Aflatoxins in milk. In *Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*. D. L. Eaton, and J. D. Groopman, eds. San Diego, Academic Press, Inc., p. 365.
214. Adhikari, M., R. Gita, and P. Berjak. 1994. Aflatoxin, kwashiorkor, and morbidity. *Nat Toxins* 2:1.
215. Rodgers, A., P. Vaughan, T. Prentice, T. T. Edejer, D. Evans, and J. Lowe. 2002. Reducing risks, promoting healthy life. In *The World Health Report 2002*. B. Campanini, and A. Haden, eds. World Health Organization, Geneva.
216. Wogan, G. N. 1996. Metabolism and biochemical effects of aflatoxins. In *Aflatoxin. Scientific Background, Control and Implications*. L. A. Goldblatt, ed. Academic Press, New York, p. 151.
217. Eaton, D. L., and J. D. Groopman. 1994. *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*. Academic Press, San Diego.
218. Serck-Hanssen, A. 1970. Aflatoxin-induced fatal hepatitis? A case report from Uganda. *Arch Environ Health* 20:729.
219. Cheng, C. T. 1992. Perak, Malaysia, mass poisoning. Tale of the Nine Emperor Gods and rat tail noodles. *Am J Forensic Med Pathol* 13:261.
220. Tandon, B. N., L. Krishnamurthy, A. Koshy, H. D. Tandon, V. Ramalingaswami, J. R. Bhandari, M. M. Mathur, and P. D. Mathur. 1977. Study of an epidemic of jaundice, presumably due to toxic hepatitis, in Northwest India. *Gastroenterology* 72:488.
221. Bourgeois, C. H., R. C. Shank, R. A. Grossman, D. O. Johnson, W. L. Wooding, and P.

- Chandavimol. 1971. Acute aflatoxin B1 toxicity in the macaque and its similarities to Reye's syndrome. *Lab Invest* 24:206.
222. Azziz-Baumgartner, E., K. Lindblade, K. Gieseke, H. S. Rogers, S. Kieszak, H. Njapau, R. Schleicher, L. F. McCoy, A. Misore, K. DeCock, C. Rubin, and L. Slutsker. 2005. Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004. *Environ Health Perspect* 113:1779.
223. Olson, L. C., C. H. Bourgeois, N. Keschamras, S. Harikul, C. K. Sanyakorn, R. A. Grossman, and T. J. Smith. 1970. Encephalopathy and fatty degeneration of the viscera in Thai children. *Am J Dis Child* 120:1.
224. Casteels-Van Daele, M., and E. Eggermont. 1994. Reye's syndrome. *Brit Med J* 308:919.
225. Sodeinde, O., M. C. Chan, S. M. Maxwell, J. B. Familusi, and R. G. Hendrickse. 1995. Neonatal jaundice, aflatoxins and naphthols: report of a study in Ibadan, Nigeria. *Ann Trop Paediatr* 15:107.
226. Hendrickse, R. G. 1991. Kwashiorkor: the hypothesis that incriminates aflatoxins. *Pediatrics* 88:376.
227. Peraica, M., B. Radic, A. Lucic, and M. Pavlovic. 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull World Health Organ* 77:754.
228. Oyelami, O. A., S. M. Maxwell, K. A. Adelusola, T. A. Aladekoma, and A. O. Oyelese. 1997. Aflatoxins in the lungs of children with kwashiorkor and children with miscellaneous diseases in Nigeria. *J Toxicol Environ Health* 51:623.
229. Oyelami, O. A., S. M. Maxwell, K. A. Adelusola, T. A. Aladekoma, and A. O. Oyelese. 1998. Aflatoxins in autopsy kidney specimens from children in Nigeria. *J Toxicol Environ Health A* 55:317.
230. Dvorackova, I. 1976. Aflatoxin inhalation and alveolar cell carcinoma. *Br Med J* 1:691.
231. Hendrickse, R. G., S. M. Maxwell, and R. Young. 1989. Aflatoxins and heroin. *Bmj* 299:492.
232. Bhat, R. V., and K. A. Krishnamachari. 1977. Follow-up study of aflatoxic hepatitis in parts of western India. *Indian J Med Res* 66:55.
233. Willis, R. M., J. J. Mulvihill, and J. H. Hoofnagle. 1980. Attempted suicide with purified aflatoxin. *Lancet* 1:1198.
234. Dragan, Y. P., and H. C. Pitot. 1994. Aflatoxin carcinogenesis in the context of the multistage nature of cancer. In *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*. D. L. Eaton, and J. D. Groopman, eds. Academic Press, p. 179.
235. Henry, S. H., F. X. Bosch, T. C. Troxell, and P. M. Bolger. 1999. Policy forum: public health. Reducing liver cancer-global control of aflatoxin. *Science* 286:2453.
236. Hsieh, D. P. H., D. N. Atkinson, and M.-S. Zhao. 1992. Aflatoxin-DNA adducts and P53 gene alterations in human liver. Abstracts. VIII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxms, Mexico City, 36.
237. Henry, S. H., F. X. Bosch, and J. C. Bowers. 2002. Aflatoxin, hepatitis and worldwide liver cancer risks. *Adv Exp Med Biol* 504:229.

238. Wang, J. S., G. S. Qian, A. Zarba, X. He, Y. R. Zhu, B. C. Zhang, L. Jacobson, S. J. Gange, A. Munoz, T. W. Kensler, and et al. 1996. Temporal patterns of aflatoxin-albumin adducts in hepatitis B surface antigen-positive and antigen-negative residents of Daxin, Qidong County, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5:253.
239. Pier, A. C., M. J. Varman, R. R. Dahlgren, E. L. Belden, and L. R. Maki. 1986. Aflatoxic suppression of cell mediated immune response and interaction with T-2 toxin. In *Mycotoxins and Phycotoxins*. P. S. Steyn, and R. Vleggar, eds. Elsevier, Amsterdam, p. 423.
240. Reddy, R. V., M. J. Taylor, and R. P. Sharma. 1987. Studies of immune function of CD-1 mice exposed to aflatoxin B1. *Toxicology* 43:123.
241. Richard, J., J. R. Thurston, and A. C. Pier. 1978. Effects of mycotoxins on immunity. In *Toxins: animal, plant and microbial*. P. Rosenberg, ed. Pergamon Press, New York, p. 801.
242. Silvotti, L., C. Petterino, A. Bonomi, and E. Cabassi. 1997. Immunotoxicological effects on piglets of feeding sows diets containing aflatoxins. *Vet Rec* 141:469.
243. Hurley, D. J., R. D. Neiger, K. F. Higgins, G. E. Rottinghaus, and H. Stahr. 1999. Short-term exposure to subacute doses of aflatoxin-induced depressed mitogen responses in young mallard ducks. *Avian Dis* 43:649.
244. Pier, A. C., E. L. Belden, J. A. Ellis, E. W. Nelson, and L. R. Maki. 1989. Effects of cyclopiazonic acid and aflatoxin singly and in combination on selected clinical, pathological and immunological responses of guinea pigs. *Mycopathologia* 105:135.
245. Giambrone, J. J., U. L. Diener, N. D. Davis, V. S. Panangala, and F. J. Hoerr. 1985. Effect of purified aflatoxin on turkeys. *Poult Sci* 64:859.
246. Dietert, R. R., M. A. Qureshi, U. C. Nanna, and S. E. Bloom. 1985. Embryonic exposure to aflatoxin-B1: mutagenicity and influence on development and immunity. *Environ Mutagen* 7:715.
247. Hatori, Y., R. P. Sharma, and R. P. Warren. 1991. Resistance of C57Bl/6 mice to immunosuppressive effects of aflatoxin B1 and relationship with neuroendocrine mechanisms. *Immunopharmacology* 22:127.
248. Richard, J. L., and J. R. Thurston. 1975. Effect of aflatoxin on phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* spores by rabbit alveolar macrophages. *Appl Microbiol* 30:44.
249. Neldon-Ortiz, D. L., and M. A. Qureshi. 1991. Direct and microsomal activated aflatoxin B1 exposure and its effects on turkey peritoneal macrophage functions in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 109:432.
250. Moon, E. Y., D. K. Rhee, and S. Pyo. 1999. Inhibition of various functions in murine peritoneal macrophages by aflatoxin B1 exposure in vivo. *Int J Immunopharmacol* 21:47.
251. Moon, E. Y., D. K. Rhee, and S. Pyo. 1999. In vitro suppressive effect of aflatoxin B1 on murine peritoneal macrophage functions. *Toxicology* 133:171.
252. Cusumano, V., F. Rossano, R. A. Merendino, A. Arena, G. B. Costa, G. Mancuso, A. Baroni, and E. Losi. 1996. Immunobiological activities of mould products: functional impairment of human monocytes exposed to aflatoxin B1. *Res Microbiol* 147:385.

