

IL LATO OSCURO DELLA QUALITÀ: INTOSSICAZIONE DA MICOTOSINE IN UN ALLEVAMENTO PER LA PRODUZIONE DI UOVA ARRICCHITE IN OMEGA-3

Pugliese N.¹, Samarelli R.¹, Dimuccio M.M.¹, Bozzo G.¹, Ceci E., Schiavone A.¹, Circella E.¹, Saleh M.^{1,2}, Siddique I.¹, Crescenzo G.¹, Camarda A.¹

¹ Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro" S.P. per Casamassima, km 3, 70010 Valenzano (BA), Italia

² Department of Animal Production, Faculty of Agriculture at Moshtohor, Benha University, Qalyubia, Egypt

Summary

Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by fungal species that usually contaminate foods and feeds. Their lipophilic properties allow them to persist in the fat tissues of animals that ingest them, representing a risk for the consumers because of their toxicity and carcinogenicity. Apart from their toxicity to human, there are species more susceptible to the mycotoxin actions, such as the avian ones. This report describes a case in a laying hen farm certified as antibiotic free, where animals were fed with foodstuff with linseed added to obtain eggs enriched in omega-3 fat acids. In this case, the concurrent action of aflatoxin B and ochratoxin A caused a significant decrease in production and increase in mortality. At anatomo-pathologic examinations, the animals showed severe kidney degeneration along with liver lesions. Ovary and oviduct were hypoplastic, and evident signs of anemia were observed. Aflatoxin B and ochratoxin A were detected by HPLC in organs and in foodstuff with the addition of linseed. This case wants to drive attention to the importance of a careful check of the feedstuff to be used in poultry farms with a quality-oriented production, in order to avoid contaminations that can harm both the animal welfare and the public health.

INTRODUZIONE

Le micotossine sono prodotti secondari del metabolismo di molte specie di funghi, tra cui quelli appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* [1]. Essi sono contaminanti naturali di granaglie, frutta secca e foraggi [2], ma il loro sviluppo è favorito da temperature tra i 20 e i 35 °C (a seconda delle specie) e valori di attività dell'acqua (a_w) solitamente superiori a 0,92, con differenze specie-specifiche [3].

Gli animali da reddito destinati alla produzione di alimenti assumono le micotossine attraverso il mangime contaminato o preparato con materie prime contaminate. Quindi le micotossine, che sono lipofile, si accumulano nei tessuti e vengono escrete con il latte e le uova [2, 4]. Se per gli animali è possibile pensare a forme acute di intossicazione, in realtà sempre più rare, il consumo di alimenti contaminati porta nel tempo a fenomeni tossici di tipo cronico che possono coinvolgere anche l'uomo. Non è certamente di importanza secondaria la potenziale cancerogenicità delle micotossine [5], le quali, peraltro, non hanno tutte lo stesso grado di tossicità. Le aflatossine (AF), prodotte principalmente da *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, sono tra le più pericolose. Infatti, è nota un'importante azione epatotossica a cui si sommano effetti cronici immunosoppressivi che favoriscono l'insorgenza di infezioni secondarie [6].

Inoltre, le aflatossine B1 (AFB1) ed M1 (AFM1) sono state rispettivamente inserite tra i carcinogeni di tipo I e 2B dall'Agencia Internazionale per la Ricerca sul cancro (IARC) [7]. Gli uccelli domestici sono particolarmente sensibili alle AF, che causano steatosi epatica, disturbi renali, deformità ossee e immunosoppressione, oltre a riduzione dell'accrescimento e riduzione della qualità delle uova deposte [4].

Le ocratossine (OT) sono invece considerate meno tossiche delle AF ma non per questo destano minore preoccupazione. In particolare, l'ocratossina A (OTA) è considerata nefrotossica, epatotossica, neurotossica, immunotossica ed è stata inserita tra i carcinogeni di classe 2B. Il pollame è particolarmente sensibile anche all'OTA, che causa anemia, alta concentrazione di urati, diarrea, calo di deposizione e riduzione della qualità delle uova [8]. L'elevata lipofilia dell'OTA, insieme con l'alta affinità per le proteine sieriche, ne determina il bioaccumulo nei tessuti, raggiungendo concentrazioni non compatibili con il consumo umano [9].

