

# AFLATOSSINA B1



Parfait Nitunga

UCSC (Piacenza)

Scienze e Tecnologie Alimentari

2° anno Magistrale 2014-2015

## **ANSA - 9 giugno 2004**

### **KENYA: MAIS CONTAMINATO, ALMENO 112 MORTI**

**(ANSA) - NAIROBI, 9 GIU**

Sono almeno 112 le persone morte dopo aver mangiato mais contaminato in un'area centro orientale del Kenya, quella di Ukambani. Oltre 100, inoltre, sono ricoverate in ospedale. Lo ha dichiarato -riferisce oggi il quotidiano 'Nation'- il ministro della sanità signora Charity Ngilu, che ha precisato che il numero delle vittime potrebbe essere anche più alto, poiché quelle accertate sono solo quelle morte in ospedale. Il dramma era emerso lunedì scorso, quando si era però parlato di 80 morti e di situazione sotto controllo. **Le vittime hanno ingerito mais - decisamente l'alimento base dell'alimentazione keniana - contaminato dall'aflatossina: una contaminazione velenosa che avviene quando i cereali non sono correttamente essiccati.**

## **Aflatossina 2004 e 2005 in Kenya.**

### **INTRODUZIONE:**

Tra aprile e settembre 2004, si è verificato una delle più grandi epidemie da aflatossicosi noto in Kenya, con 317 casi segnalati e 125 decessi. Si è verificato un'altra meno grave di epidemia nel 2005, causando 16 morti. Campioni di alimenti provenienti da abitazioni nell' area interessata contenevano alti livelli di aflatossina B1 (da 20 a > 1.000 ng / g), il che suggerisce che l'epidemia è stata causata da intossicazione acuta da Aflatossina. Lo scoppio è stato provocato da contaminazione da aflatossina nel mais di produzione locale conservato in condizioni di umidità.

Gli effetti deleteri di contaminazione da micotossine sono stati segnalati già nel 857 A.C ed epidemie molto gravi di ergotismo si sono verificati dalla fine '900 al 1800.

la maggior parte dei keniani non sono ne consapevoli ne riescono ad apprezzare l'entità dei pericoli che possono derivare dal consumo di alimenti contaminati da micotossine. Questa ignoranza rimane, anche se il Kenya ha vissuto due focolai di intossicazione alimentare da aflatossine tra aprile 2004 e il settembre 2005 in cui 125 e 16 persone sono morte rispettivamente. I villaggi nei distretti colpiti erano remoti ed i casi erano segnalati in una vasta area geografica. Le strutture



mediche limitate in questa regione dimostrano che probabilmente alcuni pazienti non hanno raggiunto le strutture sanitarie per la diagnosi e il trattamento prima di morire, quindi la vera entità di questi focolai è stata probabilmente maggiore ed il numero delle vittime molto più alto rispetto a quanto è stato documentato.

I casi del 2004 e del 2005 non sono stati i primi focolai di aflatossicosi da essere riportati in Kenya o in quella parte del paese. Kenya ha già avuto focolai sporadici di aflatossicosi, ma i focolai precedenti erano più limitati nella zona e il numero di persone colpiti molto più piccolo. L'ultima grande epidemia di aflatossicosi in Kenya si era verificata nel 1981 in cui sono morte un totale di 20 persone. Eppure fino ad oggi, il mais raccolto nei campi è ordinato in mais pulito, che viene consumato dalle famiglie e venduto, mentre quello ammuffito e scolorito è dato al bestiame o venduto ad un prezzo di circa la metà di quello pulito.

Il prezzo per chilogrammo di entrambi puliti e scoloriti o ammuffiti dipende dalla stagione. Durante i periodi di siccità prolungati, il prezzo di entrambi i tipi di mais può raddoppiare. A seconda del livello di povertà della famiglia, durante una grave carestia, il mais ammuffito può essere mescolato con mais pulito e cotto per il consumo familiare.

Durante le epidemie del 2004 e del 2005, l'area interessata era grande; ~ 40.000 km<sup>2</sup> di copertura, sei distretti della provincia orientale (Machakos, Kitui, Mwingi, Makueni, Embu e Mbeere) e un distretto (Thika) nella provincia centrale del Kenya, anche se più dell' 87% dei casi sono stati segnalati in soli quattro distretti (Machakos, Kitui, Thika e Makueni).