253. Reddy, R. V., and R. P. Sharma. 1989. Effects of aflatoxin B1 on murine lymphocytic functions. *Toxicology* 54:31.
254. Singh, J., R. P. Tiwari, G. Singh, S. Singh, and D. V. Vadehra. 1987. Biochemical and immunological effects of aflatoxins in rabbits. *Toxicol Lett* 35:225.
255. Panangala, V. S., J. J. Giambone, U. L. Diener, N. D. Davis, F. J. Hoerr, A. Mitra, R. D. Schultz, and G. R. Wilt. 1986. Effects of aflatoxin on the growth performance and immune responses of weanling swine. *Am J Vet Res* 47:2062.
256. Theumer, M. G., A. G. Lopez, D. T. Masih, S. N. Chulze, and H. R. Rubinstein. 2003. Immunobiological effects of AFB1 and AFB1-FB1 mixture in experimental subchronic mycotoxicoses in rats. *Toxicology* 186:159.
257. Marin, D. E., I. Taranu, R. P. Bunaciu, F. Pascale, D. S. Tudor, N. Avram, M. Sarca, I. Cureu, R. D. Criste, V. Suta, and I. P. Oswald. 2002. Changes in performance, blood parameters, humoral and cellular immune responses in weanling piglets exposed to low doses of aflatoxin. *J Anim Sci* 80:1250.
258. Pier, A. C., M. E. McLoughlin, J. L. Richard, A. Baetz, and R. R. Dahfren. 1985. In utero transfer of aflatoxin and selected effects in neonatal pigs. In *Trichothecenes and other mycotoxins*. J. Lacey, ed. John Wiley, New York, p. 495.
259. Raisuddin, S., K. P. Singh, S. I. Zaidi, B. N. Paul, and P. K. Ray. 1993. Immunosuppressive effects of aflatoxin in growing rats. *Mycopathologia* 124:189.
260. Ottinger, C. A., and S. L. Kaattari. 2000. Long-term immune dysfunction in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed as embryos to aflatoxin B1. *Fish Shellfish Immunol* 10:101.
261. Azzam, A. H., and M. A. Gabal. 1998. Aflatoxin and immunity in layer hens. *Avian Pathol* 27:570.
262. Gabal, M. A., and R. A. Dimitri. 1998. Humoral immunosuppressant activity of aflatoxin ingestion in rabbits measured by response to *Mycobacterium bovis* antigens using enzyme-linked immunosorbent assay and serum protein electrophoresis. *Mycoses* 41:303.
263. Venturini, M. C., C. J. Perfumo, M. A. Risso, C. M. Gomez, M. V. Piscopo, M. Sala de Miguel, and H. Godoy. 1990. Effect of aflatoxin B1 on resistance induced by Bordetella bronchiseptica vaccine in rabbits. *Vet Microbiol* 25:209.
264. Ghoneimy, W. A., H. A. Hassan, S. A. A. Soliman, and S. M. Gergis. 2000. Study on the effect of aflatoxicosis on the immune response of rabbit to Pasteurella multocida vaccine. *Assiut Vet Med J* 85:287.
265. Choudhury, M. R., D. K. Sarma, and T. Rahman. 1998. Immunosuppressive effect of aflatoxin on pigs against swine fever virus vaccination. *Indian J Comp Microbiol Immunol Infect Dis* 19:132.
266. Roebuck, B. D., and Y. Y. Maxuitenko. 1994. Biochemical mechanisms and biological implications of the toxicity of aflatoxins as related to aflatoxin carcinogenesis. In *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary and agricultural significance*. D. L. Eaton, and J. D. Groopman, eds. Academic Press, p. 27.