Per ridurre i rischi del consumatore e tutelare la salute degli animali da reddito, sono stati stabiliti dei limiti ben precisi per le AF e le OT nei mangimi destinati all'alimentazione degli animali. In particolare, il regolamento EU 574/2011 ha stabilito in 20 mg/kg la concentrazione massima di AFB1 nei mangimi per il pollame, e in 5 mg/kg quella nei mangimi per pulcini e pollastre. La concentrazione limite per l'OTA è stata invece stabilita dalle raccomandazioni UE 576/2006 in 100 mg/kg.

Alla luce di quanto sopra descritto, questo studio riporta le cause e gli effetti di un episodio di intossicazione da AFB1 e OTA osservato in un allevamento di galline ovaiole allevate senza antibiotici per la produzione di uova arricchite in acidi grassi ν -3 (O3).

MATERIALI E METODI

Storia del caso

L'azienda oggetto di studio è certificata “*Antibiotic free*” e, al momento dell'episodio descritto, ospitava 2 gruppi di 3600 galline ovaiole ciascuno, uno di ibridi Lohmann White e l'altro di Lohmann Red, in due capannoni distinti. Tutti gli animali erano stati accasati nel maggio 2021 ad un'età di 112 giorni ed erano allevati a terra al chiuso su lettiera. In particolare, il gruppo di Lohmann White produceva uova arricchite con O3, regolarmente certificate da un ente accreditato. L'arricchimento era ottenuto integrando l'alimentazione delle galline con quantità di semi di lino crescenti dal 3% (luglio 2021) al 7% (ottobre 2021).

La curva di deposizione, inizialmente sovrapponibile a quella indicata dalla casa madre per gli ibridi accasati, a dicembre 2021 si attestava su una percentuale del 95%. Nelle settimane successive, tuttavia, la produzione di uova calava drasticamente, fino a raggiungere in 21 giorni il 68%. In questo periodo al calo della deposizione non corrispondeva alcun aumento della mortalità (0,27% mensile).

A partire dal primo gennaio 2022, a causa dell'anomalo andamento della produzione, l'allevatore sospendeva l'integrazione con i semi di lino, al quale corrispondeva un aumento della deposizione che raggiungeva l'82%. Al ripristino dell'integrazione con semi di lino al 4%, corrispondeva con un nuovo calo di deposizione che raggiungeva questa volta il 70%, e che stavolta si associava ad un aumento significativo della mortalità (3,25% mensile).

Un capannone gemello, in cui la razione alimentare non era arricchita con semi di lino non ha manifestato alcuna sintomatologia clinica, né alterazioni della curva della deposizione e della mortalità per l'intero ciclo produttivo.

Per determinare la causa del calo della deposizione e dell'anomala mortalità dieci carcasse sono state sottoposte a esame necroscopico. Dagli animali esaminati sono stati prelevati fegato e reni. Contemporaneamente, in azienda sono stati raccolti cinque campioni di mangime addizionato con semi di lino al 4% e cinque di mangime non addizionato.

L'allevatore, contestualmente all'invio delle carcasse al laboratorio, sostituiva il mangime contenente i semi di lino con altro non addizionato che in quel periodo era somministrato al capannone gemello. Dopo pochi giorni la curva di deposizione si alzava nuovamente avvicinandosi a quella prevista dalle tabelle fornite dalla casa produttrice e la mortalità calava su livelli fisiologici per l'allevamento.

Esami istopatologici

Parte dei campioni raccolti durante l'esame necroscopico sono stati posti in formalina tamponata al 10%. I campioni sono stati quindi inclusi in paraffina secondo le procedure standard, sezionati a 4 mm con microtomo e colorati con ematossilina-eosina.

