

Recherches préliminaires sur la présence d'aflatoxine B1 dans les fourrages fanés de la province de Reggio Emilia (Italie)

L. Tomasi¹, W. Horn², P. Roncada¹, A. Zaccaroni¹, M. Ligabue³, F. Battini⁴, G.L. Stracciari^{1*}

L'aflatoxine B1 est une micotoxine, produite par *Aspergillus flavus*, qui peut présenter des risques pour la santé des animaux et de l'homme, notamment par l'intermédiaire de la production laitière. Les systèmes basés sur le foin comme dans la zone du Parmesan, présentent-ils des risques particuliers de contamination ?

RÉSUMÉ

Les concentrations en aflatoxine B1 ont été mesurées sur 257 échantillons de fourrages fanés de prairies naturelles et de luzerne prélevés pendant 4 ans. Les enrubannages sont plus souvent contaminés et présentent des taux moyens de micotoxine plus élevés ($3,00 \pm 0,95$ ppb) que les foins de prairies naturelles et de luzerne dont seulement 1,4% des échantillons dépassent 10,0 ppb, le seuil retenu par la législation italienne pour les aliments étant de 50 ppb. Ces résultats confirment que les fourrages fanés ne présentent aucun risque pour la santé des animaux en rapport avec l'aflatoxine B1 et qu'ils ne peuvent être responsables d'éventuelles contaminations du lait par l'aflatoxine M1.

* Travail effectué dans le cadre du programme de recherche de la Région Emilia Romagna et avec la coordination du Centre de Recherche et Production Animaux (C.R.P.A.) de Reggio Emilia.

MOTS CLÉS

Aspergillus flavus, aflatoxine, enrubannage, foin, Italie, production laitière, qualité du lait, qualité des produits.

KEY-WORDS

Aspergillus flavus, aflatoxin, dairying, hay, Italy, milk quality, product quality, wrapping.

AUTEURS

1 : Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Sezione Farmacologia e Tossicologia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bologna.

2 : Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Sezione di Biotecnologie, Bologna.

3 : Centro Ricerche Produzione Animale, Reggio Emilia.

4 : Consorzio Volontario per la Valorizzazione Agricola e Zootecnica dell'Appennino.

CORRESPONDANCE

ZACCARONI A., Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Sezione Farmacologia e Tossicologia, Via Tolara di Sopra 50, I-40064 Ozzano Emilia (BO), Italie.

1. Introduction

■ Les risques présentés par les micotoxines

Les micotoxines sont des métabolites secondaires produits par des espèces fongiques (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*) qui peuvent s'avérer dangereuses : elles présentent une grande toxicité hépatique et rénale, et une action cancérogène pour toutes les espèces animales ainsi que pour l'homme.

En Europe, les infestations les plus importantes sont provoquées par *Aspergillus flavus* qui trouve, à nos latitudes, des conditions ambiantes favorables à sa croissance et à la production d'aflatoxines B1 et B2 (humidité relative élevée et température de 8 à 42°C). Ces toxines sont particulièrement stables, même dans les processus de transformation des aliments, et on peut les trouver longtemps après la mort du mycélium. **Les micotoxines peuvent ainsi atteindre directement l'homme, par les aliments végétaux ou indirectement** par la viande, les oeufs, le lait et ses dérivés, provenant d'animaux nourris d'aliments contaminés (BOTTALICO, 1988).

■ L'aflatoxine B1 et les fourrages conservés

Les aspects de la contamination et de la toxicologie des micotoxines en général et des aflatoxines en particulier ont été présentés par de nombreux auteurs (STOLOFF, 1977 ; POMPA, 1984 ; LAMPE, 1993). L'aflatoxine B1 mérite une attention particulière en raison de ses implications sanitaires, notamment pour les groupes de population humaine à plus haut risque et pour les animaux eux-mêmes (SAAD et ZAKY, 1995). **Cette aflatoxine est présente dans les fourrages destinés aux vaches laitières.** Bien qu'il soient moins sensibles que les autres espèces monogastriques, les bovins présentent une réduction de la production laitière avec anorexie et lésions hépatiques suite à la consommation plus ou moins prolongée de micotoxine (POMPA, 1984).

Compte tenu de la corrélation directe entre le taux d'aflatoxine B1 dans les produits destinés à l'alimentation animale et le niveau d'aflatoxine M1 dans le lait bovin (BLANC et KARLESKIND, 1981 ; Milchwirtschaftlicher Verein Baden-Wurtemberg, 1996), les dispositions législatives italiennes (D.M. 322/90 et modifications suivantes, appliquant la norme CEE 74/63) fixent à **50 ppb les quantités maximales de micotoxines dans les matières premières destinées à l'alimentation animale.** A défaut de définition de limites précises, on considère habituellement la même valeur limite pour les fourrages. La présence d'aflatoxine M1 dans le lait est particulièrement importante dans le cas de son utilisation fromagère, qui peut multiplier sa concentration par 5 à 8 (APPLEBAUM *et al.*, 1982).