267. Turner, P. C., S. E. Moore, A. J. Hall, A. M. Prentice, and C. P. Wild. 2003. Modification of immune function through exposure to dietary aflatoxin in Gambian children. *Environ Health Perspect* 111:217.
268. Young, R. H., R. G. Hendrickse, S. M. Maxwell, and B. G. Maegraith. 1988. Influence of aflatoxin on malarial infection in mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82:559.
269. Wild, C. P., F. N. Rasheed, M. F. Jawla, A. J. Hall, L. A. Jansen, and R. Montesano. 1991. In-utero exposure to aflatoxin in west Africa. *Lancet* 337:1602.
270. Lamplugh, S. M., R. G. Hendrickse, F. Apeageyi, and D. D. Mwanmut. 1988. Aflatoxins in breast milk, neonatal cord blood, and serum of pregnant women. *Br Med J (Clin Res Ed)* 296:968.
271. Gong, Y., A. Hounsa, S. Egal, P. C. Turner, A. E. Sutcliffe, A. J. Hall, K. Cardwell, and C. P. Wild. 2004. Postweaning exposure to aflatoxin results in impaired child growth: a longitudinal study in Benin, West Africa. *Environ Health Perspect* 112:1334.
272. Gong, Y. Y., S. Egal, A. Hounsa, P. C. Turner, A. J. Hall, K. F. Cardwell, and C. P. Wild. 2003. Determinants of aflatoxin exposure in young children from Benin and Togo, West Africa: the critical role of weaning. *Int J Epidemiol* 32:556.
273. Gong, Y. Y., K. Cardwell, A. Hounsa, S. Egal, P. C. Turner, A. J. Hall, and C. P. Wild. 2002. Dietary aflatoxin exposure and impaired growth in young children from Benin and Togo: cross sectional study. *Bmj* 325:20.
274. Shane, S. M. 1994. Economic issues associated with aflatoxins. In *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*. D. L. Eaton, and J. D. Groopman, eds. Academic Press, p. 513.
275. Hendrickse, R. G. 1997. Of sick turkeys, kwashiorkor, malaria, perinatal mortality, heroin addicts and food poisoning: research on the influence of aflatoxins on child health in the tropics. *Ann Trop Med Parasitol* 91:787.
276. Abbas, T. A., and B. H. Ali. 2001. Retinol values in the plasma of the Arabian camel (*Camelus dromedarius*) and the influence of aflatoxicosis. *Vet Res Commun* 25:517.
277. Pimpukdee, K., L. F. Kubena, C. A. Bailey, H. J. Huebner, E. Afriyie-Gyawu, and T. D. Phillips. 2004. Aflatoxin-induced toxicity and depletion of hepatic vitamin A in young broiler chicks: protection of chicks in the presence of low levels of NovaSil PLUS in the diet. *Poult Sci* 83:737.
278. Reddy, K. V., P. V. Rao, and R. VR. 1989. Effect of aflatoxin on the performance of broiler chicks fed diets supplemented with vitamin A. *Indian J Anim Sci* 59:140.
279. Glahn, R. P., K. W. Beers, W. G. Bottje, R. F. Wideman, Jr., W. E. Huff, and W. Thomas. 1991. Aflatoxicosis alters avian renal function, calcium, and vitamin D metabolism. *J Toxicol Environ Health* 34:309.
280. Mocchegiani, E., A. Corradi, L. Santarelli, A. Tibaldi, E. DeAngelis, P. Borghetti, A. Bonomi, N. Fabris, and E. Cabassi. 1998. Zinc, thymic endocrine activity and mitogen responsiveness (PHA) in piglets exposed to maternal aflatoxicosis B1 and G1. *Vet Immunol Immunopathol* 62:245.
281. Kalorey, D. R., H. F. Dagainawala, A. G. Ganorkar, and M. N. 1996. Serum zinc and iron status in experimental aflatoxicosis in chicks. *Indian J Vet Res* 5:28.

-
282. Mocchegiani, E., A. Corradi, L. Santarelli, A. Tibaldi, E. DeAngelis, P. Borghetti, A. Bonomi, N. Fabris, and E. Cabassi. 2001. Zinc, thymic endocrine activity and mitogen responsiveness (PHA) in piglets exposed to maternal aflatoxicosis B1 and G1. *Vet Immunol Immunopathol* 62:245.
283. Ikegwuonu, F. I. 1985. Zinc, copper, manganese and iron in rat organs after the administration and withdrawal of aflatoxin B1. *J Appl Toxicol* 4:241.
284. Doyle, J. J., W. C. I. Stearman, J. O. Norman, and H. D. V. Petersen. 1977. Effects of aflatoxin B1 on distribution of Fe, Cu, Zn, and Mn in rat tissues. *Bull Environ Contam Toxicol* 17:33.
285. Chen, S. Y., C. J. Chen, W. Y. Tsai, H. Ahsan, T. Y. Liu, J. T. Lin, and R. M. Santella. 2000. Associations of plasma aflatoxin B1-albumin adduct level with plasma selenium level and genetic polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and T1. *Nutr Cancer* 38:179.
286. Hegazy, S. M., and Y. Adachi. 2000. Comparison of the effects of dietary selenium, zinc, and selenium and zinc supplementation on growth and immune response between chick groups that were inoculated with Salmonella and aflatoxin or Salmonella. *Poult Sci* 79:331.
287. Allcroft, R., and R. B. A. Carnaghan. 1963. Groundnut toxicity: An examination for toxin in human food products from animals fed toxic groundnut meal. *Vet. Rec.* 75:259-263.
288. de Iongh, H., R. O. Vles, and J. G. van Pelt. 1964. Milk of mammals fed an aflatoxin contaminated diet. *Nature* 202.
289. Allcroft, R., H. Rogers, G. Lewis, J. Nabney, and P. E. Best. 1966. Metabolism of aflatoxin in sheep: excretion of the "milk toxin". *Nature* 209:154.
290. Holzapfel, C. W., P. S. Steyn, and I. F. Purchase. 1966. Isolation and structure of aflatoxins M1 and M2. *Tetrahedron Lett* 25:2799.
291. Chang, S. B., M. M. Abdel-Kader, E. L. Wick, and G. N. Wogan. 1963. Aflatoxin B2: chemical identity and biological activity. *Science* 142:1191.
292. Sinnhuber, R., D. J. Lee, J. M. Wales, M. K. Lander, and A. C. Keyl. 1970. Aflatoxin M1: a potent liver carcinogen in rainbow trout. *Fed Proc* 29:168.
293. Wogan, G. N., S. Paglialunga, and P. M. Newberne. 1974. Carcinogenic effects of low dietary levels of aflatoxin B1 in rats. *Food Cosmet Toxicol* 12:681.
294. Uwaifo, A. O., and E. A. Bababunmi. 1979. The reduced mutagenicity of aflatoxin B1 due to hydroxylation: observations on five Salmonella typhimurium tester strains. *Cancer Lett* 7:221.
295. Neal, G. E., and P. J. Colley. 1978. Some high-performance liquid-chromatographic studies of the metabolism of aflatoxins by rat liver microsomal preparations. *Biochem J* 174:839.
296. Neal, G. E., D. L. Eaton, D. J. Judah, and A. Verma. 1998. Metabolism and toxicity of aflatoxins M1 and B1 in human-derived in vitro systems. *Toxicol Appl Pharmacol* 151:152.
297. Egner, P. A., X. Yu, J. K. Johnson, C. K. Nathasingh, J. D. Groopman, T. W. Kensler, and B. D. Roebuck. 2003. Identification of aflatoxin M1-N7-guanine in liver and urine of tree shrews and rats following administration of aflatoxin B1. *Chem Res Toxicol* 16:1174.
298. Lutz, W. K., W. Jaggi, J. Luthy, P. Sagelsdorff, and C. Schlatter. 1980. In vivo covalent binding of aflatoxin B1 and aflatoxin M1 to liver DNA of rat, mouse and pig. *Chem Biol Interact* 32:249.