Estrazione e purificazione delle micotossine da organo

Aliquote da 20 g di organo sono state omogenizzate in acido fosforico 1M, e 2,5 g di omogenato sono stati trattati con etilacetato prima di essere centrifugate per 5' a 350xg. Le fasi organiche sono state combinate e sottoposte ad estrazione con NaHCO₃ 0,5 M, pH 8,4. L'estratto è stato purificato ulteriormente mediante passaggio in una colonna AflaOchra LC a immunoaffinità e le micotossine sono state eluite con alcol metilico.

Estrazione e purificazione delle micotossine da mangime

Al momento del conferimento presso il Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Bari, il mangime è stato triturato e mantenuto a +4 °C. Aliquote da 25 g sono state successivamente omogenizzate in alcol metilico 70% e filtrate. Parte del filtrato è stato tamponato con PBS e sottoposto a purificazione in colonne AflaOchra LC. Le micotossine sono state eluite in alcol metilico.

Cromatografia liquida ad alta prestazione

Venti mL di eluito sono stati utilizzati per la ricerca di micotossine in cromatografia liquida, mediante uno strumento Agilent 1100 dotato di pompa, iniettore Rheodyne 7125 e rilevatore a fluorescenza. Nello specifico, il campione è stato introdotto in colonna Restek C18, e una miscela metanolo-acqua 45:55 v/v è stata usata come fase mobile per la mobilizzazione di AFB₁, con rilevazione a 360 e 440 nm come lunghezze d'onda rispettivamente di eccitazione e di emissione. L'OTA è stata mobilizzata con una miscela acetonitrile-acqua-acido acetico 99:99:2 e lunghezze d'onda di rilevazione di 333 e 477 nm [10].

RISULTATI

Rilievi anatomopatologici

All'esame necroscopico si evidenziava cattivo stato di nutrizione. La regione pericloacale era imbrattata di feci diarroiche di colorito giallastro, mentre le creste, i bargigli e le mucose apparenti apparivano di colorito pallido ad indicare un grave stato anemico (Fig. 1a). Anche il midollo osseo (Fig. 1b), si mostrava discromico rispetto alla normale condizione questa tipica degli stati aplastici.



Figura 1. a) Pallore di cresta e bargigli. b) Midollo osseo in cui è chiaramente evidente la decolorazione nella porzione distale.

I reni si presentavano di colorito giallo-ocra e con evidenti segni di sofferenza, quale ad esempio un consistente aumento di volume ed emorragie superficiali. Si osservava inoltre l'assenza di adiposi nelle logge renali (Fig. 2).

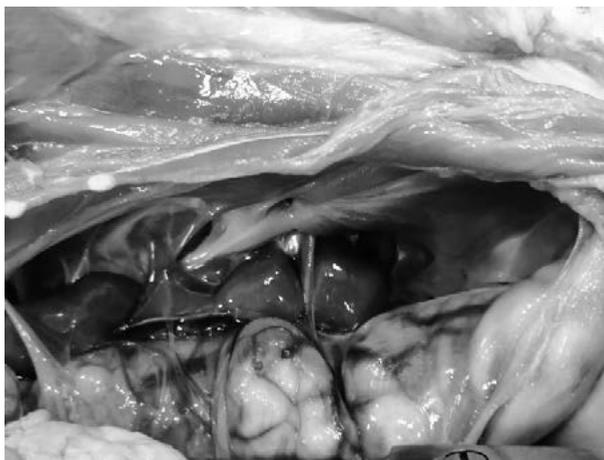


Figura 2. Reni ipocromici e ipertrofici. Si apprezza anche l'ipoplasia dell'ovidutto. Quest'ultimo segno era probabilmente legato allo stato di denutrizione degli animali, e si associava a una palese riduzione di volume dello stomaco muscolare. Ioplastico risultava anche l'apparato riproduttore, con evidente regressione di ovario e ovidutto (Figg. 2 e 3).

