

EFFETTI DELLE AFLATOSSINE SUGLI ASPETTI PRODUTTIVI NELLA BUFALA MEDITERRANEA ITALIANA

Giuseppe Auriemma, Giuseppe Grazioli, Rodolfo Baculo, Fiorella Sarubbi
Istituto per il Sistema Produzione Animale in Ambiente Mediterraneo, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Napoli

Introduzione

Il mais (*Zea mays*) è un cereale che ha assunto, a livello mondiale, una diffusione e un'importanza crescenti. Gran parte del mais coltivato in Italia (82%) è destinato all'alimentazione degli animali ad interesse zootecnico; se a questa percentuale si aggiunge la quota del 3,7% di mais utilizzato come sottoprodotto dell'industria dell'amido, si raggiunge un valore dell'86%. La granella e l'insilato di mais sono la fonte energetica per eccellenza nell'alimentazione dei ruminanti per cui la presenza di Aflatossine (AF) rappresenta un serio problema.

L'impiego del mais come pianta intera, trinciato e insilato, e delle diverse parti botaniche (pastone di pannocchia) è largamente diffuso in quanto costituisce un alimento di grande interesse nutrizionale per le sue caratteristiche di elevata appetibilità, versatilità e buona digeribilità dei principi nutritivi, oltre ad essere caratterizzato da un basso costo di acquisto e produzione.

La granella di mais, in diverse forme fisiche (intera, sfarinata, fioccata, estrusa, ecc.) rappresenta invece la fonte energetica per eccellenza nell'alimentazione sia dei monogastrici (suini, avicoli, ecc.) che dei grandi e piccoli ruminanti.

Le problematiche relative alla presenza delle micotossine nel mais destinato all'alimentazione degli animali ad interesse zootecnico rappresentano un serio problema e possono essere riassunte in due grossi capitoli:

- salute e benessere degli animali, in quanto possono influire sulle attività metaboliche e quindi sulle funzioni fisiologiche che garantiscono lo stato di salute dell'animale stesso;
- tutela del consumatore in quanto ingerisce alimenti di origine animale che potrebbero essere contaminati in seguito ad ingestione da parte dell'animale stesso delle micotossine (es. insilato contaminato da Aflatossina B₁ → latte con Aflatossina M₁).

L'Aflatossina B₁ (AFB₁) è quella presente in maggior quantità e sulla quale è stato focalizzato l'interesse dei ricercatori per via della sua elevata tossicità acuta e cronica.

Gli alimenti che contengono AF con maggior frequenza sono i cereali e suoi derivati; ma va ricordato che una cattiva conservazione può far comparire le AF anche in prodotti non considerati a rischio.

I livelli di AF comprese tra 0,3-0,7 mg/kg vengono considerati tossici per le vacche da latte (1), mentre i vitelli sono già sensibili alla presenza 0,02 mg/kg (2).

Bovini, suini e volatili sono gli animali maggiormente sensibili alla AFB₁ e i sintomi vengono osservati già ad 1 o 2 giorni dall'esposizione (3). Contaminazioni di 0,2 mg/kg sono già in grado di diminuire la crescita giornaliera, di ridurre l'attività ruminale, l'efficienza alimentare e riproduttiva causando una minore produzione di latte (4, 5). L'effetto sulla riproduzione non sembra essere diretto ed è piuttosto dovuto a un'azione indiretta attraverso altri sistemi fisiologici.

L'AFM₁ (*milk toxin*) è stato il primo metabolita della AFB₁ ad essere identificato. Tutti i poligastrici che ingeriscono AFB₁ ne eliminano una quota come AFM₁ nel latte; nel caso dei grossi ruminanti, la quota eliminata è generalmente l'1-3% di quella ingerita. Vi è tuttavia un'elevata variabilità di escrezione, dovuta sia a fattori individuali che allo stadio di lattazione. Il *carry-over* di un singolo animale è 3,3-3,5 volte maggiore a inizio lattazione che a lattazione avanzata ed è linearmente correlato con il livello produttivo. Nel caso delle bufale, nel latte, accanto ad AFM₁ viene eliminata anche AFB₁.

