

## APPROCCIO PRATICO ALLA GESTIONE DELLE MICOTOSSINE NELL'ALIMENTAZIONE DEL SUINO

FABRIZIO CONTE<sup>1</sup>, GIUSEPPE BARICCO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Medico Veterinario, Responsabile Tecnico FA.MA.VIT, Pompiano (BS) (conte@famavit.it)

<sup>2</sup>Medico Veterinario Libero Professionista, Torino (giuseppe@baricco.it)

Vengono definite “*Micotossine*” le sostanze con effetto tossico, sia per gli animali che per l'uomo, prodotte da alcune specie di funghi i quali possono colonizzare sia i raccolti vegetali in campo sia, dopo la raccolta, i prodotti alimentari in magazzino.

Si conoscono più di 300 micotossine ma, ad oggi, solo una trentina sono riconosciute come tossiche. Queste si sviluppano, in determinate condizioni di temperatura e umidità, sui cereali, sui semi di leguminose e sui relativi prodotti e sottoprodotti e derivano per lo più dal metabolismo secondario di funghi del genere *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*.

Alcuni di questi funghi, in particolare quelli appartenenti al genere *Fusarium*, possono parassitare i cereali dal momento della semina al momento del raccolto in pieno campo, mentre i miceti appartenenti ai generi *Penicillium* e *Aspergillus* possono svilupparsi e produrre micotossine per lo più dal momento della raccolta fino all'immagazzinamento e stoccaggio dei cereali e anche dei mangimi finiti.

Questi differenti momenti di moltiplicazione dei miceti ci possono aiutare a mettere in atto le migliori forme di prevenzione: infatti se la presenza visibile di prodotti ammuffiti è sempre un indice del deterioramento della qualità dei cereali e di possibile presenza di micotossine, l'assenza visibile di muffe non ne garantisce la mancanza perché purtroppo le micotossine sono invisibili.



Foto 1: Grani contaminati  
In questo caso la presenza di micotossine è altamente **PROBABILE**



Foto 2: Grani sani  
In questo caso la presenza di micotossine è **POSSIBILE**

Nella tabella che segue si riportano i principali contaminanti delle materie prime utilizzate nell'alimentazione del suino con le rispettive classi di micotossine prodotte.

**Tabella 1. CONTAMINAZIONI**

| <b>Genere Fusarium</b>   | Micotossine  | Alimenti contaminati                            |
|--|--|---|
| <i>F. Graminearum</i> ,<br><i>F. Culmorum</i> , <i>F. Poae</i> ,<br><i>F. Sporotrichioides</i> , | <u>Tricoteceni</u> :<br>deossinivalenolo(DON),<br>nivalenolo(NIV),<br>diacetossiscirpenolo(DAS),<br>tossina T-2, HT-2<br>Zearalenone | Mais , frumento<br>e altri cereali              |
| <i>F. Moniliforme</i> ,<br><i>F. Proliferatum</i>  | <u>Fumonisine</u>  | Mais  |
| <b>Genere Penicillium</b>  |  |   |
| <i>P. Verrucosum</i>   | Ocratossina A  | Orzo, mais, frumento<br>e altri cereali         |
| <b>Genere Aspergillus</b>  |  |   |
| <i>A. Flavus</i>   | Aflatossina B1 e B2  | Mais, altri cereali,<br>semi di soia e arachidi |
| <i>A. Parasiticus</i>  | Aflatossina B1, B2, G1, G2   |   |
| <i>A. Ochraceus</i>  | Ocratossina,<br>citrinina,<br>acido penicillico  | Orzo, mais, frumento                            |

I danni derivati dalle micotossine dipendono in gran parte dalla quantità assunta e dalla tossicità delle singole molecole, ed esistono studi che indicano, a seconda delle varie specie animali, le dosi tossiche per ciascuna micotossina.

Nella pratica però bisogna tenere ben presente che i danni, soprattutto sul suino, possono essere amplificati dall'associazione contemporanea di differenti tossine che possono essere presenti in un alimento anche in quantità inferiori alla dose tossica.

Le micotossine a volte non vengono rilevate analiticamente perché risultano “mascherate” da legami di tipo glucosidico che derivano dall'attività metabolica delle piante infettate, ma non per questo perdono il loro potenziale dannoso; infatti, una volta ingerite, questi legami vengono “rotti” liberando nel lume gastro-intestinale la tossina che è così in grado di tornare a esprimere la sua tossicità originaria.

Anche per questi motivi capita a volte di vedere animali con sintomatologie riferibili a micotossicosi e nello stesso tempo avere le analisi degli alimenti negative.

Le principali micotossine che interessano l'allevamento del suino sono: Aflatossine, Ocratossine, Tricoteceni, Fumonisine, e Zearalenone e i limiti di contaminazione sono regolamentati da: Decreti (Legge e Ministeriale) che sono norme dello Stato, per quanto riguarda le Aflatossine e Ocratossine; mentre Zearalenone, Fumonisine e Tricoteceni sono regolate da Raccomandazioni della Comunità Europea.

Entrambe (DD. e Racc.) stabiliscono i limiti di micotossine che devono essere rispettati, quindi sono apparentemente equivalenti.

La loro differenza pratica sta nelle azioni obbligatorie (controlli ufficiali) e nelle conseguenze

(sanzioni) che vengono messe in opera in caso di irregolarità; infatti la violazione di una norma di legge comporta l'attivazione di controlli ufficiali che si esplicano secondo quanto previsto dalla legge stessa (n° campioni, modalità di prelievo, modalità di analisi, ecc..) e, se confermata, dall'applicazione di sanzioni.

La violazione della Raccomandazione C.E. che disciplina le contaminazioni da micotossine NON prevede l'applicazione di sanzioni, ma siccome potrebbe mettere a rischio la salute animale e/o umana (direttamente o tramite i prodotti derivati) stabilisce che i prodotti contaminati oltre le soglie stabilite NON possano essere messi in commercio.

Le Raccomandazioni sono dei **Valori Guida** indicati dal legislatore europeo che riguardano i livelli massimi di micotossine di cui gli operatori del settore devono tenere conto nella preparazione dei mangimi; esse testimoniano l'attenzione dedicata dalla C.E. sia nei confronti della sicurezza alimentare che del benessere animale e per questo viene richiesta l'attiva collaborazione di tutti gli operatori della filiera.