299. Shibahara, T., H. I. Ogawa, H. Ryo, and K. Fujikawa. 1995. DNA-damaging potency and genotoxicity of aflatoxin M1 in somatic cells in vivo of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis* 10:161.
300. Purchase, I. F. 1967. Acute toxicity of aflatoxins M1 and M2 in one-day-old ducklings. *Food Cosmet Toxicol* 5:339.
301. Wogan, G. N., and S. Paglialunga. 1974. Carcinogenicity of synthetic aflatoxin M1 in rats. *Food Cosmet Toxicol* 12:381.
302. Denning, D. W., S. C. Quiapo, D. G. Altman, K. Makarananda, G. E. Neal, E. L. Camallere, M. R. Morgan, and T. E. Tupasi. 1995. Aflatoxin and outcome from acute lower respiratory infection in children in The Philippines. *Ann Trop Paediatr* 15:209.
303. Park, D. L., and A. E. Pohland. 1986. A rationale for the control of aflatoxin in animalfeeds. In *Mycotoxins and Phycotoxins*. P. S. Steyn, and R. Vleggaar, eds. Elsevier, Amsterdam, pp. 473-482.
304. Trucksess, M. W., L. Stoloff, W. C. Brumley, D. M. Wilson, O. M. Hale, L. T. Sangster, and D. M. Miller. 1982. Aflatoxicol and aflatoxins B1 and M1 in the tissues of pigs receiving aflatoxin. *J Assoc Off Anal Chem* 65:884.
305. Trucksess, M. W., L. Stoloff, K. Young, R. D. Wyatt, and B. L. Miller. 1983. Aflatoxicol and aflatoxins B1 and M1 in eggs and tissues of laying hens consuming aflatoxin-contaminated feed. *Poult Sci* 62:2176.
306. Zaghini, A., G. Martelli, P. Roncada, M. Simioli, and L. Rizzi. 2005. Mannanoligosaccharides and aflatoxin B1 in feed for laying hens: effects on egg quality, aflatoxins B1 and M1 residues in eggs, and aflatoxin B1 levels in liver. *Poult Sci* 84:825.
307. Oliveira, C. A., E. Kobashigawa, T. A. Reis, L. Mestieri, R. Albuquerque, and B. Correa. 2000. Aflatoxin B1 residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin. *Food Addit Contam* 17:459.
308. Creppy, E. E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett* 127:19.
309. Diaz, D. E., W. M. Hagler, Jr., J. T. Blackwelder, J. A. Eve, B. A. Hopkins, K. L. Anderson, F. T. Jones, and L. W. Whitlow. 2004. Aflatoxin binders II: reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. *Mycopathologia* 157:233.
310. Masoero, F., A. Gallo, M. Moschini, G. Piva, and D. Diaz. 2007. Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. *Animal Research* 1:1344.
311. Battacone, G., A. Nudda, A. Cannas, A. Cappio Borlino, G. Bomboi, and G. Pulina. 2003. Excretion of aflatoxin M1 in milk of dairy ewes treated with different doses of aflatoxin B1. *J Dairy Sci* 86:2667.
312. Polan, C. E., J. R. Hayes, and T. C. Campbell. 1974. Consumption and fate of aflatoxin B1 by lactating cows. *J Agric Food Chem* 22:635.
313. Frobish, R. A., B. D. Bradley, D. D. Wagner, P. E. Long-Bradley, and H. J. Hairston. 1986. Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain. *Food Protection* 49:781.

314. Pettersson, H., J. Bertilsson, and O. Wennberg. 1989. Carry-over of aflatoxin from dairy cattle feed to milk. Healthy animals, safe foods, healthy man. In *Xth Jubilee International Symposium*. World Association of Veterinary Food Hygienists, p. 97.
315. Battacone, G., A. Nudda, M. Palomba, M. Pascale, P. Nicolussi, and G. Pulina. 2005. Transfer of aflatoxin B1 from feed to milk and from milk to curd and whey in dairy sheep fed artificially contaminated concentrates. *J Dairy Sci* 88:3063.
316. Westlake, K., R. I. Mackie, and M. F. Dutton. 1989. in vitro metabolism of mycotoxins by bacterial, protozoal and ovine ruminal fluid preparations. *Animal Feed Sci Technol* 25:169-178.
317. McKinney, J. D., G. C. Cavanaugh, J. T. Bell, A. S. Hoverland, D. M. Nelson, J. Pearson, and R. J. Selkirk. 1973. Effects of ammoniation on aflatoxins in rations fed lactating cows. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 50:79.
318. Kiemeier, F., and M. Buchner. 1977. Zur verteilung van aflatoxin M1 auf Molke and Bruch bei der Kaseherstellung. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 164:87.
319. Galvano, F., A. Pietri, T. Bertuzzi, G. Fusconi, M. Galvano, A. Piva, G. Piva, and . 1996. Reduction of carryover of aflatoxin from cow feed to milk by addition of activated carbons. *J Food Protect* 59:551.
320. Veldman, A., J. A. C. Meijs, G. J. Borggreve, J. J. Heeres van der Tol, and . 1992. Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. *Animal Production* 55:163.
321. Price, R. L., J. H. Paulson, O. G. Lough, C. Ginng, and A. G. Kurtz, . 1985. Aflatoxin conversion by dairy cattle consuming naturally contaminated whole cottonseed. *J Food Protect* 48:11-15.
322. Munksgaard, L., J. Larsen, H. Werner, P. E. Andersen, and B. T. Viuf. 1987. Carry over of aflatoxin from cows' feed to milk and milk products. *Milchwissenschaft* 42:165-167.
323. Harvey, R. B., T. D. Phillips, J. A. Ellis, L. F. Kubena, W. E. Huff, and H. D. Petersen. 1991. Effects on aflatoxin M1 residues in milk by addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate to aflatoxin-contaminated diets of dairy cows. *Am J Vet Res* 52:1556.
324. Lafont, P., J. Sarfati, J. Jacquet, M. Gaillardin, and J. Lafont. 1983. Influences de facteurs pathologiques et nutritionnels sur l'elimination de l'aflatoxine par la memelle chez la vache. *Microbiologie Aliments Nutrition* 1:293-300.
325. Walstra, P., and R. Jenness. 1984. Variability. In *Dairy chemistry and physics*. P. Walstra, and R. Jenness, eds. Wiley-Interscience Publication John Wiley & Sons, Inc., p. 146.
326. Davis, S. R., V. C. Farr, and K. Stelwagen. 1999. Regulation of yield loss and milk composition during once-daily milking: a review. *Livestock Prod. Sci.* 59:77.
327. Bruckmaier, R. M., D. Weiss, M. Wiedemann, S. Schmitz, and G. Wendl. 2004. Changes of physicochemical indicators during mastitis and the effects of milk ejection on their sensitivity. *J. Dairy Res.* 71:316.
328. Van Egmond, H. P. 1989. Aflatoxin M1: occurrence, toxicity, regulation. In *Mycotoxins in dairy products*. H. P. Van Egmond, ed. Elsevier Applied Science, London, UK, pp. 11-55.