■ Motivations de l'étude

De nombreux travaux ont concerné les aliments destinés au bétail (ANFOSSI *et al.*, 1990 ; JUSZKIEWICZ *et al.*, 1993 ; RASHDA-ALI *et al.*, 1993 ; ROB *et al.*, 1993 ; SAHIN et CERCİ, 1994) ; la plupart de ces études se sont intéressées aux ensilages et aux aliments concentrés, le foin étant souvent considéré comme une source secondaire ou négligeable d'aflatoxines. Toutefois, **le foin représente fréquemment une portion importante de la ration des vaches laitières, notamment en cas de production de fromages à longue durée d'affinage ; il peut ainsi représenter un réservoir potentiel d'aflatoxine**, par exemple suite à une mauvaise fenaison (mauvaises conditions météorologiques) ou à une conservation imparfaite. La première coupe est particulièrement concernée, car elle représente une part importante de la production et le climat printanier, généralement défavorable au séchage des fourrages, rend la fenaison difficile et aléatoire.

Après une étude préliminaire conduite dans la même région (PERINI et DELBONO, 1998) en 1997, **le but de cette étude était d'évaluer l'ampleur de la présence éventuelle d'aflatoxine dans les fourrages des élevages de vaches laitières de la province de Reggio Emilia, zone typique de production du Parmesan**. Dans ce système fourrager basé exclusivement sur le foin, la qualité nutritionnelle et sanitaire du foin est essentielle. A l'heure actuelle, presque tout le foin est séché au sol ; seule une petite part est réalisée avec ventilation en grange ou séchage des balles rondes (à l'aide d'un système de plateaux).

2. Matériel et méthodes

■ Présentation de l'étude et de la zone

L'étude a concerné **253 échantillons de fourrage de prairie naturelle et de luzerne**, récoltés au cours de 4 années dans des élevages situés dans la province de Reggio Emilia (figure 1). Ces fourrages étaient conservés sous forme de foin traditionnel et d'enrubannage.

Dans cette zone, en raison de la distance de la côte Adriatique et de la présence de la chaîne des Apennins, l'influence de la mer est peu sensible. **Le climat** est de type continental, caractérisé par des hivers relativement rigoureux et de fortes températures en été. La pluviométrie annuelle varie de 700 mm dans la zone basse à 1 200 mm dans la zone de moyenne montagne (700-800 m d'altitude). Les précipitations sont mal réparties durant l'année, avec un maximum en automne et un déficit hydrique considérable de juin à août. En mai, il pleut en moyenne 1 jour sur 3 ; par conséquent, le risque de mouiller les foins est très élevé.

Le choix des élevages, du nombre et de **la distribution des prélèvements** a été raisonné en fonction des volumes de production laitière et des différents problèmes techniques rencontrés lors des opérations de fenaison dans les deux zones considérées (plaine et collines).

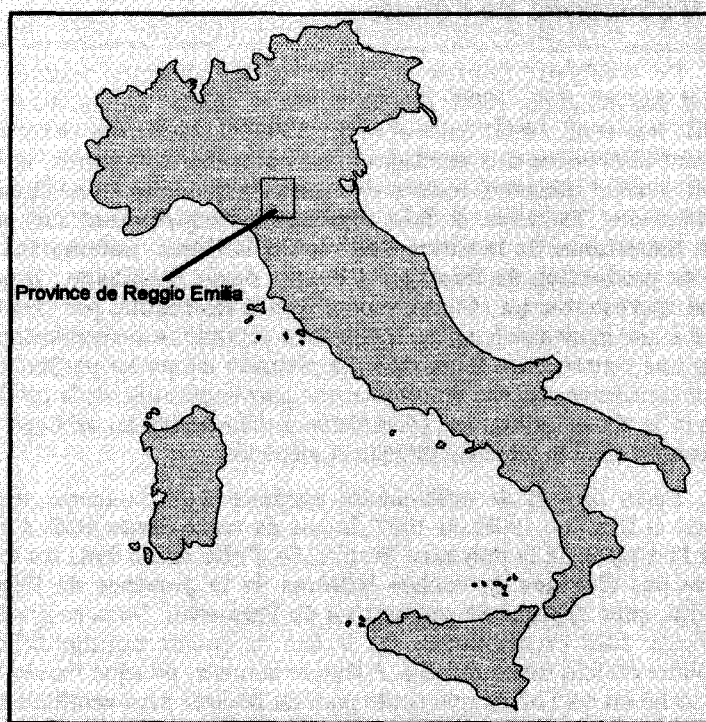


FIGURE 1 : Localisation de la région d'étude.