Una serie di studi sono stati intrapresi, l'epidemiologia descrittiva ha determinato un'ipotesi relativa ad aflatossina dovuta alle modalità di raccolta, preparazione e conservazione del grano di mais. Sulla base di questa ipotesi altri due studi contemporanei sono stati intrapresi, una valutazione del mais sul mercato e studi sul controllo del caso (Lewis et al., 2005).

I focolai del 2004 e 2005 hanno colpito soprattutto i giovani e gli adulti, alcuni capi di bestiame ed animali addomesticati. I pazienti avevano un'età compresa tra 1 e 80 anni, con un'età media di 22 anni. Tuttavia, in alcuni casi tutti i membri adulti di una famiglia erano affetti.

Ci sono stati casi di recidività in alcuni pazienti che erano stati dimessi. Questi casi ricorrenti hanno dimostrato che il mais contaminato era rimasto presente nelle comunità locali.

## **VALUTAZIONE DEL RISCHIO:**

### **Identificazione del pericolo**

Le aflatossine sono micotossine, Il termine micotossine trae origine dal greco “*mykes*” che significa fungo e “*toxicon*” veleno. Le micotossine non sono correlate direttamente alla crescita del fungo, ma risultano essere piuttosto una sua risposta a determinati stimoli ambientali, quindi sono metaboliti secondari che colonizzano gli alimenti (Mais, Sorgho, Riso, Frutta secca, spezie, Arachide.. ecc) in campo e in post-raccolta. Sono molecole capaci di produrre risposte tossiche (acute o croniche) nei confronti dell'uomo e degli animali. I funghi tossigeni più diffusi appartengono al genere *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. In particolare le Aflatossine (B1, B2, G1, G2) sono prodotte dal genere *Aspergillus*.

Le muffe tossigene riescono a crescere su substrati diversi in quanto producono una grande quantità di enzimi che permettono loro di trarre nutrimento da un gran numero di composti organici. Le

muffe sono ubiquitarie, possono cioè vivere in molti tipi di ambienti: vivono bene in un ampio intervallo di temperature (prediligono quelle elevate senza però disdegnare quelle più basse), come quelle che si trovano negli impianti di refrigerazione e anche in frigoriferi di uso domestico e in presenza di un tenore di umidità elevata.

Il loro aspetto polverulento è dovuto ad una fitta rete di ife o filamenti e di sporangi, sono i contenitori delle spore, che invadono l'ospite infiltrandosi in modo capillare. Solo ad un certo punto del loro sviluppo e con condizioni ambientali particolari, i filamenti si riproducono attraverso la produzione di un corpo fruttifero, lo sporangio appunto, dalle cui spore avranno origine nuovi individui.

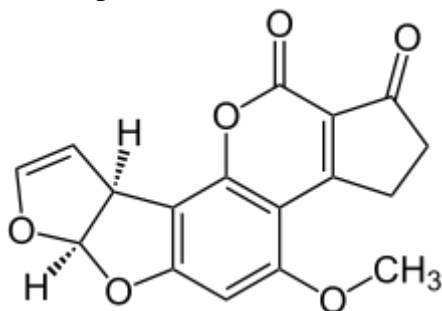
Lo sviluppo di funghi e la formazione di micotossine sono possibili già quando una pianta coltivata si trova ancora in campo, e poi in tutte le successive fasi di conservazione e trasformazione. Ad esempio, l'*Aspergillus flavus* si mantiene nel terreno nel periodo che intercorre tra una coltura di mais e la successiva. I conidi del fungo possono giungere sui filamenti che escono dalle pannocchie (gli stigmi dei fiori femminili dette sete) perchè trasportate dal vento e dagli insetti. Nella fase di conservazione, via via che i frutti maturano perdono umidità e si creano le condizioni ideali per lo sviluppo del fungo e la produzione di tossine. Tale fenomeno è favorito da condizioni ambientali idonee, come le temperature tra i 25 e i 30°C, dalla presenza di lesioni sul frutto, procurati dai danni meccanici dovuti ad esempio alla grandine o ai danneggiamenti degli insetti fitofagi, dal tipo di gestione della coltura, come ad esempio l'uso di varietà di piante che maturano precocemente o stress idrico da mancato apporto di acqua, o nelle fasi di raccolta, trasporto e stoccaggio a causa di inadeguate operazioni di pulizia e scorrette pratiche di conservazione.