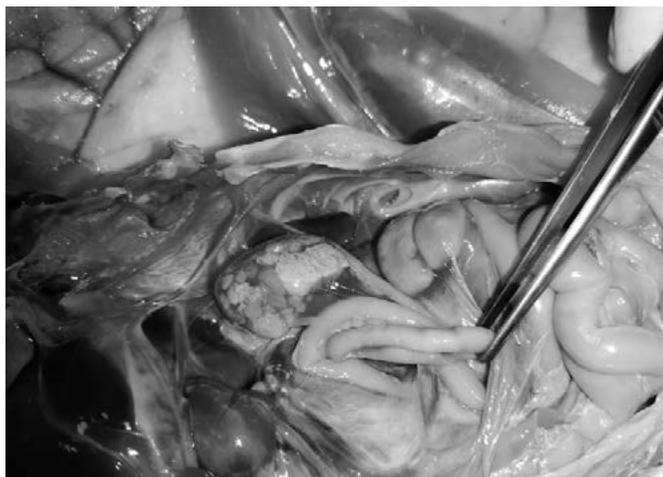


Figura 3. Iperplasia di ovario e ovidutto.

I depositi di urati evidenziabili sul peritoneo (Fig. 4a) e sui sacchi aerei (Fig. 4b) erano probabilmente direttamente correlati con alterazioni metaboliche dei reni.



Figura 4. Depositi di urati sul peritoneo (a) e sulle membrane dei sacchi aerei addominali (b).

L'esame necroscopico metteva in luce anche importanti lesioni epatiche quali epatomegalia, e focolai necrotici diffusi.

L'esame istologico confermava i rilievi anatomopatologici rilevando importanti lesioni renali ed epatiche. Infatti, la sezione trasversale del rene mostrava le cariomegalia e vacuolizzazione delle cellule dei tubuli prossimali con degenerazione dei nuclei, che delineava un quadro complessivo di tubulonefrosi (Fig. 5a) e fibrosi interstiziale. La base dei capillari glomerulari risultava inspessita. Si evidenziava infine una diffusa atrofia dei glomeruli (Fig. 5b).

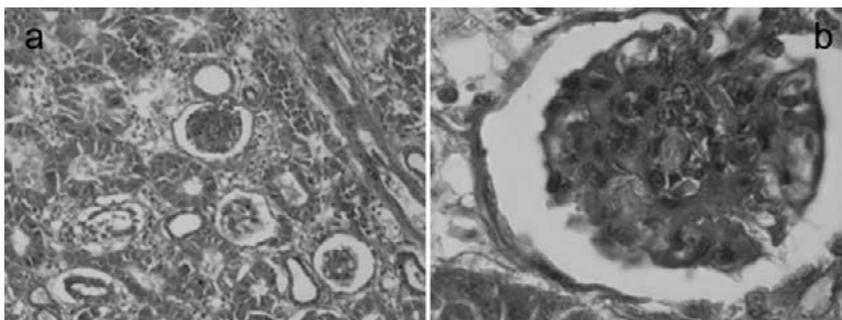


Figura 5. Rene. Cellule vacuolate con degenerazione nucleare (a, 20X) e atrofia glomerulare (b, 40X).

A livello del fegato si apprezzavano alterazioni degenerative del parenchima, caratterizzate da iperplasia nodulare degli epatociti, focolai di cellule infiammatorie e modesta fibrosi focale (Fig. 6a). Erano visibili anche numerosi epatociti con infiltrazione grassa ed erano visibili focolai emorragici ed aree congeste (Fig. 6b).

