

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE VETERINARIE

Ciclo 34

Settore Concorsuale: 07/H4 - CLINICA MEDICA E FARMACOLOGIA VETERINARIA

Settore Scientifico Disciplinare: VET/07 - FARMACOLOGIA E TOSSICOLOGIA VETERINARIA

OCRATOSSINA A, METALLI, INSETTICIDI E FITOESTRATTI:
VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI E DEGLI ASPETTI RESIDUALI NEL
POLLAME E IN ALIMENTI DESTINATI ALL'UOMO

Presentata da: Alessandro Guerrini

Coordinatore Dottorato

Arcangelo Gentile

Supervisore

Paola Roncada

Co-supervisore

Annalisa Zaccaroni

Esame finale anno 2022

ABSTRACT

La presente tesi di Dottorato di Ricerca descrive le attività riguardanti diversi ambiti della sicurezza alimentare e della farmacologia e tossicologia veterinaria.

In relazione alla sicurezza alimentare è stata effettuata la ricerca di ocratossina A (OTA) in campioni di bile, rene e fegato prelevati da 102 polli provenienti da 16 allevamenti amatoriali localizzati in 6 diverse regioni italiane, e in 96 campioni di salami prodotti artigianalmente e 84 campioni di diversi tipi di formaggio acquistati in negozi dell'area bolognese. In un altro studio sono state rilevate le concentrazioni di diversi metalli (Hg, Pb, Al, Cr, Ni, As, U) in uova di 5 genotipi diversi di galline rurali di razza e ibride allevate con metodo free-range e 5 tipologie di uova provenienti da 3 sistemi di allevamento industriale.

Nella tesi sono presentati anche i dati preliminari ottenuti dai primi campioni analizzati per la ricerca del fipronil in campioni di uova e penne provenienti da allevamenti ornamentali e da autoconsumo di pollame.

In collaborazione con IZSLER (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna) è stato condotto uno studio inerente la presenza di agenti patogeni nel pollame, in particolare relativo alla prevalenza sierologica e microbiologica per *Salmonella enterica* var. *enteritidis* e *Salmonella enterica* var. *thiphymurium* in allevamenti ornamentali e da autoconsumo di pollame. Sono inoltre stati condotti studi di prevalenza e caratterizzazione di potenziali varianti per alcune malattie infettive del pollame ornamentale, (malattia di Marek, Bronchite infettiva-IBV), batteriche (Micoplasmosi) e zoonosiche (*Chlamydia* spp., *Salmonella* spp.) in collaborazione con IZS e con colleghi del Dipartimento.

È stato condotto uno studio di farmaco-sensibilità e farmaco-resistenza alle molecole di fipronil e foxim in popolazioni naturali di *Dermanyssus gallinae* (acaro rosso) al fine di valutarne una potenziale resistenza. Sempre su popolazioni naturali di acaro rosso è stato altresì testato l'effetto tossico di alcuni fitocomposti a base di tannini somministrati per aspersione e per contatto diretto, per studiarne il potenziale effetto insetticida.

Con collaborazioni interne Dipartimentali e l'IZSLER è stato effettuato uno studio in campo sul trattamento *off-label* con Fenbendazolo e Flubendazolo in infestazioni massive da *Cyathostoma bronchialis* in oche esotiche ornamentali, un parassita bronco-polmonare per il quale non esiste ad oggi un protocollo terapeutico per specie non convenzionali. Con collaborazioni esterne, in particolare con l'Università di Firenze e l'ospedale pediatrico Meyer, è stato effettuato uno studio relativo all'azione e funzionamento dei recettori Beta3, espressi nelle neoplasie più frequenti che si verificano nelle donne in gravidanza, di cui il suo blocco riduce la crescita di tumori durante lo sviluppo del feto. Lo studio è stato condotto su modello murino con uso di indometacina.

Nella tesi verranno presentati i dati preliminari ottenuti nei primi mesi di una prova sperimentale (ancora in corso) sulla gallina ovaioia di razza Livornese, allevata con metodo free-range, finalizzata allo studio della attività anti-infiammatoria e immuno-stimolante, nonché alla valutazione della sicurezza della integrazione nella dieta di due fitoestratti, *Boswellia serrata* e *Salix alba*. Oggetto dello studio sono anche le potenziali alterazioni o miglioramenti delle caratteristiche nutraceutiche del prodotto uovo, dovuto all'effetto dei fitoestratti.

INDICE

1.	INTRODUZIONE	1
1.1.	L'allevamento del pollo rurale da autoconsumo e da esposizione	1
1.2.	Esposizione di polli ornamentali	2
1.3.	Locali adibiti all'allevamento	4
1.4.	Alimentazione dei polli ornamentali e destinati all'autoconsumo	7
1.5.	Somministrazione e conservazione alimenti destinati all'alimentazione del pollame	8
1.6.	Le Micotossine	10
1.6.1.	Generalità	10
2.	LE OCRATOSSINE	13
2.1.	Sensibilità interspecifiche nelle specie aviarie, tossicocinetica e tossicodinamica di OTA nel pollo	16
2.2.	Destino della quota di OTA non assorbita	21
2.3.	Tossicità di OTA nel pollo	22
2.4.	Presenza di OTA in salami e formaggi	25
3.	ANTIPARASSITARI	27
3.1.	Il fipronil, generalità	27
3.2.	Meccanismo di azione, metaboliti e tossicità	29
3.3.	Tossicocinetica del fipronil nelle specie aviarie	31
3.4.	Potenziale presenza di fipronil e metaboliti in uova di pollame destinate all'autoconsumo	34
3.5.	Materiali e metodi	35
3.6.	Risultati e discussione	36
4.	VALUTAZIONE IN VITRO DELLA ATTIVITÀ DI FIPRONIL E FOXIM SU POPOLAZIONI NATURALI DI <i>DERMANYSSUS GALLINAE</i> DA ALLEVAMENTI RURALI/ORNAMENTALI	39
4.1.	Premessa	39
4.2.	Materiali e metodi	41
4.2.1.	Popolazioni naturali di <i>Dermanyssus gallinae</i> testati	41
4.2.2.	Soluzioni da testare	42
4.2.3.	Esecuzione del test	43
4.2.4.	Lettura e analisi dei risultati	44

4.3.	Risultati	44
4.4.	Discussione	46
5.	TOSSICOLOGIA DEI FITOESTRATTI	49
5.1.	<i>Boswellia serrata</i> e <i>Salix alba</i> : utilizzo come integratore nell'allevamento della gallina ovaioia di razza livornese con metodo rurale free-range	49
5.2.	Materiali e metodi	52
5.2.1.	Animali e ambiente di allevamento	52
5.2.2.	Alimentazione	53
5.2.3.	Valutazione delle performance produttive	54
5.2.4.	Mortalità e valutazioni comportamentali	55
5.2.5.	Valutazioni con scala roche, qualità e test microbiologici sulle uova	55
5.2.6.	Parametri biochimici	56
5.2.7.	Analisi citofluorimetrica	56
5.2.8.	Elettroforesi proteine sieriche	57
5.3.	Risultati	58
5.3.1.	Performance, mortalità e osservazioni comportamentali	58
5.3.2.	Parametri biochimici	61
5.3.3.	Analisi citofluorimetrica e rapporto h/l	62
5.3.4.	Elettroforesi proteine sieriche	64
6.	TOSSICOLOGIA DEI METALLI	67
6.1.	Metalli pesanti presenti nelle uova da consumo	67
6.2.	Materiali e metodi	69
6.2.1.	Campionamento e gestione dei campioni	69
6.2.2.	Metodo di analisi	70
6.3.	Risultati	71
6.4.	Discussione	76
7.	BIBLIOGRAFIA	81

1. INTRODUZIONE

1.1. L'ALLEVAMENTO DEL POLLO RURALE DA AUTOCONSUMO E DA ESPOSIZIONE

Sul territorio italiano ed estero, l'allevamento del pollo ornamentale e per autoconsumo (ibridi commerciali o auto-prodotti), rappresenta un circuito di "nicchia", molto lontano dall'ottica industriale. I principali scopi dell'allevamento del pollame di razza, a fini espositivi, sono i seguenti: selezione in purezza della razza, loro miglioramento genetico, salvaguardia di razze rare o recupero di razze in via di estinzione, creazione di nuove colorazioni di piumaggio all'interno della stessa razza o anche, per autoconsumo di carne e uova. La quota di animali che viene destinato all'autoconsumo o che può essere ceduta a terzi, rappresenta generalmente lo "scarto" della selezione. Queste tipologie di allevamenti rivestono a tutti gli effetti principalmente fini hobbistici, assimilabili all'allevamento di altri uccelli ornamentali quali canarini, pappagalli, ecc. In questo contesto di allevamento, il pollo viene infatti considerato dalla maggioranza degli allevatori come "pet". L'allevamento del pollame per solo e unico scopo di autoconsumo, prevede come accennato, l'allevamento di ibridi auto-prodotti o commerciali, acquistati per l'ingrasso, allevato frequentemente in numeri non irrisoni (allevamenti da 30 a 200-250 animali).

In ambito normativo, anche l'allevamento amatoriale hobbistico a scopo ornamentale rientra negli allevamenti considerati a conduzione familiare e/o da autoconsumo, ove il numero di capi allevati non supera le 250 unità. Secondo quanto previsto dalla normativa, allevamenti avicoli a conduzione familiare o a indirizzo hobbistico che non superano i 50 capi allevati, non hanno l'obbligo di registrazione in Banca Dati Nazionale (BDN), mentre se superiori a 50, l'obbligo è previsto secondo quanto emanato con la Legge 27 dicembre 2017, n. 205, in vigore dal 1° gennaio 2018. Indipendentemente dal numero allevato, è quindi obbligatoria la registrazione dell'allevamento presso la propria Azienda Sanitaria Locale (ASL). Se l'obiettivo principale e unico dell'allevamento è il solo autoconsumo o selezione in purezza delle razze, non sono previsti dalla normativa piani di autocontrollo o campionamenti ufficiali, come quelli previsti dal Piano Nazionale Residui (PNR). Tale esclusione è chiaramente specificata nel Regolamento 178/2002, che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare, nonché dallo stesso PNR. Per contro, se all'allevamento è associata la vendita diretta di uova o carne, l'allevamento stesso rientra nelle condizioni per le quali è obbligato a piani di autocontrollo microbiologici (*Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp.), al fine di tutelare la sicurezza alimentare e il consumatore nell'ambito del rischio di tossinfezioni alimentari di origine batterica, di opportuni

luoghi adibiti alla macellazione e del registro trattamenti previsto per legge. Non sono comunque previsti campionamenti ufficiali per Ocratossina A, metalli tossici o residui di antiparassitari/pesticidi.

1.2. ESPOSIZIONE DI POLLI ORNAMENTALI

Oltre all'allevamento del pollo per autoconsumo e per selezione in purezza, che ricordiamo essere lo scopo principale di questo hobby, un altro fondamentale obiettivo che ogni allevatore di razza annualmente persegue, è quello della partecipazione a mostre espositive a giudizio. Tale obiettivo prevede un intenso lavoro selettivo durante ogni anno riproduttivo, al fine di ottenere soggetti più conformi possibile alle caratteristiche della razza. Le manifestazioni sono organizzate in Italia dalle Associazioni Regionali, affiliate alla Federazione Italiana Associazioni Avicole (FIAV), coordinata dall'*Entente Européenne d'Aviculture et de Cuniculture*, sede centrale in Francia. Gli animali che vengono esposti sono censiti e provvisti di anello inamovibile di riconoscimento (Figura 1). Ogni anello riporta scritte, acronimi e numeri di serie per la corretta identificazione dell'animale e della nazione di appartenenza, in particolare: EE; Entente Européenne d'Aviculture et de Cuniculture, I; Italia, una serie di 3 o 2 numeri in ordine progressivo (es. 258, 450, ecc.), preceduti da una lettera dell'alfabeto (A, B, C, ecc.) anche esse in ordine progressivo, indicanti il numero identificativo dell'animale (es. EE I258) quindi dell'allevatore e infine, il numero di diametro dell'anello, diverso per ogni razza, come ad esempio anello calibro 12, 16, ecc. (es. EE I258 16) (Figura 2). In sede di giudizio, che avviene tramite la valutazione da parte di giudici ufficiali qualificati, gli animali vengono valutati in forma, colore, portamento, integrità e condizione del piumaggio e stato di benessere (adattabilità alla gabbia, assenza di comportamenti stereotipati, docilità e propensione ad essere maneggiati) e viene compilata una scheda di valutazione (cartellino di valutazione), descrivendo pregi, difetti ed eventualmente caratteri da migliorare a cui segue la premiazione dei soggetti vincitori (Figura 3-4).



Figura 1-2. Anelli utilizzati per l'identificazione degli animali (sinistra) e anello correttamente inserito nel tarso (destra).



3



4

Figura 3-4. Foto di esposizioni con premiazione dei soggetti vincitori.

1.3. LOCALI ADIBITI ALL'ALLEVAMENTO

Le tipologie di allevamento del pollame rurale, di razza e/o da autoconsumo, ricalcano per molti aspetti le vecchie tipologie di allevamento rurale del pollame degli anni '50. Con l'avvento delle razze allevate a scopo ornamentale per fini espositivi, negli ultimi anni l'allevamento è diventato più specializzato considerando la delicatezza a livello sanitario e soprattutto di piumaggio di alcune razze. La riproduzione avviene in modo naturale o artificiale, tramite l'ausilio di incubatrici. Indipendentemente dal metodo di allevamento utilizzato, gli animali allevati possono, come detto precedentemente, essere destinati anche all'autoconsumo. L'allevamento degli animali può avvenire:

- 1.** all'aperto, dove il pollame per tutto l'arco della giornata ha accesso all'esterno e i pollai (costruiti in legno o metallo, o prefabbricati) sono utilizzati solo per la deposizione e il riposo notturno. Il cibo viene fornito in mangiatoie esterne, protette dalle intemperie, e gli animali assumono parte del cibo anche dal pascolo e dal razzolamento (Figura 5, 6);
- 2.** in box chiusi su lettiera, dove gli animali passano la maggior parte della giornata chiusi nei pollai con paddock su lettiera costituita da truciolo o paglia e giornalmente, per qualche ora, hanno libero accesso all'esterno per il razzolamento e pascolo (Figura 7). Alimento e acqua viene sempre lasciato a disposizione in mangiatoie e abbeveratoi al chiuso;
- 3.** in box su lettiera senza alcun accesso all'esterno. Questo allevamento è tipico di alcune razze caratterizzate da tarsi calzati o piumaggi lunghi e abbondanti, come Cocincine, Brahma, razze ciuffate, Moroseta, ecc. (Figura 8, 9). Anche in questo caso, l'alimento e l'acqua di abbeverata vengono sempre lasciati a disposizione in mangiatoie e abbeveratoi al chiuso.



Figura 5. Esempio di pollai completamente all'aperto, con possibilità per gli animali di essere liberi di razzolare.



Figura 6. Esempio di libero accesso alle mangiatoie all'aperto sotto tettoie.



Figura 7. Esempio di pollai in serie su lettiera ma con paddock esterno che viene lasciato a turno a disposizione ai gruppi di animali, per il razzolamento.



8



Figura 8-9. Esempio di box chiuso su lettiera per l'allevamento di Cocincine grandi (sopra) e Moroseta (sotto), razze particolarmente delicate per il piumaggio ma abitualmente anche consumate, nel caso della Cocincina, per la produzione di carne.

1.4. ALIMENTAZIONE DEI POLLI ORNAMENTALI E DESTINATI ALL'AUTOCONSUMO

Nell'ambito delle tante razze esistenti, vi sono molte differenze nelle esigenze nutrizionali richieste dagli animali per soddisfare una regolare crescita e qualità del piumaggio secondo gli standard. Pertanto, obiettivo degli allevatori è quello di fornire la miglior dieta possibile, atta a soddisfare le esigenze degli animali ma anche la resa in carne o uova. La scelta della dieta da somministrare intesa come alimenti costituenti della formula, dei valori dei nutrienti da raggiungere e relative integrazioni, viene fatta in base alle esperienze personali di ogni allevatore, maturate durante gli anni di allevamento, sulla disponibilità di materie prime reperibili nella propria zona geografica e anche su base prettamente documentale e di scambio di esperienze con allevatori più esperti, nonché il costo. Bisogna tener conto che vi sono, oltre la razza, molti altri fattori che possono andare a influenzare la scelta di una tipologia di dieta rispetto ad un'altra, come l'ambiente, la gestione dell'allevamento, la presenza o meno di pascolo, la produzione di uova o carne, la località geografica, che condiziona le temperature estive e invernali, quindi i consumi e la necessità di diete più energetiche. Da non trascurare anche i costi da sostenere, poiché l'alimentazione rappresenta il costo di maggior rilevanza. Questo condiziona a volte l'allevatore nella scelta di integrare la dieta base di alimenti a basso costo, come ad esempio scarti da mercati ortofrutticoli o scarti casalinghi (pane, pasta, croste di formaggio, avanzi di carne e pesce ecc.). Molti allevatori per comodità si affidano a mangimi già pronti disponibili in commercio, mentre altri si dedicano alla

calibrazione e messa a punto di diete casalinghe, rappresentate da misti di granaglie e integrazioni con frutta e verdura di ogni genere e pascolo. La dieta può essere fornita solida, come mix granaglie o mangimi già formulati (Figura 10) o semi-solida, rappresentata da pastoni o brode, costituite da farine di cereali, cruscami (sottoprodotti della lavorazione dei cereali) e fioccati, con aggiunta di acqua o siero di latte, grassi vegetali o animali e integratori multi-vitaminici (Figura 11).



Figura 10-11. Mangime mix granaglie (a sinistra) e pastone di farine di cereali con olio e siero di latte (a destra).

1.5. SOMMINISTRAZIONE E CONSERVAZIONE DEGLI ALIMENTI DESTINATI ALL'ALIMENTAZIONE DEL POLLAME

L'alimento è di norma lasciato a disposizione, salvo nei casi di razze particolarmente voraci e molto pesanti che tendono all'ingrassamento eccessivo o nel caso di razze particolarmente poco fertili, in cui si attua un razionamento alimentare. La dieta semi-solida costituita da pastoni viene solitamente somministrata una volta al giorno o al massimo due, a seconda della gestione degli animali e dalla stagione. Ad accezione di quando vengono fornite diete costituite da mangimi secchi o mix granaglie, che vengono lasciati anche diversi giorni in mangiatoie solitamente a tramoggia e con dispenser, quando vengono fornite diete semi-solidi viene evitata la permanenza per lungo tempo in mangiatoia, soprattutto durante le stagioni calde per evitare eccessive fermentazioni, talvolta dannose per gli animali. A monte, può invece costituire un problema tecnico la conservazione delle materie prime (cereali) o dei mangimi, che se mal conservate, possono produrre muffe, e quindi, secondariamente, micotossine. Solitamente gli alimenti sono conservati in sacchi (Figura 12) o bidoni chiusi ermeticamente (Figura 13, 14) in luoghi più freschi e asciutti possibili (< 16-18 °C). Il recipiente di conservazione, a seconda di dove viene ubicato (locali) può influire sulla qualità e conservazione dei mangimi. Verosimilmente infatti, contenitori scuri e plastificati come bidoni ermetici mantenuti in luoghi soleggiati e poco protetti possono surriscaldarsi, alterando le

proprietà nutritive e organolettiche del mangime e favorire lo sviluppo di muffe. Stessa cosa può avvenire anche per i sacchi plastificati. Nella stagione invernale rispetto a quella estiva, caratterizzata da alte temperature e umidità, la conservazione dei mangimi e cereali è meno problematica, anche se livelli di umidità elevati tipici di alcune regioni, possono costituire un problema sia in estate sia in inverno incentivando la produzione di muffe all'interno degli alimenti. Gli allevatori non sono ad oggi ancora sufficientemente edotti e sensibilizzati al problema, che si traduce in mancate indagini, anche di laboratorio, sulla sicurezza dei mangimi che somministrano ai loro animali.



Figura 12-14. Diversa conservazione dei mangimi: sacco plastificato (12), in bidone nero (13), bidone bianco (14).

1.6. LE MICOTOSSINE

1.6.1. GENERALITÀ

Le micotossine rappresentano un gruppo eterogeneo di sostanze chimiche tossiche cosmopolite (~ 700 Da), prodotte naturalmente da alcune specie di funghi filamentosi parassiti o ubiquitari, appartenenti per la maggior parte a tre generi molto diffusi: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Zinedine et al., 2017; Manizan et al., 2018), mentre altri generi, quali *Claviceps*, *Alternaria*, *Cladosporium* o *Rhizopus* rivestono minore importanza. Tipicamente, i primi due generi si trovano comunemente come contaminanti degli alimenti durante l'essiccazione e stoccaggio, come ad esempio salumi e formaggi o cereali insilati, mentre il terzo costituisce maggiormente un agente patogeno e contaminante delle fasi prima o immediatamente successive alla raccolta dei cereali. Il termine micotossina infatti, trae origine dal greco “*mykes*” che significa fungo e “*toxicon*” che significa veleno (Turner et al., 2009). Sono composti di diversa struttura chimica, derivati principalmente dal metabolismo amminoacidico dei funghi produttori, caratterizzati da un basso peso molecolare e soprattutto, da una elevata resistenza nei confronti di agenti chimico-fisici, risultando chimicamente molto stabili, permettendo loro di persistere molto a lungo anche dopo la scomparsa del fungo (Turner et al., 2009). Seppur siano metaboliti secondari dell'attività fungina, presumibilmente, potrebbero svolgere uno o più ruoli fondamentali nell'ecologia dei funghi, oggi non ancora del tutto chiariti. Data la loro persistenza, una volta sintetizzate le micotossine possono diffondersi e contaminare alimenti di origine vegetale o animale. Quando partite di cereali sviluppano muffe produttrici di micotossine, presentano comunemente muffe di colore nerastro, grigio o bianco, talvolta verde-bluastro. La contaminazione delle derrate alimentari può avvenire direttamente o indirettamente. La contaminazione diretta prevede che le specie di funghi produttori di micotossine si sviluppino all'interno dell'alimento, come cereali, spezie ecc., sia in campo che post raccolta, quindi ad esempio durante e in condizioni di stoccaggio, e che in condizioni idonee di stress, producano micotossine diffondendole all'interno della derrata destinata all'alimentazione degli animali o dell'uomo. La contaminazione indiretta prevede che l'alimento contenga il solo prodotto del metabolismo fungino, quindi la tossina e/o suoi metaboliti. È il caso ad esempio, del latte vaccino contaminato dall'aflatossina M1, metabolita che la bovina produce a seguito dell'ingestione di alimenti contaminati da aflatossina B1, prodotta da funghi del genere *Aspergillus* spp. (*Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*) (Figura 15). La produzione delle micotossine non avviene quindi in qualunque circostanza, bensì solo se le condizioni ambientali dove il fungo si sviluppa sono favorevoli a questo processo. Devono essere presenti infatti, alcuni fattori microclimatici o di stress ambientale per il fungo che ne consentano la produzione, quali

temperatura, umidità, contenuto di acqua degli alimenti ecc., o presenza anche di fattori biologici, quali insetti e parassiti, che con il deterioramento delle cariossidi e quindi danneggiamento del substrato di crescita per il fungo, possono agevolare la produzione di tossine (Bhatnagar et al., 2002). Le muffe, a differenza dei batteri e dei lieviti, sopravvivono ad ampi range di temperature, prediligono temperature mesofile (20-45 °C) ma riescono a resistere anche a quelle di refrigerazione. Per quanto riguarda il pH, il range di sviluppo è molto ampio (2-11); prediligono, inoltre, un elevato tenore di umidità e valori molto bassi di a_w (riescono a sviluppare anche ad a_w di 0,60), motivo per il quale è facile ritrovarle in prodotti carnei insaccati e stagionati. Tuttavia, non si conoscono specie tossigene in grado di crescere con valori di $a_w < 0,78$. La produzione di micotossine, è favorita da temperature comprese tra 15-30 °C, con range differenti a seconda della specie. Tuttavia, ci sono specie in grado di crescere anche a temperature inferiori a 0 °C, come alcune specie di *Penicillium* spp. (Figura 15), in grado di sviluppare anche su pesce congelato. Convenzionalmente, le micotossine sono classificate in:

- Aflatossine
- Ocratossine
- Deossivalenolo
- Fumonisine
- Tricoteceni
- Zearalenone
- Patulina
- Citrinina

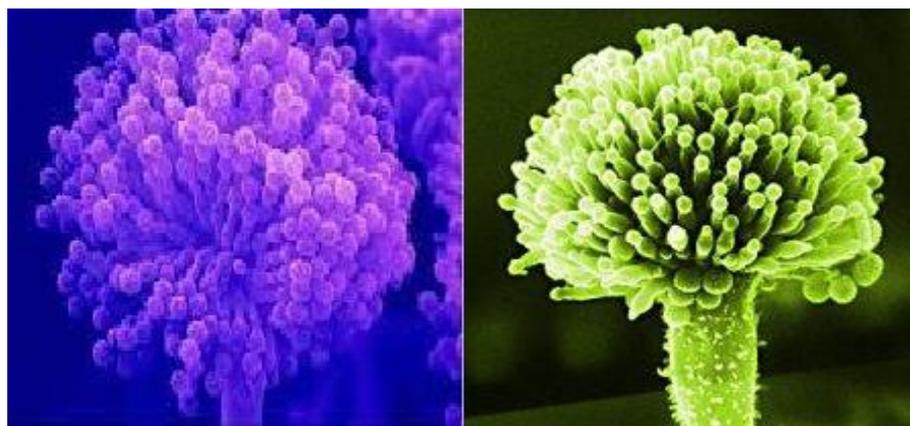


Figura 15. Funghi del genere *Penicillium* (a sinistra) e *Aspergillus* (a destra) produttori di micotossine, al microscopio elettronico.