FIGURE 1 : Localization of the region under study.

La majorité (96%) des fourrages collectés étaient des foins de prairies naturelles et de luzerne, le reste (4%) étant des enrubannages (ensilages préfanés) de luzerne prélevés exclusivement en plaine. La teneur en matière sèche (MS) des foins variait entre 86 et 88%, tandis que celle des enrubannages (tous bien conservés) se situait entre 35 et 40%. Les prélèvements étaient effectués :

- par carottage radial des balles de foin jusqu'à 75 cm de profondeur,
- dans la mangeoire, à différents moments de la distribution, pour les enrubannages.

De cette façon, il a été possible d'obtenir des matériaux homogènes, conservés à -20°C jusqu'au moment de l'extraction et de l'analyse.

■ Extraction et analyse de l'aflatoxine B1

L'extraction de l'aflatoxine B1 était effectuée sur 25 g de fourrage, traité selon la méthode décrite par CIRILLI *et al.* (1986), avec quelques modifications. L'extrait était ensuite utilisé pour les déterminations analytiques, effectuées par HPLC (High Pressure Liquid Chromatography). Les conditions opératoires suivantes étaient appliquées : colonne Hypersyl 5 ODS (250x4,00 mm), phase mobile : eau/acétonitrile/alcool isopropilique/acide acétique (proportions : 79/7/7/7 v/v), flux : 0,8 ml/min.

Concentration d'aflatoxine B1 (ppb)	n*	Répartition des échantillons (%)					Moyenne ± écart type
		Nullé	0,10 - 2,49	2,50 - 4,99	5,00 à 9,99	> 10,00	
Enrubannage de luzerne	10	0,0	30,0	70,0	0,0	0,0	3,00 ± 0,95
Foin de prairie naturelle	114	41,2	21,1	21,9	14,0	1,8	2,26 ± 2,73
Foin de luzerne	133	42,6	29,3	16,5	6,8	0,8	1,56 ± 2,19
Total	267	42,4	25,7	21,0	9,7	1,2	

* n : nombre d'échantillons

TABLEAU 1 : Répartition des analyses selon l'intervalle de concentration d'aflatoxine B1 et le type de fourrage.

TABLE 1 : *Distribution of analyses according to interval of B1 aflatoxin content and to forage type.*

Dans ces conditions, le pourcentage moyen de récupération d'aflatoxine B1, caractérisée par un temps de rétention de 5,1 minutes, a été de 75% ; l'évaluation quantitative, au moyen de courbes précédemment calculées en utilisant une micotoxine standard à concentrations dégressives, présentait une limite de 0,1 ppb.

Les coefficients de corrélation (R), qui définissent la réponse analytique, ont été constamment supérieurs à 0,99, alors que les coefficients de variation (CV), indicatifs de la précision de la méthode, ont été caractérisés par des valeurs comprises entre 8,5% et 7,4%. L'analyse statistique a été effectuée en utilisant le test non paramétrique de Kruskal-Wallis du logiciel Statistix pour Windows.

3. Résultats

■ Concentration d'aflatoxine B1 dans les fourrages

Les résultats obtenus sur le niveau de contamination par l'aflatoxine B1 des différents fourrages (foins et enrubbannages de prairies naturelles et de luzerne) sont résumés dans le tableau 1 et présentés par intervalles de concentration.

Même si les données relatives aux enrubbannages portent sur un nombre relativement bas d'échantillons, provenant seulement de la plaine, les évaluations effectuées démontrent **une présence constante d'aflatoxine B1, mais les valeurs moyennes de contamination restent modestes** (3,00 ppb).

En ce qui concerne les prairies naturelles, 47 échantillons (41,2% des aliments examinés) étaient dépourvus d'aflatoxine B1 tan-

TABLEAU 2 : Concentrations moyennes d'aflatoxine B1 des analyses selon la localisation et le type de fourrage.

TABLE 2 : *Mean B1 aflatoxin contents of analyses according to localization and to forage type.*

	Plaine		Collines	
	n	Moyennes ± écart type	n	Moyennes ± écart type
Enrubannage de luzerne	10	3,00 ± 0,95	0	
Foin de prairie naturelle	50	2,85 ± 2,95	64	1,81 ± 2,48
Foin de luzerne	95	1,33 ± 1,86	38	2,14 ± 2,81
Total	155		102	

dis que, dans 15,8% des échantillons, la concentration dépassait 5,00 ppb. Globalement, la contamination des prairies naturelles est de 2,26 ppb, **celles de la plaine étant plus contaminées que celles des collines** (2,85 vs 1,81 ppb, tableau 2).