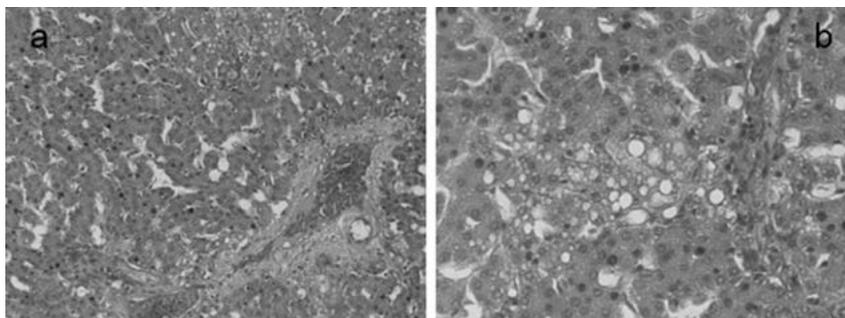


Figura 6. Fegato. Si osserva infiltrazione a focolaio di cellule infiammatorie ed aree di congestione circondate da fibrosi focale (a, 20X), oltre che infiltrazione grassa a carico degli epatociti (b, 40X).

Rilevamento e quantificazione delle micotossine.

Entrambe le micotossine ricercate, AFB e OTA, sono state rilevate e quantificate nei campioni di fegato e rene sottoposti ad HPLC. In particolare, la concentrazione media di AFB era di $3,6 \pm 0,44$ mg/kg nel fegato, e di $1,4 \pm 0,3$ mg/kg nel rene, mentre per l'OTA si ottenevano valori medi di $47 \pm 0,3$ mg/kg nel rene e di $24 \pm 1,92$ mg/kg nel fegato.

Anche i campioni di mangime addizionati con semi di lino sono risultati contaminati da OTA e AFB a concentrazioni medie di $31 \pm 3,08$ e $5,6 \pm 0,33$ mg/kg di peso secco, rispettivamente. Nel mangime senza addizione di semi di lino l'AFB non era invece stata rilevata, e anche la concentrazione di OTA era decisamente più bassa ($1,1 \pm 0,15$ mg/kg).

Il limite di rilevamento era pari a $0,10$ mg/kg e $0,25$ mg/kg, rispettivamente per OTA e AFB.

DISCUSSIONE

Il caso descritto in questa nota offre diversi spunti di riflessione che riguardano specificamente sia gli effetti patologici che le micotossine hanno sugli animali, sia aspetti più strettamente normativi, i quali sono indirizzati a ridurre il rischio di sviluppare micotossicosi durante il ciclo di allevamento ed evitare la produzione e commercializzazione di alimenti contaminati e quindi potenzialmente pericolosi.

Infatti, il quadro anatomopatologico osservato non è riconducibile all'azione di una specifica micotossina ma è probabilmente da attribuire ad una patologia ad eziologia tossica ad andamento cronico dovuta all'azione combinata di AF e OT.

Il quadro osservato, pertanto, è da considerare misto e contempera sia aspetti patologici legati ad una o all'altra delle due tossine. Per quanto riguarda le AF, ad esempio, se da un lato, sono assenti o poco presenti le alterazioni macroscopiche tipiche dell'intossicazione soprattutto a livello del fegato, che rappresenta l'organo bersaglio, ben più significativo è il quadro istopatologico dello stesso organo che è molto più rispondente a quanto descritto in letteratura in questi casi [11].

Inoltre, particolarmente evidenti sono le alterazioni patologiche primarie del rene (aumento di volume, decolorazione e presenza di urati disseminati sui foglietti sierosi), e gli effetti secondari sulle sierose (accumulo di urati) attribuibili all'azione delle OT [12, 13]. Molto interessante l'effetto della patologia tossica sullo sviluppo dell'ovaio e dell'ovidutto, ritrovati quasi costantemente ipoplastici, che motivano il significativo calo della deposizione registrato durante il ciclo produttivo [14].

Gli esami tossicologici confermano un accumulo anomalo di micotossine a livello del fegato e del rene che è compatibile con il quadro clinico e anatomopatologico riscontrato. Va rilevato, tuttavia, che le quantità di tossine presenti negli organi erano di gran lunga al di sotto delle DL50 determinate per ciascuna di esse, stimata per l'OTA a 3,3 mg/kg [9], e per l'AFB compresa tra 0,025 e 2 mg/kg, essendo quest'ultima influenzata dal sesso, dall'età e persino dall'ibrido [11, 15].