A queste se ne aggiungono altre emergenti e ancora in fase di studio, come quelle appartenenti alla famiglia delle enniatine (prodotte dal genere *Fusarium*), tra cui la Beauvericina che possiede effetti antibiotici ed insetticidi (Jestoi, 2008); tuttavia, tra le micotossine presenti in natura ed attualmente isolate, l'aflatossina è quella considerata più pericolosa per i suoi effetti cancerogeni. Le micotossine agiscono su diversi organi bersaglio di uomo o animali, con effetti acuti o cronici in relazione alla quantità e durata dell'esposizione, agendo su vie di biosintesi e metaboliche differenti. Più specificamente, in base al loro effetto tossico (acuto o cronico) e in base all'organo o organi target, le micotossine sono classificate anche in: immunotossine, dermatossine, epatotossine e neurotossine, e anche in mutagene, cancerogene e teratogene (Krogh, 1974). Una sola micotossina ovviamente, può avere anche più di un effetto tossico (Smith et al., 1994). Il responso tossico

dovuto all'esposizione e/o ingestione di questi metaboliti secondari tramite fonti quali gli alimenti, sia per uomo sia per gli animali, viene indicato con il termine di micotossicosi. La capacità di causare effetti tossici è dovuta al fatto che queste molecole possono interagire, grazie alle loro diverse attività biologiche, con il DNA, l'RNA (Creppy et al., 1979), le proteine cellulari funzionali, i cofattori enzimatici, i costituenti di membrana ed altre strutture cellulari. Tuttavia, la gravità della micotossicosi non dipende esclusivamente dalla tossicità della micotossina ma da una combinazione di altri fattori, quali ad esempio la durata dell'esposizione ad essa, l'età dei soggetti esposti (uomo o animali), il peso corporeo, lo stato di salute e di nutrizione, l'eventuale presenza di più micotossine e gli effetti sinergici tra le stesse ed altri composti ai quali gli individui affetti sono stati esposti. Possiamo distinguere le micotossicosi in primarie e secondarie. Le prime, si verificano quando i substrati alimentari contaminati come le piante, i semi e i cereali, vengono ingeriti direttamente dall'animale o dall'uomo, producendo un effetto tossico diretto; le micotossicosi secondarie, quando gli alimenti zootecnici contaminati, utilizzati per la formulazione delle diete, vengono ingeriti dall'animale allevato. Nell'organismo animale la micotossina può essere assorbita e biotrasformata (ossidazione, glucuronazione, ecc.) e può permanere tal quale o sotto forma di metaboliti nei tessuti, quali muscolo, grasso, uova o latte, e costituire un rischio alimentare per l'uomo consumatore. Vista la considerevole quantità di alimenti che le micotossine possono contaminare, la completa assenza è quasi del tutto improbabile. Per tale motivo, negli anni, la legislazione ha mirato a cercare di stabilire un limite massimo di tossina o metabolita per ciascuna classe di alimenti, in maniera tale da garantire una soglia al di sopra della quale il prodotto non risulti più idoneo al consumo. Stesso obiettivo è stato perseguito per il controllo del contenuto di micotossine nei mangimi destinati all'alimentazione degli animali da produzione. Le normative sono realizzate, sulla base degli effetti tossici noti e dell'alimento considerato. La valutazione dei rischi viene effettuata dal JEFCA (Joint Expert Committee on Food Additives), corpo consultivo scientifico della FAO e del WHO, ed ente internazionale assieme all'EFSA. La valutazione dei dati tossicologici, normalmente, risulta nella stima di un PTDI (Provisional Tolerable Daily Intake - Ingestione giornaliera tollerabile provvisoria). Per le micotossine accertate cancerogene non si stabilisce un PTDI ma si raccomanda di ridurre la contaminazione con il criterio ALARA (As Low As Reasonably Achievable) che è definito come "la concentrazione di una sostanza che non può essere eliminata da un alimento senza richiedere lo scarto dell'alimento nel complesso o senza compromettere severamente la disponibilità delle maggiori domande di alimento". La circolare del 9 Giugno del 1999, N.10, infatti, riporta i valori massimi ammissibili del Reg. (CE) n.1525/98, ed i valori massimi ammissibili di micotossine indicati in prodotti alimentari. I valori riportati nella circolare sono stati modificati dall'attuale Reg. (CE) 1881/2006, ma restano in vigore per quelle

matrici o quelle micotossine non contemplate nello stesso. Per i prodotti destinati all'alimentazione umana, le micotossine sono normate a livello comunitario dal Reg. (CE) N. 1881/2006, relativo alla definizione di alcuni tenori massimi di contaminanti nei prodotti alimentari. Questo regolamento abroga il Reg. (CE) n. 466/2001 e le sue successive modifiche. Il 28 settembre 2007 è stato pubblicato, sulla gazzetta ufficiale dell'Unione Europea, il Regolamento 1126/07 che modifica il Regolamento 1881/2006 con i nuovi tenori massimi di Deossinivalenolo, Zearalenone e Fumonisine nei prodotti alimentari. Le micotossine nei prodotti destinati all'alimentazione degli animali, invece, sono normate a livello comunitario dalla Direttiva 2000/32/CE (e successive modifiche, Direttiva 2003/57/CE, Direttiva 2003/100/CE) sulla presenza di Aflatossina B1, e dalla Raccomandazione del 17 agosto 2006 sulla presenza di Deossinivalenolo, Zearalenone, Ocratossina A, tossine T-2 e HT-2 e Fumonisine. Questi regolamenti prendono in considerazione tutte le derrate alimentari provenienti dall'industria alimentare e zootecnica, convenzionalmente commercializzati nella Grande Distribuzione Organizzata (GDO), escludendo da controlli ufficiali tutti gli alimenti autoprodotti, quindi destinati all'autoconsumo.

2. OCRATOSSINE

Le ocratossine furono isolate per la prima volta nel 1965 in Sud Africa, da un ceppo di colture di *Aspergillus ochraceus*, da cui deriva il loro nome (van der Merwe et al., 1965). Queste tossine sono un gruppo di metaboliti secondari strutturalmente simili, prodotti da due generi principali di muffe: *Aspergillus* e *Penicillium* (Ringot et al., 2006; Liuzzi et al., 2017). Le due specie più rappresentative sono *A. ochraceus* e *P. verrucosum*, ma possono essere prodotte anche da *A. niger*, *A. carbonarius*, *P. viridicatum* e *P. nordicum* (Battilani et al., 2010). Chimicamente, le ocratossine costituiscono un gruppo di derivati dell'isocumarina, strettamente collegati tra loro, legati al gruppo amminico della L-β-fenilalanina.

L'OTA, il cui nome IUPAC è [(3R)-5-cloro-8-idrossi-3-metil-1-oxo-7-isocromanil] carbonil)-3-fenil-L-alanina, la formula bruta C₂₀H₁₈ClNO₆, e il peso molecolare 403,8, dal punto di vista chimico, è costituita da acidi organici deboli con una frazione diidroisocumarina unita da un legame peptidico alla 1-fenilalanina (Figura 16). Si presenta sotto forma cristallina, incolore, è solubile nei solventi organici polari quali etanolo, metanolo o cloroformio, è poco solubile in acqua (circa 0,42 mg/L a 25°C) (Boudra et al., 1995; Cole et al., 2003) ma liposolubile. L'OTA è un acido organico debole e possiede una intensa fluorescenza verde se viene esposta a raggi UV in un mezzo acido, fluorescenza blu in un mezzo alcalino (Bredenkamp et al., 1989; Steinbruck et al., 2008). La principale via biosintetica dell'OTA da parte dei funghi non è stata completamente chiarita. Tuttavia, è noto che la frazione di fenilalanina origina dalla via di sintesi dello shikimato (acido

shikimico), mentre la frazione diidrosocumarina dalla via del polichetide (pentaketide) (Andre & Ali, 2010). Quest'ultima via di sintesi può differire tra le diverse specie *Penicillium* e *Aspergillus*. La sua sintesi è generalmente successiva alla raccolta dei cereali, quindi durante la fase di stoccaggio (Yiannikouris & Jouany, 2002). Il gruppo delle ocratossine è costituito da: ocratossina A (OTA), il suo estere metilico, il suo estere etilico conosciuto come ocratossina C (OTC), la 4-idrossiocratossina A (4-OH OTA), l'ocratossina B (OTB) ovvero la forma non clorurata e i suoi esteri, e l'ocratossina α (OT α) (metabolita inattivo dell'OTA). Tra queste, l'OTA è quella più diffusa e dotata di maggior tossicità (Luzzi et al., 2017). Una caratteristica particolare della struttura dell'OTA è il sostituente del cloro, che sembra essere importante per esplicitare la sua tossicità. Altre micotossine ad esse correlate possono essere prodotte da funghi produttori di OTA ma come esteri metilici di OTA e OTB, quali acido diidroisocumarico libero o ammido di OT α , con serina, idrossiprolina e lisina (Malir et al., 2016). L'OTA, classificata dallo IARC (International Agency for Research on Cancer) già nel 1993 nel gruppo 2B come potenziale cancerogeno per l'uomo, in quanto accertato cancerogeno in animali da laboratorio (IARC, 1993), è quella che maggiormente viene rinvenuta negli alimenti destinati sia all'uomo che animali. In alcune circostanze, in particolare in prodotti fortemente colonizzati da funghi produttori di ocratossine, si può ritrovare anche l'OTB (Visconti & Bottalico, 1983).

L'OTB ha scarsa tossicità rispetto alla stessa OTA o anche all'OTC, che può, tra l'altro, essere pericolosa e tossica quanto la OTA, ma raramente viene ritrovata (O'Brien & Dietrich, 2004). Le specie di *Aspergillus* possono però produrre OTA e OTB contemporaneamente, come avviene spesso per le colture di *A. ochraceus* che avviano una produzione associata alla crescita di OTA e OTB, in cui la resa e il rapporto tra le due dipende dalle condizioni di coltura. Infatti, una complessa interazione tra diverse fonti di carbonio, mezzi basali e fonti di azoto sembra essere cruciale nella produzione maggiore di una o dell'altro tipo di ocratossina (Harris & Mantle, 2001; Abbas et al., 2009). Spesso, la quantità di OTB prodotta è notevolmente inferiore a quella di OTA, con rapporti di produzione (OTA/OTB) variabili da 2:1 fino a rapporti di 34:1, quando vengono prodotte entrambe. Esperimenti di fermentazione in laboratorio con *A. ochraceus* hanno portato a rese molto elevate (fino a 10 mg/g) di OTA e OTB (Hesseltine, 1972; Mantle & Chow, 2000). Sempre in condizioni sperimentali, è stato notato che il metabolita intermedio OT β , può essere biotrasformato in modo molto efficiente sia in OTA che in OTB, mentre il metabolita OT α , può essere biotrasformato solo in OTA. Inoltre, l'OTB è scarsamente convertito (solitamente intorno all'1,5%) in OTA, ma allo stesso tempo, OTB può essere prodotto dalla dechlorazione dell'OTA (Harris & Mantle, 2001). Tuttavia, poiché l'OTA utilizzata negli studi metabolici è di origine fungina e solo molto raramente viene anche analizzato il potenziale contenuto di OTB, diviene

difficile discriminare l'OTB introdotto come contaminante insieme all'OTA da quella derivante dal metabolismo dell'OTA stessa, quindi come suo metabolita. Questo influenza quindi anche il quantitativo di metaboliti prodotti. L'OTA è una molecola abbastanza stabile. Il suo punto di fusione si aggira intorno ai 168-173 °C (Koszegi & Povero, 2016) e non si degrada quando sottoposta alla maggior parte dei processi tecnologici che si possono effettuare sui prodotti alimentari, in particolar modo, la resistenza si ha nei confronti dell'ebollizione, della cottura, della torrefazione e della fermentazione, e resiste anche a condizioni di spiccata acidità. Si ritrova ampiamente nei cereali, nel caffè, che risulta essere uno degli alimenti maggiormente contaminati (EC, 2002; Cramer et al., 2008; EFSA, 2020), vino, liquori, frutta secca tra cui le noci (Fink-Gremmels, 2005; Gagliano et al., 2006), medicinali a base di erbe (Shim et al., 2014) spezie secche quali peperoncino, pepe, paprika, chili e tea (Fazekas & Kovács, 2005; Hierro et al., 2008; Santos et al., 2010; Ahn et al., 2010; Iqbal et al., 2013; Ham et al., 2016) ma anche spezie fresche quali peperoni dolci (Gambacorta et al., 2018), alimenti coloranti e integratori alimentari vegetali (Solfrizzo et al., 2015). È stata rinvenuta persino in acqua in bottiglia (Mata et al., 2015). In alcuni studi, l'OTA è stata ritrovata anche nelle uova (Piskorska-Pliszczynska & Juskiewicz, 1991; Iqbal et al., 2014; Paoloni et al., 2018). Nel lavoro di Armorini et al. (2015), non è stata rilevata OTA nelle uova deposte da galline alimentate con dieta contaminata, deducendo che il bioaccumulo nelle uova è dipendente dalla concentrazione assunta dall'animale che tanto più è alta tanto più è possibile ritrovarla nel tuorlo (Battacone et al., 2010; Bozzo et al., 2011). Concentrazioni di OTA piuttosto importanti sono state rilevate persino nel latte umano. Secondo uno studio infatti, 84 di 87 campioni di latte umano (96,6%) sono stati trovati positivi per OTA con concentrazioni medie di $24,57 \pm 13,6$ ng/L (Parvin et al., 2014). In un altro studio condotto da Munoz et al. (2014), concentrazioni di OTA sono state rilevate anche nel colostro umano, con concentrazioni più elevate in quest'ultimo che nel latte vero e proprio, a causa della maggior concentrazione di proteine che ha il colostro rispetto al latte. L'ampia presenza di OTA e la sua elevata stabilità termica rende molto difficile l'eliminazione dell'OTA dalla catena alimentare (Frantisek et al., 2016). Data la sua tossicità, l'OTA è soggetta a normativa sia a livello nazionale che internazionale, secondo quanto previsto dalla Raccomandazione della Commissione 2006/576/CE del 17 agosto 2006 sulla presenza di OTA nei prodotti destinati all'alimentazione degli animali (Unione Europea, 2006) e quindi il limite per l'OTA nei mangimi. Sono stati stabiliti valori guida per l'OTA nelle materie prime destinate alla produzione di questi ultimi, in particolare nei cereali e prodotti a base di cereali utilizzati (0,25 mg/kg), per i mangimi complementari e completi per suini (0,05 mg/kg) e per il pollame (0,1 mg/kg). Per contro, se a livello europeo un valore massimo pari a 0,05 mg/kg è stato stabilito in mangimi complementari o completi per suini, un valore massimo non è stato fissato in

carne e prodotti a base di carne ottenuti dagli stessi, quali ad esempio i salumi freschi o stagionati. In Italia, il Ministero della Salute nel 1999, ha fissato un valore guida pari a 1 µg/kg nella carne suina e nei prodotti da essa derivati.

Uno degli obiettivi di questa tesi è stato quello di verificare la presenza di OTA nei polli destinati all'autoconsumo, oggi ancora non valutata da nessuno studio, utilizzando la bile come biomarker e ipotizzando un potenziale rischio per il consumatore derivato dal consumo di carne contaminata. Tale valutazione è di fondamentale importanza in quanto questi prodotti, come già accennato, non sono soggetti a controlli ufficiali, ma commercializzabili in piccoli circuiti anche al di fuori del distretto familiare. Altresì, la presenza di OTA è stata indagata anche in salumi, in particolare salami provenienti da diverse regioni d'Italia, e formaggi grattugiati, acquistati nella GDO, considerando i pochi dati presenti in bibliografia sulla presenza della tossina in questi alimenti destinati all'uomo, come evidenziato anche in alcune opinioni EFSA.

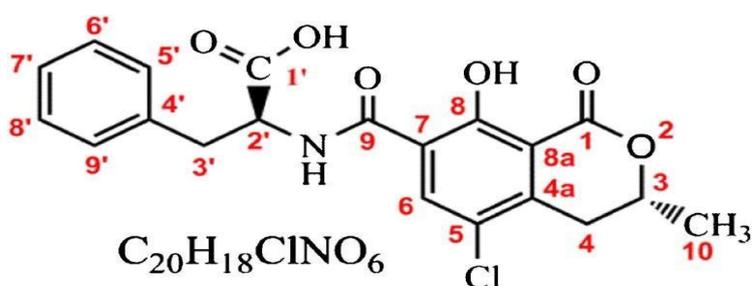


Figura 16. Struttura chimica dell'OTA.

2.1. SENSIBILITÀ INTER-SPECIFICHE NELLE SPECIE AVIARIE, TOSSICOCINETICA E TOSSICODINAMICA DI OTA NEL POLLO

Il pollame è noto per essere la categoria zootecnica meno sensibile agli affetti tossici dell'OTA, diversamente dal suino che invece, risulta essere la specie maggiormente sensibile tra i mammiferi (Stoev et al., 2002; Altafini et al., 2017; EFSA, 2020). In bibliografia, sono presenti diversi studi, seppur datati, che individuano per le diverse specie di pollame più comunemente allevate i valori di *DL50*. Sono note ampie differenze di sensibilità tra le diverse specie aviarie, con valori di *DL50* pari 0,5 mg/kg per le anatre, 3,3 mg/kg nel broiler (pollo da carne), 5,9 mg/kg nel tacchino e di 16,5 mg/kg nella quaglia (Ghimpeteanu et al., 2012; EFSA, 2020). Questi valori indicano una maggiore sensibilità nelle anatre, o in generale per gli anatidi (Prior et al., 1976), rispetto a polli, tacchini e quaglie. Per contro invece, l'OTB, molto meno comune e tossica rispetto

a OTA, ha mostrato valori di *DL50* nei pulcini di 1890 µg di OTB (54 mg/kg) rispetto a una *DL50* di 120 µg (circa 3,5 mg/kg) per OTA (Peckham et al., 1971). Polli e galline ovaiole allevati con metodi tradizionali e intensivi, o allevati per l'autoconsumo con metodo rurale, entrano in contatto con la tossina assumendo diete contaminate, o perché mal conservate (cereali e mangimi) o perché integrate con avanzi casalinghi, anch'essi contaminati (residui di frutta e verdura, avanzi carnei ecc.). Rimangono dubbi sulla possibilità degli animali di assumere la tossina dall'ambiente (frutti selvatici, sementi, ecc.) durante il razzolamento, in quanto convenzionalmente allevati all'aperto.

La tossicocinetica di OTA nel pollo è riassunta schematicamente in Figura 17. Successivamente all'assunzione per via orale, l'OTA viene rapidamente assorbita per diffusione passiva, e velocemente metabolizzata (Biró et al., 2010; Grenier e Applegate, 2013). Nel pollo, una quota di OTA viene assorbita direttamente anche a livello gastrico, in particolare nello stomaco ghiandolare (Grenier e Applegate, 2013). L'assorbimento di OTA nel pollo è generalmente basso ma avviene molto rapidamente (Galtier et al., 1981). La biodisponibilità è di circa il 40% della quota ingerita, rispetto al 60-66% che si evidenzia per il suino (Galtier et al., 1981). La quota prontamente assorbita raggiunge la circolazione sistemica (Figura 17, frecce rosse), dove si lega in alta percentuale (circa il 99 %) alle proteine plasmatiche, in modo particolare alle albumine (Heussner et al., 2002; Ringot et al., 2006; Hagelberg et al., 2010). Questo legame è altresì favorito per la formula chimica di OTA, in quanto acido debole. Giunta nella circolazione sanguigna, si distribuisce in tutti i tessuti e organi, in particolare reni, fegato (Figura 17, cerchio blu), muscolo e tessuto adiposo, indicandone un'ampia distribuzione tissutale (Gareis et al., 2000). Il legame con le albumine sembra contribuire alla permanenza della micotossina per tempi lunghi nell'organismo animale, essendo difficilmente metabolizzata ed escreta, in particolar modo dal rene (Figura 17, cerchio rosso). I valori di clearance plasmatica molto elevati (Schiavone et al., 2008) indicano una elevata biotrasformazione ed eliminazione della tossina. Giunta nel fegato (Figura 17, cerchio blu), l'OTA è soggetta a metabolizzazione e successivamente a escrezione biliare. Diversamente da altre specie, quali suino e coniglio (Galtier et al., 1981), nel pollo la tossina è soggetta a circolo enteroepatico (O'Brien & Dietrich, 2005; Armorini et al., 2015), ragione per cui viene escreta dal fegato, concentrata nella bile e nuovamente riassorbita a livello del piccolo intestino, a seguito dello svuotamento della cistifellea durante la digestione (Figura 17, cerchio blu). Nel pollo e nella gallina, lo svuotamento della cistifellea dalla bile avviene piuttosto rapidamente e in modo costante, considerando che l'assunzione di alimento è continua durante l'arco della giornata. Infatti, il tratto intestinale (gozzo, stomaco ghiandolare, stomaco muscolare e intestino) risulta essere sempre repleto nell'arco della giornata, con uno svuotamento completo dell'apparato digerente in 8-16 ore a seconda del tipo di alimento assunto. La bile e gli urati, che rappresentano per gli uccelli l'analogo

delle urini dei mammiferi, costituiscono le principali vie di eliminazione di OTA e suoi metaboliti. La bile, in particolare, rappresenta un valido bio-marker per la valutazione della esposizione del pollame alla tossina (Armorini et al., 2015). Nel fegato, come accennato, OTA è soggetta a metabolizzazione. Pochi studi in merito sono stati effettuati sul metabolismo di OTA nel pollo e nella gallina ovaioia. La biotrasformazione della tossina avviene ad opera del citocromo P450 (CYP450) e sue isoforme (Gross-Steinmeyer et al., 2002), sia nell'uomo che negli animali. OTA può essere soggetta a reazioni di fase I ma anche di fase II (Størmer et al., 1981; Størmer et al., 1983). Le reazioni di fase I sono molto probabilmente correlate all'azione della famiglia di enzimi CYP450, portando alla formazione di intermedi metabolicamente attivi, responsabili anche dell'azione cancerogena e di altri effetti tossici. Ad esempio, in uno studio condotto da Omar et al. (1996), è stato dimostrato che le isoforme del citocromo P450 denominate IA1/IA2, IIB1 e IIIA1/IIIA2 sono coinvolte nella formazione del metabolita 4(R)-OH-OTA, ma si è anche evidenziato che l'isoforma P450-IIB1, viene coinvolta anche nel processo di detossificazione. La tossina è sottoposta a 4 reazioni di metabolismo principali: idrolisi, idrossilazione, dechlorazione e coniugazione (Wu et al., 2011; EFSA, 2020). A livello epatico e anche renale, confermato da esperimenti sia *in vitro* che *in vivo*, oltre alla escrezione di OTA immodificata, il pollo produce a seguito di biotrasformazione, fino a 8 metaboliti principali (Figura 18), convenzionalmente indicati e numerati da M1 a M8, escreti poi con le feci e gli urati (Figura 17, cerchio rosso). Nelle feci, la tossina in forma immodificata si può riscontrare fino al 56,6% (Galtier et al., 1979). Vengono prodotti per primi due metaboliti idrossilati che includono gli epimeri 4(R)-OH-OTA e 4(S)-OH-OTA, rispettivamente indicati come M2 e M1, prodotti nel rene (Størmer et al., 1981; Størmer et al., 1983) e anche dal fegato dall'azione di vari citocromi P450 (Størmer et al., 1981; Størmer et al., 1983), di cui l'isomero 4(R) risulta essere quello prodotto in maggior quantità tra i due. Quantità considerevoli di un terzo metabolita prodotto nel fegato, presente nella bile e escreto poi con le feci, è il 7'-OH-OTA (7'-idrossi-ocratossina A, M3). Viene prodotto nei microsomi epatici, anche nell'uomo e nel ratto (Figura 4), risultando il principale metabolita prodotto e in maggior quantità dal pollo. La notevole quantità di 7'-OH-OTA prodotto, suggerisce che l'idrossilazione nella frazione fenilalaninica dell'OTA, sia per il pollo la principale via metabolica nonché fondamentale strumento di detossificazione da OTA (Yang et al., 2015). Produce inoltre altri due metaboliti idrossilati, quali 5'-OH-OTA (5'-idrossi-ocratossina A, M5) e 9'-OH-OTA (9'-idrossi-ocratossina A, M4), prodotti per idrossilazione della catena laterale del benzene (Yang et al., 2015). Questi due metaboliti sono stati rinvenuti entrambi nelle feci di pollo ma dei due, solo il metabolita M4 è stato ritrovato anche nella bile. In ultimo, viene prodotto anche OTB (M6) come metabolita dechlorato (Galtier et al., 1979), escreto dal fegato con la bile e poi con le feci. Viene escreto anche dal rene,

quindi in seguito con gli urati. Nelle feci, ma non nella bile, il pollo elimina anche altri due metaboliti idrossilati da OTB, quali gli isomeri (4*S*)-OH-OTB (M7) e (4*R*)-OH-OTB (M8) (Figura 4) (Yang et al., 2015). Diversamente da quanto avviene nel ratto o nel topo, il pollo sembra non produrre coniugati glucuronidi da OTA, derivati dalla idrossilazione della stessa in condizioni alcaline con conseguente apertura dell'anello lattonico, che porta alla produzione di metaboliti altamente tossici più della molecola madre, noti come OP-OTA, ne produce OTQ o idrochinoni (Xiao et al., 1996), che invece vengono prodotti dal fegato nel coniglio, da OTB e non da OTA (Mally et al., 2005). In generale, l'escrezione di OTA e metaboliti nel pollo avviene più velocemente che nei mammiferi, portando ad un bioaccumulo relativamente più limitato. OTA e metaboliti permangono nei tessuti per un tempo variabile, dipendente dalla concentrazione di tossina assunta e dal tempo di esposizione. Più specificamente, l'emivita di eliminazione ($t_{1/2}$) dell'OTA nei polli è significativamente più breve di quella dei suini, circa 20-22h vs 72-120h (Hagelberg et al., 1989; Devreese et al., 2018) traducendosi, almeno teoricamente, a una minore esposizione sistemica della tossina. La quota non inattivata che raggiunge i reni, viene escreta dal rene tramite trasportatori, in particolare anioni organici, noti come polipeptidi trasportatori di anioni organici (OATP) (Anzai et al., 2010). Questa particolarità è dovuta al fatto che il legame di OTA con l'albumina limita fortemente la filtrazione glomerulare della stessa; tuttavia, la piccola frazione che riesce ad essere filtrata, può essere riassorbita nelle cellule dei tubuli renali, a livello dei nefroni. I trasportatori di anioni organici svolgono un ruolo nel riassorbimento urinario di OTA, che si traduce in persistenza, accumulo renale e tossicità. La nefrotossicità infatti, dovuta alla difficile escrezione renale che caratterizza la tossina, è il principale effetto tossico apportato da OTA (Anzai et al., 2010). Il pollo come tutti gli uccelli, elimina con le feci anche gli urati. La quota di tossina immodificata ed eliminata con feci e urati potrebbe, almeno solo sulla base di ipotesi empiriche, costituire una fonte di riassunzione di OTA da parte degli animali, soprattutto per il pollame che etologicamente possiede abitudini coprofaghe, prolungando così il periodo di esposizione degli animali alla tossina.