In considerazione del fatto che la principale influenza negativa sulla fertilità, e quindi sulla produttività, deriva non tanto dalle infezioni specifiche o non della sfera genitale, quanto dagli effetti di una serie di fattori che esercitano la loro azione interagendo fra loro, rendendo difficile una diagnosi causale dell'infertilità in un dato allevamento, e che tra questi fattori le micotossine giocano un ruolo fondamentale, si è concentrata l'attenzione degli autori sulla presenza di AFB₁ nell'insilato di mais; sulla presenza di AFM₁ nel latte e l'influenza che questi hanno mostrato sugli aspetti produttivi e metabolici nella bufala mediterranea italiana.

Si preferito concentrare l'attenzione sulla bufala mediterranea italiana in considerazione dell'importanza economico-ambientale sul sistema agro-zootecnico del Mezzogiorno d'Italia.

Materiale e metodi

Analisi qualitativa degli insilati

La determinazione della composizione chimica rappresenta il primo fondamentale passo nella valutazione qualitativa dell'insilato. Infatti non bisogna dimenticare che lo scopo dell'alimentazione e nutrizione animale è quello di massimizzare l'efficienza di trasformazione dell'alimento nelle diverse produzioni dell'animale e, se possibile, anche quello di influenzare positivamente le caratteristiche qualitative delle produzioni stesse.

Nella Figura 1 si riporta lo schema base seguito per le determinazioni chimiche nutrizionali effettuati secondo le indicazioni AOAC (6) e di Bhandari *et al.* (7).

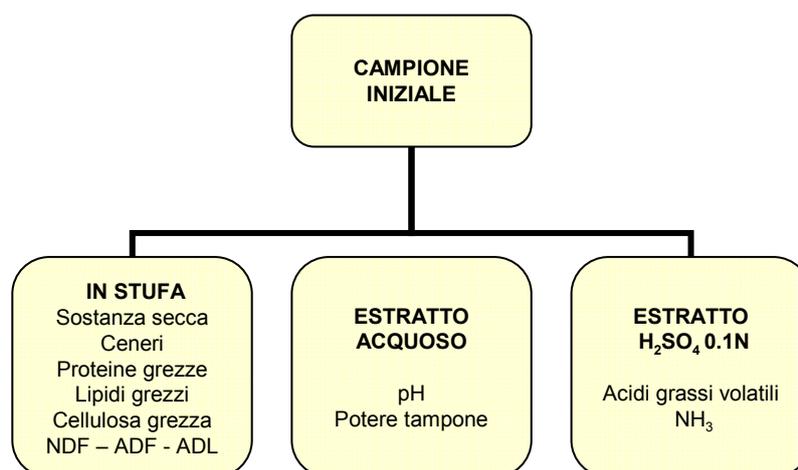


Figura 1. Schema base seguito per le determinazioni chimiche nutrizionali

Determinazione delle AF

Per la determinazione delle AFB₁ 50 g circa di campione sono stati disposti in frullatore con 10 g di NaCl.

Sono stati aggiunti circa 200 mL di metanolo:acqua (80:20, v:v) e frullati ad alta velocità per circa 1 minuto. L'estratto così ottenuto è stato filtrato su carta Whatmann 541 e raccolto in beuta. Sono stati miscelati 10 mL dell'estratto filtrato con 40 mL di acqua ultrapura in *vortex*. La soluzione così ottenuta e diluita è stata filtrata ulteriormente con filtro in microfibra di vetro e aspirato in siringa di vetro fino ad ottenere circa 4 mL (corrispondente a circa 0,2 g di campione iniziale). Alla base della siringa è stata posizionata una colonna cromatografica ad immunoaffinità monoclonali (Aflatest), al di sotto della quale era posizionato un beacker di raccolta. Il passaggio nella colonna è stato impostato a una velocità di circa 1-2 gocce al secondo fino a quando nella colonna è iniziata a entrare aria. A questo punto la colonna è stata lavata con 5 mL di acqua bidistillata, alla stessa velocità del campione. La colonna è stata successivamente lavata con 1 mL di metanolo per HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) sempre alla stessa velocità e l'eluato (circa 1 mL) è stato raccolto in cuvetta di vetro. È stato poi aggiunto 1 mL di Aflatest Developer e agitato il tutto su *vortex*. Circa 30 µL del campione così ottenuto sono stati iniettati in HPLC.