**Tabella 2. AFLATOSSINA B1** (estratto da Decreto Legge n° 149 del 10/05/2004)

| <b>Tipologia di alimento</b>   | <b>Valore massimo di AFLATOSSINA B1 µg/kg oppure ppb</b> |
|--|--|
| Tutte le materie prime per mangimi   | 20   |
| Mangimi completi e complementari per <b>suini</b> e pollame (escluso animali giovani)            | <b>20</b>  |
| Mangimi completi e complementari per bovini, ovini e caprini(esclusi animali giovani e da latte) | 20   |
| Mangimi completi per vitelli e agnelli   | 10   |
| Altri mangimi completi   | 10   |
| Mangimi completi e complementari per animali da latte  | 5  |
| Altri mangimi complementari  | 5  |

Nella Tabella 2 sono riportati i valori massimi di Aflatossina B1 ammessi nelle materie prime e nei mangimi per le diverse specie animali. Si può notare che nella specie suina sono consentiti valori elevati di questa micotossina (20 ppb) e ciò sta a indicare come questo animale sia considerato meno sensibile.

Per quello che riguarda invece tutte le altre micotossine i valori massimi consentiti per il suino sono di gran lunga inferiori rispetto a quelli ammessi nelle altre specie animali. (Tabella 3 e 4)

**Tabella 3. OCRATOSSINA A** (estratto da Decreto Min. Sal. del 15/05/2006)

| Tipologia di alimento  | Valore massimo in OCRATOSSINA A<br>mg/kg oppure ppm |
|--|---|
| Cereali e prodotti derivati dai cereali*   | <b>0,25</b>   |
| Mangimi completi e complementari <ul style="list-style-type: none"> <li>• Polli</li> <li>• <b>Suini</b></li> </ul> | 0,10<br><b>0,05</b>                                 |

Si ritiene utile sottolineare che il Decreto non prevede limiti per l'ocratossina A nei mangimi composti destinati a specie differenti da quelle menzionate.

**Tabella 4. Livelli di micotossine raccomandati** (estratto da Racc.C.E. n° 576/2006)

| MICOTOSSINA             | PRODOTTI DESTINATI ALL'ALIMENTAZIONE<br>DEGLI ANIMALI  | Valori di<br>riferimento<br>mg/kg (ppm) di<br>mangime con<br>umidità al 12% |
|-------------------------|--|---|
| <b>Deossinivalenolo</b> | Materie prime per mangimi <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cereali e prodotti a base di cereali</li> <li>• (escluso sottoprodotti del granoturco)*</li> <li>• Sottoprodotti del granoturco*</li> </ul>   | 8<br>12   |
|                         | Mangimi complementari e completi, ad eccezione di Mangimi complementari e completi per vitelli (< 4 mesi) agnelli e capretti   | 5<br>2  |
|                         | Mangimi complementari e completi per <b>suini</b>  | <b>0,9</b>  |
|                         |  |   |
| <b>Zearalenone</b>      | Materie prime per mangimi <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cereali e prodotti a base di cereali (escluso sottoprodotti del granoturco)*</li> <li>• Sottoprodotti del granoturco*</li> </ul>  | 2<br>3  |
|                         | Mangimi complementari e completi per Vitelli, bovini da latte, ovini, caprini <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Scrofe e suini all'ingrasso</b></li> <li>• <b>Suinetti e scrofette</b></li> </ul>  | 0,5<br><b>0,25</b><br><b>0,1</b>  |
|                         |  |   |
| <b>Fumonisina B1+B2</b> | Materie prime per mangimi: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Granoturco e prodotti derivati*</li> </ul>   | 60  |
|                         | Mangimi complementari e completi per: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Suini</b> ed equini (<i>Equidi</i>), conigli e animali da compagnia</li> <li>• Pesci</li> <li>• Pollame, vitelli (&lt;4 mesi), agnelli e capretti</li> <li>• Ruminanti adulti (&gt;4 mesi) e visoni</li> </ul> | <b>5</b><br>10<br>20<br>50  |

Nelle Tabelle 3 e 4 si deve notare che i *cereali e prodotti derivati dai cereali*, e i *sottoprodotti e derivati del granoturco* appaiono sempre contrassegnati da un asterisco al quale corrisponde la seguente nota:

\* “Nel caso dei cereali e prodotti a base di cereali somministrati direttamente agli animali occorre prestare particolare attenzione a che il loro utilizzo nella razione giornaliera non comporti un’esposizione degli animali a tali micotossine superiore a quella che comporterebbe una razione giornaliera composta esclusivamente da mangimi completi”.

Questa nota ha implicazioni notevoli perché in sostanza limita a percentuali ben precise nella razione giornaliera o nel mangime completo, l’inclusione del granoturco (o dei cereali per l’ocratossina A) e dei suoi derivati eventualmente contaminati.

Per quanto riguarda l’Ocratossina A la percentuale impiegabile, per cereali e derivati dei cereali contaminati, il valore massimo di tossina è del 20%; per la Fumonisin B1+B2 la quantità massima impiegabile di granoturco e prodotti derivati è del 8,33%; per il Diossinivalenolo è l’ 11,25% per i cereali e prodotti a base di cereali, e si riduce al 7,5% per i soli sottoprodotti del granoturco.

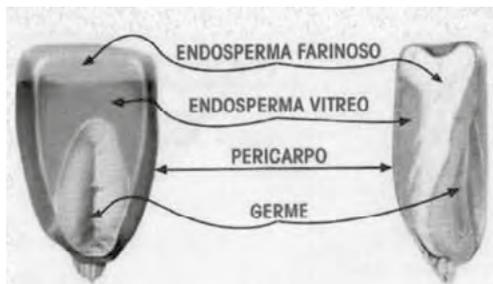
Più complesso è l’utilizzo di cereali eventualmente contaminati da Zearalenone. La normativa prevede in questo caso una differenza per i diversi momenti di crescita del suino: per cereali e prodotti a base di cereali (escluso i sottoprodotti del granoturco) non si può superare l’impiego del 5 % nei mangimi per i suinetti e scrofette, e del 12,5 % per scrofe e suini all’ingrasso.

Per quello che riguarda i sottoprodotti del granoturco sempre contaminati al valore massimo, non si può superare il 3,33 % di impiego per i suinetti e scrofette e l’ 8,33 % per scrofe e suini all’ingrasso.