329. Steiner, J., A. Bluthgen, and W. W. S. H. J. Heeschen. 1990. Untersuchungen zur beeinflussung der ausscheidung von aflatoxin M1 durch polychlorierte bifhenyle beim laktierenden rind. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 42:543.
330. Auerbach, H., R. F. M. Maas, O. d. C. .H.J.M., A. Pol, and J. Fink-Gremmels. 1998. Biodegradation of aflatoxin B1 by bovine rumen micro-organism in vitro and its effects on rumen fermentation. *Revue de Medicine Veterinaire* 149:573.
331. Van Eijkeren, J. C. H., M. I. Bakker, and M. J. Zeilmaker. 2006. A simple steady-state model for carry-over of aflatoxins from feed to cow's milk. *Food Addit. Contam* 23:833.
332. Patel, P. M., S. P. Netke, D. S. Gupta, and A. K. Dabadghao. 1981. Note on the effect of processing milk into Khoa on aflatoxin M1 content. *Indian J. Anim. Sci.* 51:791.
333. Govaris, A., V. Roussi, P. A. Koidis, and N. A. Botsoglou. 2001. Distribution and stability of aflatoxin M1 during processing, ripening and storage of Telemes cheese. *Food Addit Contam* 18:437.
334. Yousef, A. E., and E. H. Marth. 1989. Use of ultraviolet energy to degrade aflatoxin M1 in raw or heated milk with and without added peroxide. *J Dairy Sci* 69:2243–2247.
335. Wiseman, D. W., and E. H. Marth. 1983. Behavior of aflatoxin M1 in yogurt, buttermilk and kefir. *J.Food Prot.* 46:115.
336. Pietri, A., T. Bertuzzi, P. Bertuzzi, and G. Piva. 1997. Aflatoxin M1 occurrence in samples of Grana Padano cheese. *Food Addit Contam* 14:341.
337. Applebaum, R. S., and E. H. Marth. 1982. Use of sulfite or bentonite to eliminate aflatoxin M1 from naturally contaminated raw milk. *Z Lebensm Unters Forsch* 174:303.
338. Applebaum, R. S., and E. H. Marth. 1982. Inactivation of aflatoxin M1 in milk using hydrogen peroxide and hydrogen peroxide plus riboflavin or lactoperoxidase. *J Food Prot* 45:557.
339. European. Community (EC) 2004. Regolamento n. 683/2004 della Commissione, del 13 aprile 2004, che modifica il regolamento n. 466/2001 per quanto riguarda le aflatossine e l'ocratossina A negli alimenti per lattanti e prima infanzia. Gazzetta ufficiale n. L 106 del 15 Aprile 2004.
340. Ministero. della Salute. Italia. D.G.V.A./IX/25664/F.5.B.B.2/P del 24.08.2004. Metodi di campionamento e di analisi per la ricerca di aflatossine nei formaggi.
341. European. Community (EC) 2002. Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed. Eur Comm Online J no. L 140 of 30 May 2002, pp. 10-21.
342. European. Community (EC) 1999. Direttiva 1999/29/CE del Consiglio, del 22 aprile 1999, relativa alle sostanze ed ai prodotti indesiderabili nell'alimentazione degli animali. Gazzetta ufficiale n. L 115 del 04 maggio 1999.
343. Ministero. della Salute. Italia. Decreto 23 dicembre 2002, n.317. Regolamento interministeriale recante norme di attuazione della direttiva 1999/29/CE, relativa alle sostanze ed ai prodotti indesiderabili nell'alimentazione degli animali. Gazzetta Ufficiale n. 155 del 7 luglio 2003.
344. Galvano, F., A. Piva, A. Ritieni, and G. Galvano. 2001. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. *J Food Prot* 64:120.

345. Mehan, V. K., C. D. Mayee, S. Jayanthi, and D. McDonald. Preharvest seed infection by *Aspergillus flavus* group fungi and subsequent aflatoxin contamination in groundnuts in relation to soil types. *Plant Soil* 1991:239.
346. Cole, R. J., J. W. Dorner, and C. C. Holbrook. 1995. Advances in mycotoxin elimination and resistance. In *Advances in peanut science*. H. E. Pattee, and H. T. Stalker, eds. American Peanut Research and Education Society, Inc., Stillwater, p. 456.
347. Santin, E. 2005. Mould Growth and mycotoxin production. In *The Mycotoxin Blue Book*, D. E. Diaz, ed. Nottingham University Press, Thrumpton, Nottingham, p. 225.
348. Bruns, H. A. 2003. Controlling Aflatoxin and Fumonisin in Maize by Crop Management. *J. Toxicol.: TOXIN REVIEWS* 22:153-173.
349. Cleveland, and J. W. Dorner. 2008. Management and prevention of mycotoxins in peanuts. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 25:203.
350. Cleveland, T. E., P. F. Dowd, A. E. Desjardins, D. Bhatnagar, and P. J. Cotty. 2003. United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service research on pre-harvest prevention of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in US crops. *Pest Manag Sci* 59:629.
351. Wright, G. C., and R. R. Nageswara. 2000. A crop modelling approach to define optimum maturity for drought and aflatoxin avoiding varieties. *Proc APRES*:27.
352. Dixon, R. C., and P. B. Hamilton. 1981. Effect of food ingredients on the antifungal activity of propionic acid. *Poult. Sci.* 60:2407.
353. Hell, K., K. F. Cardwell, M. Setamou, and H. Poehling. 2000. The influence of storage practices on aflatoxin contamination in maize in four agroecological zones of Benin, west Africa. *J Stored Prod Res* 36:365.
354. Van Egmond, H. P., and G. J. A. Speijers. 1999. Mycotoxins. In *International Food Safety Handbook*. C. A. van der Heyden, M. Younes, L. Fishbein, and S. Miller, eds. Marcel Dekker, New York, p. 341.
355. Piva, G., A. Galvano, A. Pierti, and A. Piva. 1995. Detoxification methods of aflatoxins. A review. *Nutr. Res.* 5: 689.
356. Phillips, T. D., B. A. Clement, and D. L. Park. 1994. Approaches to reduction of aflatoxin in foods and feeds. In *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*. D. L. Eaton, and J. D. Groopman, eds. Academic Press, p. 383.
357. Dvorak, M. 1990. [Possibilities of chemical detoxification of aflatoxin]. *Vet Med (Praha)*. 35:37.
358. D'Souza, D. H., and R. E. Brackett. 2001. Aflatoxin B1 degradation by flavobacterium aurantiacum in the presence of reducing conditions and seryl and sulfhydryl group inhibitors. *J Food Prot* 64:268.
359. Davidson, J. I., T. B. Whitaker, and J. W. Dickens. 1982. *Grading, cleaning, storage, shelling, and marketing of peanuts in the United States*. American Peanut Research and Education Society, Yoakum, TX.