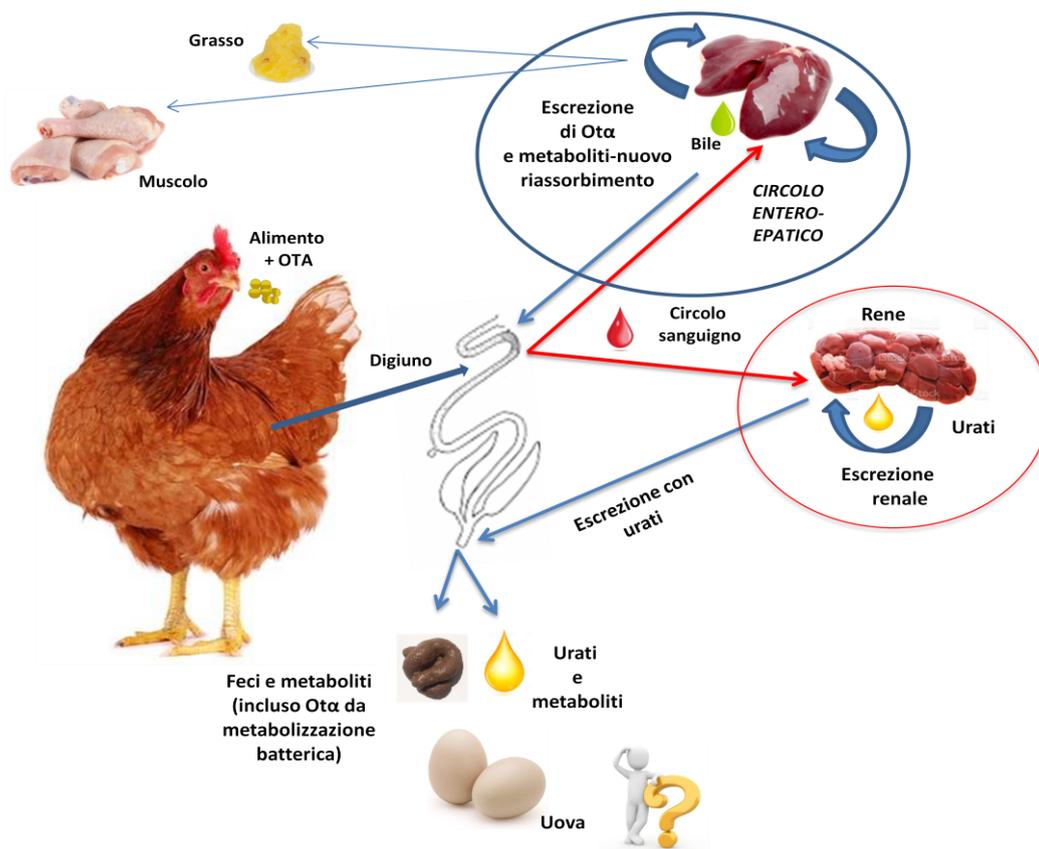


Figura 17. Schema semplificato della tossicocinetica di OTA in *Gallus gallus domesticus*.

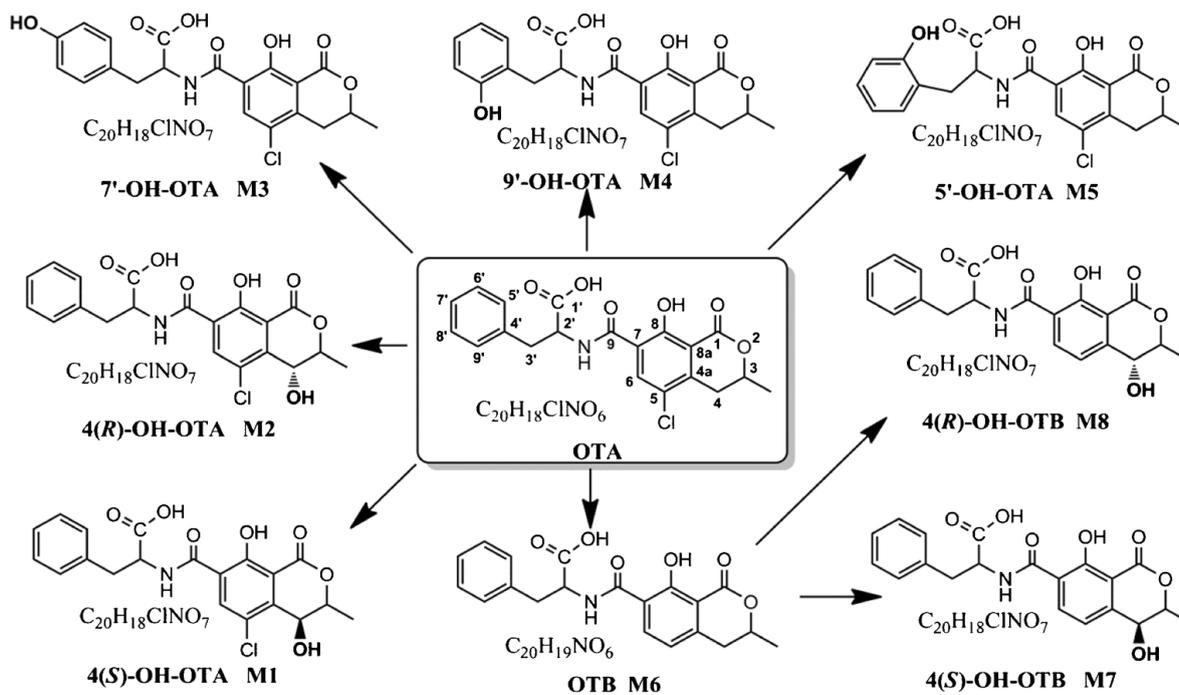


Figura 18. Metaboliti derivanti dal metabolismo dell'OTA nel pollo.

2.2. DESTINO DELLA QUOTA DI OTA NON ASSORBITA

A livello del tratto digerente, la quota non assorbita viene sottoposta ad idrolisi sia enzimatica, grazie a reazioni catalizzate da enzimi quali tripsina, α -chimotripsina e carbossipeptidasi A, a livello dei diversi comparti gastro-intestinali, sia a idrolisi diretta da parte della microflora batterica (Galtier et al., 1979; Omar et al., 1996; Abrunhosa et al., 2006; Wu et al., 2011). In uno studio condotto da Suzuky et al. (1977), hanno dimostrato che la maggior attività di idrolisi è posseduta dal pancreas, ileo e duodeno, mentre risulta scarsa a livello epatico e renale. L'idrolisi comporta la scissione del legame ammidico tra fenilalanina e acido diidroisocumarico, producendo un metabolita di bassa tossicità noto come OT α (Yang et al., 2015). La bassa tossicità è imputabile alla frazione isocumarina della molecola che singolarmente, una volta scissa, non è dotata di potere tossico ma per esercitarli, deve essere legata alla fenilalanina (Creppy et al., 1983; Xiao et al., 1996). La formazione di OT α è da ritenersi per il pollo una prima via di detossificazione dall'OTA (Yang et al., 2015). La produzione di questo metabolita è quindi importante anche per limitare i danni tossici a livello intestinale e per limitare la microflora intestinale, considerando che nel pollo, la sola microflora fermentante (specie batteriche cellulololitiche ecc.) è minima. La tossicità di OTA può essere a livello del tratto digerente anche maggiore di quella esplicita in altri tessuti. Molti studi infatti, hanno dimostrato che nel tratto intestinale del pollo, la tossina può deteriorare irreversibilmente l'integrità della barriera intestinale sopprimendo le proteine a giunzione (Tight Junction Proteins - TJP), come occludina e claudina (Ruan et al., 2019; Wang et al., 2019; Yang et al., 2020), aumentando la permeabilità intestinale con conseguenti danni tissutali e peggioramento delle performance negli animali allevati. In altre specie diverse dal pollo però, la produzione del metabolita OT α avviene anche in altri tratti dell'intestino; ad esempio, nei ratti, avviene ad opera dei batteri anaerobici del cieco e dell'intestino crasso (Galtier, 1991; Galtier & Alvinerie, 1976), nei bovini invece nel rumine, ad opera dei protozoi ruminanti, la cui attività è tanto più efficiente a seconda della tipologia di dieta assunta. Se ne deduce quindi che l'idrolisi può avvenire anche in condizioni di pH differenti, a seconda del tratto intestinale e del tipo di microflora coinvolto. Il metabolita OT α viene infine escreto con le feci (Figura 17). Ad oggi, non è stato studiato se a seguito dell'ingestione della tossina da parte del pollo o della gallina ovaioia, una quota possa essere assorbita direttamente o idrolizzata enzimaticamente con conseguente produzione del metabolita OT α a livello di distretti gastrici intermedi quali il gozzo, prima di giungere allo stomaco ghiandolare. Si ricorda infatti che funzionalmente, il pollo è considerato un monogastrico, seppur dal punto di vista strettamente anatomico, sia oggettivamente un poligastrico.

2.3. TOSSICITÀ DI OTA NEL POLLO

L'OTA è nota per i suoi effetti nefrotossici, mutageni, cancerogeni, teratogeni e immunosoppressivi, sia negli animali e nell'uomo (Huff et al., 1975; Marin-Kuan et al., 2006; Solcan et al., 2013; Malir et al., 2013; EFSA, 2020). Proprio per quanto concerne quest'ultimo, è stato ipotizzato il possibile ruolo di OTA nella comparsa di nefropatie e tumori uroteliali, e nella sua possibile implicazione nella eziopatogenesi della Nefropatia Endemica dei Balcani o BEN (Balcan Endemic Nephropathy) (EFSA, 2020), prevalentemente diffusa in alcune aree rurali di Bulgaria, Bosnia, Croazia e Romania. A sostegno di questa ipotesi, sono le caratteristiche eziopatogenetiche che la BEN condivide con le nefropatie indotte da OTA nei suini. Tuttavia, studi recenti hanno dimostrato che anche altre sostanze tossiche, come l'acido aristolochico o la citrinina, possono esserne la causa, in quanto mostrano lesioni istologiche renali molto simili a quelle rilevate nella BEN. Dunque, l'OTA potrebbe non essere la sola causa della nefropatia endemica balcanica, bensì agire in sinergia con queste altre sostanze tossiche (Pfohl-Leszkowicz et al., 2007). L'effetto nefrotossico è stato dimostrato in tutte le specie di mammiferi, e i danni osservati nelle cellule epiteliali dei reni ma anche del fegato, sono imputabili alla via di eliminazione dell'OTA stessa, tenendo conto del circolo enteroepatico e della via epatobiliare di escrezione della tossina (Schaaf et al., 2002). La nefrotossicità infatti, è il principale danno causato da OTA, considerando che lo stesso rene costituisce l'organo target della tossina. In tal modo, questa micotossina può esercitare anche effetti cancerogeni diretti su questi organi (O'Brien & Dietrich, 2005). Nel pollo, è stato dimostrato che l'esposizione cronica a OTA, causa adenocarcinomi e carcinomi epatici e renali, linfomi e linfosarcomi (Stoev, 2010).

Il meccanismo di tossicità dell'OTA è molto complesso, ed oggi ancora oggetto di studio. In generale, include la formazione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS), quindi stress ossidativo a cui è associata la perossidazione degli acidi grassi, in particolare quelli polinsaturi (Schaaf et al., 2002). La formazione di radicali liberi, induce danno cellulare e apoptosi, per alterazione dei sistemi di difesa cellulare costituiti dagli antiossidanti. Lo stress ossidativo indotto da OTA ha un effetto sulle difese antiossidanti sia enzimatiche che non enzimatiche (Cavin et al., 2007), e modula anche l'espressione del gene e della proteina Nrf2, che regola a sua volta l'espressione della risposta antiossidante (Kövesi et al., 2019). In risposta a un elevato livello di ROS che si vengono a formare, in particolare in fegato e reni, la proteina Nrf2 induce l'espressione di enzimi antiossidanti, componenti chiave della via di biosintesi del glutatione (GSH), che OTA sembra addirittura sopprimere (Kövesi et al., 2019). Nel pollo, alcuni studi hanno dimostrato che radicali liberi si formano prevalentemente nel rene e nel fegato ma non nel sangue.

Considerando la struttura chimica della tossina, simile all'aminoacido fenilalanina, OTA può alterare anche la sintesi proteica influenzando negativamente sulle prestazioni zootecniche, quali la resa in peso e l'indice di conversione alimentare (Dirheimer & Creppy, 1991). Secondo alcuni studi, la somministrazione di mangime contaminato da OTA a polli da carne (2,5 mg di OTA/kg) ha causato una significativa riduzione dell'aumento di peso corporeo con aumento considerevole dei reni (Gentles et al., 1999), mentre non si assistono a variazioni di peso e dell'indice di conversione alimentare in polli alimentati con dieta contaminata in ragione di 0,1 mg/kg di OTA (Pozzo et al., 2012). L'esito delle prestazioni zootecniche è da imputare ai danni che la tossina esercita sull'apparato gastro-intestinale del pollo e della gallina. L'epitelio del tratto digerente contiene enterociti, cellule enteroendocrine e caliciformi nei villi, e cellule di Paneth, che si trovano sotto le cripte. L'epitelio funge da barriera per bloccare l'ingresso di agenti patogeni, tossine e antigeni estranei, ma soprattutto svolge un ruolo importante nell'assorbimento dei nutrienti, compreso quello di elettroliti e acqua attraverso la sua membrana permeabile selettiva (Maresca et al., 2001). Le proteine di giunzione strette (TJ) e aderenti, sono responsabili del legame meccanico delle cellule tra di esse. Le giunzioni strette controllano lo spazio intercellulare e regolano il trasporto ionico paracellulare selettivo dei soluti (Capaldo et al., 2014), e sono importanti come barriere per il mantenimento della permeabilità epiteliale intestinale (Buckley e Turner, 2018). Nel pollo, le cellule epiteliali intestinali vengono esposte ad OTA generalmente attraverso il mangime contaminato. Le cellule epiteliali dell'esofago e del tratto gastrico quale gozzo e stomaco ghiandolare e muscolare, possono essere direttamente danneggiate come precedentemente menzionato, portando facilmente a disfunzione gastrointestinale, squilibrio microbico intestinale, malnutrizione, diarrea, vomito, infiammazione e, infine, peggioramento delle prestazioni di crescita (Ruan et al., 2019; Wang et al., 2019). Molti studi hanno dimostrato che l'OTA può distruggere l'integrità della barriera intestinale sopprimendo le proteine TJ (Ruan et al., 2019; Wang et al., 2019; Yang et al., 2020). L'aumento della permeabilità intestinale, a sua volta, favorisce il passaggio di popolazioni batteriche comprese quelle potenzialmente patogene (Kelly et al., 2015). Insieme, l'OTA potrebbe distruggere le TJ, come sottoregolare l'espressione dei geni e delle proteine TJ e aumentare il contenuto sierico di lipopolisaccaridi, aumentando così la permeabilità intestinale (Cafsi et al., 2020). Nei polli è stata osservata una diminuzione dell'altezza dei villi in combinazione con un aumento della necrosi e dell'apoptosi (Solcan et al., 2015). In particolare, l'OTA diminuisce il rapporto altezza dei villi/profondità della cripta e le cellule caliciformi del duodeno, del digiuno e dell'ileo, con necrosi dei ciechi e sfaldamento della mucosa. Negli avicoli, è stato notato che la prima espressione della tossicità dell'OTA è l'immunosoppressione, che può manifestarsi clinicamente prima che si manifesti la nefropatia (Aleo et al., 1991). Un effetto

immunosoppressivo è stato riscontrato anche al livello massimo proposto dall'Unione Europea (0,1 mg/kg di mangime) nel pollo da carne, provocando atrofia e diminuzione del peso relativo degli organi linfoidei tra cui borsa di Fabrizio, timo e milza, e depressione a causa dell'atrofia del midollo osseo (Huff et al., 1977). A livello emato-biochimico, polli esposti a OTA sviluppano primariamente leucocitopenia, anche alle più piccole dosi somministrate. La leucocitopenia indotta da OTA induce la diminuzione del numero di leucociti, principalmente come riflesso di una diminuzione dei linfociti e, in misura molto minore, un riflesso di una diminuzione dei monociti (Akbar Khan et al., 2019).

Article

Assessment of Ochratoxin A Exposure in Ornamental and Self-Consumption Backyard Chickens

Alessandro Guerrini, Alberto Altafini and Paola Roncada *

Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, Via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano dell'Emilia (Bologna), Italy; alessandro.guerrini5@unibo.it (A.G.); alberto.altafini@unibo.it (A.A.)

* Correspondence: paola.roncada@unibo.it

Received: 6 December 2019; Accepted: 6 February 2020; Published: 07 February 2020

Abstract: Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin that may be present in various food and feed of plant and animal origin, including chicken meat. In Italy, backyard poultry farming is rather widespread. Animals are raised for meat, eggs and for ornamental purpose, and they are often fed with home-made diets not subject to official controls. The purpose of this study was to evaluate exposure of ornamental and backyard chickens to OTA using biliary ochratoxin A as a biomarker. Therefore, bile samples, in addition to kidney, liver and muscle, were collected from 102 chickens reared in 16 farms located in 6 Italian regions. High-performance liquid chromatography method and fluorimetric detection (HPLC-FLD) analysis were carried out firstly on bile from all animals, and OTA was detected in 12 chickens (concentration range 3.83–170.42 µg/L). Subsequently, the kidneys of these chickens were also analysed, and the mycotoxin was not detected. The analytical detection limits (LODs) of OTA in bile and kidney were 2.1 µg/L and 0.1 µg/kg, respectively. In conclusion, these animals were exposed to OTA but their meat can be considered safe, given that this mycotoxin, if present, concentrates highest in kidneys. Biliary ochratoxin A confirms its use as a valid biomarker to assess exposure of poultry to OTA.

Keywords: backyard chickens; bile; food safety; HPLC-FLD; ochratoxin A

1. Introduction

Ochratoxins are known mycotoxins, secondary toxic metabolites produced by several fungal species mainly belonging to the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. Among ochratoxin forms (nominally referred to as A, B, C), ochratoxin A (OTA) is the most prevalent and relevant of this group, with the greatest toxic effects [1]. OTA may be present in almost all cereals of zootechnical interest, such as corn, barley, rice, sorghum, oats, soya beans [2], and also in dry foodstuffs such as coffee beans, spices, cocoa [3] and raisins [4,5]. Even drinks such as wine [6], grape juice and beer [7,8] may be contaminated. OTA has also been found in foods of animal origin, such as cheese [9], hams, salami [10–12], and chicken meat [13–16]. Considering the wide variety of foods where OTA and other mycotoxins have been found, it can be said that humans and animals are constantly exposed to these toxins. In food safety context, the problem of residues with potentially toxic activity has grown in importance over time, and the monitoring of "natural" contaminants such as mycotoxins, has become a routine control for the agri-food industry. The International Agency for Research on Cancer (IARC) classified OTA in 2B group (possibly carcinogenic to humans) [17], and for this reason, maximum residue limits (MRL) and guidance values have been set at European level for food or feeding stuffs. For example, in unprocessed cereals for human consumption, a limit for OTA of 5.0 µg/kg has been established [18], while in cereals and cereal products for animal feeding, the European Commission set a guidance value for OTA of 0.25 mg/kg [19]. Moreover, in compound feed for poultry and pigs, two species in which the presence of this mycotoxin in edible tissues is well

documented [20,21], more restrictive guidance values for OTA (0.1 mg/kg and 0.05 mg/kg, respectively) have been set [19]. However, in Italy, since 1999 the Ministry of Health has established a guidance value for OTA of 1 µg/kg only in pork meat and derived products [22]. Toxicokinetics, toxic effects, and residues of OTA have been studied in different avian species, such as turkey, Muscovy ducks, broiler chickens [23], and Japanese quail [24].

Poultry species are also reared in backyard farms for the production of eggs and meat for self-consumption. This type of breeding, similar to free-range breeding method, is very widespread in Italy. Despite the non-negligible role of such sector, few data are available on the real number of these small backyard holdings, also because poultry rearing below 50 heads are not registered in the National Data Base for Livestock Registration. In 2004, the production of chicks intended for backyard poultry farm was 30 million, while a more recent survey showed that in the period 2004–2014 backyard poultry rearing only partially confirmed the quantity of 2004 [25]. In addition to the farms where chicks come from poultry hatcheries, there are ornamental poultry farms in which purebred chicks born and raised on farm are bred for participation in beauty competitions, and the birds which do not conform to the breed standard are slaughtered for consumption or offered for sale live. In backyard farms, where animals are often fed with home-made diets not subject to official controls, there is no real knowledge of the levels of exposition to OTA, and consequently of the health risks for consumers.

The aim of this preliminary study was to evaluate the presence of OTA in purebred chickens reared for self-consumption and/or for beauty competition in backyard farms, an important and often overlooked area of Italian poultry breeding. For this purpose, biliary ochratoxin A was used as a biomarker to assess exposure of chickens to this mycotoxin, according to the study conducted by Armorini et al. [15]. Analyses were performed using the high-performance liquid chromatography method and fluorimetric detection (HPLC-FLD).

2. Materials and Methods

2.1. Farms and Animals

A total of 102 samples of bile, kidney, liver and muscle from backyard chickens of both sexes were collected to verify the presence of OTA. Sampling was performed after home-made slaughter carried out by farmers, who allowed the collection of matrices for diagnostic use. Seventeen homogeneous farms were selected on the basis of certain criteria, such as the breeds reared, the breeding method, and how chickens were fed. The farms, all situated in open countryside, were located in six different Italian regions (four in Lombardy, one in Friuli Venezia Giulia, one in Emilia Romagna, five in Tuscany, three in Lazio, two in Campania). The animals were reared with the free-range method for the production of meat and eggs for self-consumption and for beauty competitions. The chickens were of light breed (1–2 kg) and heavy breed (>2 kg), and in particular belonged to the following breeds: Leghorn, Amrocks, Barred Plymouth Rock, Robusta Lionata, Sussex, Marans, Australorp and Indian Fighter.

2.2. Diets and Nutrition

For this study, farms that administered very similar diets to animals were selected. In the first period of life (0–50 days of age), the chicks were fed with commercial feeds. Subsequently, the animals were fed with home-made balanced diets prepared with cereals and by-products. The diet was generally administered *ad libitum*, and the birds had free access to clean water. Farmers also supplied mash twice a day, 3/4 times a week. Furthermore, the diet was supplemented with kitchen waste such as bread, fruit, vegetables, and orchards. The ingredients, their average inclusion rates, and the chemical composition of the diets are shown in Table 1 and Table 2.