Fattori ambientali che influenzano la crescita fungina :

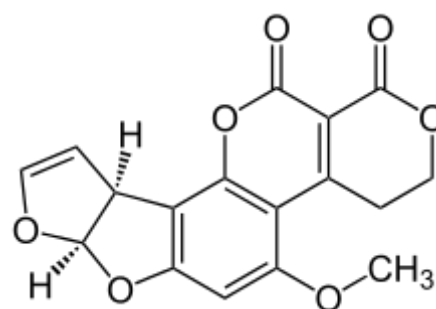
- Temperatura (C°) minimo 3 ,ottimo 20-35, massimo 60
- Attività dell'acqua (Aw) minimo 0.65, ottimo 0.80-0.95, massimo 0.99
- Ossigeno (%) minimo 0.14, ottimo >2.0
- pH minimo 2.0, ottimo 4.5-6.5, massimo 8.0
- Anidride carbonica (%) ottimo <10.0, massimo >15.0

Ci sono materie prime che per composizione e zone d'origine sono maggiormente suscettibili di contaminazione. Si tratta di tutti i cereali (mais, frumento, orzo, avena, segale, ecc.) salvo il riso, i semi oleaginosi (arachidi, girasole, semi di cotone, ecc.), la frutta secca ed essiccata (mandorle, noci, nocciole, fichi secchi, ecc.), i semi di cacao e caffè, le spezie come il peperoncino, il pepe, lo zenzero, la frutta e verdura (uva, mele, pere, carote, pomodori, ecc). Sono di conseguenza suscettibili di contaminazione alcuni prodotti derivati da queste materie prime: per esempio farine ad uso umano e animale, derivati dei semi oleaginosi, esclusi gli oli raffinati (perché le tracce di micotossine che possono passare nell'olio greggio vengono rimosse dal trattamento con alcali usato nel processo di raffinazione), prodotti contenenti cacao, caffè, vino, birra, succhi di frutta e ortaggi, latte, prodotti contenenti spezie.

*Aspergillus* è un fungo ubiquitario, e le due specie produttrici di Aflatossine sono *A.flavus* (B1e B2) e *A.parasiticus* (B1,B2,G1,G2)



**Aflatossina B1.**



**Aflatossina G1.**

Le aflatossine possono dirsi inoltre, contaminanti ambientali e agenti cancerogeni ad elevata stabilità (resistenti anche alla degradazione derivante dai trattamenti termici), con la peculiare caratteristica dell'essere inodori, insapori e incolori. Inoltre sono moderatamente solubili in acqua (10-30 µg/ml), in solventi organici polari (cloroformio e metanolo) e soprattutto in dimetilsolfossido, viceversa risultano insolubili in solventi non polari.

Ancora oggi destano le maggiori preoccupazioni in quanto contaminanti dell'alimentazione di larga parte della popolazione mondiale che vive nelle fasce tropicali, dove le caratteristiche del clima e la pressoché totale assenza di refrigerazione facilitano la crescita delle muffe produttrici.

## **Caratterizzazione del pericolo**

Le Aflatossine B<sub>1</sub> sono sostanze naturali più tossiche in assoluto, sono state classificate dall'International Agency for Research on Cancer (IARC) nel gruppo 1 come sicuri agenti cancerogeni per l'uomo.

La tossicità può essere per ingestione, contatto e inalazione (gli aspergilli hanno spore molto piccole che si disperdono nell'aria causando una tossicità per inalazione).

La tossicità cronica è decisamente più dannosa di quella acuta per l'individuo. Le micotossine sono molecole molto stabili e tendono ad accumularsi negli organi (reni, fegato,...ecc), causando nel tempo una tossicità cronica.

## **Valutazione dell'esposizione**

L'esposizione dell'uomo e dell'animale può avvenire tramite ingestione di alimenti contaminati oppure tramite via aerea, in ambienti di lavoro dove siano presenti polveri di granaglie contaminate aero-disperse, o in ambienti domestici in cattive condizioni igieniche. Inoltre gli animali esposti a loro volta diventano fonte di esposizione se destinati a diventare alimenti o produttori di alimenti destinati all'uomo (latte, carne, uova, ecc).