Per comprendere meglio il perché di questi differenti valori di micotossine tra cereale e sottoprodotti/derivati nelle diverse normative, dobbiamo prendere in esame quello che avviene durante il processo di molitura dei cereali: di norma all’arrivo del cereale nel mulino (es.mais), si ha la prima fase di pulitura che consiste nella separazione della granella dalle polveri ed eventuali corpi estranei, poi, a seconda delle tipologie di produzione, la granella può venire decorticata e degerminata, in questo caso il germe di mais è destinato all’industria olearia per l’estrazione dell’olio.

La parte rimanente viene di solito “macinata” in maniera più o meno grossolana e vagliata per la preparazione di Grits, che è formato da spezzato degerminato grosso, medio o fine, e parti fini quali farine bramate, fioretto, fumetto e farinette.

Queste differenti fasi di lavorazione coinvolgono porzioni diverse della cariosside di mais: la decorticazione toglie il pericarpo (crusca), la degerminazione separa il germe, mentre gli spezzati grossi, medi, fini e il fioretto derivano dall’endosperma vitreo della cariosside, l’endosperma farinoso dà origine al fumetto, mentre parti fini (farinose e vitree) e pericarpo miscelate insieme danno origine alla farinetta.



**Figura 1.** Da Costa e Coll. 2006, parzialmente modificato

Da studi compiuti da Costa e Coll. (2006) si è visto che la ripartizione delle Fumonisine nella cariosside di mais è molto varia trovandosi nel pericarpo per il 49-55%, nell'endosperma farinoso il 28-31%, nell'endosperma vitreo il 7-17%, e infine nel germe solo il 4-6%.

Nei prodotti derivati si assiste ad una diversa ripartizione delle Fumonisine che sarà minore nei prodotti di origine vitrea, per cui negli spezzati e fioretto si trovano tracce di Fumonisine ridotte al 10-30% rispetto ai valori iniziali della granella intera.

Nei prodotti di origine farinosa la concentrazione sarà media, infatti nel fumetto si riduce al 30-60% rispetto alla granella, mentre sarà maggiore nei prodotti contenenti il pericarpo per cui nelle farinette aumenta fino al 200% rispetto alla granella.

Anche nei sottoprodotti del granturco quali la semola di mais ( detta anche farina glutinata o corn gluten feed che sono sottoprodotti delle amiderie) , il pannello di mais o la farina di estrazione di germe di mais ( sottoprodotto degli oleifici), e i distillers-DDGS- (sottoprodotto industriale della filiera dell'etanolo) si assiste ad una concentrazione delle micotossine già presenti nel cereale di partenza.

E' evidente quindi che: ***tutti i processi di lavorazione industriale dei cereali provocano una concentrazione delle micotossine già presenti nel cereale di partenza.***

Che cosa possiamo fare per contrastare le diverse micotossine presenti nelle materie prime?

Le azioni da intraprendere nei loro confronti sono le seguenti:

- Prevenzione
- Decontaminazione-Detossificazione
- Adsorbimento
- Biotrasformazione
- Bioprotezione

## **PREVENZIONE**

La prevenzione consiste principalmente nel "prevenire" la contaminazione da funghi e la possibile conseguente produzione e sviluppo di micotossine, riducendo al minimo i cosiddetti "fattori di rischio".

Le azioni di prevenzione possono ridurre e contenere il problema delle micotossine, ma non ne eliminano il rischio.

L'obiettivo sarà quindi quello di ridurre al minimo la formazione di tali tossine attraverso buone pratiche di lavorazione.

È importante che i produttori prendano atto del fatto che le buone pratiche agricole (BPA) rappresentano la prima linea di difesa contro la contaminazione dei cereali, seguite dall'attuazione di buone pratiche di fabbricazione (BPF) durante la manipolazione, lo stoccaggio, la trasformazione e la distribuzione dei cereali destinati all'alimentazione umana e animale. (Raccomandazioni della CE 2006/583)

D'altra parte la contaminazione dei cereali può essere causata da una molteplicità di fattori e le buone pratiche, per quanto accurate, non consentono di controllare tutti questi fattori come ad esempio le condizioni climatiche.

La prevenzione può essere quindi attuata in 3 momenti distinti quali:

- la produzione delle materie prime, attraverso le Buone Pratiche Agricole (BPA)
- la lavorazione delle materie prime, attraverso le Buone Pratiche di Fabbricazione (BPF)
- la produzione dei mangimi attraverso le Buone Pratiche di Produzione (BPP)

Con le **BPA** si cerca di ridurre al minimo il rischio di contaminazione della pianta in campo attraverso:

**Rotazione dei raccolti:** utilizzare colture diverse dalle graminacee, che non ospitano *Fusarium*, come ad esempio barbabietole, erba medica, ortaggi, ecc..è un modo per ridurre anche il possibile “inoculo da campo”, cioè quella contaminazione delle piante nuove dovuta ad un inquinamento fungino “lasciato” dalle piante vecchie infettate.

**Metodologia di lavorazione in campo:** ogni operazione finalizzata all’eliminazione, alla distruzione o all’interramento dei residui infestanti dei raccolti , quale l’aratura, consentirà di ridurre l’inoculo da *Fusarium* nel raccolto successivo.

**Riduzione dello “stress dei vegetali”:** occorre scegliere gli ibridi o le varietà più adatte alla natura del suolo, alle condizioni climatiche e alle pratiche agricole correnti. Va individuato il miglior periodo di semina infatti la semina del mais a maggio è più rischiosa, per il possibile sviluppo di ZEA, FB1, FB2 , della semina a marzo/aprile.

Bisogna per quanto possibile, evitare lo stress delle piante:i fattori di stress sono diversi e tra questi la siccità, il freddo, la densità di semina elevata (> di 7,5/pt/m2 aumenta il rischio di crescita fungina), le carenze nutritive e le reazioni indesiderabili alle sostanze utilizzate nelle coltivazioni.

L’irrigazione è un metodo efficace per ridurre lo stress, così come un apporto nutritivo ottimale è essenziale per evitare l’indebolimento della pianta favorendo quindi un’infezione da *Fusarium*.

Bisogna cercare di ridurre l’allettamento e va assicurato un apporto di sostanze nutritive specifiche per l’area coltivata e per il tipo di specie vegetale.