Table 1. Feeds used in diets and inclusion rates.

Ingredients	Inclusion Rates (%)
Maize (in the form of grain, flakes or flour)	30–60
Hulless barley	12–15
Barley flaked	9–12
Wheat	25–30
Wheat bran	7–10
Wheat feed (8.5% CF)	9–10
Soyabean meal, ext. 43%–45%–46% CP	20–30
Oat flakes	5–10
Sunflower naked	3–5
Milk whey or buttermilk	1 l/kg of dry feed
Salt	0.1–0.2
Vinegar (white or apple vinegar)	10 ml/l of water used to prepare mash
Olive oil	2–5
Seeds oil (peanuts or sunflower)	2–4
Multi-vitamins and oligoelements supplement	1–1.5

Table 2. Chemical composition of different types of diet as formulated and fed.

Type of Diets	CP (%)	RL (%)	CF (%)	ASH (%)	LYS (%)	MET (%)	Met + Cis (%)	Ca (%)	Energy (kcal/kg)
Dry grain diet	16–17.5	3.5–4	4–7	9.5–11	0.85–1.1	0.30–0.40	0.48–0.55	0.80–1	2.900–3.100
Mash	16–18	3.5–8	4–8	9.5–12	0.85–1.1	0.30–0.40	0.50–0.55	0.80–1	2.900–3.300

CP: Crude Protein; RL: Raw Fat and Oil; CF: Crude Fibre; ASH: Ash; LYS: Lysine; MET: Methionine; Met + Cis: Methionine + Cysteine; Ca: Calcium; kcal/kg: kilocalorie/kilogram.

2.3. Sampling

The slaughter was carried out “on farm” by farmers. Animals were slaughtered at 6–7 months of age, depending on the breed. Bile and kidneys are considered slaughter waste, while liver is usually consumed. Immediately after removing the liver from the carcass, bile samples were collected using a 2.5 mL sterile syringe and stored in identified Eppendorf tubes. Kidney, liver, and muscle samples were placed in 50 mL Falcon tubes identified with the same code of the corresponding bile. All samples were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.4. Solvents and Reagents

The chemicals and solvents used for OTA extraction and for HPLC analysis were analytical grade or HPLC grade. The OTA standard used to prepare standard solutions for the validation of the applied methodology was obtained from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Immunoaffinity columns used for samples purification (OchraTest™ WB) were purchased from Vicam® (Milford, MA, USA). PBS buffer pH 7.0 used during sample clean up procedure was prepared by dissolving sodium chloride (8.0 g), sodium phosphate dibasic (1.2 g), potassium phosphate monobasic (0.2 g), and potassium chloride (0.2 g) in purified water so as to obtain 1 litre of buffer. Water, acetonitrile, isopropyl alcohol, dichloromethane, and methanol were purchased from Mallinckrodt Baker B.V. (Deventer, The Netherlands); citric acid, phosphoric acid, sodium bicarbonate, sodium chloride, sodium phosphate dibasic, potassium phosphate monobasic, and potassium chloride were purchased from Carlo Erba Reagents (Cornaredo, MI, Italy); acetic acid and ethyl acetate were obtained from Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA).

2.5. Chromatographic Apparatus and Conditions

HPLC analysis was performed using a C18 Onyx Monolithic column 100 mm × 4.6 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA) coupled in sequence to a C18 Chromolith Performance RP-18e column 100 mm × 4.6 mm (Merck, Darmstadt, Germany) in a chromatographic system consisting of

a System Gold Programmable Solvent Module 126 Pump (Beckman, San Ramon, CA, USA) equipped with an HT 800 L autosampler (HTA, Brescia, Italy) fitted with a 20 μ L loop. The FLD detection was obtained by means of a 821 FP fluorescence detector (Jasco, Tokyo, Japan) set at the excitation wavelength of 340 nm and emission wavelength of 460 nm. The system was computer-controlled by a Beckman Coulter 32 Karat Software (Beckman, San Ramon, CA, USA). OTA separation was archived using isocratic elution and at room temperature, under conditions similar to those adopted by Altafini et al. [21]. The mobile phase consisted of 70% of a mixture of water, isopropyl alcohol-acetonitrile and acetic acid 1% (79:7:7:7 v/v) and 30% of acetonitrile. The flow rate was set at 1 mL/min, while the injection volume was 20 μ L.

2.6. Bile Extraction

The procedure was based on the method described by Armorini et al. [20], slightly modified. Bile samples (200 μ L), after being acidified with 200 μ L of citric acid 30% water solution, were extracted with 2 mL of dichloromethane in 15 mL polypropylene conical-bottom centrifuge tubes by shaking for 30 minutes on a rotary shaker. The samples were then cooled on ice (10 minutes) and centrifuged (1860 \times g for 10 minutes). The lower organic layer was transferred into a conical tube and evaporated to dryness under vacuum (Univapo Martinsried/Munich, Germany). The dry residue was redissolved in 800 μ L of methanol (OTA eventually present in bile samples results diluted four times in the final analysis solution), and 20 μ L injected into HPLC.

2.7. Kidney Extraction and Clean Up

The procedure was carried out following the method for the extraction of OTA from tissues and organs of wild boar described by Bozzo et al. [26] with some modifications. The samples for analysis were obtained by weighing 2.5 ± 0.01 g of tissue, previously thawed, in 50 mL polypropylene conical-bottom centrifuge tubes, and by adding 1.5 mL of 1 M phosphoric acid and 5 mL of ethyl acetate. The mixture was homogenized for 3 minutes with Ultra-Turrax T25 (IKA Labortechnik, Staufen, Germany), centrifuged for 10 minutes at 1920 \times g, and cooled on ice for 10 minutes; the upper organic phase was then transferred into a 15 mL conical centrifuge tube. The pellet was subsequently reextracted in the same way and, after centrifugation, the ethyl acetate extract was transferred in the tube containing the organic phase resulting from the first extraction. The combined extract was then frozen overnight and, after thawing, it was centrifuged for 10 minutes at 1860 \times g in order to separate emulsified and suspended components, which were removed. Eight mL of the extract (equivalent to a 2 g sample) were measured into a 10 mL graduated glass centrifuge tube and reduced to 2 mL in a rotational vacuum concentrator (Univapo Martinsried/Munich, Germany). The ethyl acetate extract was then back-extracted by shaking it with 2 mL of 0.5 M sodium bicarbonate solution on a rotating shaker for 30 minutes. The mixture was frozen (-20 °C) for one hour, and centrifuged for 10 min (1860 \times g) to separate the organic and aqueous layer. Finally, after removing the upper organic layer, an aliquot of the bicarbonate extract (1.5 mL) was transferred into a glass tube, diluted with 3.5 mL of PBS buffer and loaded onto an OchraTest™ WB immunoaffinity column for purification. The column was washed with 10 mL of PBS buffer and 10 mL of water. The elution of OTA was performed with 1.5 mL of methanol, and the fraction collected was reduced to dryness by means of Univapo. The residue was redissolved in 150 μ L of methanol, diluted with 150 μ L of water, and after vortexing, transferred to a HPLC vial for analysis.

2.8. Method Validation

A stock solution of OTA (500 μ g/mL) was prepared by dissolving 1 mg OTA standard (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) in 2 mL ethanol, and stored at -20 °C.

Working standard solutions in methanol were set up and used to obtain reference standards in methanol-water solution (50:50 v/v) at five concentration levels (1, 2, 5, 7.5, 10 μ g/L), and these were analysed by HPLC-FLD to generate reference curves in solvent. Aliquots of blank samples of bile and kidney were spiked with OTA standard solutions at appropriate concentration levels in order to

obtain, in the final solutions resulting from the extraction process, the same concentrations of the reference standards in solvent (1, 2, 5, 7.5, 10 µg/L). These concentrations correspond to 4× higher concentrations in bile-spiked samples, and 5× lower concentrations in kidney-spiked samples, in consideration of the dilution and concentration factor of the respective extraction procedures applied. The final extraction solutions were analysed by HPLC-FD to generate reference curves in the matrix. Calibration curves were obtained from least squares linear regression analysis, and determination coefficient (R^2) was calculated.

Specificity was assessed by analysing blank samples and OTA-spiked samples, and by verifying the absence of interfering substances at the retention time of OTA under the experimental conditions.

OTA recovery was established by comparing peak areas of spiked samples and peak areas of pure standard solutions at the same concentration levels.

Accuracy and precision were determined via analysis of spike samples at three different levels (three replicates per concentration level, for a total of nine determinations), and were expressed as percent error (% er) and relative standard deviation (RSD) of the replicates, respectively.

The limit of detection (LOD) was calculated on the basis of a signal-to-noise ratio of 3:1 at the OTA retention time, while the limit of quantification (LOQ) was established as the lowest concentration of the calibration curves. This study was performed according to ISO 9001 requirements.

3. Results

3.1. Performances of the Method

All the calibration curves showed a linear response over the entire observed ranges, with a determination coefficient (R^2) always >0.999.

Analysis of blank samples and spike samples of bile and kidney showed the absence of matrix interfering peaks in the retention time-window of the OTA peak. Retention time for OTA was constant both during the analysis of bile samples and kidney samples (12.2 and 11.6 min, respectively). Figure 1 shows representative chromatograms of a blank sample of bile (a), a naturally contaminated sample of bile at 13.09 µg/L level (b), a blank sample of kidney (c), a blank sample of kidney spiked with OTA at 1.5 µg/kg level (d). For the analytical session relate to bile samples, three calibration standards at concentration of 8, 20, and 30 µg/L were prepared and analysed in three different days. RSD and % er never exceeded 5.6% and 5.2%, respectively. Similarly, for the analytical session relate to kidney samples, three calibration standards at concentration of 0.4, 1, and 1.5 µg/kg were prepared and analysed in three different days. In this case, RSD and % er never exceeded 1.8% and 4.2%, respectively.

Recovery values were estimated for each matrix at three spike levels. Three replicates were analysed for each level, and the average overall recoveries (mean of means) were 90.9% (bile) and 90.5% (kidney). The results are shown in Table 3. To determine LODs, analytical response and chromatographic noise were both measured from the chromatogram of blank samples and spike samples. The estimated LODs were 2.1 µg/L and 0.12 µg/kg for bile and kidney, respectively. The LOQ values were 4 µg/L (bile) and 0.2 µg/kg (kidney). Overall, the validation results show that the methodology applied in this study performed well in quantitating OTA in the matrices analysed.

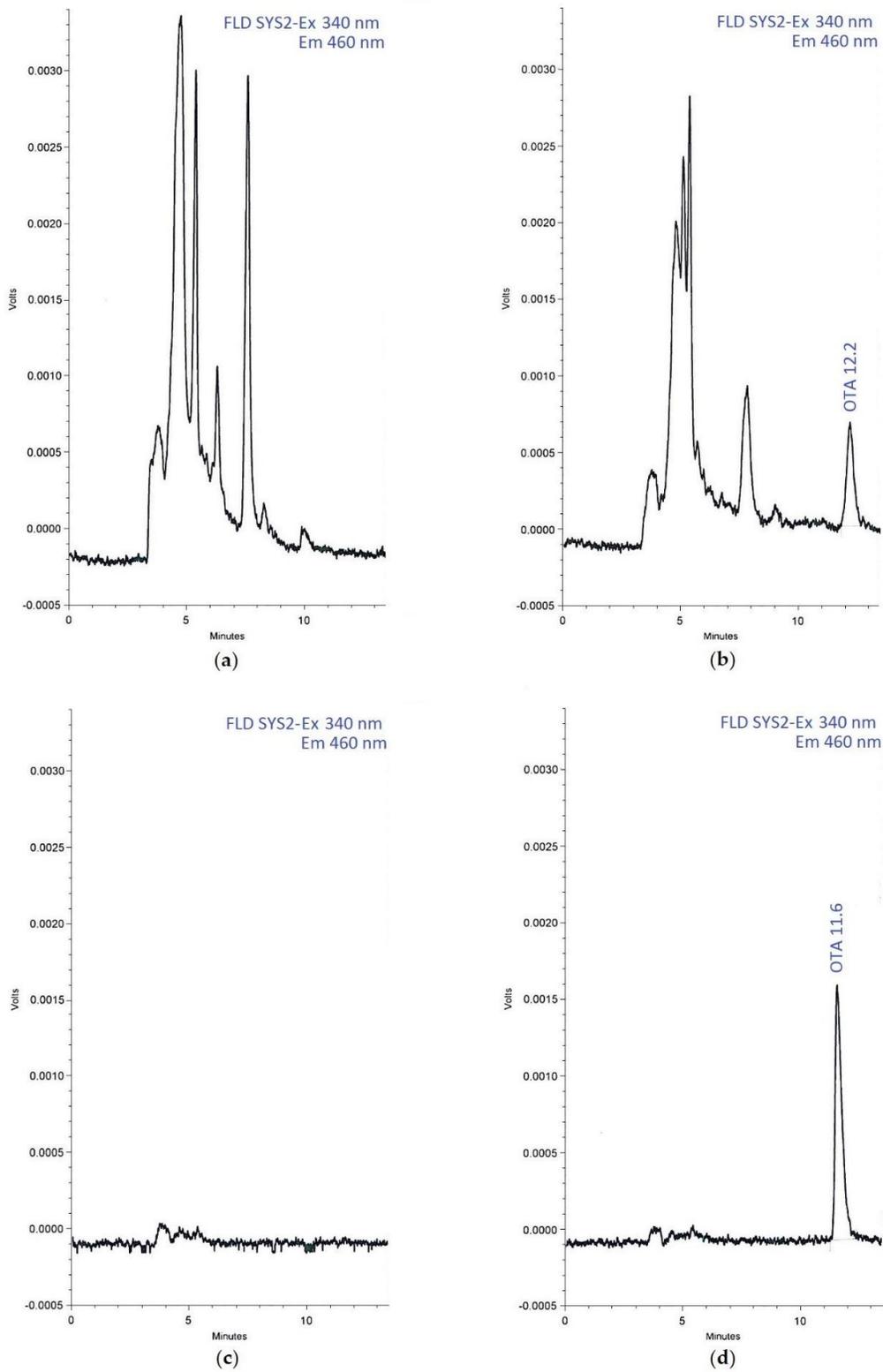


Figure 1. Chromatograms of a blank sample of bile (a), a naturally contaminated sample of bile at 13.09 µg/L level (b), a blank sample of kidney (c), a blank sample of kidney spiked with OTA at 1.5 µg/kg level (d).

Table 3. Recovery data of the method for analysis of OTA in samples of bile and kidney spiked at three concentration levels.

Matrix	OTA spiking levels ($\mu\text{g/L}$ or $\mu\text{g/kg}$)	Recovery (%) ¹	M (%) ²
Bile	8	87.1	90.5
	20	89.3	
	30	96.3	
Kidney	0.4	90.5	90.9
	1	91.1	
	1.5	89.8	

¹ Number of replicates: 3. ² Average recoveries of the three spiking levels.

3.2. Occurrence of OTA in Bile and Kidney Samples

In this study, 102 samples of bile were analysed, and 12 were positive for the presence of OTA, representing 11.8% of the total samples. OTA concentration ranged from 3.83 to 170.42 $\mu\text{g/L}$, with an average concentration of 22.25 $\mu\text{g/L}$ (RSD = 211.44%). Positive bile samples and OTA concentrations are reported in Table 4.

Table 4. Samples of bile tested positive for OTA.

Farm (ref.)	Region	Total Samples	F	M	Positive Samples (ref.)	OTA ($\mu\text{g/L}$)	Sex	Positive Samples/Total Samples	Positive Samples (%)
MO	Friuli Venezia Giulia	18	9	9	MO 12	5.36	F	7/18	38.9
					MO 13	3.83	F		
					MO 14	3.85	F		
					MO 15	7.29	F		
					MO 16	4.62	F		
					MO 17	6.36	F		
					MO 18	4.38	F		
FI	Tuscany	9	4	5	FI 19	7.54	F	3/9	33.3
					FI 20	17.83	F		
					FI 22	170.42	F		
LO	Lombardy	6	4	2	LO 6	13.09	F	1/6	16.7
RO	Lazio	1	1	0	RO 1	22.39	F	1/1	100

F, females; M, males

Excluding the farm located in Lazio (only one sample collected), the highest percentage of positive samples (38.9%, 7 out of 18 samples) was found in a farm located in Friuli Venezia Giulia (Ref. MO), and OTA concentration ranged from 3.83 to 7.29 $\mu\text{g/L}$, with an average concentration of 5.10 $\mu\text{g/L}$ (RSD = 25.77%). High levels of OTA were found in bile of animals from a farm located in Tuscany (Ref. FI) in which three out of nine bile samples were positive (33%) with a concentration range between 7.54 and 170.42 $\mu\text{g/L}$ (average concentration 65.26 $\mu\text{g/L}$, RSD = 139.76%). The other two positive samples (concentrations 13.09 and 22.39 $\mu\text{g/L}$) were from animals reared in two farms, one located in Lombardy (where six samples were collected), and one in Lazio (only one sample collected). OTA positive bile samples were from females only. The kidneys of the animals whose bile was found positive for OTA were analysed, but the mycotoxin was not detected in any sample tested. Kidney is generally considered the tissue of choice to assess exposure of chicken to OTA. According to the study conducted by Armorini et al. [20], extremely low concentrations of OTA in kidney (in this study, below the detection limit of 0.12 $\mu\text{g/kg}$) do not correspond to detectable levels of OTA in liver. Indeed, the tissue distribution in chicken follows the order kidney > liver > muscle > fat [27,28],

as reported also for pig [27,29], rat and goat [27]. Therefore, no further investigations were carried out on the liver and muscle of those animals whose kidneys were negative for OTA.

4. Discussion

Analytical performance results proved that the method adopted was fit for the determination of OTA in the analysed samples, and generated reliable results. Chromatography is the most commonly used method for mycotoxin analysis in food and feed, although alternative fast, easy to use and cheap technologies have recently been developed, such as analytical methods based on biosensors [30]. However, in the case of the analysis of bile for the detection of OTA, the analytical method adopted is fast and cheap. In fact, the sample preparation procedure is a simple liquid-liquid extraction that does not need a clean-up step with SPE or immunoaffinity columns. Furthermore, due to natural OTA fluorescence, sample derivatization is not necessary for fluorescence detection. For these reasons, the adoption of the HPLC-FLD method for analysis of OTA in bile, used as biomarker of ochratoxin exposure in poultry, was an appropriate choice.

As widely reported by the scientific literature, OTA contaminates different foods of both vegetable and animal origin, for human consumption or used as feed for farm animals. To date, there is little information and data on its presence in poultry products, and particularly in backyard chickens destined for self-consumption. In fact, these products are not subject to official controls. Furthermore, chicken products do not have any maximum residue limit for OTA. The bio-monitoring investigation conducted in these hobby farms has shown that ornamental and self-consumption poultry can be exposed to this mycotoxin. In poultry, dietary intake of OTA can lead to nephrotoxic, hepatotoxic, teratogenic and immunosuppressive effects [31]. The animals can show clinical signs such as reductions in weight gain and pigmentation, enteritis, diarrhoea, and intestinal breakage during processing from intestinal fragility [28]. Furthermore, birds' behaviour is depressed [32], and reduced feed intake and egg production can be observed [33–35]. All animals considered in this study were healthy without visible adverse symptoms. No gross alterations of kidneys and liver (such as swelling, discoloration, congestion, increase in size and weight) attributable to mycotoxin ingestion were observed in chickens whose bile was found positive for OTA. Biliary ochratoxin A reconfirms its use as a valid biomarker to assess exposure of poultry to OTA, as reported by Armorini et al. [20], and as described also for the rat [36]. In kidney, which is generally considered the tissue of choice for the evaluation of OTA, the toxin was not present at levels above LOD; this is an indicator of the healthiness of the meat of these animals. However, the results of the present study also show that the presence of OTA in backyard chickens is possible, and this constitutes a potential food risk for the consumer that must not be underestimated. In factory farms, laying hens and broilers are typically reared in sheds, and the possibility of coming into contact with OTA is exclusively through feed. The tested animals were raised on pasture (meadow-orchard), with a method very similar to free-range. The fact that birds had the opportunity to wander freely, to peck and scratch in the grass at will, taking food from pastures and orchards (fresh fruit and fruit waste), and feeding also kitchen waste, suggests that these animals were potentially exposed to other possible sources of contamination by OTA, different from the feed administered daily, such as cereal grains or mash.

With respect to OTA levels detected in bile, some further considerations should be made. Slaughtered animals had been fasting for at least 12 hours, and the gallbladders had different amounts of bile. The volume of bile might be influenced by several factors, such as the transit time through the digestive tract and the intestinal content. These factors could have affected the presence and concentration of OTA in the bile of the animals of the same slaughter group. This could explain why not all animals belonging to the same slaughtering group, consuming the same feed in the last two months of pre-slaughter life, were positive for OTA. The groups of slaughtered animals were composed of males and females of different breeds, with different food intake and slaughtering weight. The 12 OTA-positive bile samples, were from females only, six/seven months old, belonging to the following breeds: Sussex Columbia (n = 4), Barred Plymouth Rock (n = 3), Barnevelder (n = 1) and Robusta Lionata (n = 4). It can be hypothesized that the finding of the mycotoxin only in females, might be linked to hormonal factors and/or physiological factors related to eggs deposition. In fact,

hens start laying eggs at 6–7 months old, depending on the breed. The deposition of eggs causes a strong metabolic effort, involving the liver in particular, with production of albumins and fat metabolization, which could affect the biotransformation of OTA. Dietrich et al. reported that some of the sex differences in distribution and elimination kinetics of OTA that have been found in various species could be due to sex differences in plasma proteins binding and/or sex variations in the expression levels of OTA-specific transporters able to modulate organ and cellular OTA concentrations, and therefore to have a direct influence on the toxicodynamics [37].

Scientific literature reports several experiments in which tissues and organs from poultry experimentally exposed to OTA were analysed [20,38–41] but only few survey studies were carried out to monitor the presence of OTA in tissues of animals normally reared on poultry farms.

Schiavone et al., in a survey for OTA conducted on 94 chicken blood samples collected in ten poultry farms located in Italy, report 53% of positive samples with values of OTA in the range 0.003–0.165 ng/mL [42]. Milićević et al. examined 90 liver, kidney and gizzard samples coming from chicken farms located in Serbia. OTA was detected in 23 (38.33%), 17 (28.3%) and 16 (26.6%) samples, respectively, with concentration levels ranging from 0.14 to 3.9 ng/g in liver, 0.1 to 7.02 ng/g in kidneys, and 0.25 to 9.94 ng/g in gizzard [13]. Iqbal et al. report data on the presence of OTA in 115 chicken meat samples (including also liver) and 80 eggs samples, collected from central areas of Punjab, Pakistan. Forty-one percent meat and 35% eggs samples were found contaminated with the mycotoxin, and maximum level 4.70 µg/kg was detected in the liver part of chicken meat. The sampling included also 31 domestic chicken, and the meat of these animals (wings, legs and chest) did not show traces of OTA, indicating that backyard poultry is less exposed to this type of contamination [14]. In another survey conducted in Iraq on 60 samples of chicken meat and liver (30 samples each) purchased from Sulaimani markets, 26 (86.66%) and 17 (56.6%) samples of meat and liver, respectively, were found positive for OTA, with concentration levels in the range 0.149–4.106 µg/kg (meat) and 0.359–8.699 µg/kg (liver) [15]. A study carried out in Jordan on 72 poultry meat samples collected from different commercial sources showed that the 100% of thigh and leg, liver, gizzard samples and 66% of breast samples were contaminated with OTA (range: 1.89 ± 0.07 – 7.68 ± 0.12 µg/kg), with the highest concentration levels in liver samples [16].

The results of the abovementioned studies generally show non-negligible percentages of positives, proving that exposure of chickens to this mycotoxin is quite common in many countries. Furthermore, taking as reference the Italian guideline value set for OTA in pork meat products (the only food products of animal origin for which a guideline value for OTA was established), these surveys reports OTA levels in many cases above 1 µg/kg. On the other hand, many other investigations focused on the occurrence of OTA in poultry feed and feed ingredients have shown high percentages of contaminated samples [43]. In poultry hobby farms, bad husbandry practices such as feeding chickens with moulded kitchen waste (e.g., bread) and other possible sources of moulded feed (e.g., feed from own production, generally not submitted to any compliance control) can lead to exposure of animals to OTA [44]. Our results, if compared with those from the survey studies reported above, would seem to indicate that backyard poultry is less exposed to this type of contamination, according to the findings of Iqbal et al. [14].

5. Conclusions

In conclusion, the present survey on the occurrence of OTA in backyard chickens showed that only a low percentage of animals was exposed to the mycotoxin and, although also high levels of OTA were found in positive bile samples, the corresponding kidney samples were negative. Consequently, it is possible to state that the consumption of meat from these animals is safe.