L'analisi in HPLC (LC-10AC Shimadzu) è stata effettuata in isocratica con le seguenti condizioni:

- colonna Supelcosil C18 termostata a 35°C;
- fase mobile: acetonitrile:acqua (15:85, v:v);
- flusso di 1 mL/min;
- volume di iniezione 10 µL;
- detector fluorimetro ($\lambda_{eccitazione}$ a 365 nm ed $\lambda_{emissione}$ a 440 nm).

La soluzione standard di taratura è stata ottenuta diluendo la soluzione stock nella stessa miscela di acetonitrile:acqua con concentrazioni crescenti da 0,5 a 25 mg/kg.

Analisi campioni di latte

I campioni di latte sono stati prelevati individualmente su un campione rappresentativo della mandria in ogni azienda a entrambe le mungiture giornaliere (5 am e 5 pm). Il campione finale è stato ottenuto miscelando il campione raccolto a ogni mungitura tenendo conto della quantità di latte prodotto.

Su ogni campione, dopo aver registrato la quantità di latte prodotto, sono state effettuate le seguenti determinazioni:

- grasso (Metodo Gerber);
- proteine grezze (Metodo Kjeldhal);
- AFM₁.

Determinazione delle AFM₁

Il campione di latte è stato sgrassato per centrifugazione a 3000 g per 15 minuti. Sono stati prelevati circa 30 mL di latte. Attraverso una colonna di immunoaffinità (Easy-extract) si è fatto passare il latte a una velocità di circa 2-3 mL al minuto, e la colonna è stata poi lavata con 10 mL di acqua. Circa 2 mL di eluato sono stati trasferiti in fiala e portati a secco sotto flusso di azoto e poi ricostituiti con acqua-acetonitrile (80:20; v:v) fino a un volume di circa 300 µL. La soluzione è stata filtrata con filtro per siringa con porosità pari a 0,2 µm.

L'analisi in HPLC è stata effettuata in isocratica con le seguenti condizioni:

- colonna Supelcosil C18 column termostata a 35°C;
- fase mobile: acqua:acetonitrile:metanolo (68:24:8, v:v:v);
- flusso: 1 mL/min;
- volume di iniezione: 10 µL;
- detector fluorimetro ($\lambda_{eccitazione}$ a 363 nm ed $\lambda_{emissione}$ a 433 nm).

Analisi campioni di sangue per la determinazione del profilo metabolico

Urea, glucosio, creatinina, ALT e AST sono stati determinati sui campioni del siero, raccolti una volta alla settimana da ogni bufalo dalla vena giugulare, con il metodo Vacutainer. I parametri sono stati determinati sul siero usando il Reflotron (Boehringer, Ingelheim, Germania).

Risultati e discussione

Determinazione della composizione chimico-nutrizionale degli insilati

L'analisi chimico-nutrizionale (Tabella 1) degli insilati raccolti nelle aziende considerate è risultata essere nella media del buon insilato a dimostrazione della seria pratica agronomica effettuata dagli allevatori. Le determinazioni del pH e del potere tampone sono state effettuate su estratti acquosi degli insilati appena campionati. I risultati ottenuti (Tabella 1) sono risultati essere nella media dei valori riportati in bibliografia.

Tabella1. Valori medi, con le rispettive deviazioni standard, della composizione chimica, del pH e del potere tampone degli insilati campionati

Parametri degli insilati	Valore
Sostanza secca	28,36±3,54
Ceneri	6,24±1,14
Proteine grezze	7,68±1,87
Lipidi grezzi	2,26±0,74
NDF	45,36±4,86
ADF	27,89±3,67
ADL	3,75±0,97
pH	4,24±0,65
Potere tampone	67,72±28,46

Determinazione degli acidi grassi volatili

La determinazione degli acidi grassi volatili è stata effettuata su estratti solforici ottenuti su campioni freschi nello stesso giorno del campionamento. Gran parte degli insilati ha mostrato una composizione in acidi grassi volatili nella norma dei buoni insilati. In qualche caso, dove anche a livello macroscopico, vi era la presenza di muffe e/o di un cappello visibile sulla superficie superiore del silos, sono stati riscontrati livelli elevati di acido valerianico.