La quantità corretta di N per ettaro di terreno è di circa 200 kg./ha, quindi bisogna tenere presente che le carenze di N possono favorire lo sviluppo di Fumonisine, mentre gli eccessi di N possono favorire lo sviluppo di ZEA, DON, Ocratossine.

I metodi di lotta contro gli insetti (difesa dalla Piralide) non sembrano, in genere, aver effetto sulla fusariosi. Tuttavia, la lotta contro gli insetti presenti sul granturco può ridurre l’incidenza della marcescenza da *Fusarium* e il conseguente tenore di fumonisine nel granturco.

**Raccolta tempestiva dei cereali (es.mais):** dal momento della maturazione fisiologica il cereale deve rimanere in campo il meno possibile: infatti la raccolta risulta essere una delle fasi dove è possibile intervenire maggiormente per il controllo delle micotossine. La formazione di questi metaboliti avviene a partire dalla fase di maturazione cerosa della granella e la produzione di Aflatossine è favorita, in campo, da temperature elevate (massima giornaliera superiore a 30°C) e dall’umidità.

Con le **BPF** si cerca di prevenire possibili produzioni di micotossine riducendo le condizioni che favoriscono lo sviluppo dei funghi attraverso:

**Metodi di raccolta appropriati e pulitura delle granaglie:** per quanto possibile bisogna evitare di causare danni meccanici alle granaglie, e evitare il contatto con il terreno durante le operazioni di raccolta.

I chicchi striminziti, di piccole dimensioni, possono contenere una maggiore quantità di micotossine dei chicchi sani, di taglia normale, quindi è possibile ridurre il rischio da micotossine eliminando tali chicchi con una regolazione corretta della mietitrebbia dopo il raccolto, al fine di eliminare i chicchi danneggiati e altre materie estranee. Alcuni metodi di pulitura, come la setacciatura meccanica, consentono di eliminare chicchi contaminati.

**Attenzione ai livelli di umidità delle granaglie:** una sensibile riduzione del rischio Aflatossine può essere perseguita raccogliendo la granella con umidità non inferiore al 22%, come peraltro evidenziato dalle esperienze e dai risultati della ricerca e sperimentazione degli

ultimi anni. Si evidenzia che valori di umidità inferiori al 20% sono considerati ad elevato rischio in quanto possono favorire l'accumulo delle aflatossine, soprattutto in annate con andamento stagionale caldo e asciutto. Le partite di mais così raccolte dovrebbero essere separate e stoccate a parte. Effettuare una raccolta anticipata consente anche di ridurre la contaminazione da Fumonisine.

**Essiccazione:** il tenore di umidità della coltura va determinato durante il raccolto o immediatamente dopo.

I campioni prelevati a tal fine dovranno essere quanto più rappresentativi possibile.

Il raccolto va essiccato al più presto (24-48 h) per raggiungere il tasso di umidità raccomandato per l'immagazzinamento in modo omogeneo. La temperatura di esercizio dell'impianto di essiccazione è di 90°C (+/- 20°C) e varia a seconda dell'umidità del prodotto da essiccare e delle condizioni ambientali esterne;

la granella umida va sempre areata prima dell'essiccazione per evitarne il surriscaldamento, inoltre non vanno mescolate partite di cereali che presentano rischi di contaminazione differenti.

**Conservazione:** dove è possibile, le granaglie vanno aerate per mantenere una temperatura adatta e uniforme in tutta la massa. Il tasso di umidità e la temperatura dei cereali vanno controllati regolarmente durante il magazzinaggio. La formazione di odori può significare che le granaglie si stanno riscaldando troppo, soprattutto se immagazzinate in luogo chiuso. Durante la conservazione la temperatura dei cereali immagazzinati va rilevata ripetutamente a intervalli stabiliti. Un innalzamento della temperatura può indicare una proliferazione microbica e/o un'infestazione da organismi nocivi. Le parti visibilmente infette vanno separate e vanno prelevati campioni da sottoporre ad analisi. In seguito, occorre abbassare la temperatura dei cereali immagazzinati e aerarli frequentemente.

Con le **BPP** si cerca di ridurre al minimo i rischi di contaminazione e sviluppo delle micotossine nei mangimi, sia negli impianti di produzione, sia negli allevamenti

Per quello che riguarda gli IMPIANTI di PRODUZIONE AZIENDALE bisogna:

- Evitare acquisti e utilizzo di materie prime a rischio verificando la provenienza delle merce (tracciabilità)
- Eseguire campionamenti prima di accettare la merce
- Controllare umidità e presenza di insetti che sono i fattori che aumentano il rischio di sviluppo delle micotossine
- Pulire i silos di stoccaggio possibilmente con l'utilizzo di prodotti fumiganti
- Svuotare e pulire periodicamente i diversi punti di passaggio delle materie prime nell'impianto
- Aerare i silos per evitare il surriscaldamento delle materie prime soprattutto in estate
- Utilizzare automezzi per il trasporto del mangime nei diversi siti produttivi che siano in buone condizioni e facili da pulire

Per gli ALLEVAMENTI bisogna:

- Eseguire campioni in contraddittorio al momento del ricevimento della merce
- Pulire periodicamente i silos e/o le aree di stoccaggio della merce (porticati, magazzini) soprattutto in primavera
- Aprire i coperchi dei silos di stoccaggio durante la notte nei mesi estivi per ridurre l'umidità causata dalla condensa che si accumula sulle pareti nelle ore più calde della giornata e che provoca il fenomeno dell' "*impaccamento del mangime*"

- Evitare durante i periodi caldo/umidi di ritirare scorte che durano parecchie settimane (partite voluminose di mangime)
- Evitare di conservare i mangimi finiti (sacchi) all'interno dei locali dell'allevamento
- Mantenere pulite le mangiatoie e i truogoli

Per quanto riguarda i campionamenti bisogna prima di tutto ricordare che: **le micotossine sono distribuite in modo eterogeneo nella materia prima** quindi il prelievo di un *campione rappresentativo* da una partita o da un lotto è molto importante e richiede attenzione perché procedure errate possono influire negativamente sull'attendibilità dei risultati.

Per convenzione i campionamenti si dividono in:

CAMPIONAMENTO STATICO: composto da prelievi effettuati in punti diversi su una massa immobile.

CAMPIONAMENTO DINAMICO: composto da prelievi effettuati in tempi diversi su una massa in movimento.