On the other hand, the present research also showed that contamination by OTA could potentially occur. For this reason, hobby breeders should be appropriately sensitized with respect to the importance of the correct conservation of feeds and good breeding practices. Furthermore, health authorities could encourage the establishment of a guideline value for OTA also in chicken meat (as was done in Italy for pork meat) for a better protection of consumer health. To the best of our knowledge, the present study is the first survey carried out in Italy to assess ochratoxin A exposure

in backyard poultry farms. We believe it would be interesting to continue the research extending it to other farms to have a more complete picture of the ochratoxin A risk in this type of breeding.

Author Contributions: Conceptualization, A.G. and P.R.; methodology, A.A. and A.G.; validation, A.A. and A.G.; formal analysis, A.A. and A.G.; investigation, A.G. and P.R.; resources, A.G. and P.R.; data curation, A.G. and A.A.; writing—original draft preparation, A.G. and A.A.; writing—review and editing, A.A. and P.R.; visualization, A.G.; supervision, P.R.; project administration, P.R.; funding acquisition, P.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Heussner, A.H.; Bingle, L.E.H. Comparative ochratoxin toxicity: A review of the available data. *Toxins* **2015**, *7*, 4253–4282. doi:10.3390/toxins7104253.
2. Bazin, I.; Faucet-Marquis, V.; Monje, M.C.; El Khoury, M.; Marty, J.L.; Pfohl-Leszkowicz, A. Impact of pH on the stability and the cross-reactivity of ochratoxin A and citrinin. *Toxins (Basel)* **2013**, *5*, 2324–2340. doi:10.3390/toxins5122324.
3. EFSA (European Food Safety Authority). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. *EFSA J.* **2006**, *365*, 1–56. doi:10.2903/j.efsa.2006.365.
4. Heshmati, A.; Zohrevand, T.; Khaneghah, A.M.; Mozaffari Nejad, A.S.; Sant'Ana, A.S. Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in dried fruits in Iran: Dietary exposure risk assessment. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *106*, 202–208. doi:10.1016/j.fct.2017.05.046.
5. Škrbić, B.; Antić, I.; Cvejanov, J. Determination of mycotoxins in biscuits, dried fruits and fruit jams: An assessment of human exposure. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **2017**, *34*, 1012–1025. doi:10.1080/19440049.2017.1303195.
6. Freire, L.; Guerreiro, T.M.; Pia, A.K.R.; Lima, E.O.; Oliveira, D.N.; Melo, C.F.O.R.; Catharino, R.R.; Sant'Ana, A.S. A quantitative study on growth variability and production of ochratoxin A and its derivatives by *A. carbonarius* and *A. niger* in grape-based medium. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 14573. doi:10.1038/s41598-018-32907-z.
7. Peters, J.; van Dam, R.; van Doorn, R.; Katerere, D.; Berthiller, F.; Haasnoot, W.; Nielen, M.W.F. Mycotoxin profiling of 1000 beer samples with a special focus on craft beer. *PLoS One* **2017**, *12*, e0185887. doi:10.1371/journal.pone.0185887.
8. Mariño-Repizo, L.; Goicoechea, H.; Raba, J.; Cerutti, S. A simple, rapid and novel method based on salting-out assisted liquid-liquid extraction for ochratoxin A determination in beer samples prior to ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **2018**, *35*, 1622–1632. doi:10.1080/19440049.2018.1486045.
9. Anelli, P.; Peterson, S.W.; Haidukowski, M.; Logrieco, A.F.; Moretti, A.; Epifani, F.; Susca, A. *Penicillium gravinicaesei*, a new species isolated from cave cheese in Apulia, Italy. *Int. J. Food Microbiol.* **2018**, *282*, 66–70. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.006.
10. Armorini, S.; Altafini, A.; Zaghini, A.; Roncada, P. Ochratoxin A in artisan salami produced in Veneto (Italy). *Food Addit. Contam. Part B Surveill.* **2016**, *9*, 9–14. doi:10.1080/19393210.2015.1098735.
11. Merla, C.; Andreoli, G.; Garino, C.; Vicari, N.; Tosi, G.; Guglielminetti, M.L.; Moretti, A.; Biancardi, A.; Arlorio, M.; Fabbi, M. Monitoring of ochratoxin A and ochratoxin-producing fungi in traditional salami manufactured in Northern Italy. *Mycotoxin Res.* **2018**, *34*, 107–116. doi:10.1007/s12550-017-0305-y.
12. Altafini, A.; Fedrizzi, G.; Roncada, P. Occurrence of ochratoxin A in typical salami produced in different regions of Italy. *Mycotoxin Res.* **2019**, *35*, 141–148. doi:10.1007/s12550-018-0338-x.
13. Milićević, D.R.; Jovanović, M.; Matekalo-Sverak, V.F.; Radičević, T.; Petrović, M.M.; Vuković, D.Ž. Residue of ochratoxin A in chicken tissues-risk assessment. *Arch. Oncol.* **2011**, *19*, 23–27. doi:10.2298/AOO1102023M.
14. Iqbal, S.Z.; Nisar, S.; Asi, M.R.; Jinap, S. Natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in chicken meat and eggs. *Food Control* **2014**, *43*, 98–103. doi:10.1016/j.foodcont.2014.02.046.
15. Murad, H.O.M. Levels of ochratoxin a in chickens livers and meat at Sulaimani City markets. *Inter. J. Sci. Tech.* **2015**, *10*, 75–79. doi:10.12816/0024587.
16. AL khalailah, N.I. Prevalence of ochratoxin A in poultry feed and meat from Jordan. *Pak. J. Biol. Sci.* **2018**, *21*, 239–244. doi: 10.3923/pjbs.2018.239.244.

17. IARC. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. *Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* **1993**, *56*, 489–521.
18. European Commission. Commission Regulation (EC) 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* **2006**, *L364*, 5–24.
19. European Commission. Commission Recommendation (EU) 2016/1319 of 29 July 2016 amending Recommendation 2006/576/EC as regards deoxynivalenol, zearalenone and ochratoxin A in pet food. *Off. J. Eur. Union* **2016**, *L208*, 58–60.
20. Armorini, S.; Al-Qudah, K.M.; Altafini, A.; Zaghini, A.; Roncada, P. Biliary ochratoxin A as a biomarker of ochratoxin exposure in laying hens: An experimental study after administration of contaminated diets. *Res. Vet. Sci.* **2015**, *100*, 265–270. doi:10.1016/j.rvsc.2015.03.004.
21. Altafini, A.; Armorini, S.; Zaghini, A.; Sardi, L.; Roncada, P. Tissue distribution of ochratoxin A in pigs after administration of two-levels contaminated diets. *World Mycotoxin, J.* **2017**, *10*, 263–272. doi:10.3920/WMJ2016.2152.
22. Ministero della Sanità. CIRCOLARE 9 giugno 1999, n.10 Direttive in materia di controllo ufficiale sui prodotti alimentari: Valori massimi ammissibili di micotossine nelle derrate alimentari di origine nazionale, comunitaria e Paesi terzi. *Gazzetta Ufficiale* **1999**, *135*, 52.
23. Devreese, M.; Croubels, S.; De Baere, S.; Gehring, R.; Antonissen, G. Comparative toxicokinetics and plasma protein binding of ochratoxin A in four avian species. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 2129–2135. doi:10.1021/acs.jafc.7b06048.
24. Prior, M.G.; Sisodia, C.S.; O'Neil, J.B. Acute oral ochratoxicosis in day-old White Leghorns, turkeys and Japanese Quail. *Poult. Sci.* **1976**, *55*, 786–790. doi:10.3382/ps.0550786.
25. Cerrato, M. L'allevamento avicolo per autoconsumo in Campania: Tra sostenibilità ambientale e utilità economica. *Scienze e Ricerche* **2016**, *25*, 71–76.
26. Bozzo, G.; Ceci, E.; Bonerba, E.; Di Pinto, A.; Tantillo, G.; De Giglio, E. Occurrence of ochratoxin A in the wild boar (*Sus scrofa*): Chemical and histological analysis. *Toxins* **2012**, *4*, 1440–1450. doi:10.3390/toxins4121440.
27. Tao, Y.; Xie, S.; Xu, F.; Liu, A.; Wang, Y.; Chen, D.; Pana, Y.; Huang, L.; Peng, D.; Wang, X., et al. Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *112*, 320–331. doi:10.1016/j.fct.2018.01.002.
28. Hoerr, F.J. Mycotoxicoses. In *Diseases of Poultry*, 14th ed.; Swayne, D.E., Boulianne, M., Logue, C.M., McDougald, L.R., Nair, V., Suarez, D.L., Eds.; John Wiley and Sons: Hoboken, NJ, USA, 2019; Volume 2, pp. 1330–1348.
29. Kaynarca, H.D.; Hecer, C.; Ulusoy, B. Mycotoxin hazard in meat and meat products. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.* **2019**, *14*, 90–97. doi:10.17094/ataunivbd.449705.
30. Rhouati, A.; Bulbul, G.; Latif, U.; Hayat, A.; Li, Z.-H.; Marty, J.L. Nano-aptasensing in mycotoxin analysis: Recent updates and progress. *Toxins* **2017**, *9*, 349. doi:10.3390/toxins9110349.
31. Abidin, Z.; Khatoon, A.; Arooj, N.; Hussain, S.; Ali, S.; Manzoor, A.W.; Saleemi, M.K. Estimation of ochratoxin A in poultry feed and its ingredients with special reference to temperature conditions. *Br. Poult. Sci.* **2017**, *58*, 251–255. doi:10.1080/00071668.2017.1293797.
32. Abidin, Z.; Khatoon, A.; Numan, M. Mycotoxins in broilers: Pathological alterations induced by aflatoxins and ochratoxins, diagnosis and determination, treatment and control of mycotoxicosis. *Worlds Poult. Sci. J.* **2011**, *67*, 485–496. doi:10.1017/S0043933911000535.
33. Battaccone, G.; Nudda, A.; Pulina, G. Effects of ochratoxin A on livestock production. *Toxins* **2010**, *2*, 1796–1824. doi:10.3390/toxins2071796.
34. Stoev, S.D. Studies on some feed additives and materials giving partial protection against the suppressive effect of ochratoxin A on egg production of laying hens. *Res. Vet. Sci.* **2010**, *88*, 486–491. doi:10.1016/j.rvsc.2009.12.007.
35. Duarte, S.C.; Lino, C.M.; Pena, A. Ochratoxin A in feed of food-producing animals: An undesirable mycotoxin with health and performance effects. *Vet. Microbiol.* **2011**, *154*, 1–13. doi:10.1016/j.vetmic.2011.05.006.
36. Li, S.; Marquardt, R.R.; Frohlich, A.A. Identification of ochratoxins and some of their metabolites in bile and urine in rats. *Food Chem. Toxicol.* **2000**, *38*, 141–152. doi:10.1016/S0278-6915(99)00153-2.

37. Dietrich, D.R.; Heussner, A.H.; O'Brien, E. Ochratoxin A: Comparative pharmacokinetics and toxicological implications (experimental and domestic animals and humans). In *ILSI Supplement on Ochratoxin A in Food*, supplement. *Food Addit. Contam.* **2005**, *22*, 45–52. doi:10.1080/02652030500309327.
38. Roncada, P.; Simioli, M.; Altafini, A.; Zaghini, A.; Mancini, G.; Rizzi, L. Ochratoxin A, esterified glucomannan and *Saccharomyces cerevisiae* in diet for laying hens. In Book of Abstracts of the 12th European Poultry Conference, Verona, IT, 10–14 September 2006, supplement. *Worlds Poult. Sci. J.* **2006**, *62*, 313–314.
39. Hanif, N.Q.; Muhammad, G.; Muhammad, K.; Tahira, I.; Raja, G.K. Reduction of ochratoxin A in broiler serum and tissues by *Trichosporon mycotoxinivorans*. *Res. Vet. Sci.* **2012**, *93*, 795–797. doi:10.1016/j.rvsc.2011.09.013.
40. Pozzo, L.; Salamano, G.; Mellia, E.; Gennero, M.S.; Doglione, L.; Cavallarin, L.; Tarantola, M.; Forneris, G.; Schiavone, A. Feeding a diet contaminated with ochratoxin A for chickens at the maximum level recommended by the EU for poultry feeds (0.1 mg/kg). Effects on growth and slaughter performance, haematological and serum traits. In Proceedings of the 15th Congress of the ESVCN, Zaragoza, ES, 14–16 September 2011. Special Issue, *J. Anim. Physiol. An. N.* **2013**, *97*, 13–22. doi:10.1111/jpn.12050.
41. Pappas, A.C.; Tsiplakou, E.; Tsitsigiannis, D.I.; Georgiadou, M.; Iliadi, K.; Sotirakoglou, K.; Zervas, G. The role of bentonite binders in single or concomitant mycotoxin contamination of chicken diets. *Br. Poult. Sci.* **2016**, *57*, 551–558. doi:10.1080/00071668.2016.1187712.
42. Schiavone, A.; Cavallero, C.; Girotto, L.; Pozzo, L.; Antoniazzi, S.; Cavallarin, L. A survey on the occurrence of ochratoxin A in feeds and sera collected in conventional and organic poultry farms in Northern Italy. *Ital. J. Anim. Sci.* **2008**, *7*, 495–503. doi:10.4081/ijas.2008.495.
43. Khatoon, A.; Abidin, Z. An extensive review of experimental ochratoxicosis in poultry: I. Growth and production parameters along with histopathological alterations. *Worlds Poult. Sci. J.* **2018**, *74*, 627–645. doi:10.1017/S0043933918000685.
44. Tangni, E.K.; Waegeneers, N.; Van Overmeire, I.; Goeyens, L.; Pussemier, L. Mycotoxin analyses in some home produced eggs in Belgium reveal small contribution to the total daily intake. *Sci. Total Environ.* **2009**, *407*, 4411–4418. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.10.060.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

2.4. PRESENZA DI OTA IN SALAMI E FORMAGGI

I salami sono alimenti appartenenti alla tradizione gastronomica italiana le cui origini risalgono, come per altri salumi, all'epoca etrusca e romana. Viene classificato nella categoria dei salumi, più specificamente dei prodotti insaccati, crudi (pertanto facilmente deperibili) e fermentati, in quanto ottenuti attraverso una fermentazione lattica ad opera di microrganismi, che conferisce al prodotto le sue caratteristiche commerciali dopo un periodo di stagionatura. La carne utilizzata per la produzione dei salami è principalmente quella suina, come parti della coscia e rifilature magre della stessa, muscoli della spalla, il trito o cosiddetto "magro di banco", e come fonte lipidica il solo grasso suino, data la sua peculiare attitudine alla trasformazione. L'utilizzo di carni di specie diverse da quella suina nella produzione dei salami può essere attuata, ma implica l'obbligo di riportare in etichetta le informazioni riguardanti la specie. I salami contengono oltre alla componente carnea e lipidica, sale (tra il 2,5% e il 4%), zuccheri, in genere glucosio (0,2-0,4%), saccarosio (0,2-0,4%) o lattosio (1-2%), come fonte energetica per le culture starter immesse nell'impasto, che hanno lo scopo di favorire le fermentazioni. Convenzionalmente vengono aggiunti anche nitriti e nitrati, per la loro azione conservante ed antiossidante, ma anche per conferirgli il tipico aroma e colore. Questi, aggiunti sotto forma di sali di sodio e di potassio, inibiscono la crescita di batteri sporigeni anaerobi, come il *Clostridium botulinum* e/o *Listeria monocytogenes* (Tompkin, 2005). Secondo la normativa vigente, è consentita l'aggiunta di tali sostanze in ragione di 250 mg/kg per i nitrati e 150 mg/kg per i nitriti (Decreto Ministero della Sanità, No 209, 1996). Peculiarità dei salami è la muffa di copertura che si sviluppa sul budello, naturale o artificiale/sintetico, durante la fase di maturazione. Le specie fungine che più frequentemente sviluppano sui salami appartengono al genere *Penicillium*, come *P. verrucosa* è la più comune, *P. chrysogenum*, *P. nalgiovense* e *P. nordicum* (Comi et al., 2013; Ferrara et al., 2016). La formazione di notevoli quantitativi di muffa, tra cui specie produttrici di OTA, può avvenire in condizioni errate di maturazione e stagionatura.

Escludendo quindi la potenziale, ma sempre possibile, presenza di OTA nell'impasto dovuto alla materia prima contaminata, la carne, le muffe possono penetrare con le ife a fondo nel budello, rilasciando la tossina nell'impasto in maturazione, oppure rimanere solo all'esterno e contaminare la massa carnea durante il taglio del salame. Per tale ragione, in uno studio condotto da Roncada et al. (2020), salami artigianali sono stati trovati positivi ad OTA a livello del budello ma non dell'impasto, considerando quindi sicuro il consumo del salame previa sbucciatura, anche se per alcune tipologie di salame, il budello può essere edibile. Seppur i dati della presenza di OTA nei salami siano ancora oggi scarsi ai fini di una completa valutazione del rischio da parte di EFSA, i

pochi studi presenti confermano comunque che i salami possono essere alimenti fortemente contaminati da OTA, costituendo un rischio per il consumatore (Armorini et al., 2016; Altafini et al., 2019; Roncada et al., 2020). Considerazione analoga può essere fatta per i formaggi, che a livello di crosta formatasi durante la stagionatura, possono sviluppare muffe produttrici di OTA. La contaminazione da OTA di latte e derivati può realizzarsi pertanto attraverso due vie: secretoria, da parte dell'animale durante la lattazione, e post-secretoria, quindi nei prodotti derivati dalla lavorazione del latte. Numero sono le varietà di formaggi prodotti sul nostro territorio, prodotti con solo latte vaccino, ovino, caprino o miscele di questi, scremato, parzialmente scremato, panna e/o siero di latte, tramite coagulazione presamica o acida, con aggiunta o meno di sale (0,5-2%). La salatura può avvenire anche dopo la messa in forma e durante la stagionatura, come salatura a secco o in salamoia. La maturazione può durare qualche giorno nei formaggi a pasta molle, mentre per i formaggi a pasta dura e a lunga stagionatura invece, può durare diversi mesi o anni, e avviene in celle a temperatura e umidità costante. Particolare attenzione andrebbe rivolta verso i formaggi erborinati, come Roquefort o Camembert, o molto stagionati, dove la presenza di muffe interne o esterne rappresenta una peculiarità e caratteristica essenziale distintiva. Pochi dati sono oggi presenti in bibliografia sulla presenza di OTA nei formaggi, ragione per cui l'EFSA ha richiesto espressamente dati relativi a biomonitoraggi su questi prodotti. In particolare, con uno studio condotto da Altafini et al. (2021) hanno, a seguito di un campionamento di formaggi grattugiati liberamente acquistati dalla GDO, confermato la presenza di OTA in alcuni campioni. In questo caso, la presenza di della tossina potrebbe essere dovuto alla presenza di percentuali di crosta grattugiata contaminata, non escludendo comunque la possibilità di contaminazione con OTA del latte utilizzato per produrre i formaggi stessi.

Ochratoxin A contamination of the casing and the edible portion of artisan salamis produced in two Italian regions

P. Roncada¹✉, A. Altafini¹, G. Fedrizzi², A. Guerrini¹, G.L. Polonini² and E. Caprai²

¹Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano Emilia (BO), Italy; ²Chemical Food Department, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna 'Bruno Ubertini', via P. Fiorini 5, 40127 Bologna, Italy; paola.roncada@unibo.it

Received: 20 February 2020 / Accepted: 27 May 2020

© 2020 Wageningen Academic Publishers

OPEN ACCESS 

RESEARCH ARTICLE

Abstract

The purpose of this study was to provide data on the presence of ochratoxin A (OTA) in artisan salamis produced in the Campania and Marche regions (Italy). For this aim, 96 different salamis were purchased from farms and small salami factories. Analysis were carried out firstly on the casings of all samples, and in a second step, in the outer and inner edible parts of those samples whose casings were found positive for OTA at concentration levels above the Italian guideline value established for OTA in pork meat (1 µg/kg). The analytical method, based on a sample preparation procedure with immunoaffinity columns, together with analysis by LC-MS/MS, has guaranteed average recoveries between 79.4 and 89.0%, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of 0.10 and 0.25 µg/kg, respectively. OTA was detected in 25.0% of the analysed casings (24 samples) at concentration ranging from 0.25 to 98.52 µg/kg. Ten of these samples were from the same production plant in which an additional sampling was carried out, and where a problem of environmental contamination by ochratoxigenic moulds probably exists. The edible parts were mostly uncontaminated, except in 3 samples, 2 of which showed OTA contamination levels above 1 µg/kg. The presence of OTA on the casing does not seem to be cause for alarm about the safety of this type of product but it should in any case be monitored. Before slicing the meat for consumption, it is always good practice to peel the casing even if reported as edible on salami label.

Keywords: mycotoxins, sausages, food safety, LC-MS/MS

1. Introduction

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin produced by several species of the genera *Aspergillus* and *Penicillium*, mainly *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum*, and *Penicillium nordicum* (Dall'Asta *et al.*, 2010). It has been shown to be nephrotoxic, hepatotoxic, teratogenic and immunotoxic to several species of animals, and to cause kidney and liver tumours in mice and rats (JECFA, 1996). In addition, it is a significant causal determinant of porcine nephropathy (Hald, 1991). OTA has been classified as a possible human carcinogen (Group 2B) by the International Agency for Research on Cancer (IARC, 1993). Literature also reports its possible implication in Balkan Endemic Nephropathy (BEN) (Castegnaro *et al.*, 2006; Pfohl-Leszkiwicz *et al.*, 2007), and in Chronic

Interstitial Nephropathy (CIN), a highly similar disease found in North Africa (Hassen *et al.*, 2004), although the most recent studies have shown that OTA plays a minor role in the aetiology of these diseases (Pavlović, 2013; Stiborová *et al.*, 2016).

The products that are most frequently contaminated are: barley, sorghum, corn, wheat and other cereals, legumes, raw coffee beans and various baked products, spices, peanuts, fresh fruit (especially grapes) and dried fruit, raisins, cocoa, beer and wine (EC, 2002; EFSA, 2006; Jørgensen, 2005). OTA has also been found in edible pork by-products, due to the carry-over from naturally contaminated feed and its accumulation in different tissues and organs (blood, kidneys, lungs, heart, liver, spleen, fat and muscle) (Altafini *et al.*, 2017; Persi *et al.*, 2014; Pleadin *et al.*, 2016). However,

in most cases the presence of OTA in cured meat products could be due to direct contamination with moulds (Battilani *et al.*, 2007; Bertuzzi *et al.*, 2013). It is important to report that in products of animal origin, mycotoxins could also come from other ingredients added during preparation, especially spices (Altafini *et al.*, 2019; Armorini *et al.*, 2016; EFSA, 2006). A study has also shown that the sea salt used for salting meat in the early stages of dry-cured meat processing can be a source of *P. nordicum*, a toxigenic mould which can then proliferate on dried meats and cause OTA contamination (Sonjak *et al.*, 2011). Processed meat products, such as dry-cured ham, fermented sausage and others, are foods of major importance in several European countries, both nutritionally and economically (Meftah *et al.*, 2018). In particular, salami is a typical product of the Italian tradition. In 2016 Italy became the world leader in export of prepared or preserved meat of swine, and salamis represent 17% of these products (ASSICA, 2018).

Salami is an encased sausage containing even grains of product predominantly obtained from a mixture of minced pork meat and fat in natural or artificial casings. The name derives from the salting operation, necessary to ensure conservation. Besides sea salt, nitrate and/or nitrite and spices, often including sugar, starter cultures and other additives may be added. After being packed into casings, salami is subjected to a fermentation and drying/ripening stage (Fongaro *et al.*, 2015).

At European level, a guidance value for OTA equal to 0.05 mg/kg was established in complementary and complete feedingstuffs for pigs (EC, 2006a), but not in meat and meat-based products. In Italy, the Ministry of Health has set a guideline value of 1 µg/kg in pork meat and derived products (Ministero della Sanità, 1999). According to a survey carried out in the European Union, meat contribute 1% to the mean human dietary intake of OTA (EC, 2002), while in a more recent research conducted in the United States it is reported that, among the adult population, pork consumption supposes 15.82% of the total OTA intake (Mitchell *et al.*, 2017).

The accumulation of OTA by *Aspergillus* and *Penicillium* is affected by the amount of inoculum, substrate, water activity, moisture content, temperature, incubation time and by the species of the fungus itself (Rizzo *et al.*, 2002). All these factors interact together, and also fungal growth depend on a combination of these parameters. In addition, optimum conditions for fungal growth are usually different from those for mycotoxin production (Gil-Serna *et al.*, 2015). The published studies indicate that OTA is stable and processing procedures, such as ripening, drying, and storage, have been proved to be ineffective for its reduction in meat products (Monaci *et al.*, 2005; Schiavone *et al.*, 2008). If OTA is produced by moulds growing on the surface of the casing throughout the ripening process, it becomes

interesting to evaluate if the accumulation of this mycotoxin is limited to the casing or may penetrate to the inner edible part. This information could be used to implement actions to avoid production of salamis contaminated with OTA.

The aim of this work was to monitor the degree of OTA contamination of the casing and the edible part of artisan salamis produced in the Campania and Marche regions (Italy). The present survey is part of a larger research project monitoring the occurrence of OTA in salamis from several Italian regions. Compared to our previous studies, this research has focused on the presence of the mycotoxin on the casing. A liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) method was used for analyses of samples.