Di seguito si riportano i valori medi degli acidi grassi volatili (g/kg t.q.) riscontrati negli insilati dove l'acido valerianico era assente:

Ac. lattico	19,75 ± 7,07
Ac. acetico	10,91 ± 1,76
Ac propionico	2,46 ± 0,56

Ac. isobutirrico	4,44 ± 1,19
Ac butirrico	2,75 ± 0,80
Ac. isovalerianico	0,00 ± 0,00
Ac. valerianico	0,00 ± 0,00

I valori medi degli acidi grassi volatili (g/kg t.q.) negli insilati che presentavano contaminazioni macroscopiche è stata la seguente:

Ac. lattico	12,04 ± 2,14
Ac. acetico	3,81 ± 0,75
Ac propionico	3,57 ± 0,42
Ac. isobutirrico	1,68 ± 0,87
Ac butirrico	2,25 ± 0,36
Ac. isovalerianico	0,73 ± 0,05
Ac. valerianico	16,64 ± 7,85

Determinazione del contenuto in Aflatossina negli insilati di mais

Dall'esame dei dati ottenuti degli insilati raccolti è emerso che nel 73,3% delle aziende è stata registrata una presenza significativa di muffe e lieviti. La colonizzazione da parte di questi microrganismi si è verificata per il 63,16% delle volte nel periodo estivo. Le elevate temperature e l'umidità che caratterizzano questo periodo, unitamente all'utilizzazione della parte finale del silomais, componente principale di gran parte delle diete somministrate, probabilmente rappresentano la causa dei valori elevati riscontrati.

I valori di AF dosate nei singoli alimenti e calcolati sul totale delle razioni somministrate rientrano in gran parte del periodo nei limiti stabiliti per la B₁ dal Reg. CE 1525/1998.

Nella seguente Tabella riportiamo i valori di AFB₁ nelle aziende considerate.

Tabella 1. Contenuti in AFB₁ nelle aziende considerate

Azienda	AFB ₁ (µg/kg)	
	media	deviazione standard
A	3,78	0,12
B	2,89	0,08
C	3,14	0,10
D	3,72	0,12
E	3,84	0,14
F	3,57	0,10
G	2,81	0,09
H	4,72	0,20

Dall'esame della Tabella appare evidente che i livelli di AFB₁ risultano non particolarmente elevati.

Analisi campioni di latte

Si riporta di seguito i dati relativi alla quantità di latte prodotto e le corrispettive percentuali di grasso e proteine nelle aziende selezionate sul territorio regionale (Tabella 2).

Sono state prese in considerazione 30 bufale pluripare per ogni azienda considerata nella prova sperimentale.

Tabella 2. Caratteristiche medie del latte nelle diverse aziende considerate

Azienda	kg latte prodotto		% di grasso		% proteine	
	media	DS	media	DS	media	DS
A	10,21	3,07	9,04	1,24	4,69	0,46
B	9,20	2,92	8,56	1,63	5,06	0,48
C	8,29	2,85	8,31	1,48	5,03	0,43
D	9,70	2,36	8,75	1,93	4,85	0,41
E	9,59	2,34	8,73	1,92	4,75	0,39
F	9,84	3,01	8,70	1,62	4,56	0,29
G	12,29	2,74	8,58	2,02	4,65	0,37
H	11,51	2,30	8,13	1,85	4,66	0,41

DS: Deviazione Standard

Sono state prese in considerazione bufale tra la seconda e la quarta lattazione, anche in vista del confronto statistico finale sull'influenza dell'inquinamento da micotossine sugli aspetti produttivi.

Le differenze riscontrabili tra le aziende sono risultate essere legate più alla diversa fase di lattazione in cui si trovavano le bufale al momento del prelievo che ad inquinamento da Aflatossine.