Molti Autori evidenziano l'importanza delle intossicazioni multiple nelle forme cliniche di micotossicosi [12]. Questa interazione può essere di vario tipo, ma più spesso esita in un'azione sinergica esercitata dai diversi tossici, i quali sarebbero in grado di esprimere il proprio potenziale patologico anche a concentrazioni molto più basse rispetto a quelle ritenute limite [12, 16]. Non è escluso che nell'episodio citato, come già anticipato precedentemente, si sia verificata proprio questa condizione, che ha portato alla comparsa della sintomatologia clinica in presenza di livelli di tossine che, al contrario, presi singolarmente, non sarebbero stati tossici.

Gli effetti patologici esercitati dalla contemporanea presenza delle due tossine si possono osservare sia nel fegato che nel rene [17]. È a livello di quest'ultimo, tuttavia, che l'azione sinergica ha raggiunto il massimo dell'attività [17], determinando un significativo aumento di volume dell'organo e le alterazioni fisiopatologiche che possono portare alla morte l'animale. L'OTA, infatti, tende a legarsi tenacemente alle proteine sieriche, allungando quindi sensibilmente i tempi di eliminazione e favorendo i fenomeni di bioaccumulo nel fegato e nei reni [18].

Veicoli principali delle micotossine sono certamente i mangimi. Per questo, il regolamento EU 574/2011 e la raccomandazione UE 576/2006 definiscono quali siano i livelli massimi di AF e OTA accettabili nel prodotto finito. Questi limiti infatti, tengono conto della capacità di detossificazione fisiologica dell'organismo animale, dovrebbero impedire il verificarsi di fenomeni tossici e nel contempo ridurre il

rischio di contaminazione degli alimenti (carni e uova) destinati all'alimentazione umana. L'episodio descritto sembrerebbe evidenziare, che le prescrizioni normative non sono in grado di impedire il verificarsi di fenomeni tossici in caso di contemporanea presenza di almeno due micotossine e suggeriscono la necessità di una verifica dei limiti accettabili nel caso di contemporanea presenza delle stesse nei mangimi o nelle materie prime.

Un particolare singolare, ma allo stesso tempo importante dell'episodio riportato in questa nota è che molto probabilmente la fonte di contaminazione del mangime era individuabile nei semi di lino utilizzati come integrazione per consentire alle uova di rientrare nei parametri utili ad ottenere la certificazione di uova arricchite con Omega 3. Questi, infatti, costituivano l'unico elemento di differenziazione nell'alimentazione delle ovaiole che presentavano la sintomatologia tossica rispetto al gruppo privo di tale certificazione.

La ricerca di produzioni di elevata qualità in grado di occupare nicchie di mercato sempre più ampie grazie alla capacità di attrarre il consumatore oggi più che mai attento ai temi salutisti, deve stimolare i produttori a porre un'attenzione maggiore alla qualità delle materie prime utilizzate. In tal senso il nuovo Reg. UE n° 2017/625 che disciplina i Controlli Ufficiali, rappresenta uno strumento innovativo a disposizione del medico veterinario. Infatti, attraverso la corretta interpretazione giuridica del Regolamento i controlli non si fermeranno al concetto di catena alimentare, ma saranno estesi a quello ben più ampio di filiera agroalimentare.

Questo al fine di garantire che produzioni che hanno costi elevati sia in filiera che al mercato rispondano pienamente alle aspettative e consentano di perseguire l'obiettivo per cui sono realizzate che, oltre alla qualità del prodotto, certamente importante, spesso si configura specificamente in una promozione dell'immagine aziendale.