2. Materials and methods

Samples

In this study, from May to July 2018, a total of 96 salamis produced by traditional artisan techniques were purchased mainly from small family farms located in the provinces of the Italian regions of Campania and Marche. Firstly, 83 salamis of various type (51 from Campania and 32 from Marche) were sampled. From each salami, the casing was removed, and an aliquot was then taken both from the outer portion and from the core. The casing, the inner and outer portion were collected and analysed separately. Precautions were taken to avoid cross-contamination between the different parts. All the samples were stored at -18 °C. Analysis were performed firstly on the casings of all samples, and in a second step, in the outer and inner edible parts of those samples whose casings were found positive for OTA at concentration levels above the Italian guideline value established for OTA in pork meat (1 µg/kg). After analysis of these 83 samples, further investigations were carried out on the same farm from which the two most contaminate products came by collecting and analysing 13 additional samples of salamis.

Chemicals and reagents

All solvents and reagents were analytical grade or HPLC grade. The OTA standard and the U-[¹³C₂₀]-OTA standard (internal standard, IS) used to prepare standard solutions for the validation of the applied methodology were purchased from Biopure (Tulln, Austria). Ochraprep® immunoaffinity columns from R-Biopharm AG (Darmstadt, Germany) were used for samples purification. Acetonitrile, acetic acid, sodium phosphate dibasic dihydrate, potassium dihydrogen phosphate anhydrous, potassium chloride and sodium carbonate were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA); sodium chloride and sodium sulphate anhydrous were obtained from Panreac (Barcelona, Spain); sodium hydroxide, methanol, and formic acid were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany),

WWR Chemicals (Milano, Italy), and Carlo Erba Reagents (Cornaredo, MI, Italy), respectively. Ultrapure water used throughout the experiments was produced by a Millipore Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Chromatographic apparatus

OTA analysis were performed by LC-MS/MS on an Alliance HT 2695 (Waters, Milford, MA, USA) coupled to a Quattro Ultima Platinum triple-quadrupole mass spectrometer with electrospray ionization source (Micromass, Manchester, UK). Chromatographic separation was achieved in gradient elution mode and at room temperature using an analytical column Luna C18 (2) 100Å 100×2.0 mm 3 µm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). The mobile phase consisted of deionized water (solvent A), and acetonitrile (solvent B), both containing 0.2% formic acid. The gradient program started with 85% A and 15% B, reaching 0% A in 5.5 min with linear increase; then return to 85% A in 3 min and re-equilibration time of 2.5 min, giving a total run time of 11 min. The flow rate of the mobile phase was 0.25 ml/min, and the injection volume was 10 µl. Based on the structural properties of the analytes, the positive ionization modes (ESI+) was applied. The parameters were as follows: cone voltage, 45 V; capillary voltage, 4.5 kV; source temperature, 120 °C; and desolvation temperature, 350 °C. Mass Lynx TM 4.0 SP4 software (Micromass, Manchester, UK) was used to control the instruments and process the data. The data acquisition was in multiple reactions monitoring (MRM) mode. The ion transitions and mass parameters monitored for OTA and U-[¹³C₂₀]-OTA are reported in Table 1.

Sample extract preparation

For the analysis of the casing, 1 g of minced sample was added with 20 ml of acetonitrile-water solution (80:20) in a centrifuge tube. The mixture was then mixed for 30 min on an horizontal shaker and centrifuged at 48,384×g for 10 min at ambient temperature. A 10 ml aliquot of the upper phase was transferred into a clean centrifuge tube, diluted with 10 ml of phosphate buffered saline (PBS) buffer pH 7.4, and centrifuged as described before. 10 ml of the resulting solution (equivalent to 0.25 g sample) were then loaded onto an Ochraprep® IAC. Before the immunoaffinity

cleanup, 50 µl of the U-[¹³C₂₀]-OTA standard solution 10 ng/ml was added to each sample as an internal standard (IS) (resulting in a final concentration in the sample of 2 ng/g). For the analysis of the edible part of salami, 25 g of minced sample were weighed in a suitable centrifuge tube, and 10 g of sodium sulphate anhydrous were added and thoroughly mixed in order to remove any water. After addition of 100 ml of acetonitrile-water solution (80:20), the mixture was mixed for 30 min on an horizontal shaker and centrifuged at 48,384×g for 10 min at ambient temperature. A 4 ml aliquot of the upper phase (equivalent to 1 g sample) was then transferred into a clean centrifuge tube and diluted with 44 ml of PBS buffer pH 7.4. Before cleanup, 10 µl of the U-[¹³C₂₀]-OTA standard solution at a concentration of 100 ng/ml were added as an internal standard (resulting in a final concentration in the sample of 1 ng/g).

The extract of each matrix was then passed through the IAC at a flow rate of 1 drop/s. After a washing step with 20 ml of PBS buffer solution, the column was dried for several seconds using draw vacuum. OTA was eluted in a glass tube with 1.5 ml of methanol acidified with acetic acid (98:2) and 1.5 ml of deionised water. After vortexing, the eluate was transferred in a glass vial before LC-MS/MS analysis.

Quantification

For the quantification of OTA in salami, calibration curves were obtained using calibration solutions in solvent. The curves were generated from the peak area ratio between OTA and U-[¹³C₂₀]-OTA (IS). Eight calibration standards were prepared in the range of 0.01-10 ng/ml, and a constant amount of internal standard (U-[¹³C₂₀]-OTA) was added to all standards. The OTA contents of the samples were calculated by extrapolating the peak-area ratio to the calibration curve.

Performance evaluation

The performance of the method applied was assessed using standard OTA solutions in solvent, blanks and spiked samples. The evaluation of linearity was determined using OTA solutions at concentrations of 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, and 10 µg/kg, and it was checked using the coefficient

Table 1. Mass spectrometric parameters for the simultaneous determination of OTA and U-[¹³C₂₀]-OTA (IS) using an electrospray interface (ESI) in positive ionization mode.

Analyte	MW (g/mol)	Retention time (min)	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Collision energy (eV)
Ochratoxin A	403.81	8.61	404.1	238.9 ^a 358.1	22 13
U-[¹³ C ₂₀]-ochratoxin A	423.67	8.61	424.0	377.1	15

^a Quantification ion.

of determination (R^2). Specificity and matrix effects were evaluated by analysis of blanks and spiked samples to verify the possible presence of interfering substances at the retention time of OTA. The recovery and repeatability experiments were carried out using samples spiked with OTA at levels of 0.5, 1, and 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ by making 6 replicate measurements for a total of 18 determinations. The spiked samples were prepared and analysed by the same operators with the same instruments and on the same day. The recovery values were calculated by comparing the peak area ratio between OTA and U- $^{13}\text{C}_{20}$ -OTA in spiked samples and the peak area ratio between OTA and U- $^{13}\text{C}_{20}$ -OTA of pure standard solutions at the same concentration levels. The repeatability was expressed in terms of relative standard deviation (RSD %) of the replicate measurements. The within-laboratory reproducibility was determined using samples spiked with OTA at levels of 0.5, 1, and 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ by making 6 replicate measurements for each concentration on 3 different days (54 determinations in total), and RSD % of the replicate measurements was calculated. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were determined on the basis of a signal-to-noise ratio of 3:1 for the LOD and 10:1 for the LOQ.

3. Results

Method validation

Linearity was checked for all the calibration curves over the entire observed range (0.01-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$), and the coefficient of determination (R^2) was always >0.99 . Under the analytical conditions described above, the specificity of the method was acceptable. Assay interference was investigated by injecting blank samples and spiked samples: no interfering peaks were observed around the retention time of OTA (8.5 min). The run time was 11 min. Supplementary Figure S1 shows a chromatogram obtained following the analysis of a naturally contaminated casing at 24 $\mu\text{g}/\text{kg}$ level.

Recovery was checked at 3 spike levels, and the average recovery percentages ranged from 79.4 to 89.0%, while the overall average recovery was 83.8%. The data about the percent recoveries and the mean recoveries for each fortification level are shown in Table 2.

The repeatability was expressed as intra-day precision, and the RSDs of quantification results were in the range 8.1-15.8%, while the within-laboratory reproducibility was expressed as inter-day precision, and the RSDs of quantification results ranged from 11.8 to 16.4% (Table 3).

These results comply with the performance criteria fixed by Regulation (EC) 401/2006 of the Commission of the European Communities (EC, 2006b). The LOQ and the LOD values obtained were 0.25 and 0.10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. These values underline the good level of sensitivity attained

Table 2. Recovery data of the method for analysis of ochratoxin A (OTA) in salami samples spiked at 3 concentration levels.

	OTA spiking level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			M^2
	0.5	1	2	
Recovery (%) ¹	89.0	79.4	83.0	83.8

¹ Average of 18 replicates at 3 concentrations.
² Average recoveries of the 3 spiking levels.

Table 3. Results of repeatability and within-laboratory reproducibility tests (expressed as RSD%) calculated for analysis of ochratoxin A (OTA) in salami samples.¹

OTA spiking level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Repeatability			Within-laboratory reproducibility		
	Mean ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD (%)	Mean ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD (%)
0.5	0.46	0.07	15.8	0.45	0.07	16.4
1	0.79	0.06	8.1	0.79	0.09	11.8
2	1.60	0.24	14.7	1.66	0.26	15.6

¹ SD = standard deviation; RSD % = relative standard deviation.

in the present work since they are 4 and 10 times lower than the Italian guideline value of 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ established for OTA in pork meat and derived products. Taken together, these validation results show that the methodology applied in this study performed well in quantitating OTA in the products analysed.

Occurrence of ochratoxin A in salami samples

As reported above, in this study a total of 96 artisan salamis were analysed for the presence of OTA. Firstly, the casings of 83 salamis purchased at the start of the study (51 from Campania and 32 from Marche) were analysed, and 57 of them were negative, while 16 samples (11 from Campania and 5 from Marche) showed a concentration level of OTA ranging from the LOQ (0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) to 23.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$. In particular, 5 out of these positives (2 from Campania and 3 from Marche) exceeded the guidance value of 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ established for OTA by the Italian Ministry of Health, as shown in Table 4.

The edible part of these last 5 samples was then examined, and the outer portion and the core of each salami were analysed individually. OTA was detected in the outer edible part of 3 salamis, and in one of them also in the inner core. In two cases, the concentration found in the outer portion exceeded the guidance value of 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (3.9 and 5.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$,

Table 4. Occurrence of ochratoxin A (OTA) on the casing of salami samples collected in the Campania and Marche regions at the first sampling.

Region	# positives/ # total samples	% positives	# positives exceeding OTA guideline value (1 µg/kg)	% positives exceeding OTA guideline value (1 µg/kg)
Campania	11/51	21.6	2	3.9
Marche	5/32	15.6	3	9.4

respectively), while the OTA level detected in the inner part was 0.3 µg/kg, that is slightly above LOQ (Table 5).

Since salami samples that showed the highest concentrations of OTA came from the same production plant located in the Marche region, an additional sampling was carried out in this site in order to assess the possible contamination of salamis of other types and from different batches. Thirteen further samples of sausage products were therefore

collected, and analysis were carried out separately on the casing and on the outer and inner edible parts. OTA was found on the casing of 8 samples (equal to 61.5% of the products sampled), and 6 of them exceeded the Italian guidance value for OTA. The concentrations detected ranged from LOQ to 98.5 µg/kg, while the mycotoxin was not found in the edible parts of any sample (Table 6).

Table 5. Concentration levels of ochratoxin A (OTA) in salamis whose casings exceeded the Italian guideline value for OTA (1 µg/kg).

Ref.	Region	Type of salami	OTA levels (µg/kg)		
			Casing	Outer edible part	Inner edible part
C/7	Campania	Sopressata	9.2	3.9	0.3
C/50	Campania	Salame Corallina	1.1	< LOQ ^b	< LOQ
M/21 ^a	Marche	Salame Nostrano	10.6	< LOQ	< LOQ
M/22 ^a	Marche	Salame Nostrano	23.8	5.7	< LOQ
M/30	Marche	Salame Suino	4.1	0.3	< LOQ

^a Samples from the same production plant.

^b LOQ = limit of quantification.

Table 6. Ochratoxin A (OTA) levels in positive samples collected at the additional sampling carried out in the same production plant.¹

Ref.	Region	Type of salami	OTA levels (µg/kg) ²		
			Casing	Outer edible part	Inner edible part
M II/2A	Marche	Ciauscolo	24.3*	< LOQ	< LOQ
M II/2B	Marche	Ciauscolo	2.0*	< LOQ	< LOQ
M II/6A	Marche	Salame Nostrano	62.0*	< LOQ	< LOQ
M II/6B	Marche	Salame Nostrano	98.5*	< LOQ	< LOQ
M II/7A	Marche	Salame Nostrano	7.7*	< LOQ	< LOQ
M II/7B	Marche	Salame Nostrano	4.2*	< LOQ	< LOQ
M II/8A	Marche	Salame al Cinghiale	0.25	< LOQ	< LOQ
M II/8B	Marche	Salame al Cinghiale	0.49	< LOQ	< LOQ

¹ Concentration exceeding the Italian guideline value for OTA (1 µg/kg) indicated by *.

² LOQ = limit of quantification.

Considering all the 96 sausage products examined, on the whole, OTA was detected on the casing of 24 samples, which account for a relatively high percentage (25.0% of the total). However, the distribution of the concentration levels shows that more than 50% of the positive samples was in the concentration range 0.25-1 µg/kg, and therefore did not exceed OTA guidance value (Figure 1).

4. Discussion and conclusions

The percentage of positive samples is slightly different in the two regions (21.6% of samples from Campania, 15.6 or 28.9% of samples from Marche, depending on whether we consider only the data about the first sampling or even the additional sampling). However, there are no elements to say that these differences are related to the production area.

The two regions have quite different climates. The entire production process of sausages is significantly affected by the climatic conditions, and in particular the drying-maturing process during which the growth of microflora characteristic of the geographical environment occurs. Moreover, other differences between the products from the two areas concern raw materials, ingredients and preparation methods. However, what all sausages examined have in common is that they were purchased from farms in which pigs were reared using traditional livestock-farming methods in a wild and semi wild state, using a diet based on wheat bran and household food scraps (such as potatoes, apples and tomato skins). The casings used in sausage production were mainly of natural origin and no mould

starters were added for the fermentation process and mould cover formation.

The edible parts of the salamis were mostly uncontaminated and this would mean that the diet administered to animals from which raw material for sausages production derive was safe, at least as regard OTA contamination, while the presence of the mycotoxin on the casings could be due to an environmental contamination. Thus, the high percentage of sausage products from the same farm in which OTA was detected on the casing is probably due to mycotoxigenic moulds originating from the indoor air of the dehydrating and ripening rooms. This is not a situation common to the sausage products from the Marche region, but it is a problem of contamination linked to a single production plant.

Several studies have been carried out to monitor the presence of OTA in pork meat-derived products. The main results reported by some authors are summarised in Table 7.

Based on the present data and the results of previous studies, some further interesting consideration can be made in evaluation of OTA risk in cured meat products. Indirect contamination of pork products due to transmission of OTA from animals exposed to contaminated feed, although it has been largely demonstrated experimentally, occurs rarely (Iacumin *et al.*, 2009, 2011; Pietri *et al.*, 2006). Otherwise, direct contamination with toxigenic moulds of environmental origin is the most commonly reported cause for mycotoxin presence (Dall'Asta *et al.*, 2010; Iacumin *et al.*, 2009; Merla *et al.*, 2018; Pietri *et al.*, 2006; Pleadin *et al.*, 2015; Rodríguez *et al.*, 2012). However, the high contamination risk is greater in dry-cured ham than in sausage products either because of the long curing time or because of the fact that ham is not protected by the casing (Bertuzzi *et al.*, 2013; Dall'Asta *et al.*, 2010; Pleadin *et al.*, 2015). It seems quite clear that the casing acts as a protective system against external contamination during ripening.

However, the results of several studies also indicate that OTA can cross the casing (Bertuzzi *et al.*, 2013; Pietri *et al.*, 2006; Spotti *et al.*, 1999), but not always (Iacumin *et al.*, 2009). Regarding this last question, the data of the present study show that in some cases, also in presence of very high levels of OTA on the casing, the mycotoxin was not detected in the edible parts (Table 6), while in others, the presence of OTA on the casing is associated to the detection of the mycotoxin in the sausage meat (Table 5). Furthermore, one of the positive samples (ref. C/7) was in artificial casing, showing that OTA was capable of diffusing also through this type of casing, according to Spotti *et al.* (1999). To prevent or limit this kind of contamination, the control of environmental parameters (physical and microbiological) is the most important measure that should be implemented (Comi *et al.*, 2004).

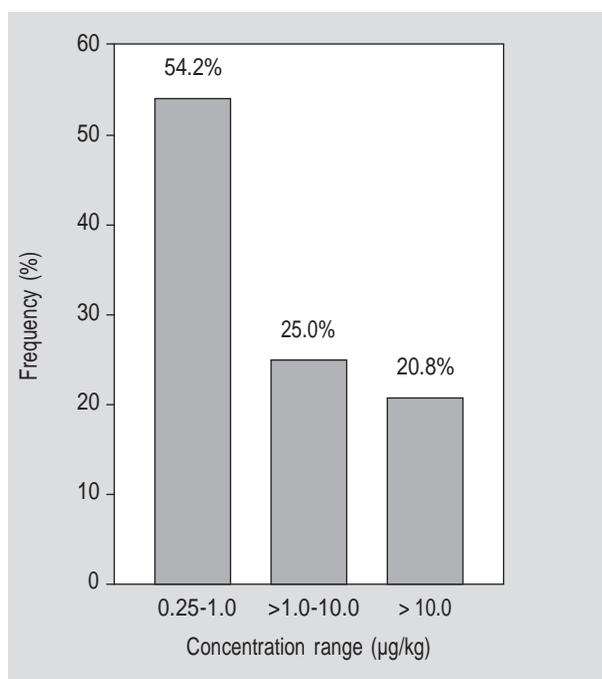


Figure 1. Distribution of ochratoxin A (OTA) levels detected on the casings of the positive samples.

Table 7. Residual levels of ochratoxin A in in pork meat-derived products.

Samples	# positive/ # total samples	% positive	Contamination range ¹ (µg/kg)		Sampling area	References
			Min	Max		
Pork raw sausages	14/30	46.7	0.006	0.4	South Italy	Monaci <i>et al.</i> , 2005
Artisanal and industrial sausages (dry meat)	0/160	0	< 0.1 (LOD)		Northern Italy	Iacumin <i>et al.</i> , 2009
Artisanal and industrial sausages (casings)	72/160	45.0	3	18		
Dry-cured hams (surface portion)	84/110	76.4	–	12.51	Italy	Dall'Asta <i>et al.</i> , 2010
Dry-cured hams (inner core)	32/110	29.1	–	4.66		
Artisanal sausages (dry meat)	0/450	0	<0.1 (LOD)		Northern Italy	Iacumin <i>et al.</i> , 2011
Artisanal sausages (casings)	108/450	24.0	0.11	625.70		
Fermented meat products	58/90	64.4	1.23	7.83	Croatia	Markov <i>et al.</i> , 2013
Dry-fermented sausages	14/208	6.7	0.95	5.10	Croatia	Pleadin <i>et al.</i> , 2015
Artisan salamis	5/50	10.0	0.09	103.69	Northern Italy	Armorini <i>et al.</i> , 2016
Traditional salamis	13/133	9.8	>1 (LOQ)		Northern Italy	Merla <i>et al.</i> , 2018
Artisan salamis	22/172	12.8	0.07	5.66	Italy	Altafini <i>et al.</i> , 2019

¹ LOD = limit of detection; LOQ = limit of quantification; – undefined.

The production of OTA is in turn strain dependent and requires ad hoc conditions of temperature, humidity, water activity (a_w), nutrients, and each fungal species has different optimal conditions for producing OTA (Merla *et al.*, 2018). It has been demonstrated that uncontrolled and heterogeneous indigenous fungal population represents a serious risk of OTA accumulation in dry-cured meat products (Bernáldez *et al.*, 2018). The most interesting methods developed to control OTA accumulation in these products are represented by bioprotective cultures of non-toxigenic moulds (Iacumin *et al.*, 2017). Some other measures that can be taken to prevent or reduce OTA contamination are the removal of moulds from the product surfaces using various techniques (e.g. brushing, washing, or air pressure) and the spreading of rice flour on the casings (Iacumin *et al.*, 2009; Pleadin *et al.*, 2015). In addition to cleaning sausages physically, chemical antifungal agents, such as sodium benzoate, potassium sorbate, and methyl p-hydroxybenzoate can be used as superficial mould inhibitors (Martín-Sánchez *et al.*, 2011; Matos *et al.*, 2007).

However, in recent years the problem of possible health hazards linked to the use of chemical preservatives in foods has caused concern among consumers (Ingredients Insight, 2018). For this reason, the increasing trend is using natural preservatives (in the specific case, natural antifungals) instead of chemically synthesised compounds (Ribes *et al.*, 2018). Among them, natamycin is a natural antifungal agent produced during the fermentation of the bacterium *Streptomyces natalensis* (Pipek *et al.*, 2010). Some essential oils (EO) from plants such as oregano (*Origanum vulgare*) and basil (*Ocimum basilicum L.*) can be used as natural antifungals for the production of dry sausages without having detrimental effects on sensory properties (Martín-Sánchez *et al.*, 2011; Saggiorato *et al.*, 2012).

Also chitosan, a natural polycationic linear polysaccharide derived from chitin, was suggested as alternative natural antifungal agent. Chitosan solution 1%, whether used singly or enriched with some EO (1% thyme-EO or 1% rosemary-EO) has shown to be effective for the inhibition of surface mould growth without affecting the quality parameters of

sausages (Arslan and Soyer, 2018; Soncu *et al.*, 2018). Finally, another technique worth mentioning is treatment with ozonated air during drying and ripening. It was reported as an effective method to prevent potentially toxigenic mould contamination and growth (Comi *et al.*, 2013; Iacumin *et al.*, 2011, 2012). Furthermore, the use of ozone do not seem to influence the ripening, physico-chemical parameters, lipid oxidation or sensorial characteristics of the sausages (Iacumin *et al.*, 2012).

However, these practices cannot always be implemented and in any case, care is needed in such approaches as they can cause the inhibition of growth of specific mould species or strains that play an important role, especially in the typical productions, for the development of characteristic flavours and aromas (Rodríguez *et al.*, 2015).

In conclusion, the present study on the occurrence of OTA in artisan salamis showed that although also very high OTA levels were found on the surface of some products, only in two cases the concentration found in the edible portion exceeded the guidance value of 1 µg/kg. On the whole, OTA was detected on the casing in 25.0% of the samples and even if this data is affected by the high number of positives samples found in one single farm, the percentage is nevertheless not negligible. The presence of OTA on the casing does not therefore seem to be cause for alarm about the safety of this type of product. However, it should be noted that sausages are sometimes sliced without removing the casing especially if it is very thin, also because on salamis labels the casing is often reported as edible. Moreover, even if it is removed from the slices before consumption, a contamination of the edible part from the outside via the knife blade might also be possible. Lastly, it is worth stressing the importance of monitoring the whole production chain of these food products in order to implement appropriate measures to prevent and minimise the health hazard due to this mycotoxin.

Supplementary material

Supplementary material can be found online at <https://doi.org/10.3920/WMJ2020.2568>.

Figure S1. Chromatogram obtained after LC-MS/MS analysis of a naturally contaminated casing at 24 µg/kg level representing the quantitation and confirmation MRM transitions.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Altafini, A., Armorini, S., Zaghini, A., Sardi, L. and Roncada, P., 2017. Tissue distribution of ochratoxin A in pigs after administration of two-levels contaminated diets. *World Mycotoxin Journal* 10: 263-272.
- Altafini, A., Fedrizzi, G. and Roncada, P., 2019. Occurrence of ochratoxin A in typical salami produced in different regions of Italy. *Mycotoxin Research* 35: 141-148.
- Armorini, S., Altafini, A., Zaghini, A. and Roncada, P., 2016. Ochratoxin A in artisan salami produced in Veneto (Italy). *Food Additives and Contaminants Part B* 9: 9-14.
- Arslan, B. and Soyer, A., 2018. Effects of chitosan as a surface fungus inhibitor on microbiological, physicochemical, oxidative and sensory characteristics of dry fermented sausages. *Meat Science* 145: 107-113.
- Associazione Industriali delle Carni e dei Salumi (ASSICA), 2018. Analisi del settore e dati economici 2017. L'Industria delle Carni e dei Salumi. ASSICA, Milan, Italy. Available at: <https://tinyurl.com/y85nfat6>
- Battilani, P., Pietri, A., Giorni, P., Formenti, S., Bertuzzi, T., Toscani, T., Virgili, R. and Kozakiewicz, Z., 2007. *Penicillium* populations in dry-cured ham manufacturing plants. *Journal of Food Protection* 70: 975-980.
- Bernaldez, V., Rodríguez, A., Delgado, J., Sánchez-Montero, L., Juan, J. and Córdoba, J.J., 2018. Gene expression analysis as a method to predict OTA accumulation in dry-cured meat products. *Food Analytical Methods* 11: 2463-2471.
- Bertuzzi, T., Gualla, A., Morlacchini, M. and Pietri, A., 2013. Direct and indirect contamination with ochratoxin A of ripened pork products. *Food Control* 34: 79-83.
- Castegnaro, M., Canadas, D., Vrabcheva, T., Petkova-Bocharova, T., Cherozemsky, I.N. and Pfohl-Leszkwicz, A., 2006. Balkan endemic nephropathy: role of ochratoxins A through biomarkers. *Molecular Nutrition and Food Research* 50: 519-529.
- Comi, G., Chiesa, L., Panseri, S., Orlic, S. and Iacumin, L., 2013. Evaluation of different methods to prevent *Penicillium nordicum* growth on and ochratoxin A production in country-style sausages. *World Mycotoxin Journal* 6: 411-418.
- Comi, G., Orlic, S., Redzepovic, S., Urso, R. and Iacumin, L., 2004. Moulds isolated from Istrian dried ham at the pre-ripening and ripening level. *International Journal of Food Microbiology* 96: 29-34.
- Dall'Asta, C., Galaverna, G., Bertuzzi, T., Moseriti, A., Pietri, A., Dossena, A. and Marchelli, R., 2010. Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscle, salami and dry-cured ham from pigs fed with contaminated diet. *Food Chemistry* 120: 978-983.
- European Commission (EC), 2002. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states. Report of the Scientific Cooperation, Task 3.2.7. Directorate-General Health and Consumer Protection. EC, Brussels, Belgium. Available at: <http://tinyurl.com/mea7ar5>
- European Commission (EC), 2006a. Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding, 2006/576/EC. *Official Journal of the European Union L* 229: 7-9.