Determinazione del contenuto in AFM₁

In considerazione del fatto che la variabilità del passaggio di AFB₁ nel latte (sottoforma di M₁) è legata ai seguenti fattori:

- stadio di lattazione (passaggio superiore a inizio lattazione);
- produzione di latte/lattazione;
- stato clinico della mammella (presenza di mastiti);
- variabilità individuale ed età dei soggetti.

Sono stati scelti animali quanto più omogenei tra di loro in modo da ridurre al minimo la possibilità che differenti quantità di M₁ fossero legata alle variabili indicate.

Nelle aziende esaminate i valori riscontrati sono stati i seguenti (Tabella 3).

Tabella 3. Percentuale di positività all'AFM₁

Azienda	% campioni positivi all'AFM ₁
A	2
B	3
C	5
D	4
E	2
F	5
G	4
H	3

Tenendo conto del fatto che l'AFM₁ è una molecola semipolare che nel latte si lega principalmente alla caseina, possiamo dedurre che nella produzione del formaggio circa il 50% della tossina iniziale si ritroverà nella cagliata e pertanto le concentrazioni nel formaggio potranno essere sensibilmente più alte di quelle del latte con cui è stato prodotto.

Considerando che la lavorazione del formaggio avviene su latte di massa e non su latte individuale, appare chiaro che tali valori percentuali possono essere considerati non significativi. Infatti indagini effettuate su latte di massa per azienda non hanno mostrato alcuna positività.

Per completezza dei risultati si riportano che il 48% dei campioni hanno mostrato valori di AFM₁ inferiori a 0,02 mg/kg, il 20% valori tra 0,02 e 0,03 mg/kg, e il 4% tra 0,03 e 0,05 mg/kg.

Analisi campioni di sangue per la determinazione del profilo metabolico

Si riporta di seguito la Tabella relativa ai dosaggi dei principali parametri ematochimici rappresentativi dei diversi metabolismi (Tabella 4):

Tabella 4. Alcuni parametri del profilo metabolico di campioni di sangue (media e DS)

Azienda	Urea mg/dL		Glucosio mmol/L		Creatinine µmol/L		AST UI/L		ALT UI/L	
A	54,62	8,12	3,34	0,26	137,43	16,79	157,01	25,87	66,49	8,58
B	56,40	9,41	3,36	0,95	136,27	18,36	158,08	26,13	65,85	9,24
C	50,90	7,67	3,41	0,64	127,55	16,57	165,77	27,67	66,15	10,7
D	50,62	8,25	3,34	0,71	129,78	15,32	161,87	29,92	67,53	9,15
E	51,25	8,16	3,43	0,68	130,54	16,24	160,39	26,15	66,58	8,57
F	54,12	7,59	3,39	0,59	131,01	14,39	159,87	24,31	65,97	7,89
G	52,36	8,23	3,25	0,71	129,69	14,27	161,05	20,98	65,47	9,02
H	53,16	6,98	3,15	0,70	130,03	15,63	160,34	21,39	63,21	7,96

Dall'esame della tabella appare evidente che non sono risultate differenze significative tra le aziende anche se le aziende A e B hanno mostrato valori significativamente più alti rispetto alle altre aziende. È da sottolineare che i valori riscontrati sono stati, in tutti i casi analizzati, superiori a quelli considerati fisiologici, anche se in linea con altri dati riportati in letteratura (8).

Questi parametri non ritrovano riscontro con i valori di AF rilevati precedentemente.

Conclusioni

La pericolosità e gli effetti tossici delle micotossine a carico di uomini e degli animali hanno addirittura preceduto l'individuazione delle micotossine stesse come colpevoli. L'interesse della ricerca scientifica è costantemente in via di evoluzione ed è finalizzato alla comprensione degli effetti negativi a carico delle produzioni zootecniche, alla comprensione dei meccanismi patogenetici a carico dell'uomo e alla prevenzione della contaminazione.

Nelle prove sperimentali oggetto del presente lavoro scarsi sono stati i livelli di micotossine nelle diete somministrate ai bufali sottoposti ad indagine sperimentale, e la dove presenti, anche se all'interno del limite di legge non hanno causato cambiamenti nei parametri zootecnici considerati.