360. Piva, G., P. Battilani, and A. Pietri. 2006. Emerging issues in Southern Europe: Aflatoxins in Italy. In *The mycotoxin factbook - food & feed topics*. D. Barug, D. Bhatnagar, H. P. van Egmond, J. W. van der Kamp, W. A. van Osenbruggen, and A. Visconti, eds. Wageningen Academic Publisher, The Netherlands, p. 139.
361. Kensler, T. W., J. D. Groopman, and B. D. Roebuck. 1998. Use of aflatoxin adducts as intermediate endpoints to assess the efficacy of chemopreventive interventions in animals and man. *Mutat Res* 402:165.
362. Hayes, J. D., D. J. Pulford, E. M. Ellis, R. McLeod, R. F. James, J. Seidegard, E. Mosialou, B. Jernstrom, and G. E. Neal. 1998. Regulation of rat glutathione S-transferase A5 by cancer chemopreventive agents: mechanisms of inducible resistance to aflatoxin B1. *Chem Biol Interact* 111-112:51.
363. Davidson, J. D. Hayes, R. McLeod, E. M. Ellis, D. J. Pulford, L. S. Ireland, L. I. McLellan, D. J. Judah, M. M. Manson, and G. E. Neal. 1996. Regulation of glutathione S-transferases and aldehyde reductase by chemoprotectors: studies of mechanisms responsible for inducible resistance to aflatoxin B1. *IARC Sci Publ*:175.
364. Kuilman, M. E., R. F. Maas, F. M. Woutersen-van Nijnanten, and J. Fink-Gremmels. 2000. Inhibition of aflatoxin M1 production by bovine hepatocytes after intervention with oltipraz. *Vet Q* 22:30.
365. Murthy, T., B. Reddy, and G. Devegowda. 2002. Evaluation of glucomannan for its adsorbing ability of Aflatoxin B1 and T-2 Toxin in the Gastrointestinal Tract of Broiler Chickens. *Mycotoxin Research* 18:20.
366. Diaz, D., W. Hagler, B. Hopkins, and L. Whitlow. 2003. Aflatoxin Binders I: In vitro binding assay for aflatoxin B1 by several potential sequestering agents. *Mycopathologia* 156:223.
367. Bailey, R. H., L. F. Kubena, R. B. Harvey, S. A. Buckley, and G. E. Rottinghaus. 1998. Efficacy of various inorganic sorbents to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin in broiler chickens. *Poult Sci* 77:1623.
368. Phillips, T. D., L. F. Kubena, R. B. Harvey, D. R. Taylor, and N. D. Heidelbaugh. 1988. Hydrated sodium calcium aluminosilicate: a high affinity sorbent for aflatoxin. *Poult Sci* 67:243.
369. Phillips, T. D., E. Afriyie-Gyawu, J. Williams, H. Huebner, N. A. Ankrah, D. Ofori-Adjei, P. Jolly, N. Johnson, J. Taylor, A. Marroquin-Cardona, L. Xu, L. Tang, and J. S. Wang. 2008. Reducing human exposure to aflatoxin through the use of clay: a review. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 25:134.
370. Harvey, R. B., L. F. Kubena, M. H. Elissalde, D. E. Corrier, and T. D. Phillips. 1994. Comparison of two hydrated sodium calcium aluminosilicate compounds to experimentally protect growing barrows from aflatoxicosis. *J Vet Diagn Invest* 6:88.
371. Harvey, R. B., L. F. Kubena, M. H. Elissalde, and T. D. Phillips. 1993. Efficacy of zeolitic ore compounds on the toxicity of aflatoxin to growing broiler chickens. *Avian Dis* 37:67.
372. Harvey, R. B., L. F. Kubena, W. E. Huff, D. E. Corrier, D. E. Clark, and T. D. Phillips. 1989. Effects of aflatoxin, deoxynivalenol, and their combinations in the diets of growing pigs. *Am J Vet Res* 50:602.

373. Harvey, R. B., L. F. Kubena, T. D. Phillips, W. E. Huff, and D. E. Corrier. 1989. Prevention of aflatoxicosis by addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate to the diets of growing barrows. *Am J Vet Res* 50:416.
374. Phillips, T. D., B. A. Clement, L. F. Kubena, and R. B. Harvey. 1990. Detection and detoxification of aflatoxins: prevention of aflatoxicosis and aflatoxin residues with hydrated sodium calcium aluminosilicate. *Vet Hum Toxicol* 32 Suppl:15.
375. Phillips, T. D. 1999. Dietary clay in the chemoprevention of aflatoxin-induced disease. *Toxicol Sci* 52:118.
376. Kubena, L. F., R. B. Harvey, W. E. Huff, M. H. Elissalde, A. G. Yersin, T. D. Phillips, and G. E. Rottinghaus. 1993. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and diacetoxyscirpenol. *Poult Sci* 72:51.
377. Kubena, L. F., R. B. Harvey, R. H. Bailey, S. A. Buckley, and G. E. Rottinghaus. 1998. Effects of a hydrated sodium calcium aluminosilicate (T-Bind) on mycotoxicosis in young broiler chickens. *Poult Sci* 77:1502.
378. Pietri, A., T. Bertuzzi, G. Piva, E. M. Binder, D. Schatzmayr, and I. Rodrigues. 2009. Aflatoxin Transfer from Naturally Contaminated Feed to Milk of Dairy Cows and the Efficacy of a Mycotoxin Deactivating Product. *Int J Dairy Sci* 4:34.
379. Ramos Girona, A. J., and E. Hernandez Gimenez. 1997. [In vitro adsorption of aflatoxins by means of sorbent compounds: montmorillonite]. *Rev Iberoam Micol* 14:72.
380. Wogan, G. N. 1975. Mycotoxins. *Annu Rev Pharmacol* 15:437.
381. Torosantucci, A., C. Bromuro, P. Chiani, F. De Bernardis, F. Berti, C. Galli, F. Norelli, C. Bellucci, L. Polonelli, P. Costantino, R. Rappuoli, and A. Cassone. 2005. A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *J Exp Med* 202:597.
382. Cervino, C., D. Knopp, M. G. Weller, and R. Niessner. 2007. Novel aflatoxin derivatives and protein conjugates. *Molecules* 12:641.
383. Chu, F. S., M. T. Hsia, and P. S. Sun. 1977. Preparation and characterization of aflatoxin B₁-1-(O-carboxymethyl) oxime. *J Assoc Off Anal Chem* 60:791.
384. Langone, J. J., and H. Van Vunakis. 1976. Aflatoxin B₁; specific antibodies and their use in radioimmunoassay. *J Natl Cancer Inst* 56:591.
385. Swenson, D. H., J. A. Miller, and E. C. Miller. 1975. The reactivity and carcinogenicity of aflatoxin B₁-2,3-dichloride, a model for the putative 2,3-oxide metabolite of aflatoxin B₁. *Cancer Res* 35:3811.
386. Lau, H. P., P. K. Gaur, and F. S. Chu. 1981. Preparation and Characterization of Aflatoxin B_{2a} Hemiglutarate and its Use for the Production of Antibody against Aflatoxin B₁. *J. Food Safety* 3:1.
387. Chu, F. S., B. W. Steinert, and P. K. Gaur. 1985. Production and Characterization of Antibody against Aflatoxin G₁. *J. Food Safety* 7:161.
388. Odugbesan, E. A., O. A. Osowole, and A. O. Uwaiifo. 1988. Effect of antiserum against aflatoxin B₁-bovine serum albumin complex on aflatoxin B₁-induced lysogenesis. *Mutat Res* 209:7.