- European Commission (EC), 2006b. Commission Regulation EC No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. Official Journal of the European Union L 70: 12-34.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2006. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to ochratoxin A in food. EFSA Journal 365: 1-56.
- Fongaro, L., Alamprese, C. and Casiraghi, E., 2015. Ripening of salami: assessment of colour and aspect evolution using image analysis and multivariate image analysis. Meat Science 101: 73-77.
- Gil-Serna, J., Patiño, B., Cortes, L., Gonzalez-Jaen, M.T. and Vazquez, C., 2015. *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* as potential risk of OTA contamination in food products in warm climates. Food Microbiology 46: 168-175.
- Hald, B., 1991. Porcine nephropathy in Europe. IARC Scientific Publications 115: 49-56.
- Hassen, W., Abid, S., Achour, A., Creppy, E. and Bacha, H., 2004. Ochratoxin A and β_2 -microglobulinuria in healthy individuals and in chronic interstitial nephropathy patients in the Centre of Tunisia: a hot spot of ochratoxin A exposure. Toxicology 199: 185-193.
- Iacumin, L., Chiesa, L., Boscolo, D., Manzano, M., Cantoni, C., Orlic, S. and Comi, G., 2009. Moulds and ochratoxin A on surfaces of artisanal and industrial dry sausages. Food Microbiology 26: 65-70.
- Iacumin, L., Manzano, M. and Comi, G., 2012. Prevention of *Aspergillus ochraceus* growth on and ochratoxin A contamination of sausages using ozonated air. Food Microbiology 29: 229-232.
- Iacumin, L., Manzano, M., Andyanto, D. and Comi, G., 2017. Biocontrol of ochratoxigenic moulds *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium nordicum* by *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomycopsis fibuligera* during speck production. Food Microbiology 62: 188-195.
- Iacumin, L., Milesi, S., Pirani, S., Comi, G. and Chiesa, L.M., 2011. Ochratoxigenic mold and ochratoxin A in fermented sausages from different areas in Northern Italy: occurrence, reduction or prevention with ozonated air. Journal of Food Safety 31: 538-545.
- Ingredients Insight, 2018. Growing concern over additives in food. Ingredients Insight, Nottingham, UK Available at: <https://tinyurl.com/y8a5dcfy>
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 1993. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 56. IARC, Lyon, France.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 1996. Ochratoxin A. Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. Forty-four meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Food Additives Series 35, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Jørgensen, K., 2005. Occurrence of ochratoxin A in commodities and processed food – a review of EU occurrence data. Food Additives and Contaminants, Suppl. 1: 26-30.
- Markov, K., Pleadin, J., Bevardi, M., Vahčić, N., Sokolić-Mihalak, D. and Frece, J., 2013. Natural occurrence of aflatoxin B₁, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. Food Control 34: 312-317.
- Martín-Sánchez, A.M., Chaves-López, C., Sendra, E., Sayas, E., Fenández-López, J. and Pérez-Álvarez, J.Á., 2011. Lipolysis, proteolysis and sensory characteristics of a Spanish fermented dry-cured meat product salchichón with oregano essential oil used as surface mold inhibitor. Meat Science 89: 35-44.
- Matos, T.J.S., Jensen, B.B., Bernardo, F.M.A., Barreto, A.H.S. and Hojberg, Ø., 2007. Mycoflora of two types of Portuguese dry-smoked sausages and inhibitory effect of sodium benzoate, potassium sorbate, and methyl p-hydroxybenzoate on mold growth rate. Journal of Food Protection 70: 1468-1474.
- Meftah, S., Abid, S., Dias, T. and Rodrigues, P., 2018. Effect of dry-sausage starter culture and endogenous yeasts on *Aspergillus westerdijkiae* and *Penicillium nordicum* growth and OTA production. LWT – Food Science and Technology 87: 250-258.
- Merla, C., Andreoli, G., Garino, C., Vicari, N., Tosi, G., Guglielminetti, M.L., Moretti, A., Biancardi, A., Arlorio, M. and Fabbi, M., 2018. Monitoring of ochratoxin A and ochratoxin-producing fungi in traditional salami manufactured in Northern Italy. Mycotoxin Research 34: 107-116.
- Ministero della Sanità, 1999. CIRCOLARE 9 giugno 1999, n.10. Direttive in materia di controllo ufficiale sui prodotti alimentari: valori massimi ammissibili di micotossine nelle derrate alimentari di origine nazionale, comunitaria e Paesi terzi. Gazzetta Ufficiale 135. Available at: <https://tinyurl.com/y8q4uqzg> (in Italian)
- Mitchell, N.J., Chen, C., Palumbo, J.D., Bianchini, A., Cappozzo, J., Stratton, J., Ryu, D. and Wu, F., 2017. A risk assessment of dietary ochratoxin A in the United States. Food and Chemical Toxicology 100: 265-273.
- Monaci, L., Palmisano, F., Matrella, R. and Tantillo, G., 2005. Determination of ochratoxin A at part-per-trillion level in Italian salami by immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. Journal of Chromatography A 1090: 184-187.
- Pavlović, N.M., 2013. Balkan endemic nephropathy – current status and future perspectives. Clinical Kidney Journal 6: 257-265.
- Perši, N., Pleadin, J., Kovačević, D., Scortichini, G. and Milone, S., 2014. Ochratoxin A in raw materials and cooked meat products made from OTA-treated pigs. Meat Science 96: 203-210.
- Pfohl-Leszkowicz, A., Tozlovanu, M., Manderville, R., Peraica, M., Castegnaro, M. and Stefanovic, V., 2007. New molecular and field evidences for the implication of mycotoxins but not aristolochic acid in human nephropathy and urinary tract tumor. Molecular Nutrition and Food Research 51: 1131-1146.
- Pietri, A., Bertuzzi, T., Gualla, A. and Piva, G., 2006. Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscles and in pork products from northern Italy. Italian Journal of Food Science 1: 1-8.
- Pipek, P., Rohlík, B.A., Lojtková, A. and Staruch, L., 2010. Suppression of mould growth on dry sausages. Czech Journal of Food Sciences 28: 258-263.
- Pleadin, J., Kudumija, N., Kovačević, D., Scortichini, G., Milone, S. and Kmetič, I., 2016. Comparison of ochratoxin A levels in edible pig tissues and in biological fluids after exposure to a contaminated diet. Mycotoxin Research 32: 145-151.

- Pleadin, J., Staver, M.M., Vahčić, N., Kovačević, D., Milone, S., Saftić, L. and Scortichini, G., 2015. Survey of aflatoxin B1 and ochratoxin A occurrence in traditional meat products coming from Croatian households and markets. *Food Control* 52: 71-77.
- Ribes, S., Fuentes, A., Talens, P. and Barat, J.M., 2018. Prevention of fungal spoilage in food products using natural compounds: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 58: 2002-2016.
- Rizzo, A., Eskola, M. and Atroshi, F., 2002. Ochratoxin A in cereals, foodstuffs and human plasma. *European Journal of Plant Pathology* 108: 631-637.
- Rodríguez, A., Capela, D., Medina, Á., Córdoba, J.J. and Magana, N., 2015. Relationship between ecophysiological factors, growth and ochratoxin A contamination of dry-cured sausage based matrices. *International Journal of Food Microbiology* 194: 71-77.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Martín, A., Delgado, J. and Córdoba, J.J., 2012. Presence of ochratoxin A on the surface of dry-cured Iberian ham after initial fungal growth in the drying stage. *Meat Science* 90: 728-734.
- Saggiorato, A.G., Gaio, I., Treichel, H., De Oliveira, D., Cichoski, A.J. and Cansian, R.L., 2012. Antifungal activity of basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.): evaluation *in vitro* and on an Italian-type sausage surface. *Food Bioprocess Technology* 5: 378-384.
- Schiavone, A., Cavallero, C., Giroto, L., Pozzo, L., Antoniazzi, S. and Cavallarin, L., 2008. A survey on the occurrence of ochratoxin A in feeds and sera collected in conventional and organic poultry farms in Northern Italy. *Italian Journal of Animal Science* 7: 495-503.
- Soncu, E.D., Arslan, B., Ertürk, D., Küçükkaya, S., Özdemir, N. and Soyer, A., 2018. Microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Turkish fermented sausages sucuk coated with chitosan-essential oils. *LWT – Food Science and Technology* 97: 198-204.
- Sonjak, S., Ličen, M., Frisvad, J.C. and Gunde-Cimerman, N., 2011. Salting of dry-cured meat – a potential cause of contamination with the ochratoxin A-producing species *Penicillium nordicum*. *Food Microbiology* 28: 1111-1116.
- Spotti, E., Cacchioli, C., Colla, F., Beatrisotti, M. and Zanardi, S., 1999. Growth of *Penicillium verrucosum* in model systems based on raw ripened meat products. Ochratoxin A determination and control. *Industrie Conserve* 74: 113-123.
- Stiborová, M., Arlt, V.M. and Schmeiser, H.H., 2016. Balkan endemic nephropathy: an update on its aetiology. *Archives of Toxicology* 90: 2595-2615.

Article

Occurrence of Ochratoxin A in Different Types of Cheese Offered for Sale in Italy

Alberto Altafini ¹, Paola Roncada ^{1,*}, Alessandro Guerrini ¹, Gaetan Minkoumba Sonfack ², Giorgio Fedrizzi ² and Elisabetta Caprai ²

¹ Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, 40064 Ozzano dell'Emilia, Italy; alberto.altafini@unibo.it (A.A.); alessandro.guerrini5@unibo.it (A.G.)

² Reparto Chimico Degli Alimenti, Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", 40127 Bologna, Italy; g.minkoumbasonfack@izsler.it (G.M.S.); giorgio.fedrizzi@izsler.it (G.F.); elisabetta.caprai@izsler.it (E.C.)

* Correspondence: paola.roncada@unibo.it

Abstract: The detection of Ochratoxin A (OTA) in the milk of ruminants occurs infrequently and at low levels, but its occurrence may be higher in dairy products such as cheese. The aim of this study was to investigate the presence of OTA in cheeses purchased in the metropolitan city of Bologna (Italy) and the surrounding area. For the analysis, a LC-MS/MS method with a limit of quantification (LOQ) of 1 µg/kg was used. OTA was detected in seven out of 51 samples of grated hard cheese (concentration range 1.3–22.4 µg/kg), while it was not found in the 33 cheeses of other types which were also analysed. These data show a low risk of OTA contamination for almost all types of cheese analysed. To improve the safety of cheese marketed in grated form, more regulations on cheese rind, which is the part most susceptible to OTA-producing moulds, should be implemented or, alternatively, producers should consider not using the rind as raw material for grated cheese. It would be interesting to continue these investigations particularly on grated hard cheeses to have more data to update the risk assessment of OTA in cheese, as also suggested by EFSA in its 2020 scientific opinion on OTA.

Keywords: ochratoxin A; cheese; food safety; LC-MS/MS

Key Contribution: The presence of OTA was investigated in 84 samples of different types of cheese offered for sale in Italy. The grated hard cheese category is the one at higher risk of this type of contamination, while OTA was not detected in the other types of cheese. Regulations focused on cheese rind, which is the part most susceptible to OTA-producing moulds, should be implemented.

Citation: Altafini, A.; Roncada, P.; Guerrini, A.; Minkoumba Sonfack, G.; Fedrizzi, G. Occurrence of Ochratoxin A in Different Types of Cheese Offered for Sale in Italy. *Toxins* **2021**, *13*, 540. <https://doi.org/10.3390/toxins13080540>

Received: 29 June 2021

Accepted: 31 July 2021

Published: 2 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The whole world is facing a large crisis due to the coronavirus pandemic (COVID-19) which began in 2019 in China, from where it rapidly spread all over the world. The pandemic affected food industries around the globe, in sectors such as agriculture, food supplies and animal production [1], causing an adverse impact on poverty, food security, and diets [1,2]. The concept of food security includes four components: availability, access, utilisation (quality and safety), and stability; and five elements that are recognised to be critical in determining food environment: proximity, convenience, availability, affordability, and quality [3].

In order to combat the COVID crisis, food companies confirmed the implementation of more restrictive hygiene procedures as well as the additional purchases of PPE. Despite all of these challenges, available data seemed to indicate that food safety had not been compromised [4]. In this context, we believe it is important to emphasise that, in addition to all the new measures taken to reduce the risk of coronavirus contamination in food,

regulations in the food industry, already in place before the pandemic, should not be overlooked. Among these, those concerning environmental contaminants, including mycotoxins, are of primary interest. The present study concerns the detection of a well-known mycotoxin (Ochratoxin A) in cheeses.

Cheese is one of the oldest foods in human history. It was born as a “natural preservation” of milk. In fact, it was the easiest way to keep a liquid and otherwise perishable raw material in a solid form [5]. According to the Italian legislative definition, cheese is the product that is obtained from whole, partially or totally skimmed milk, or from cream, as a result of coagulation with acid treatment, or rennet, which use of ferments and salt [6].

The wide variety of cheeses makes a single general classification of them impossible. They can be subdivided on the basis of different characteristics such as the origin, the ripening time, the temperature of the curd, the percentage of fat or water, and the consistency of the paste. Other elements are the breed of the animal and the treatment of the milk (raw, pasteurised, whole, or skimmed) [7–10].

Each cheese could belong to more than one reference group. In order to avoid this problem, the main reference is generally the fundamental characteristic of the cheese in question [9]. In Italy, there is a large variety of typical cheeses that are made in a specific way, according to gastronomic heritage. They are naturally processed, and distinguished because of their sensory properties and association with a certain local area or region [5,8]. Several consortiums have been established for the protection of these products and to obtain the recognition of them as a PDO (Protected Designation of Origin), PGI (Protected Geographical Indication) or TSG (Traditional Specialties Guaranteed) product [9,11]. Furthermore, a large number of cheeses (more than 450) are included in a national list of traditional agro-alimentary products (PAT), which is updated by the Italian Ministry for Agricultural, Food and Forestry Policies in collaboration with the appropriate regions every year [9,12].

Cheese is a staple food for many populations in Europe and around the world [13], and is one of the excellences of Italy. This food sector is extremely important for the Italian economy. According to 2019 data, at EU level, Italy is the third largest cheese producer producing over 1.2 million tonnes per year, after Germany (2.3 million tonnes) and France (1.9 million tonnes). Furthermore, Italy is the largest producer of PDO cheeses, while the EU is the world’s largest exporter of cheese (over 900,000 tonnes in 2020) [14].

Mycotoxins are toxins produced by some fungi such as mushrooms, yeasts, and moulds. Some of them are able to produce toxins only in particular conditions while others are not toxigenic [15]. Moulds are generally considered as undesirable in food, but that is not always the case. In fact, in several meat and cheese products, the growth of spontaneous microflora, characteristic of the geographical environment from which the food originates, plays an important role, especially in the typical productions, in the development of characteristic flavours and aromas. Furthermore, moulds can be intentionally added to food products to induce the formation of specific flavours [16]. Classic examples are blue cheeses such as Roquefort and Gorgonzola, characterised by an extensively spotted or veined structure due to blue or blue–green moulds [17], and cheeses ripened with surface mould (for example, Camembert and Brie) [18,19]. Among meat products, typical examples are ham, speck, Bündnerfleisch, coppa and dry-cured sausages.

The shift in production of these foods from small local producers to large-scale factories and the need to assure a high level of safety towards mycotoxin production has resulted in an increasing use of commercial mould starter cultures [20]. These cultures may also act as biocontrol agents even though they had not been selected for their properties to inhibit unwanted microorganisms [21]. Protective cultures inoculated during cheesemaking may actively compete with potentially toxigenic fungal contaminants and hinder their spread through the production of inhibitory compounds [22]. A study carried out on white mould cheese has shown that two secondary starters,

Penicillium camemberti and *Geotrichum candidum* can have an inhibitory effect on toxigenic mould contaminants isolated from either the dairy environment or directly from the cheese [23]. Delgado et al. reported that some moulds belonging to the genera *Aspergillus*, *Fusarium*, *Monascus*, *Neosartorya*, and *Penicillium* produced various peptides and proteins with antifungal properties, and that such moulds could be a useful tool to control mycotoxigenic fungi [21]. However, even mould species that contribute positively to the maturation process and to the development of the typical organoleptic characteristics of certain type of cheeses, in cases where they grow on the wrong cheeses, they are considered contaminants that cause great economic losses for food manufacturers [24]. Mycotoxins reported to contaminate cheese include: sterigmatocystin, penicillic acid, patulin, PR toxin, roquefortine, citrinin, cyclopiazonic acid, mycophenolic acid, aflatoxin, isofumigaclavine A, ochratoxin A, and penitrem A. Among all of these mycotoxins, the most hazardous are aflatoxin M1 and ochratoxin A [22,25]. The presence of these substances in dairy products can be due to indirect contamination of the milk used for cheese production, which comes from animals fed with contaminated feed, or can be due to direct contamination of the cheese caused by the growth of mycotoxigenic moulds [22,25–28]. In the cheese production plants, air contaminated with mould spores represents the most major source of mould contamination [29–32].

Ochratoxin A (OTA), the mycotoxin on which the present study is focused, is the most prevalent and most toxic of the ochratoxins. This group of structurally similar molecules are poisonous secondary metabolites produced by fungi belonging to the genera *Aspergillus* and *Penicillium* [15,33,34]. OTA has been shown to have nephrotoxic, hepatotoxic, carcinogenic, teratogenic, genotoxic and immunotoxic properties, as well as other hazardous properties [35–37]. In 1993, OTA was classified by the International Agency for Research on Cancer as a possible carcinogen (Group 2B) to humans [38].

Several studies also report that OTA may be involved in the pathogenesis of different forms of human nephropathies such as the Balkan Endemic Nephropathy (BEN) [39–41] and the Chronic Interstitial Nephropathy (CIN) [42,43], but the true role of this toxin in the etiology of these diseases is still debated [44–47]. OTA has been detected in a wide variety of agricultural commodities, including beans, cocoa, corn, dried fruits, grapes, raisins, grape juice, wine, beer, coffee, rice, spices, wheat, barley, oats, and rye, and can also contaminate livestock products such as meat, milk and their derived products [48–50]. Recent studies have also shown OTA to be present in alfalfa, food colours, spices and even in bottled water [51]. The food categories representing the main contributors of human exposure to OTA are preserved meats, cheeses, grains, and grain-based products [52]. OTA is frequently present in various feedstuffs, in particular cereals (maize, barley, wheat, oats, rice) and cereal by-products [36,53].

Among farmed animals, pigs are particularly susceptible to the adverse health effects associated with OTA exposure, and the toxin can accumulate in the tissues of such animals [54–56]. Pigs are also one of the most frequently exposed species due to their mainly cereal-based diet [57]. Compared to monogastric animals, ruminants are less sensitive to OTA exposure because the protozoan fraction of rumen fluid is capable of enzymatic degradation into ochratoxin- α (OT α) and other less toxic metabolites [58]. However, the rumen bypass of a certain percentage of intact, undegraded OTA needs to be taken into account, and this rate could range from 5 to 62% [59]. Since in these animals the bioavailability of OTA is low to begin with, the chance of OTA transferring to milk is minimal. Thus, detection of the toxin in milk generally occurs only in cases of high concentrations of OTA in animal feed [60,61].

Guidance values for OTA have been established at a European level for feed materials, in particular cereals and cereal products (0.25 mg/kg), and complementary and complete feedstuffs for pigs (0.05 mg/kg) and poultry (0.1mg/kg) [62]. The European Union adopted maximum permissible limits for OTA in several foodstuffs such as cereals, dried vine fruits, coffee, wine, grape juice, foods for infants and young children, spices, liquorice, and wheat gluten, and range from 0.5 to 80 μ g/kg [63]. In contrast, there are no

regulations in the European Union for mycotoxins in milk, except for aflatoxin M1 and the hydroxylated derivative of aflatoxin B1, which occur in the milk of lactating animals [64]. Among the EU member states, only Slovakia has set a maximum level for OTA in milk (5 µg/kg) [65,66].

Even though the detection of OTA in the milk of ruminants occurs infrequently and at low levels, OTA occurrence may be higher in dairy products such as cheese [52]. However, relatively few data are available about the presence of OTA in cheese. The European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM Panel), in its 2020 scientific opinion on ochratoxin A (OTA) in food, reported that more data on OTA in cheese paste in comparison to cheese rinds are needed [52].

The aim of the present study was to investigate the presence of ochratoxin A in various type of cheese purchased from local markets, supermarkets, and specialised shops, mostly located in the metropolitan city of Bologna (Emilia Romagna, Northern Italy) and the surrounding area. Priority was given to the purchase of Italian products produced in the regions Emilia Romagna and Lombardy. Furthermore, a significant part of the samples were packages of ready-to-use grated cheese, which are increasingly popular because of their convenience and packaging that allows proper storage in the refrigerator. For the analysis, a sample preparation procedure with immunoaffinity columns (IACs) and a liquid chromatography-tandem mass spectrometry system (LC-MS/MS), were used.

2. Results

2.1. Method Validation

In all regressions, linearity was satisfactorily higher than the considered range (0.1–20 µg/L). The coefficient of determination (R^2) was always > 0.99 showing a good agreement between peak area and OTA concentration. Assay interference was evaluated by analyzing cheese samples with no detectable amount of OTA and spiked samples (from 1 to 40 µg/kg). No interfering peaks were observed in the spiked samples and no significant peaks were found at the retention time of OTA in the blank samples, showing a satisfactory specificity. The retention time of OTA in naturally contaminated samples and standard solutions was about 2.7 min while the total run time was 3.5 min. Figure 1 shows a chromatogram of a naturally contaminated cheese at a 5 µg/kg level for the mass transitions monitored for U-[$^{13}\text{C}_{20}$]-OTA (internal standard [IS]) and OTA.

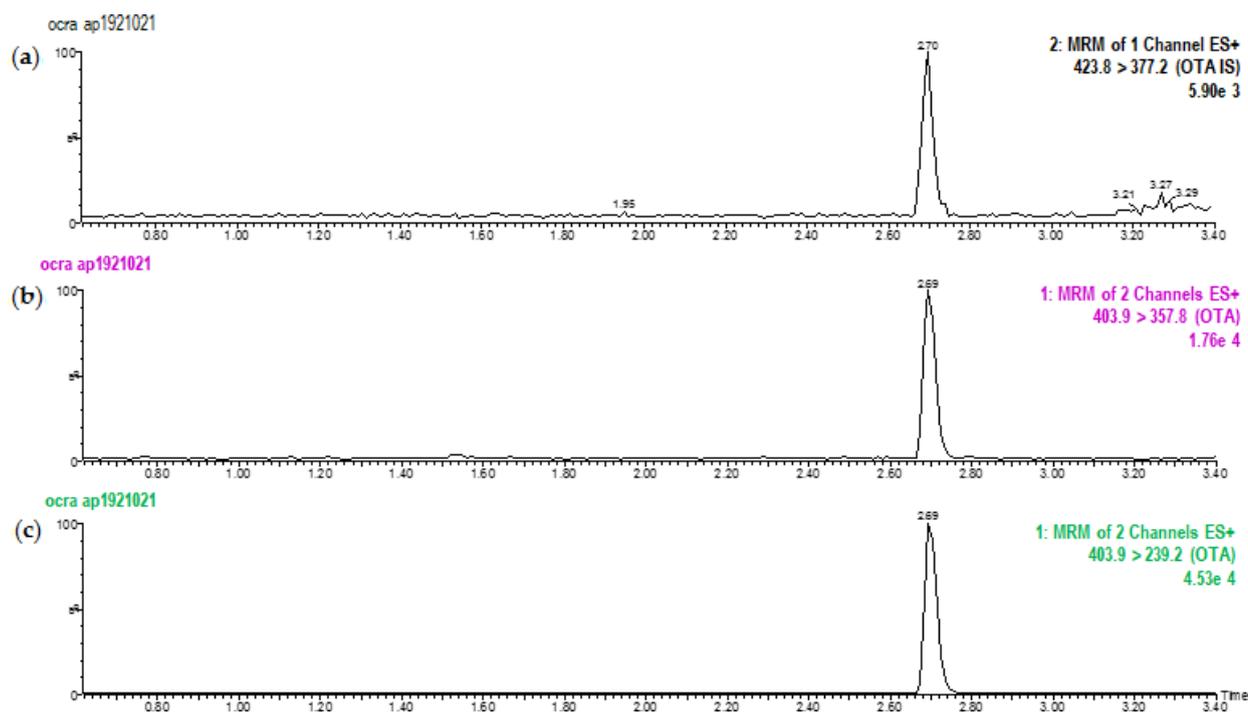


Figure 1. Chromatograms obtained after LC-MS/MS analysis of a naturally contaminated cheese at a 5 µg/kg level for the following mass transitions (a) $m/z = 423.8 > 377.2$ (IS), (b) $m/z = 403.9 > 357.8$, and (c) $m/z = 403.9 > 239.2$.