La seconda modalità di prelievo è considerata più attendibile per la minore variabilità dei risultati di analisi.

#### **In quale occasione dobbiamo richiedere controlli per micotossine:**

- Se l'alimento somministrato ha muffe evidenti oppure quando l'alimento è troppo umido o comunque è stato conservato in situazioni che possono aumentare il rischio di sviluppo di funghi e muffe.
- Se si osservano cali importanti nelle produzioni e/o cambiamenti nello stato di salute della maggior parte degli animali non giustificati da problematiche di ordine sanitario
- Quando i sintomi degli animali e i cali di produzione rientrano nei segni tipici degli effetti delle micotossine

#### **Cosa controllare quando si ha il sospetto di una intossicazione da micotossine:**

- Prelevare campioni dei singoli ingredienti sospetti di contaminazione
- Prelevare campioni dalla razione completa

La normativa comunitaria stabilisce con il Regolamento C.E. n°401/2006, i metodi di campionamento e analisi per il controllo ufficiale dei livelli di micotossine nei prodotti alimentari (cereali o semi oleosi presenti nei magazzini dei diversi fornitori). Anche i mangimi (semplici e/o composti) possono essere sottoposti a controlli ufficiali e le metodiche di campionamento e analisi sono state recentemente riviste con il Regolamento C.E. n° 152/2009 del 27 gennaio 2009.

### **DECONTAMINAZIONE-DETOSSIFICAZIONE**

Nel 2002, in seguito alla Direttiva CE 32/2002 che riguardava le sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali (le micotossine appartengono a questa categoria), l'Autorità Europea decise di vietare la "diluizione" delle materie prime contenenti sostanze indesiderabili oltre i valori massimi ammessi, con altre materie prime non contaminate e/o con mangimi destinati all'alimentazione.

Al tempo stesso si decise di consentire la detossificazione dei prodotti contaminati a patto che tale processo soddisfacesse i criteri di accettabilità, da definirsi a livello Europeo (articolo 8 della Direttiva).

Solo dopo alcuni anni i Servizi della Commissione Europea hanno proposto i seguenti criteri di accettabilità:

- 1) Nel caso di trattamento Fisico bisogna fornire le seguenti informazioni e/o garanzie:
  - Efficienza del trattamento fisico di Decontaminazione/Detossificazione per ridurre in maniera sufficiente la contaminazione della partita di mangime
  - Garanzie di un corretto smaltimento della parte rimossa della partita.
  
- 2) Nel caso di trattamento Chimico bisogna fornire le seguenti informazioni e/o garanzie:
  - Dimostrare che la sostanza chimica usata per la detossificazione, non causi residui nocivi nell'alimento detossificato sottoforma di composto o di metabolita della sostanza chimica
  - Dimostrare che i metaboliti del contaminante, dopo il processo di detossificazione, non mettono in pericolo la salute animale pubblica e dell'ambiente
  - Dimostrare che il processo di detossificazione è irreversibile
  - Garantire che le caratteristiche del mangime non sono modificate significativamente dal trattamento di detossificazione

Si è dovuto attendere il Regolamento C.E. n° 767/2009 del 13 luglio 2009 (entrerà in vigore il 1 settembre 2010) perché le materie prime per mangimi contaminate da micotossine potessero essere destinate a impianti riconosciuti per la detossificazione, a patto che sull'etichettatura venissero riportate le seguenti indicazioni:

- «mangimi contenenti livelli eccessivi di... da usarsi a fini di alimentazione animale unicamente previa detossificazione in stabilimenti riconosciuti»
- «mangimi contenenti livelli eccessivi di... da usarsi a fini di alimentazione animale unicamente previa adeguata purificazione»

Sostanzialmente la decontaminazione/detossificazione consiste nel sottoporre le diverse materie prime contaminate a trattamenti fisici e/o chimici per ridurre il livello di tossine presenti.

I principali trattamenti fisici consistono nel:

- Lavare, sbucciare, pulire l'ingrediente contaminato
- Separare tramite ventilatori e/o setacci i semi contaminati
- Separare per densità (galleggiamento)
- Trattare con calore (autoclave, forno, microonde)
- Irradiare con UV

I trattamenti fisici hanno un'applicazione limitata perché danno **risultati incerti**, producono **perdite di sostanze nutrienti** e sono **costosi**.

I principali trattamenti chimici prevedono l'impiego di prodotti quali:

- Gas di cloro
- Ammoniaca
- Perossido di idrogeno
- Idrossido di ammonio
- Acido cloridrico
- Bisolfuro di sodio
- Formaldeide
- Idrossido di calcio
- Monometilammina

Tali trattamenti hanno scarsa applicazione perché possono produrre **sottoprodotti con tossicità** anche superiore al prodotto di partenza, **influenzano negativamente il valore nutritivo, modificano colore e odore dell'alimento** trattato, richiedono **molto tempo** e sono **molto costosi**.

Di fatto tali trattamenti oggi non vengono impiegati nel settore zootecnico.

## ADSORBIMENTO

E' di gran lunga la strategia più praticata, ed anche quella nella quale l'offerta di prodotti sul mercato è più variegata ed articolata. La teoria alla base è che le sostanze contenute nei prodotti "leghino" le micotossine in modo così intenso da evitare o ridurre ogni loro interazione con l'organismo animale, in primo luogo evitandone o riducendone l'assorbimento intestinale. I materiali adsorbenti via via presi in considerazione sono il carbone vegetale, gli alluminosilicati naturali e lavorati industrialmente (i c.d."sintetici"), complessi di carboidrati indigeribili (cellulosa, polisaccaridi estratti dalla parete di lieviti e batteri come i glucomannani ed i peptidoglicani), e polimeri sintetici come la colestiramina ed i derivati del polivinilpirrolidone.

La valutazione delle capacità di fissazione dei diversi prodotti alle differenti micotossine può avvenire con metodi *in vitro* oppure *in vivo* (questi ultimi generalmente misurando le prestazioni degli animali, o considerando parametri biochimici che potrebbero venire influenzati dalla micotossina oggetto della valutazione). In linea generale, la bibliografia non riporta una convincente correlazione tra i risultati di sperimentazioni *in vitro* ed *in vivo*.

In più le metodiche usate e riportate in letteratura, sia *in vivo* che *in vitro*, sono spesso tra loro differenti, per cui anche riconosciuti esperti della materia si sono trovati in difficoltà nell'effettuare delle meta-analisi accettabili sulla massa delle pubblicazioni disponibili.