Il latte può risultare contaminato da aflatossina in seguito ad un processo di trasferimento (carry over) della molecola interessata dai mangimi contaminati, mais e altri cereali con cui vengono alimentate le lattifere. Le aflatossine presenti nei mangimi sono assorbite dalla vacca produttrice di latte a livello intestinale e passano nel sangue, dove si legano alle albumine sieriche. L'aflatossina B<sub>1</sub> viene metabolizzata a livello del fegato, dando origine, tra i propri metaboliti, alle aflatossine M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub>, che vengono secrete per via biliare, urinaria e mammaria, quindi nel latte, con un processo simile in tutti i mammiferi.

## **Caratterizzazione del rischio**

L'impatto delle micotossine sulla salute dipende dalla quantità di micotossina assunta con gli alimenti, dalla tossicità del composto, dal peso corporeo dell'individuo, dalla presenza di altre micotossine e da fattori dietetici. Per stabilire un rapporto di causalità tra l'ingestione di micotossine e una specifica malattia umana devono essere soddisfatti alcuni criteri: presenza di micotossine negli alimenti, accertata esposizione alle micotossine, correlazione fra esposizione e incidenza di una determinata malattia, riproducibilità dei caratteristici sintomi negli animali da esperimento, simile modalità di azione nell'uomo e nei modelli animali.

Una misura dell'esposizione sull'uomo è oggi possibile grazie alla messa a punto della metodica per l'individuazione di biomarcatori molecolari consistenti nella determinazione quantitativa delle aflatossine o dei loro derivati metabolici nei fluidi biologici dei soggetti esposti. Questo tipo di test è stato usato per indagini epidemiologiche in alcune aree dell'Africa e dell'Asia, dove il 95% circa dei sieri testati è risultato positivo all'analisi dell'addotto aflatossina-albumina.

Le aflatossine sono essenzialmente delle epatotossine dotate di attività cancerogena (1 µg/Kg di aflatossina B<sub>1</sub> nella dieta della trota è sufficiente per causare il cancro del fegato), mutagena e teratogena.

L'aflatossina B<sub>1</sub> risulta genotossica ed in grado di produrre, *in vitro* danni al DNA, mutazioni genetiche e anomalie cromosomiali. L'aflatossina B<sub>1</sub> è epatotossica nel uomo e negli animali.

Tale micotossina è in grado di superare la barriera placentare umana e si è osservata un'associazione tra l'esposizione all'AFB<sub>1</sub> e danni alla crescita in bambini piccoli (IARC, 2002).

Dagli studi effettuati su diversi animali la mutagenicità, la cancerogenicità e l'attività di legame con il DNA dell'aflatossina B<sub>1</sub> derivano dalla sua attivazione da parte del citocromo P450 e la successiva formazione del suo 8,9-epossido. Tale composto ha vita breve ma risulta essere molto reattivo, e si pensa sia il principale mediatore del danno cellulare.

Essa è altamente tossica per somministrazione acuta in tutte le specie studiate, per l'uomo la dose mortale di aflatossina B<sub>1</sub> oscilla tra 0,6 e 10 parti per milione (ppm = mg/Kg).

Le aflatossine sono assorbite nel tratto gastrointestinale dove vengono o attivate metabolicamente o detossificate nella mucosa intestinale e nel fegato. La biotrasformazione della AFB<sub>1</sub> varia molto da specie a specie ed è largamente influenzata da fattori endogeni ed esogeni. Tale biotrasformazione avviene attraverso processi di epossidazione, ossidrilazione, O-demetilazione, coniugazione e processi non enzimatici. In particolare, l'AFB<sub>1</sub> subisce un'ossidazione, dipendente dal citocromo P-450 che porta sia a vari metaboliti ossidrilati, sia all'8,9-epossido, elettrofilo instabile e altamente reattivo dal punto di vista biologico che forma addotti covalenti con DNA (soprattutto AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-guanina), RNA e proteine. Mentre la formazione di addotti con il DNA è responsabile dell'attività cancerogena, la reazione tra l'eossido e le proteine potrebbe essere responsabile della tossicità acuta di questa tossina.