Le differenze significative riscontrate tra le aziende sono risultate essere imputabili più a condizioni manageriali diverse che ad inquinamento da micotossine.

Per ciò che concerne le Aflatossine possiamo considerare che le modalità e le variabili che condizionano il *carry-over*, cioè la percentuale di passaggio dell'AFB₁ nel latte sotto forma di M₁, possono essere le seguenti:

- elevata variabilità individuale tra gli animali;
- *carry-over* maggiore a inizio lattazione rispetto alla fase di lattazione avanzata (aumenta in modo più che proporzionale rispetto alla produzione di latte);
- infezioni della mammella.

La quantità di AFM₁ (µg/kg latte) nel latte può essere prevista utilizzando la seguente formula: AFB₁ ingerita/capo/giorno (µg) × 1,19 + 1,9. Per produrre latte con AFM₁ ≤ 50 ng/kg (o meglio 0,05 µg/kg latte) gli animali devono ingerire una quantità di AFB₁ <40 µg/capo/giorno. Va tenuto presente che la comparsa di AF nel latte in seguito ad ingestione è molto rapida: se si somministrano alimenti contaminati, l'AFM₁ comparirà nel latte già nella mungitura successiva, anche se ci vogliono 2-3 giorni perché il livello si stabilizzi; quando poi si riprende a fornire una razione esente da AF, i livelli di AFM₁ nel latte diminuiscono dalla mungitura successiva, azzerandosi in 2-3 giorni.

Esistono degli interventi pratici finalizzati a ridurre la possibilità di inquinamento da micotossine che ci è sembrato interessante riportare e che possono essere così riassunti:

- *monitorare il latte*
ogni 15 giorni (e a ogni modifica della razione) è necessario verificare il livello di AFM₁ nel latte presso un laboratorio di fiducia, va tenuto presente che l'AFM₁ nel latte è la valutazione più attendibile del livello di AFB₁ nella razione.
- *monitorare le componenti della razione*
le operazioni di monitoraggio della razione vanno indirizzate soprattutto e almeno inizialmente verso il trinciato integrale di mais e il pastone, e verso la granella di mais e i suoi derivati integrali.

Per quanto riguarda il monitoraggio va innanzitutto tenuto presente che:

- i risultati delle analisi sono validi solo se si effettua un campionamento corretto e rappresentativo dell'alimento; inoltre, se durante il periodo di tempo che intercorre tra il prelievo e l'analisi, l'umidità del prodotto non è stabilizzata, i campioni vanno tenuti surgelati;
- i risultati di una sola analisi devono essere confrontati con quelli ottenuti in condizioni simili nella zona, al fine di ridurre gli errori di interpretazione o le conseguenze di un prelievo errato o, sebbene siano rari, gli errori in fase di analisi (falsi positivi o negativi);
- nell'insilato a maturazione cerosa le alterazioni dovute alla presenza di muffe tossigene produttrici di Aflatossine non si vedono, pertanto non bisogna fidarsi delle apparenze.

Nel caso sia stata accertata la presenza di Aflatossine negli alimenti aziendali o sia stato riscontrato un elevato numero di casi positivi nei trinciati o nei pastoni della zona di monitoraggio è necessario:

- a) eliminare tutte le parti dell'alimento che presentano deterioramento aerobico perché proprio lì è più probabile la presenza di elevate concentrazioni di Aflatossine;
- b) scartare le porzioni di alimento meno compattate durante il caricamento, anche in assenza di alterazioni aerobiche riconoscibili. Per gli insilati in trincea queste porzioni sono costituite dalle parti superiori prossime alle spallette e per gli insilati in cumuli da tutta la parte superiore del «cappello»;
- c) aumentare la profondità di avanzamento del fronte del trinciato: oltre 10 o 20 cm rispettivamente in inverno o quando la temperatura massima giornaliera supera i 15°C;
- d) scoprire l'insilato sollevando il telo il meno possibile avendo cura di ricoprire il fronte con il telo stesso in caso di piogge intense;
- e) destinare agli animali gli insilati ottenuti da trinciature tardive (settembre) e ai capi meno sensibili quelli ottenuti con trinciature precoci (agosto). Questo perché il contenuto di

micotossine accumulato dall'alimento in campo e nelle prime fasi dell'insilamento è maggiore con maturazioni della pianta e formazione del silo avvenute in condizioni di elevate temperature;

- f) distribuire propionato (0,03-0,04%) nella porzione superiore della trincea, soprattutto qualora il prodotto insilato presenti oltre il 35% di s.s. (sostanza secca) per ovviare alle difficoltà di compattazione.