389. Chu, F. S., and I. Ueno. 1977. Production of antibody against aflatoxin B1. *Appl Environ Microbiol* 33:1125.
390. Ueno, I., and F. S. Chu. 1978. Modification of hepatotoxic effects of aflatoxin B1 in rabbits by immunization. *Experientia*, 1978, 34 (1): 85-6. *Experientia* 34:85.
391. Sizaret, P., C. Malaveille, G. Brun, A. M. Aguelon, and G. Toussaint. 1982. Inhibition by specific antibodies of the mutagenicity of aflatoxin B1 in bacteria. *Oncodev Biol Med* 3:125.
392. Odunola, O. A., and A. O. Uwaifo. 1998. Binding reaction of aflatoxin B1 with immunoglobulin G against aflatoxin B1-bovine serum albumin complex. *Afr J Med Med Sci* 27:1.
393. Oliver, A. R., L. K. Silbart, D. F. Keren, B. Miller, and R. A. McDonald. 1996. Mucosal tolerance to aflatoxin B1. *Ann N Y Acad Sci* 778:422.
394. Odunola, O. A., and A. O. Uwaifo. 2000. Immune response to aflatoxin B1-histone H1 complex. *Afr J Med Med Sci* 29:105.
395. Scott, P. M., and M. W. Trucksess. 1997. Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. *J AOAC Int* 80:941.
396. Castegnaro, M., M. Tozlovanu, C. Wild, A. Molinie, A. Sylla, and A. Pfohl-Leskowicz. 2006. Advantages and drawbacks of immunoaffinity columns in analysis of mycotoxins in food. *Mol Nutr Food Res* 50:480.
397. Caviezel, M., A. P. Aeschbach, W. K. Lutz, and C. Schlatter. 1984. Reduction of covalent binding of aflatoxin B1 to rabbit liver DNA after immunization against this carcinogen. *Arch Toxicol Suppl* 7:249.
398. Oliver, A. R., L. K. Silbart, D. F. Keren, H. J. Van Kruiningen, B. F. Miller, and C. Rearick. 1997. Mucosal unresponsiveness to aflatoxin B1 is not broken by cholera toxin. *Immunol Cell Biol* 75:47.
399. Holmgren, J., N. Lycke, and C. Czerkinsky. 1993. Cholera toxin and cholera B subunit as oral-mucosal adjuvant and antigen vector systems. *Vaccine* 11:1179.
400. Silbart, L. K., and D. F. Keren. 1989. Reduction of intestinal carcinogen absorption by carcinogen-specific secretory immunity. *Science* 243:1462.
401. Silbart, L. K., D. F. Keren, R. A. McDonald, P. M. Lincoln, L. Goslinoski, and J. B. Smart. 1992. Characterization of the mucosal immune response to 2-acetylaminofluorene-protein conjugates. *Reg Immunol* 4:245.
402. Wiedermann, U., L. A. Hanson, J. Holmgren, H. Kahu, and U. I. Dahlgren. 1993. Impaired mucosal antibody response to cholera toxin in vitamin A-deficient rats immunized with oral cholera vaccine. *Infect Immun* 61:3952.
403. Clements, J. D., N. M. Hartzog, and F. L. Lyon. 1988. Adjuvant activity of Escherichia coli heat-labile enterotoxin and effect on the induction of oral tolerance in mice to unrelated protein antigens. *Vaccine* 6:269.
404. Wilkinson, J., D. Rood, D. Minior, K. Guillard, M. Darre, and L. K. Silbart. 2003. Immune response to a mucosally administered aflatoxin B1 vaccine. *Poult Sci* 82:1565.

405. WHO. 2002. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Some Traditional Herbal Medicine, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene*. IARC Press, Lyon, France.
406. 1993. Aflatoxins. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 56:245.
407. Rustom, I. Y. S. 1997. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chem* 59:57.
408. Kensler, T. W., P. A. Egner, J. B. Wang, Y. R. Zhu, B. C. Zhang, G. S. Qian, S. Y. Kuang, S. J. Gange, L. P. Jacobson, A. Munoz, and J. D. Groopman. 2002. Strategies for chemoprevention of liver cancer. *Eur J Cancer Prev* 11 Suppl 2:S58.
409. Coker, R. D. 1998. The chemical detoxification of aflatoxin-contaminated animal feed. In *Natural Toxicants in Food*. Sheffield Academic Press, Boca Raton, FL., p. 284.
410. Schatzmayr, G., F. Zehner, M. Taubel, D. Schatzmayr, A. Klimitsch, A. P. Loibner, and E. M. Binder. 2006. Microbiologicals for deactivating mycotoxins. *Mol Nutr Food Res* 50:543.
411. Moss, M. O. 1996. Mycotoxic fungi. In *Microbial Food Poisoning*. A. R. Eley, ed. Chapman and Hall, New York, NY, p. 75.
412. Sizaret, P., C. Malaveille, R. Montesano, and C. Frayssinet. 1982. Detection of aflatoxins and related metabolites by radioimmunoassay. *J Natl Cancer Inst* 69:1375.
413. Beninati, C., S. Arseni, G. Mancuso, W. Magliani, S. Conti, A. Midiri, C. Biondo, L. Polonelli, and G. Teti. 2004. Protective immunization against group B meningococci using anti-idiotypic mimics of the capsular polysaccharide. *J Immunol* 172:2461.
414. Magliani, W., L. Polonelli, S. Conti, A. Salati, P. F. Rocca, V. Cusumano, G. Mancuso, and G. Teti. 1998. Neonatal mouse immunity against group B streptococcal infection by maternal vaccination with recombinant anti-idiotypes. *Nat Med* 4:705.
415. Polonelli, L., R. Lorenzini, F. De Bernardis, M. Gerloni, S. Conti, G. Morace, W. Magliani, and C. Chezzi. 1993. Idiotypic vaccination: immunoprotection mediated by anti-idiotypic antibodies with antibiotic activity. *Scand J Immunol* 37:105.
416. Polonelli, L., F. De Bernardis, S. Conti, M. Boccanera, M. Gerloni, G. Morace, W. Magliani, C. Chezzi, and A. Cassone. 1994. Idiotypic intravaginal vaccination to protect against candidal vaginitis by secretory, yeast killer toxin-like anti-idiotypic antibodies. *J Immunol* 152:3175.
417. Beninati, C., A. Midiri, G. Mancuso, C. Biondo, M. Arigo, E. Gerace, S. Papasergi, M. Gambuzza, M. Boretti, W. Magliani, S. Conti, L. Polonelli, and G. Teti. 2006. Antiidiotypic DNA vaccination induces serum bactericidal activity and protection against group B meningococci. *J Exp Med* 203:111.
418. Pillemer, L., R. G. Wittler, F. L. Clapp, and J. N. Adam, Jr. 1948. Immunochemistry of Toxins and Toxoids: IV. The Preparation of Purified Diphtherial Toxoid for Clinical Use. *J Immunol* 58:223.
419. FAO/WHO. 1999. Forty-ninth Report of the Joint Expert Committee of Food Additives: Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. WHO Technical Report. FAO/WHO 884, p. 69.
420. Felici, F., L. Castagnoli, A. Musacchio, R. Jappelli, and G. Cesareni. 1991. Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *J Mol Biol* 222:301.