Un importante meccanismo di detossificazione dell'8,9-eossido dell'AFB<sub>1</sub> è la formazione del suo derivato con il glutatione, mediata dall'enzima GSH S-transferasi; l'attività di questo enzima varia molto nelle differenti specie animali e questo è attualmente ritenuto il motivo delle enormi differenze di suscettibilità a questa tossina da parte delle varie specie animali studiate. Gli esseri umani hanno un'attività di coniugazione del glutatione agli epossidi dell'aflatossina inferiore a quella dei ratti e dei topi, e questo suggerisce che gli esseri umani abbiano minor capacità di detossificare questi importanti metaboliti. Tuttavia studi dimostrano che gli epatociti umani tendono a formare una minor quantità di epossidi rispetto agli epatociti dei ratti (WHO 2002). Le aflatossine sono inoltre in grado di inibire la respirazione cellulare per blocco dei citocromi b e c, ed hanno azione immunosoppressiva per inibizione della sintesi proteica e per legame con i recettori degli steroidi.

## **GESTIONE DEL RISCHIO:**

### **Impatto Economico delle Micotossine**

La globalizzazione, e le nuove norme e regole del commercio internazionale, hanno posto un significativo vincolo sulla competitività e l'accesso ai mercati internazionali per i paesi in via sviluppo, in particolare quelli dell'Africa sub-sahariana. Merci agricole da queste regioni devono superare i problemi che vanno dalla minore produttività e qualità dei prodotti a elevati costi per unità di trasporto agli utenti finali. La competitività dei prodotti di base africani inoltre è ostacolata da ambienti politici e istituzionali poveri che si traducono in Costi alta transazione.

Un fattore di riduzione della competitività delle materie prime agricole africane per l'esportazione è la contaminazione da aflatossina. L'aflatossina abbassa la qualità dei prodotti .

il costo della sicurezza alimentare e di mitigazione sono stati una delle principali fonti di preoccupazione nella comunità internazionale per lo sviluppo e per le economie africane.

La FDA, ha stimato da uno studio, una perdita economica diretta di circa 1 miliardo di \$/anno a causa delle micotossine, ½ miliardo/anno solo in costi di mitigazione.

Uno sguardo avanti sulla costruzione di capacità per la prevenzione e il controllo delle micotossine, rivela che la necessità di prevenire la contaminazione da micotossine negli alimenti utilizzando standard molto rigorosi può però avere gravi conseguenze economiche, in particolare per le economie deboli non avendo risorse sufficienti per un controllo adeguato, quindi sarebbe opportuno definire dei metodi di analisi efficienti nei costi (Oggi la ricerca va verso uno Screening Rapido che considera una soglia minima e massima, si effettuano anche delle analisi multitossine che danno una visione dell'insieme)

## **Limiti di legge**

Sono dati ottenuti in funzione delle conoscenze derivanti dai studi su organismi animali ed esposizione umana.

Le analisi sono costose e il campionamento è difficile da eseguire, inoltre esiste la possibilità da parte dei funghi di produrre diversi tipi di tossine ed esse possono coesistere e portare ad effetti sinergici delle tossine, per questi motivi i limiti di legge non possono essere l'unico modo per la tutela del consumatore dalle contaminazioni.

Per quanto riguarda i limiti di legge in Europa le regolamentazioni per le micotossine riguardano l'uso umano (in zootecnia i limiti valgono solo per le aflatossine), non è detto comunque che il limite di legge europeo sia valido per ogni continente (il limite di legge in USA per le aflatossine è 10 volte più alto rispetto a quello EU), quindi questo in fatto di scambi internazionale è controproducente perché in un paese un prodotto è accettabile e per un altro no.

All'interno dell'UE, esistono diverse norme dettagliate e armonizzate per le aflatossine nei prodotti alimentari, e livelli massimi sono stati stabiliti per l'aflatossina B1 e per le aflatossine totali (aflatossina B1, le aflatossine B2, aflatossina G1, G2) aflatossine nei cereali, arachidi, frutta secca e spezie, così come per l'aflatossina M1 nel latte e prodotti lattiero-caseari.

Nel 2004 il Panel scientifico EFSA (CONTAM) ha pubblicato un'opinione che portato la Commissione Europea a produrre un regolamento (Reg. CE n. 1831/2003) che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari.

Per quanto riguarda la categoria cereali e loro prodotti derivati, compresi i prodotti trasformati a base di cereali, eccetto Granturco e riso da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano, il regolamento fissa Livelli massimi di 2,0 per le Aflatossine B1 e 4,0 µg/kg per la Somma di Aflatossine B1, B2, G1 e G2.