Un pourcentage comparable (42,6%) d'échantillons complètement négatifs est observé pour **les foins de luzerne** qui présentent par ailleurs des pourcentages plus bas (respectivement 6,8% et 0,8%) pour les niveaux de contamination élevés (5,00 - 9,99 et supérieur à 10,00 ppb). **Dans les collines, la luzerne présente des valeurs légèrement supérieures à celle de la plaine** (2,14 vs 1,33 ppb).

■ Analyse statistique des données

Même si les moyennes globales de contamination des 3 types de fourrages présentent des valeurs différentes, la forte variabilité des données n'a permis de mettre en évidence qu'une différence significative entre les enrubannages et les foins de luzerne ($P < 0,01$).

En ce qui concerne les différents niveaux de contamination des aliments considérés en fonction de leur nature (tableau 2), on a pu mettre en évidence une différence significative ($P < 0,01$) seulement entre les valeurs relatives aux enrubannages de prairies naturelles et celles des foins de luzerne provenant de la plaine.

Enfin, l'analyse statistique relative à la confrontation des mêmes aliments en fonction des deux zones de provenance permet de constater une différence significative ($P < 0,05$) relativement aux prairies naturelles et non aux foins de luzerne.

4. Discussion, conclusion

Les résultats obtenus permettent avant tout de constater que **l'utilisation des foins des zones considérées pour l'alimentation des vaches laitières ne présente aucun risque d'effet toxique pour ces animaux**, pour lesquels les seuils dangereux retenus sont de 50 à 150 mg/animal pour 5 jours (ALLCROFT et LEWIS, 1963) ; ces valeurs pourraient être atteintes si le niveau de contamination du foin allait de 0,84 à 2,5 ppm, en considérant une consommation quotidienne moyenne de 12 kg MS de fourrage. Les données constatées ici sont, dans le pire des cas, 200 fois inférieures à ces concentrations.

Abstraction faite des risques directs pour la santé des animaux, on peut aussi constater que **les niveaux d'aflatoxine B1 dans tous les aliments considérés sont nettement inférieurs au taux de 50 ppb prévu** par la législation italienne pour les matières premières et habituellement utilisé pour les fourrages.

Nos résultats sont cohérents avec ceux observés par d'autres auteurs européens qui, dans des aliments forts différents, constatent des concentrations comprises entre 0,9 et 4,2 ppb (ANFOSSI *et al.*, 1990 ; ROB *et al.*, 1993 ; SAAD et ZAKY, 1995 ; Milchwirtschaftlicher Verein Baden-Wurtemberg, 1996). Toutefois, des taux plus élevés

(40 ppb) ont été retrouvés par JUSZKIEWICZ *et al.* (1993) sur des échantillons prélevés en Pologne, et des niveaux variant entre 11,2 ppb et 260-360 ppb sont rapportés par RASHDA-ALI *et al.* (1993) et SAHIN et CERCI (1994) sur des aliments provenant de la zone asiatique ; ces données sont probablement à attribuer à des conditions environnementales et de conservation favorables au développement des moisissures et, par conséquent, à la production de micotoxines.

Le bas niveau de contamination présenté par les prairies naturelles et de luzerne enquêtées, ainsi que le nombre relativement bas d'échantillons contenant des quantités de toxine supérieures à 5,00 ppb, confirme non seulement que ces aliments ne représentent pas une source primaire d'aflatoxine B₁, mais démontre également leur validité et salubrité pour l'alimentation des vaches laitières, dont ils constituent en moyenne 50% du régime.

Enfin, il est intéressant de remarquer que la différence des conditions atmosphériques et d'environnement entre plaine et collines n'a pas une influence majeure sur les niveaux de contamination par l'aflatoxine B₁, sauf pour les prairies naturelles, qui ont présenté une différence plus marquée ($P < 0,05$).

En conclusion, l'étude effectuée permet d'affirmer que **l'éventuelle contamination du lait par l'aflatoxine M₁** provenant des aliments destinés au bétail **ne peut être attribuée aux foins produits dans les zones considérées** mais plutôt à une mauvaise conservation des matières premières employées pour la production d'aliments concentrés ou à des conditions de stockage déficientes pour ces derniers dans les exploitations.