Recentemente il TNO (Nutrition and Food Research Institute, Zeist, NL) ha messo a punto e validato un sistema di laboratorio per simulare il tratto gastrointestinale dei monogastrici, il quale riproduce una serie di parametri variabili, quali le caratteristiche del pasto, la velocità di transito, il pH gastrico e le secrezioni intestinali, nonché l'assorbimento dei prodotti digeriti (Avantaggiato, 2004). Questo non ha impedito e non impedisce la pubblicazione di articoli scientifici successivi, basati su altri metodi e differenti presupposti, pur rimanendo sulla stessa questione scientifica – nel caso specifico, la capacità di fissazione di diverse sostanze verso le micotossine da *Fusarium* - (Sabater Vilar et al., 2007).

### IL CARBONE VEGETALE

E' un materiale assorbente generale, dotato di un'ampia superficie di scambio, e viene raccomandato anche per il trattamento di numerose tossicosi digestive. Gli effetti misurati nella letteratura sono variabili, con una prevalenza di buoni risultati *in vitro* rispetto a quanto si osserva *in vivo*. Mentre per ciò che riguarda la capacità di fissare le aflatossine il carbone non mostra di avere qualità superiori ai leganti minerali, esso ha mostrato avere una buona affinità sulle micotossine da *Fusarium* sia *in vitro* che nel citato modello gastrointestinale del TNO (Doll et al, 2004; Bueno et al, 2005; Avantaggiato et al, 2005, Sabater Vilar et al., 2007). Elementi di difficoltà nella diffusione del carbone come adsorbente delle micotossine da *Fusarium* sono probabilmente da mettersi in relazione col fatto che le dosi di inclusione necessarie per avere una buona risposta in termini di adsorbimento delle micotossine (tra lo 0,5 e l'1% del mangime) generano un intenso colore nero del mangime stesso, rendendolo poco commerciabile, mentre è possibile che possano interferire con i processi di digestione ed assorbimento dei nutrienti.

### *I SILICATI*

Essi possono essere utilizzati sia in forma naturale (cioè nella forma fisica in cui sono reperibili in natura), generalmente appartenendo alle subclassi dei phyllosilicati e dei tetrasilicati, sia nella forma che talvolta viene definita “sintetica”, termine che in realtà intende descrivere procedimenti industriali variabili, basati sulla idratazione completa del silicato, e sulla sua successiva essiccazione rapida ad altissime temperature. Questo processo, se da un lato consente di effettuare una purificazione della composizione chimica del materiale, dall’altro soprattutto ne incrementa di diversi ordini di grandezza (fino a 100 volte) la porosità e la finezza della microstruttura, aumentando di conseguenza la superficie di scambio. In altro modo questi tipi di silicati vengono definiti con l’acronimo inglese HSCAS (alluminosilicati *idrati* di sodio e di calcio). La differente superficie di scambio giustifica il diverso dosaggio consigliato (inferiore allo 0,5% per i silicati sintetici, dall’1 al 2% per quelli naturali).

Una grande massa di pubblicazioni ed il consolidato uso in avicoltura e nutrizione bovina certificano l’efficacia dei silicati nell’adsorbire l’aflatossina, anche nella molto meno studiata specie suina (Colvin et al., 1989; Harvey et al., 1989; Lindemann et al., 1993), mentre, salvo occasionali riscontri, i silicati non mostrano una particolare efficacia nei confronti delle tossine da *Fusarium* e dell’ocratossina.

Stante quindi il modesto impatto della aflatossina B1 (ai livelli che è storicamente possibile rilevare in Italia) sulla salute del suino, e considerato il suo quasi inesistente ruolo di carry-over di metaboliti della tossina nel piatto dei consumatori, appare di ben difficile giustificazione il riscontro di un amplissimo uso di prodotti a base di silicati per la prevenzione delle micotossicosi in ambito suinicolo.

### *POLIMERI ORGANICI E SINTETICI*

La semplice fibra indigeribile ha mostrato un potenziale nell’adsorbimento delle micotossine ; infatti la fibra purificata di erba medica ha ridotto gli effetti dello zearalenone nel suino (James et al., 1982, Stangroom et al., 1984), così come materiali fibrosi ottenuti dalla parete cellulare di lieviti hanno talvolta mostrato la capacità di legare diverse micotossine (Devegowda et al., 1998).

Di maggiore interesse appaiono però i glucomannani esterificati, polimeri estratti con procedimenti industriali diversi (e proprietari delle diverse Imprese) dalla parete di alcuni ceppi di lievito di birra, standardizzati nella loro composizione, che hanno mostrato attività verso numerose micotossicosi miste nel suino, a dosi variabili tra lo 0,1 e lo 0,2% dei mangimi (Freimund et al., 2003; Swamy et al., 2002).

Rispetto ai silicati, dunque, i glucomannani esterificati mostrano una meno intensa affinità nei confronti della aflatossina, ma apparentemente una maggiore capacità di legare le altre micotossine, in particolare quelle da *Fusarium*.

A favore dei glucomannani esterificati gioca la necessità di basse inclusioni, che quindi limitano *ab origine* possibili perplessità in merito ad interferenze sull’assorbimento dei nutrienti.

La colestiramina è una resina usata per scopi farmaceutici per ottenere la diminuzione del colesterolo. Adsorbe quasi il 100% di Zearalenone dai liquidi gastrici ed intestinali se usata ad una concentrazione superiore all’1%. L’efficacia della colestiramina nei confronti della Fumonisinina è stata confermata dagli esperimenti in vivo con i ratti. (Avantaggiato et al, 2005).

E’ in grado di far diminuire la concentrazione di Ocratossina nel plasma. L’alto costo della colestiramina la rende economicamente proibitiva.

## **BIOTRASFORMAZIONE**

La detossificazione delle micotossine in ambito intestinale può anche avvenire attraverso la loro trasformazione in sostanze prive di attività tossica: tale trasformazione può avvenire grazie ad enzimi esogeni, o a ceppi di batteri o lieviti capaci di metabolizzare le tossine detossificandole.