Nel caso di accertata presenza di Aflatossine nel campione o di elevata positività di campioni provenienti da aree con condizioni di coltivazione simili è necessario:

- scartare le partite di granella con alterazioni scure visibili che coinvolgano più dell'1% dei chicchi (oltre il 90% delle tossine prodotte da *Aspergillus flavus* si concentrano in essi);
- valutare con attenzione le partite con percentuali di granella rotta elevate;
- eseguire la vagliatura e la spazzolatura della granella (in questo modo si allontanano le parti che contengono la quasi totalità della AFB₁);
- mantenere la partita a temperatura inferiore a 15°C;
- evitare che nel luogo di essiccazione (silo e capannone) si formino punti a elevata umidità per stillicidio, frequenti in vicinanza delle aperture;
- trattare l'alimento contro gli insetti con prodotti specifici;
- controllare con attenzione lo stato di pulizia dei locali e dei silos in cui vengono stoccate le materie prime utilizzate nella razione. Eseguire una pulizia accurata e se necessario effettuare delle fumigazioni degli ambienti e dei silos.

Se l'AFM₁ nel latte supera i 0,05 µg/kg bisogna togliere l'alimento contaminante dalla razione, ricorrendo a un esperto in alimentazione per sostituirla. Per garantire la corretta alimentazione è necessario riformulare la razione e non sostituire semplicemente il mais con un'altra materia prima.

Dopo 2-3 giorni dall'eliminazione va ricontrollata l'AFM₁ nel latte: se il livello è sceso a valori di sicurezza il problema è risolto, altrimenti bisogna controllare gli altri componenti della razione.

Se il livello di AFM₁ nel latte non è troppo oltre i 0,05 µg/kg può essere opportuno utilizzare dei sequestranti di Aflatossine, miscelandoli con l'alimento contaminato. La miscelazione dei sequestranti deve essere molto accurata perché la loro efficacia è direttamente collegata alla possibilità di contatto tra la tossina e il sequestrante. Attenzione: l'aggiunta di sequestranti nel carro miscelatore non è efficace.

Bibliografia

1. Council for Agricultural Science and Technology. *Mycotoxin: economic and health risks*. Ames, IA: CAST; 1989. (Task force report 116)
2. Whitlow LW, Hagler WM Jr. Mycotoxin contamination. In: Van Horn HH, Wilcox CJ (Ed.). *Large dairy herd management*. Champaign, IL: American Dairy Science Association; 1992. p.585.
3. Coulomb RA. Jr. Biological action of mycotoxins. *Journal of Dairy Science* 1993;76:880-91.
4. Guthrie L.D. Effects of aflatoxin in corn on production and reproduction in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 1979;62 (1):134-5.
5. Bodine AB, Mertens DR. Toxicology, metabolism, and physiological effects of aflatoxins in the bovine. In: Diener UL, Asquith RL, Dickens JW (Ed.). *Aflatoxin and Aspergillus flavus in corn*. Auburn, Ala.: Department of Research Information, Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, 1983. p. 46-58.

6. AOAC *Official Methods of Analysis Association. Official Analysis chemical*. 16th ed., rev. 4. Washington DC: AOAC; 1998
7. Bhandari SK, Ominski KH, Wittenberg KM, Plaizier JC. Effect of choplength of alfalfa and corn silage on milk production and rumen fermentation of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2007;90(59),2355-66,
8. Campanile G, De Filippo C, Di Palo R, Taccone W, Zicarelli L. Influence of dietary protein on urea levels in blood and milk of buffalo cows. *Livestock Production Science* 1998;55:135-43.