-
421. Thirumala-Devi, K., J. S. Miller, G. Reddy, D. V. Reddy, and M. A. Mayo. 2001. Phage-displayed peptides that mimic aflatoxin B1 in serological reactivity. In *J Appl Microbiol*, Vol. 90, p. 330.
422. Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23.
423. Moretto, N., A. Bolchi, C. Rivetti, B. P. Imbimbo, G. Villetti, V. Pietrini, L. Polonelli, S. Del Signore, K. M. Smith, R. J. Ferrante, and S. Ottonello. 2007. Conformation-sensitive Antibodies against Alzheimer Amyloid- β by Immunization with a Thioredoxin-constrained B-cell Epitope Peptide. *Journal of Biological Chemistry* 282:11436.
424. Hutchison, C. A., 3rd, S. Phillips, M. H. Edgell, S. Gillam, P. Jahnke, and M. Smith. 1978. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *J Biol Chem* 253:6551.
425. Bradford, M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72:248.
426. Phalipon, A., A. Folgori, J. Arondel, G. Sgaramella, P. Fortugno, R. Cortese, P. J. Sansonetti, and F. Felici. 1997. Induction of anti-carbohydrate antibodies by phage library-selected peptide mimics. *Eur J Immunol* 27:2620.
427. Lee, N. A., S. Wang, R. D. Allan, and I. R. Kennedy. 2004. A rapid aflatoxin B1 ELISA: development and validation with reduced matrix effects for peanuts, corn, pistachio, and Soybeans. *J Agric Food Chem* 52:2746.
428. Ames, B. N. 1973. Carcinogens are mutagens: their detection and classification. *Environ Health Perspect* 6:115.
429. Maron, D. M., and B. N. Ames. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 113:173.
430. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193:265.
431. National. Research Council. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle, seventh revised edition. National Academy of Science, Washington, D.C.
432. Mortimer, D. N., J. Gilbert, and M. J. Shepherd. 1987. Rapid and highly sensitive analysis of aflatoxin M1 in liquid and powdered milks using an affinity column cleanup. *J Chromatogr*. 407:393.
433. AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis, 15th ed.* Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
434. AOAC. 1995. *Official Methods of Analysis. Vol. II. 16th ed.* Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
435. Reddy, L., B. Odhav, and K. Bhoola. 2006. Aflatoxin B1-induced toxicity in HepG2 cells inhibited by carotenoids: morphology, apoptosis and DNA damage. *Biol Chem* 387:87.
436. Haworth, S., T. Lawlor, K. Mortelmans, W. Speck, and E. Zeiger. 1983. *Salmonella* mutagenicity test results for 250 chemicals. *Environ Mutagen* 5 Suppl 1:1.

437. Békaert, C., C. Rast, V. Ferrier, A. Bispo, M. J. Jourdain, and P. Vasseur. 1999. Use of in vitro (Ames and Mutatox tests) assays to assess the genotoxicity of leachates from contaminated soil. *Organic Geochemistry* 30:953–962.
438. Ehrlichmann, H. W., and A. Eisentraeger. 2000. Assessment of the water-extractable genotoxic potential of soil samples from contaminated sites. *Ecotoxicol Environ Safety* 46:73.
439. Monarca, S., F. Donatella, I. Zerbini, A. Alberti, C. Zani, and R. Sergio. 2002. Soil contamination detected using bacterial and plant mutagenicity tests and chemical analyses. *Environmental Research Agenda* 88:64.
440. Chu, K. C., K. M. Patel, A. H. Lin, R. E. Tarone, M. S. Linhart, and V. C. Dunkel. 1981. Evaluating statistical analyses and reproducibility of microbial mutagenicity assays. *Mutat Res* 85:119.
441. Fan, T. S., G. S. Zhang, and F. S. Chu. 1984. Production and characterization of antibody against aflatoxin Q1. *Appl Environ Microbiol* 47:526.
442. Bolton, M. G., A. Munoz, L. P. Jacobson, J. D. Groopman, Y. Y. Maxuitenko, B. D. Roebuck, and T. W. Kensler. 1993. Transient intervention with oltipraz protects against aflatoxin-induced hepatic tumorigenesis. *Cancer Res* 53:3499.
443. Breinholt, V., M. Schimerlik, R. Dashwood, and G. Bailey. 1995. Mechanisms of chlorophyllin anticarcinogenesis against aflatoxin B1: complex formation with the carcinogen. *Chem Res Toxicol* 8:506.
444. Langouet, S., B. Coles, F. Morel, L. Becquemont, P. Beaune, F. P. Guengerich, B. Ketterer, and A. Guillouzo. 1995. Inhibition of CYP1A2 and CYP3A4 by oltipraz results in reduction of aflatoxin B1 metabolism in human hepatocytes in primary culture. *Cancer Res* 55:5574.
445. March, J. B., J. R. Clark, and C. D. Jepson. 2004. Genetic immunisation against hepatitis B using whole bacteriophage lambda particles. *Vaccine* 22:1666.
446. Yip, Y. L., G. Smith, and R. L. Ward. 2001. Comparison of phage pIII, pVIII and GST as carrier proteins for peptide immunisation in Balb/c mice. *Immunol Lett* 79:197.
447. Su, Q. P., D. Z. Wen, Q. Yang, Y. H. Zhang, C. Liu, and L. Wang. 2007. Comparison of phage pVIII and KLH as vector in inducing the production of cytokines in C57BL/6J mice. *Vaccine* 25:970.
448. Jiao, X., R. Y. Wang, Z. Feng, G. Hu, H. J. Alter, and W. K. S. J. 2004. DNA immunization encoding the secreted nonstructural protein 3 (NS3) of hepatitis C virus and enhancing the Th1 type immune response. *J Viral Hepat* 11:18.
449. Gurnathan, S., D. M. Klinman, and R. A. Seder. 2000. DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. *Annual Review Of Immunology* 18:927.
450. Haddad, D., S. Liljeqvist, S. Stahl, I. Andersson, P. Perlmann, K. Berzins, and N. Ahlborg. 1997. Comparative study of DNA-based immunization vectors: effect of secretion signals on the antibody responses in mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 18:193.
451. Menge, A. C., S. M. Michalek, M. W. Russell, and J. Mestecky. 1993. Immune response of the female rat genital tract after oral and local immunization with keyhole limpet hemocyanin conjugated to the cholera toxin B subunit. *Infect Immun* 61:2162.

452. Walders, B., A. Raschke, M. Neugebauer, E. Geuther, W. Bertling, C. Reiser, A. Buck, S. Strich, and J. Hess. 2005. Blending of a conventional *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine with a positive marker: tracking of immunised pigs by peptide-specific antibodies raised to the marker component. *Res Vet Sci* 78:135.
453. Leclerc, C., M. P. Schutze, E. Deriaud, and G. Przewlocki. 1990. The in vivo elimination of CD4+ T cells prevents the induction but not the expression of carrier-induced epitopic suppression. *J Immunol* 145:1343.
454. Na, I. K., U. Keilholz, A. Letsch, S. Bauer, A. M. Asemissen, D. Nagorsen, E. Thiel, and C. Scheibenbogen. 2007. Addition of GM-CSF to a peptide/KLH vaccine results in increased frequencies of CXCR3-expressing KLH-specific T cells. *Cancer Immunol Immunother* 56:391.
455. Buonavoglia. 2008. An oil-emulsion vaccine induces full-protection against *mycoplasma agalactiae* infection in sheep. *New Microbiol* 31:129.