Le matrici sulle quali sono stati ricercati questi ceppi di lieviti o batteri sono particolarmente il rumine (che è stato selezionato filogeneticamente per agire, oltre che come pre-digestore biodinamico, anche come “filtro” biologico per molte sostanze tossiche, tra cui evidentemente alcune micotossine) e dal terreno, nel quale quasi ogni sostanza subisce, nel tempo, fenomeni irreversibili di biotrasformazione.

La letteratura riporta effetti promettenti su Zearalenone e Ocratossina A da parte di *Trychosporium mycotoxinivorans*, un lievito attivo isolato dalle termiti che produce un enzima specifico con la capacità di detossificare le due micotossine nel tratto intestinale, modificandone in maniera selettiva ed irreversibile la struttura chimica (Politis et al., 2005, Schatzmayr et al., 2006).

Dal fluido ruminale è stato invece isolato *Eubacterium BBSH 797*, il quale sarebbe in grado, in sede intestinale, di detossificare i tricoteceni modificandone la struttura chimica (Awad et al., 2006). Occorre dire che soluzioni di questo tipo, assai selettive e mirate, allo stato delle cose non hanno ancora varcato la soglia della sperimentazione, e non hanno ancora ottenuto, in Europa, la licenza di commercializzazione.

## **BIOPROTEZIONE**

In termini di patologia indotta, le micotossine in generale interferiscono sulla sfera dello status ossidativo e dell'immunosoppressione (spesso mediata essa stessa da un eccesso di ossidazione).

E' quindi possibile che, a fronte di quelle già ricordate situazioni o periodi dell'anno di possibile maggiore incidenza di micotossine negli ingredienti, rispetto alle quali quasi sempre il nutrizionista reagisce inserendo in formula una qualche fonte di sostanze sequestranti, una gestione attenta dei fattori antiossidanti presenti nei mangimi (in particolare Vitamina E, C, e selenio in forma organica) possono contribuire ad alleviare i danni indotti dal consumo di alimenti contaminati (Alpsoy et al., 2009; Dvorska et al., 2007). Occorre tuttavia notare come, quando questo presupposto teorico sia stato verificato in allevamento, i risultati siano stati non sempre soddisfacenti (Harvey et al., 1994).

Sempre in campo di bioprotezione, e con riferimento specifico alla ocratossina, alcuni ricercatori tedeschi hanno compreso come una alcalinizzazione di urgenza delle urine dei suini, ottenuta con larghe dosi di sodio bicarbonato (2% nel mangime) favorisce grandemente la rapidità di eliminazione della micotossina attraverso le urine (+ 75 % rispetto al controllo) , proporzionalmente limitandone il potenziale di rischio per gli animali e per l'uomo consumatore dei suoi prodotti (Blank et al., 2004). Una possibile spiegazione di questo fenomeno risiede nella riduzione del riassorbimento renale della tossina in circolo, che verrebbe inibito dalla sua alcalinizzazione.

## **CONCLUSIONE**

Le micotossine rappresentano un pericolo subdolo, ma costante, per la produttività degli allevamenti.

Per questo occorre fronteggiarne i danni nella maniera più efficace possibile, sempre

tenendo in conto il necessario calcolo del rapporto costo/beneficio.

La letteratura pubblicata offre una quantità gigantesca di dati: ad esempio alla voce : “mycotoxins swine” PubMed propone 1015 referenze bibliografiche, a “zearalenone swine” ne propone 181, e così via.

Tuttavia le informazioni riportate non sono facilmente confrontabili tra loro, perchè – come già accennato – le metodiche sperimentali non sono equivalenti, e pertanto il lettore volenteroso ma non specificatamente preparato si trova in grosse difficoltà nella interpretazione di questa massa di dati.

La norma europea aiuta in qualche modo a risolvere alcune problematiche, lasciando spazio all’uso di additivi “sequestranti” solo in caso di prevenzione della contaminazione: non è infatti consentito preparare mangimi con derrate accertatamente contaminate, nemmeno previa loro diluizione.

La scelta di quale strategia utilizzare nei periodi a rischio, dunque, discende dal tipo di micotossina che si attende come più probabile: se è prevalentemente aflatoxina, allora i prodotti a base di silicati saranno ampiamente da preferire. Se invece ci si attende altro che non sia l’aflatoxina (indipendentemente fusariotossine o ocratossina) allora la scelta dovrà essere limitata ai prodotti a base di carbone vegetale (per i quali persiste il beneficio del dubbio sulla loro assorbenza non selettiva alle dosi utili) o a quelli a base di glucomannani esterificati.

Su quale prodotto commerciale scegliere, nell’ambito della variegata offerta (in assenza di realistiche possibilità di verifica di efficacia da parte del singolo formulista) vale la regola di sempre: i prodotti originali, supportati da una base di ricerche pubblicate su riviste indexate, sono quelli che, in linea generale, offrono le maggiori garanzie e richiedono un prezzo maggiore.

I prodotti generici, di solito supportati solo da dati “in house”, in genere hanno un prezzo inferiore, insieme a garanzie inferiori. Questo ovviamente non significa che necessariamente debbano essere peggiori dei prodotti più noti....

Una buona fonte di informazioni sull’argomento è contenuta nei siti:

<http://www.knowmycotoxins.com/>

[http://www.mycotoxins.info/myco\\_info/myco\\_info.html](http://www.mycotoxins.info/myco_info/myco_info.html)

mentre su YouTube c’è addirittura un canale dedicato alle micotossine (in inglese):

<http://www.youtube.com/user/MycotoxinChannel>

E’ inutile ovviamente ricordare che si tratta di strumenti sponsorizzati: sono tuttavia tutti di eccellente livello e fonti di informazioni preziose per chi si occupa di nutrizione degli animali.

## **BIBLIOGRAFIA**

Alpsoy L., Agar G., Ikbal M. (2009). Protective role of vitamins A, C, and E against the genotoxic damage induced by aflatoxin B1 in cultured human lymphocytes. *Toxicol. Ind. Health*. 25(3):183-188.

Avantaggiato G., Havenaar R., and Visconti A. (2004). Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an *in vitro* gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials. *Food and Chem. Toxicol*. 42:817-824.

Avantaggiato G., Solfrizzo M., and Visconti A. (2005). Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. *Food Additives and Contaminants* 22:379-388.

Awad W.A., Böhm J., Razzazi-Fazeli E., Ghareeb K. and Zentek J. (2006). Effect of addition of a probiotic microorganism to broiler diets contaminated with deoxynivalenol on performance and histological alterations of intestinal villi of broiler chickens. *Poult. Sci.* 85(6):974-979.