Per quanto riguarda la categoria Latte, latte trattato termicamente e latte destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte, dei livelli massimi pari a 0,050 per Aflatossine M1.

Secondo un recente studio condotto dal RIVM per conto della FAO (FAO 2004) circa 60 paesi hanno fissato limiti specifici per l'aflatossina M1. L'Unione europea, i nuovi Stati membri, nonché i paesi dell'EFTA applicano generalmente un livello massimo di 0,05 di aflatossina M1 / kg di latte. Alcuni paesi in Africa, Asia e America Latina propongono anche loro questo livello. Al contrario, gli Stati Uniti così come alcuni paesi europei e diversi paesi asiatici accettano un livello massimo di 0,5 µg /kg di aflatossina M1 nel latte, che è anche il limite armonizzato MERCOSUR applicato in America Latina. Il limite di 0,5 µg/kg per l'aflatossina M1 è stato adottato anche dal Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 2001). Pertanto, il livello massimo consentito di aflatossina M1 nel latte nel (regolamento 2003/2174 / CE) UE è tra i più bassi del mondo, e si basa sul principio ALARA (livello più basso ragionevolmente ottenibile).

Per quanto riguarda mangimi per gli animali da latte un limite di 0,005 mg / kg (direttiva 2002/32 / CE). Questo livello è inferiore al livello senza effetto in animali bersaglio.

## **Raccomandazioni**

Come raccomandazione bisognerebbe promuovere un quadro Normativo armonizzato, modernizzare i sistemi di controllo alimentare, implementare azioni coordinate ed integrative svolte a pianificare l'intera filiera alimentare, condurre un'appropriata valutazione del rischio, fornire orientamenti specifici del settore (linee guide), educare i soggetti interessati e rafforzare le comunicazioni sul argomento. Gli approcci dovrebbero essere decisi e applicati da paese a paese.

## **Prevenzione**

La prevenzione per quanto possibile avviene attraverso il controllo di alcuni fattori favorevoli al attacco da *Aspergillus* e la contaminazione da Aflatossine.

La produzione da micotossine è stimolata da condizioni di stress della pianta e del fungo, le condizioni che contribuiscono allo stress pianta/patogeno sono le condizioni ambientali (Pioggia, Vento, Sole) di per se incontrollabili, e le condizioni dovuti a sistemi culturali come il tipo di suolo, la rotazione colturale, il periodo di semina, la scelta degli ibridi, la densità delle piante, la concimazione, il controllo dei parassiti (Piralidi) degli infestanti e dei funghi, l'irrigazione e i fattori di raccolta (umidità della cariosside).

Un'altra prevenzione avviene attraverso la "Rapid Detection" (determinazione rapida) che avviene con l'esposizione alla radiazione UV (356 nm) del mais, è un metodo di analisi rapido per stimare la composizione in aflatossine, in particolare modo la fluorescenza è associata alla produzione di Acido folico da parte di *aspergillus*.

## **CONCLUSIONE**

I governi africani devono sostenere questioni di sicurezza alimentare, come la contaminazione da micotossine, a causa della loro importanza per la salute pubblica e per commercio. Per fare ciò è necessario rafforzare la capacità di controllare efficacemente le micotossine, e per stabilire efficaci controllo sistemi alimentari attraverso una legislazione adeguata.

Semplici metodi di rilevazione delle aflatossine, come ELISA, sono ideali per i paesi in via di sviluppo in Africa, a causa della loro facilità di esecuzione e costi operativi relativamente bassi. Gli sforzi per istituzionalizzare i test delle micotossine in Africa devono essere supportate da organizzazioni internazionali come la FAO, l'OMS, AIEA, Banca mondiale, USAID e l'UE attraverso l'assistenza tecnica e finanziaria.

Qualora tali servizi siano disponibili, è necessario un sostegno costante per aggiornare i laboratori, nuovi metodi di analisi sono stati sviluppati per la sicurezza alimentare.

Sviluppare competenze nella valutazione del rischio di micotossine consentirà ai paesi africani di partecipare in modo più efficace nel commercio agricolo internazionale, rafforzando la posizione dell'Africa nel commercio alimentare globale e indirettamente contribuire alla salute della popolazione locale.