BIBLIOGRAFIA

1. Driehuis F, Spanjer MC, Scholten JM and MC Giffel. (2008) Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes. *J. Dairy Sci.* 91: 4261-4271.
2. Rodríguez-Blanco M, Ramos AJ, Prim M, Sanchis V and S Marín. (2020) Usefulness of the analytical control of aflatoxins in feedstuffs for dairy cows for the prevention of aflatoxin M₁ in milk. *Mycotoxin Res.* 36: 11-22.
3. Zingales V, Taroncher M, Martino PA, Ruiz MJ and F Caloni. (2022) climate change and effects on molds and mycotoxins. *Toxins.* 14: 445.
4. Haque MA, Wang Y, Shen Z, Li X, Saleemi MK and C He. (2020) Mycotoxin contamination and control strategy in human, domestic animal and poultry: A review. *Microb. Pathog.* 142: 104095.
5. Cimbalo A, Alonso-Garrido M, Font G and L Manyes. (2020) Toxicity of mycotoxins in vivo on vertebrate organisms: A review. *Food Chem. Toxicol.* 137: 111161.
6. Kumar P, Mahato DK, Kamle M, Mohanta TK and SG Kang. (2017) Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. *Front. Microbiol.* 7: 2170.
7. Marchese S, Polo A, Ariano A, Velotto S, Costantini and L Severino. (2018) Aflatoxin B1 and B1: Biological properties and their involvement in cancer development. *Toxins.* 10: 214.

8. Navale V, Vamkudoth KR, Ajmera S and V Dhuri V. (2021) *Aspergillus* derived mycotoxins in food and the environment: Prevalence, detection, and toxicity. *Toxicol. Rep.* 8: 1008-1030.
9. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Schrenk D, Bodin L, Chipman JK, del Mazo J, Grasl-Kraupp B, Hogstrand C, Hoogenboom L, Leblanc JC, Nebbia CS, Nielsen E, Ntzani E, Petersen A, Sand S, Schwerdtle T, Vleminckx C, Wallace H, Alexander J, Dall'Asta C, Mally A, Metzler M, Binaglia M, Horvath Z, Steinkellner and M Bignami. (2020). Risk assessment on ochratoxin A in food. *EFSA J.* 148: e06113.
10. Monaci L, Tantillo G and F Palmisano. (2004). Determination of ochratoxin A in pig tissues by liquid-liquid extraction and clean-up and high-performance liquid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* 378: 1777-1782.
11. RR Dalvi. (1986). An overview of aflatoxicosis of poultry: its characteristics, prevention and reduction. *Vet. Res. Commun.* 10: 429-443.
12. Murugesan GR, Ledoux DR, Naehrer K, Berthiller F, Applegate TJ, Grenier B, Phillips TD and G Schatzmayr. (2015). Prevalence and effects of mycotoxins on poultry health and performance, and recent development in mycotoxin counter-acting strategies. *Poult. Sci.* 94: 1298-1315.
13. Haschek WM, Voss KA and VR Beasley. (2002). Selected mycotoxins affecting animal and human health. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA. (Eds.), *Handbook of toxicologic pathology*. Academic Press, Cambridge, MA, US, pp. 645-699.
14. Trucksess MW, Stoloff L, Young K, Wyatt RD and BL Miller. (1983). Aflatoxicol and aflatoxins B1 and M1 in eggs and tissues of laying hens consuming aflatoxin-contaminated feed. *Poult. Sci.* 62: 2176-2182.
15. Bryden WL, Cumming RB and AB Lloyd. (1980). Sex and strain responses to aflatoxin B1 in the chicken. *Avian Pathol.* 9: 539-550.
16. Grenier B and IP Oswald. (2011). Mycotoxin co-contamination of food and feed: meta-analysis of publications describing toxicological interactions. *World Mycotoxin J.* 3: 285-313.
17. Huff WE and JA Doerr. (1981). Synergism between aflatoxin and ochratoxin A in broiler chickens. *Poult. Sci.* 60: 550-555.
18. Pozzo L, Cavallarin L, Antoniazzi S, Guerre P, Biasibetti E, Capucchio MT and A Schiavone. (2013). Feeding a diet contaminated with ochratoxin A for broiler chickens at the maximum level recommended by the EU for poultry feeds (0.1 mg/kg). 2. Effects on meat quality, oxidative stress, residues and histological traits. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 97 Suppl 1: 23-31.