Blank R., Wolfram S. (2004). Alkalinization of urinary pH accelerates renal excretion of ochratoxin A in pigs. *J. Nutr.* 134(9):2355-2358.

Bueno D.J., Di Marco L., Oliver G. and Bardón A. (2005). *In vitro* binding of zearalenone to different adsorbents. *J. Food Prot.* 68:613-615.

Colvin B.M., Sangster L.T., Hayden K.D., Bequer R.W. and Wilson D.M. (1989). Effect of high affinity aluminosilicate sorbent on prevention of aflatoxicosis in growing pigs. *Vet. Hum. Toxicol.* 31:46-48.

Costa E., Pizzolato G., Vanara F., Reyneri A., Causin R., Pietri A., Brera C. (2006). Campionamento dei molini a mais italiani per la ricerca delle fumonisine nei prodotti della trasformazione industriale.

2° Congresso Nazionale “Le micotossine nella filiera agro-alimentare” Roma 16-18 ottobre 2006  
(comunicazione orale)

Devegowda G.M., Raju V.L.N. and Swamy H.V.L.N. (1998). Mycotoxins: Novel solutions for their counteraction. *Feedstuffs* 70:12-16.

Döll S., Dänicke S. (2004). *In vivo* detoxification of fusarium toxins. *Arch. Anim. Nutr.* 58:419-441.

Döll S., Dänicke S., Valenta H. and Flachowsky G. (2004). *In vitro* studies on the evaluation of mycotoxin detoxifying agents for their efficacy on deoxynivalenol and zearalenone. *Arch. Anim. Nutr.* 58:311-324.

Dvorska J.E., Pappas A.C., Karadas F., Speake B.K. and Surai P.F. (2007). Protective effect of modified glucomannans and organic selenium against antioxidant depletion in the chicken liver due to T-2 toxin-contaminated feed consumption. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 145(4):582-587

Freimund S., Sauter M. and Rys P. (2003). Efficient adsorption of the mycotoxins zearalenone and T-2 toxin on a modified yeast glucan. *J. Environ. Sci. and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes.* 38:243-255

Harvey R.B., Kubena L.F. and Elissalde M.H. (1994). Influence of vitamin E on aflatoxicosis in growing swine. *Am. J. Vet. Res.* 55(4):572-577.

Harvey R.B., Kubena L.F., Phillips T.D., Huff W.E. and Corrier D.E. (1989). Prevention

of aflatoxicosis by addition of hydrated sodium calcium alluminosilicate to the diets of growing barrows. Am. J. Vet. Res. 50:416-420.

James L.J. and Smith T.K. (1982). Effect of dietary alfalfa on zearalenone toxicity and metabolism in rats and swine. J. Anim. Sci. 55:110-118

Lindemann M.D., Blodgett D.J., Kornegay E.T. and Schurig G.G. (1993). Potential ameliorators of aflatoxicosis in weanling/growing swine. J. Anim. Sci. 71:171-178.

Politis I., Fegeros K., Nitsch S., Schatzmayr G. and Kantas D. (2005). Use of Trichosporon mycotoxinivorans to suppress the effects of ochratoxicosis on the immune system of broiler chicks. Br. Poult. Sci. 46(1) 58-65

Sabater Villar M., Malekinejad H., Selman N.H., Van der Doelen M.A. and Fink-Gremmels J. (2007). *In vitro* assessment of adsorbents aiming to prevent deoxyvalenol and zearalenone mycotoxinoses. Mycopathologia 163: 81-90

Schatzmayr G., Zehner F., Täubel M., Schatzmayr D., Klimitsch A., Loibner A.P. and Binder E.M. (2006). Microbiologicals for deactivating mycotoxins. Mol. Nutr. Food Res. 50(6):543-551.

Stangroom K.E. and Smith T.K. (1984). Effect of whole and fractionated dietary alfalfa meal on zearalenone toxicosis in rats and swine. Can. J. Physiol. Pharmacol. 62:1219-1224

Swamy H.V.L.N., Smith T.K., MacDonald E.J., Boermans H.J. and Squires H.J. (2002). Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with Fusarium mycotoxins on swine performance, brain regional neurochemistry, and serum chemistry and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. J. Anim. Sci. 80:3257-3267.

## NORMATIVE

**Direttiva CE n.32/2002 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 7 maggio 2002** relativa a “le sostanze indesiderabili nell’alimentazione degli animali”  
Gazzetta Ufficiale dell’Unione Europea del 30 maggio 2002

**Decreto Legislativo 10 maggio 2004, n.149** “Sostanze e prodotti indesiderabili nell’alimentazione degli animali”  
Gazzetta Ufficiale Repubblica Italiana n.139 del 16 giugno 2004

**Regolamento CE n.401 del 23 febbraio 2006** relativo ai “Metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari”  
Gazzetta Ufficiale dell’Unione Europea del 9 marzo 2006

**Decreto Ministero della Salute del 15 maggio 2006** “Determinazione dei limiti di ocratossina A negli alimenti per animali”  
Gazzetta Ufficiale Repubblica Italiana n. 120 del 25 maggio 2006

**Raccomandazione CE n.576 del 17 agosto 2006** sulla “Presenza di deossinivalenolo,

zearalenone, ocratossina A, tossine T-2 e HT-2 e fumonisine in prodotti destinati all'alimentazione degli animali"

Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea del 23 agosto 2006

**Raccomandazione CE n.583 del 17 agosto 2006** sulla "Prevenzione e riduzione delle *Fusarium*-tossine in cereali e prodotti derivati"

Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea del 29 agosto 2006

**Regolamento CE n.152 del 27 gennaio 2009** che fissa i "Metodi di campionamento e di analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali"

Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea del 26 febbraio 2009

**Regolamento CE n.767 del 13 luglio 2009** su "L'immissione sul mercato e l'uso dei mangimi che modifica il regolamento n.1831/2003 e che abroga le direttive 79/373/CEE del Consiglio, 80/511/CEE della Commissione, 82/471/CEE del Consiglio, 83/228/CEE del Consiglio, 93/74/CEE del Consiglio, 93/113/CE del Consiglio e 96/25/CE del Consiglio e la decisione 2004/217/CE della Commissione"

Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea del 1 settembre 2009