Accepté pour publication, le 25 mars 1999.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALLCROFT R., LEWIS G. (1963) : "Groundnut toxicity in cattle : experimental poisoning of calves and a report on clinical effects in older cattle", *Vet. Rec.*, 75, 487-493.
- ANFOSSI P., STRACCIARI G.L., BIANCHESSI D. (1990) : "Reperimento di micotossine in alcuni sottoprodotti utilizzabili in alimentazione animale", *Zoot. Nutr. Anim.*, 16: 137-143.
- APPLEBAUM R.A., BRACKETT R.E., WISEMAN D.W., MARTH E.H. (1982) : "Toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk products. A review", *J. Food Protection*, 45 (8), 752.
- BLANC M., KARLESKIND A. (1981) : "Données sur la contamination par l'aflatoxine M₁ du lait et des produits laitiers en France", *Lait*, 61 (608), 481-493.
- BOTTALICO A. (1988) : "Le micotossine nelle piante e nelle derrate", *Italia Agricola*, n°1.
- CIRILLI G., ALDONA CIRILLI C.S., ZAGHINI L. (1986) : "Dosaggio T.L.C. e/o H.P.L.C. delle micotossine. Nota I : Le aflatoxine", *Tecnica Molitoria*, 2, 37, 98-106.

- JUSZKIEWICZ T., KOZAK A., WISNIEWSKA DMYTROW H. (1993) : "Contamination with mycotoxins of mixed feeds and concentrates in Poland", *Medycyna Weterynaryjna*, 49, 6, 251-253.
- LAMPE K.F. (1993) : "Effetti tossici di fitotossine", *Tossicologia. I fondamenti dell'azione delle sostanze tossiche*, Amdur M.O., Doull J. E et Klaassen C.D. Eds., Edizioni Mediche Scientifiche Internazionali, Roma.
- Milchwirtschaftlicher Verein Baden-Wurtemberg (1996) : "Testing of milk for aflatoxin M1 content and of dairy concentrates for aflatoxin B1 content", *Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft*, 117, 6, 286-288.
- PERINI S., DELBONO S. (1998) : "Studio sulla contaminazione da aflatossine in foraggi e mangimi utilizzati nell'alimentazione delle bovine da latte nel comprensorio reggiano e determinazione della presenza di eventuali metaboliti nel latte destinato alla trasformazione in Parmigiano Reggiano. Contestuale valutazione della presenza, nei mangimi e nel latte, di eventuali residui di sostanze inibenti ed in particolare di sulfamidici", *Il Convegno sui programmi di ricerca finalizzata e corrente degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali Riassunti*, ISS Roma, 25-26/6/97, p. 108.
- POMPA G. (1984) : "Aflatossine", *Tossicologia Veterinaria*, Beretta C. Ed., Editoriale Grasso.
- RASHDA-ALI, SAYEED S.A., ALI R. (1993) : "Effect of aflatoxin-contaminated feeds on buffalo milk", *Indian Food Industry*, 12, 2, 38-40.
- ROB O., REISNEROVA H., YAMBA C.Y., PAVLISTA J. (1993) : "Demonstration of aflatoxin B1 and ochratoxin A in feeds, semen and testes of breeding bulls", *Veterinarstvi*, 43, 8, 302-304.
- SAAD N.M., ZAKY Z.M. (1995) : "Incidence of aflatoxigenic molds and aflatoxins in infant's milk powder", *Assiut Veterinary Medical Journal*, 32, 64, 157-163.
- SAHIN K., CERCI I.H. (1994) : "The effects of conditions and duration of storage on levels of moisture and aflatoxin contamination in cattle feed", *Saglik Bilimleri Dergisi*, 8, 2, 47-52.
- STOLOFF L. (1977) : "Aflatoxins : an overview", *Mycotoxins in Human and Animal Health*, Rodricks J.V., Hesseitine C.W. et Mehlman M.A. Eds., Pathtox Publishers, Park Forest South, Illinois.

SUMMARY

Preliminary studies on the presence of B1 aflatoxin in cured forages in the province of Reggio Emilia (Italy)

The contents of B1 aflatoxin in 257 samples of cured forages were measured (by HPLC) in natural pastures and lucerne fields of the province of Reggio Emilia during 4 years. Wrapped forages were more often contaminated and exhibited higher mean levels of mycotoxin (3.00 ppb) than hay from natural pastures and lucerne, where only 1.4% of samples had levels above 10.0 ppb ; Italian regulations set the threshold for feeds at 50 ppb. Contamination did not depend on whether the forages came from hills or from lowlands, nor on the climatic conditions ; the only significant differences were between natural pastures. These results confirm that cured forages involve no risk to animal health connected with B1 aflatoxin and cannot be responsible for any contamination of milk by M1 aflatoxin.