Recovery was assessed at three spike levels (six replicates for 3 days), and the average recovery percentages ranged from 80.17% to 84.43%. The results are shown in Table 1, and the overall average recovery was 82.9%.

Table 1. Recovery data of the method for analysis of OTA in cheese samples spiked at 3 concentration levels.

	OTA Spiking Level (µg/kg)			M ²
	1	10	20	
Recovery (%) ¹	84.43	80.17	84.27	82.9

¹ Average of 18 replicates for each concentration; ² average recoveries of the 3 spiking levels.

The repeatability and reproducibility tests were based on intraday and inter-day measurements. The relative standard deviations (RSDs) of quantification results ranged from 7.22 to 10.54% and from 9.15 to 13.26%, respectively (Table 2).

These results comply with the performance criteria fixed by Regulation (EC) 401/2006 of the Commission of the European Communities [67].

Table 2. Results of repeatability and reproducibility tests (expressed as RSD%) calculated for the analysis of OTA in cheese samples.

OTA Spiking Level (µg/kg)	Repeatability			Reproducibility		
	Mean (µg/kg)	SE ¹ (µg/kg)	RSD ² (%)	Mean (µg/kg)	SE ¹ (µg/kg)	RSD ² (%)
1	0.88	0.04	10.54	0.84	0.03	13.26
10	8.14	0.33	9.82	8.02	0.20	10.34
20	17.69	0.52	7.22	16.85	0.36	9.15

¹ Standard error; ² Relative standard deviation.

The LOQ and the LOD values obtained were 1 and 0.5 µg/L, respectively. These values underline the good level of sensitivity of the analytical method used, for example, up to the maximum level of OTA in milk established by Slovakia (5 µg/kg), the only country of the European Union who has set a limit for OTA in such this matrix [65,66]. Overall, the validation results show that the methodology applied in this study performed well in quantitating OTA in the products analysed.

2.2. Occurrence of Ochratoxin A in Cheese Samples

In the present study, a total of 84 cheeses of various type were analysed for the presence of OTA. Firstly, 73 cheeses purchased at the start of the study were tested; 69 of them were below LOQ, while four samples showed a concentration level of OTA ranging from 1.3 to 7.5 µg/kg. In particular, all of these positives were samples of grated hard cheese made from cow's milk. They were all Italian grana-type cheeses produced in the regions Emilia Romagna ($n = 2$), Lombardy and Puglia. The first two were 30-months-matured cheeses with designations of origin (PDO), while the others were products derived from a mix of different hard cheeses. Thus, the percentage of positives out of the total number of cheeses analysed was 5.5%, while, when considering only the category of grated hard cheeses ($n = 40$), this percentage increased to 10%. Furthermore, among all the samples examined, six were grana-type cheeses packaged in whole portions, and five of them also included the rind. In these samples, after analyses of the cheese paste, further investigations were also carried out on the rind but OTA was not detected on this part. Following these findings, an additional sampling focused on grated hard cheeses was carried out. Eleven further cheese samples of this type were collected and analysed. OTA was found in three samples at a concentration level ranging from 3.2 to 22.4 µg/kg. These positives were PDO grana-type cheeses produced in Emilia Romagna, one of them matured for at least 30 months and the others for at least 12 months. Thus, the percentage of positives found in the additional sampling was 27.3%, while, by considering the total number of cheeses found contaminated by OTA ($n = 7$), the percentage of positives was 13.7% and 8.3% with respect to the total number of grated hard cheeses ($n = 51$) and the total number of cheeses of various type collected for the present survey ($n = 84$). Cheese samples and OTA concentrations are reported in Table 3.

Table 3. Cheese samples and OTA concentrations.

Ref.	Type of Cheese	Milk Origin	Place of production ¹	OTA (µg/kg)	Ref.	Type of Cheese	Milk Origin	Place of Production ¹	OTA (µg/kg)
1	Soft	Goat	Lombardy	<LOQ	43	Grated hard	Cow	Piedmont	<LOQ
2	Grated hard	Ewe	Sardinia	<LOQ	44	Grated hard	Ewe	Emilia Romagna	<LOQ
3	Grated hard	Cow	Emilia Romagna	<LOQ	45	Grated hard	Cow	Lombardy	<LOQ
4	Blue	Cow	Piedmont	<LOQ	46	Grated hard	Cow	Lombardy	<LOQ
5	Blue	Cow	Piedmont	<LOQ	47	Blue	Cow	Germany	<LOQ
6	Grated hard	Cow	Emilia Romagna	<LOQ	48	Blue	Cow	Piedmont	<LOQ
7	Grated hard	Cow	Veneto	<LOQ	49	Blue	Cow	Germany	<LOQ
8	Blue	Cow	Piedmont	<LOQ	50	Grated hard	Cow	Veneto	<LOQ
9	Blue	Cow	Piedmont	<LOQ	51	Grated hard	Cow	Lombardy	<LOQ
10	Grated hard	Cow	Lombardy	<LOQ	52	Grated hard	Cow	Lombardy	<LOQ
11	Grated hard	Cow	Lombardy	<LOQ	53	Grated	Goat	Sardinia	<LOQ
12	Grated hard	Cow	Emilia Romagna	<LOQ	54	Grated hard	Ewe	Piedmont	<LOQ
13	Hard	Cow	Lombardy	<LOQ	55	Blue	Cow	Piedmont	<LOQ
14	Grated hard	Cow	Piedmont	<LOQ	56	Grated hard	Cow	Lombardy	<LOQ
15	Grated hard	Cow	Emilia Romagna	1.7	57	Grated hard	Cow	Lombardy	<LOQ
16	Grated hard	Cow	Lombardy	<LOQ	58	Blue	Cow	England	<LOQ
17	Grated hard	Cow	Lombardy	<LOQ	59	Grated hard	Cow	Veneto	<LOQ
18	Grated hard	Cow	Lombardy	<LOQ	60	Blue	Cow	France	0.0044
19	Grated hard	Cow	Emilia Romagna	<LOQ	61	Spicy	Cow	Veneto	<LOQ
20	Grated hard	Cow	Trentino	<LOQ	62	Blue	Cow	England	<LOQ
21	Grated hard	Cow	Lombardy	<LOQ	63	Grated hard	Cow	Puglia	7.5

22	Grated hard	Cow	Emilia Romagna	7.2	64	Grated hard	Cow	Lombardy	1.3
23	Grated hard	Cow	Emilia Romagna	<LOQ	65	Grated hard	Cow	Puglia	<LOQ
24	Grated hard	Cow	Lombardy	<LOQ	66	Grated hard	Cow	Umbria-Marche	<LOQ
25	Blue	Cow	Lombardy	<LOQ	67	Grated hard	Cow	Piedmont	<LOQ
26	Semi-hard	Ewe	Abruzzo	<LOQ	68	Grated hard	Cow	Lombardy	<LOQ
27	Soft	Cow	Trentino	<LOQ	69	Hard	Cow	Lombardy	<LOQ
28	Soft	Goat	n.a.	<LOQ	70	Soft-ripened	Cow	Lombardy	<LOQ
29	Spun paste	Cow	Lombardy	<LOQ	71	Hard	Cow	Emilia Romagna	<LOQ
30	Blue	Cow	Piedmont	<LOQ	72	Hard	Cow	Emilia Romagna	<LOQ
31	Blue	Cow	Lombardy	<LOQ	73	Hard	Cow	Emilia Romagna	<LOQ
32	Blue	Cow	Lombardy	<LOQ	74	Grated hard	Cow	Emilia Romagna	3.2
33	Blue	Cow	Piedmont	<LOQ	75	Grated hard	Cow	Emilia Romagna	5.0
34	Blue	Cow	Lombardy	<LOQ	76	Grated hard	Cow	Trentino	<LOQ
35	Blue	Cow	Piedmont	<LOQ	77	Grated hard	Cow	Emilia Romagna	<LOQ
36	Hard	Cow	Emilia Romagna	<LOQ	78	Grated hard	Cow	Lombardy	<LOQ
37	Grated hard	Cow	Lombardy	<LOQ	79	Grated hard	Cow	Lombardy	<LOQ
38	Grated hard	Cow	Emilia Romagna	<LOQ	80	Grated hard	Ewe	Tuscany	<LOQ
39	Grated hard	Cow	Emilia Romagna	<LOQ	81	Grated hard	Cow	Lombardy	<LOQ
40	Grated hard	Cow	Emilia Romagna	<LOQ	82	Grated hard	Cow	Lombardy	<LOQ
41	Blue	Goat	Piedmont	<LOQ	83	Grated hard	Cow	Emilia Romagna	22.4
42	Blue	Cow	Piedmont	<LOQ	84	Grated hard	Cow	Lombardy	<LOQ

¹ Italian region or foreign state.

3. Discussion

If we look at the cheeses analysed as a whole, based on the percentage of positives, we are led to conclude that, in general, OTA risk in this type of food is very low, but for a better interpretation of the results, it is necessary to extrapolate the grated hard cheese category and make a separate analysis of the data. The percentage of positive among these samples was not at all negligible, especially in the additional sampling. As for the concentration of OTA detected, while in two samples it was slightly above the LOQ and in the other two samples it was higher but $\leq 5 \mu\text{g}/\text{kg}$, this concentration was above $7 \mu\text{g}/\text{kg}$ in the other two samples. This last contamination level is not so low if we consider the maximum permitted level of OTA in milk ($5 \mu\text{g}/\text{kg}$) established by Slovakia is taken as a reference, as the European Commission has not yet set a limit for OTA in cheese. Finally, an OTA level equal to $22.4 \mu\text{g}/\text{kg}$ found in one sample shows that a fairly high contamination by OTA is possible in this type of product. Thus, among the products sampled in this survey, the grated hard cheese category is the one at the highest risk of this kind of contamination. As previously reported, in this food product, a contamination due to the presence of OTA in the milk used for cheese production is rather unlikely. In fact, indirect contamination of the milk from animals fed with contaminated feed can happen only in the case of very high concentrations of OTA in animal feed, due to the low carryover of this toxin in ruminants [51,52]. In contrast to AFM1, few investigations have been carried out on the presence of OTA in animal milk.

Valenta and Goll [68] reported no positive samples after an analysis to detect the presence of OTA in 121 regional milk samples from Germany. In a study carried out in Norway by Skaug [69], samples of organic and conventional cow's milk, and cow's-milk-based infant formulas were analysed for the occurrence of OTA. Six out of forty conventional milk samples (range 11–58 ng/L) and 5 out of 47 organic milk samples (range 15–28 ng/L) were found to be positive, while the mycotoxin was not detected in any of the 20 infant formula samples. A survey on the presence of AFM1 and OTA in samples of raw bulk milk was conducted in France in 2003 and OTA was found in 3 out of 264 samples at low levels, in a range from 5 to 8 ng/L [53]. Pattono et al. [70] analysed 63 samples of organic and 20 samples of conventional milk and OTA was detected in only three samples of organic milk with amounts comprised between 0.07 and $0.11 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Higher percentages of positive samples were found in a survey carried out in Turkey in 2017. OTA was detected at concentration levels ranging from 10 to 270 ng/L in 37 out

of 40 cow's milk samples collected from milk collection tanks [71]. A subsequent study carried out in Turkey on 105 milk samples (35 raw, 35 pasteurized, and 35 UHT) showed an average level of an OTA concentration of 119 ± 19 ng/L [66]. These last two surveys both showed slightly higher levels of OTA than previous studies, and one of them showed the highest percentage of positives. Such results could also be due to the analytical method applied (ELISA test) that sometimes leads to overestimations of the number of positives.

Direct contamination of the milk used for cheese production also rarely occurs because such milk is normally pasteurised or heat-treated and mycotoxigenic mould spores are generally not heat-resistant [29–31,72]. Therefore, the most probable hypothesis is that the presence of OTA is due to the growth of ochratoxigenic moulds of environmental origin on the surfaces of cheeses. In the specific case of the grated hard cheeses, a certain aliquot of the product can be derived from the cheese rind, even in the case of PDO cheeses. For example, according to the specifications for Grana Padano and Parmigiano Reggiano cheese, the packages of grated cheese may contain up to 18% of product from the rind [73,74]. Furthermore, all of the grated cheeses examined in the present study were matured products. In the case of the positives, 3 samples were 30 months matured, 2 samples 12 months matured, while 2 samples were a mix of cheeses matured for periods ranging from 4 to 12 months. It is clear that if contamination occurs in the maturing premises, the maturing time could also play a certain role in the growth of ochratoxigenic moulds. Conversely, in the case of fresh cheeses, this kind of contamination normally does not occur. The maturing time of a few days is insufficient for the growth of contaminating filamentous fungi [22]. However, it should be noted that the six grana-type cheeses packaged in whole pieces that were part of the sampling, were matured cheeses (12 months) but, unlike their grated counterparts, they were all negative for the presence of OTA, including the respective rinds, which were analysed separately.

The findings of the present survey corroborate a previous study carried out in Italy by Biancardi et al. [75] in which 40 samples of commercial grated hard cheese were analysed and OTA was detected in six samples at concentrations equal to 1.62, 2.03, 5.28, 12.47, 14.15, and 54.07 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively.

In a survey which aimed to provide information on the mycobiota associated with Italian grana cheese, 18 cheese samples were collected and analysed for the presence of citrinin (CIT) and OTA. This latter mycotoxin was detected in all samples at concentrations ranging from 1 to 1432 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (mean 183 $\mu\text{g}/\text{kg}$). According to the authors, the high levels of contamination found can be explained by the fact that the aliquots of cheese for analysis were taken exclusively from the rind, which is the part of the cheese most exposed to contamination in the presence of ochratoxigenic moulds of environmental origin [76]. It seems clear that in many cases cheese rinds act as a protective system against external contamination during ripening. In a study which aimed to identify the fungal colonisation of ripening cave cheese (a traditional Italian cheese) and relate it to possible mycotoxigenic risk, OTA was found on the rind of 8 out of 22 samples in the range 0.2–317 $\mu\text{g}/\text{kg}$. In addition, in order to assess the ability of OTA to diffuse from the rind into the interior of the cheese, each sample was analysed at three different depth levels (the rind, the middle, and the central part), but OTA was not detected in any of the deeper parts [64].

However, removing the rind of the cheese before consumption, while good practice, does not prevent the consumer from the risk of OTA intake from cheese. In fact, in some cases OTA can cross the rind and contaminate the inner paste of the cheese, as shown in the survey carried out by Pattono et al. [72] which focused on the control of 32 traditional handmade semi-hard cheeses. OTA was detected both in the rind and in the inner part of six samples, with amounts ranging from 1 to 262 mg/kg and from 18 to 146 mg/kg, respectively.

A study carried out in Egypt by Younis et al. [77] examined the presence of OTA in 40 dairy products equally divided among raw milk, milk powder, Roomy cheese (hard cheese) and Kariesh cheese (soft cheese). The results showed that 80% of the samples were

contaminated at concentrations ranging from 0.34 to 13 µg/kg (mean 5.134 ± 1.822 µg/kg). The highest incidence of OTA was found in Roomy cheese (concentration range 3–4.8 µg/kg), and was slightly higher than in Kariesh cheese (90% vs. 80%). According to the authors, this could have been due to the higher exposure of the matured cheeses to environmental ochratoxigenic moulds in the maturing premises. In contaminated fresh cheeses, if correctly stored, it is more likely that the occurrence of OTA may be linked to the milk used for cheese production. In fact, the short maturing time of these products is insufficient for the growth of contaminating moulds [22]. In the cited study [77], the finding of a high percentage of contaminated milk samples among those analysed (70% of fresh milk and 80% of powdered milk) and the absence of OTA-producing moulds on the surface of cheeses in 35% of the cheese products examined could support the above statement.

In case of detection of OTA in a cheese, it is always important and useful to be able to identify the origin of the contamination to determine which are the most critical points in the food production chain. Unfortunately, in many cases it is difficult to retrace the production chain to make the necessary checks. However, even from the analysis of the finished product, it is possible to find useful information to establish if the contamination is of environmental origin or due to the raw material. For example, one can observe the distribution of the toxin in the matrix (uniformly diffused, spot-like, and with a variable concentration from the outside to the centre of the cheese wheel), the presence of ochratoxigenic moulds, as well as the variation of the toxin content over time.

Zhang et al. [78] evaluated OTA concentration changes during a 2-week storage at 4 °C of two contaminated aged cheese samples, one of which had a mould stain. In the latter, a steady increase in the initial toxin concentration was found, with higher OTA levels in the area near the mould stain. These data indicate the presence of live OTA producing moulds in the cheese. In contrast, in the other sample, the toxin concentration remained constant, likely because there were inactive ochratoxigenic moulds. Furthermore, in this last case, the toxin was uniformly distributed in the cheese and this meant that the toxin was already present in the milk used to make the cheese.

Finally, blue cheeses deserve a special consideration. This category of cheese accounted for a significant percentage (23.8%) of the total samples collected. It was interesting to assess whether these cheeses, characterised by an extensively spotted or veined structure due to blue or blue–green mould, could be at risk of OTA contamination. Furthermore, scientific literature reports only one survey of this type, which was carried out by Dall’Asta et al. [17]. The authors examined the presence of OTA in four different types of blue cheeses for a total of 92 samples: Gorgonzola cheese ($n = 54$), Blue cheese ($n = 20$), Roquefort cheese ($n = 14$), and Bergader cheese ($n = 4$). OTA was detected in 23 Gorgonzola samples (concentration range 0.2–3 µg/kg), and seven Roquefort samples (concentration range 0.1–1.4 µg/kg). The study also showed that the contamination was linked to the moulded spots of the cheese and therefore it was not due to raw material. Furthermore, additional tests carried out to evaluate any change in OTA concentration during the shelf life showed that the OTA level increased in contaminated samples but not in blank samples. These results suggested the presence of active OTA-producing moulds in contaminated cheeses. Nonetheless, the study did not establish whether OTA was produced by the industrial *Penicillium* strains used as starter culture or by an accidental concomitant microorganism.

For the present survey, in order to increase the number of types of blue cheeses to be tested, some typical cheeses from foreign countries (Germany, France and England) were also collected. However, distinct from the aforementioned study, the blue cheese samples analysed were all negative for the presence of OTA and further investigation on this type of cheese were not carried out.

4. Conclusions

In conclusion, the data of the present study generally seem to indicate a low risk for OTA contamination for almost all types of cheeses examined. However, among grated hard cheeses, the percentage of positive samples that were found is not at all negligible. While we are aware of the limited number of samples analysed, the fact that our data are in line with the similar survey conducted by Biancardi et al. [75], gives more weight to our results. To improve the safety of cheese marketed in grated form, more regulations focused on cheese rind, which is the part most susceptible to OTA-producing moulds, should be implemented or otherwise, producers should consider not using the rind as raw material for grated cheese, even though such a measure would affect the final price of the product. Moreover, consumers of this type of food also include vulnerable sectors of the population, such as young children and the elderly, for which even greater caution is needed. Considering the lack of available data on OTA contamination in cheeses and the results of the present study, it would be interesting to continue these investigations particularly on grated hard cheeses. Such surveys may be useful to create more data to help update the risk assessment of OTA in cheese, as recommended by EFSA in 2020 [52].

5. Materials and Methods

5.1. Samples

For this study, a total of 84 cheeses of various type were collected between January and April 2021. The cheeses were purchased mainly from local markets, supermarkets, and specialised shops, mostly located in the metropolitan city of Bologna (Emilia Romagna, north Italy) and the surrounding area. Priority was given to the purchase of Italian cheeses produced in the regions of Emilia Romagna, Lombardy and Piedmont. Each cheese was numbered and registered in an appropriate product data sheet. Furthermore, cheese packages with their ingredient labels were photographed and the photo files stored in order to have all available information about each cheese. Firstly, 73 cheeses were sampled. The main types were grated hard cheese ($n = 40$), and blue-veined cheese ($n = 20$). The other types were hard cheese ($n = 6$), soft cheese ($n = 3$), semi-hard cheese ($n = 1$), soft-ripened cheese ($n = 1$), spicy cheese ($n = 1$), and spun paste cheese ($n = 1$). Furthermore, most of the cheeses were from cow's milk ($n = 64$), while the others were from ewe's milk ($n = 5$) and goat's milk ($n = 4$). For the analysis, in the case of hard cheeses with rinds, portions of rind and paste, collected separately, were sampled. Precautions were taken to avoid cross-contamination between the different parts of the cheeses. Portions that included white areas and areas with moulded spots were sampled in blue cheeses. All the cheeses were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis.

After these 73 samples were tested for the presence of OTA, 11 additional grated hard cheeses were collected for the further investigation of this particular type of product, which was found to be the most contaminated by OTA.

5.2. Chemicals and Reagents

The OTA standard and the U- $^{13}\text{C}_{20}$ -OTA standard (internal standard, IS) used to prepare standard solutions for the validation of the analytical method were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA) and Or Sell (Limidi di Soliera (MO), Italy), respectively. Acetonitrile (LC-MS grade) and formic acid (LC-MS grade), methanol (LC-MS grade), n-hexane (analytical grade), and acetic acid (glacial) were purchased from Carlo Erba Reagents (Cornaredo, MI, Italy), Honeywell (Charlotte, NC, USA), Panreac Applichem (Barcellona, Spain), and Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA), respectively. Ultrapure water used throughout the experiments was produced by an Evoqua Water Technologies system (Pittsburgh, PA, USA). Ochrapprep[®] immunoaffinity columns from R-Biopharm AG (Darmstadt, Germany) were used for samples purification.

5.3. Chromatographic Apparatus

Detection and quantification was conducted by LC-MS/MS on an Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) coupled to a Quattro Premier Xe triple-quadrupole mass spectrometer with electrospray ionisation source (Micromass, Manchester, UK). Based on the structural properties of the analytes, the positive ionisation modes (ESI+) were applied. The parameters were as follows: cone voltage, 25V; capillary voltage, 1.0 kV; source temperature, 120 °C; and desolvation temperature 450 °C. Mass Lynx TM 4.1 SCN 805 software (Micromass, Manchester, UK) was used to control the instruments and process the data. The data acquisition was used in multiple reactions monitoring (MRM) mode. The analytical column was an Acquity UPLC BEH C18 1.7 µm 2.1 × 100 mm (Waters, Milford, MA, USA). Chromatographic separation was achieved in gradient elution mode. The mobile phase consisted of ultrapure water containing 0.2% formic acid/acetonitrile 95:5 (*v/v*) (eluent A) and acetonitrile containing 0.2% formic acid (eluent B). The gradient program started with 98% A and 2% B, reaching 40% A in 2 min with linear increase; then returned to 98% A in 0.5 min with a re-equilibration time of 1 min, giving a total run time of 3.5 min. The flow rate was 0.45 mL/min, while the sample injection volume was 10 µL. The ion transitions and mass parameters monitored for OTA and U-[¹³C₂₀]-OTA, are reported in Table 4.

Table 4. Mass spectrometric parameters for the simultaneous determination of OTA and U-[¹³C₂₀]-OTA (IS) using an electrospray interface (ESI) in positive ionisation mode.

Analyte	MW (g/mol)	Retention Time (min)	Precursor Ion (m/z)	Product Ions (m/z)	CE (eV)
Ochratoxin A	403.81	2.7	403.9	239.2*	28
				357.8	12
U-[¹³ C ₂₀]-ochratoxin A	423.67	2.7	423.8	377.2	15

*Quantification ion.

5.4. Sample Extract Preparation

The extraction of OTA from cheese was based on a method reported in a previous study [75] with some modifications, while the sample clean-up procedure was set up on the basis of the indications given in the instruction manual supplied with the IACs. Ten grams of minced sample were weighed in a suitable centrifuge tube, and 10 µL of an U-[¹³C₂₀]-OTA standard solution 1 µg/mL were added as an internal standard (IS) (resulting in a final concentration in the sample of 1 µg/kg). After the addition of 50 mL of acetonitrile–water solution (84:16 *v/v*), the mixture was mixed for 60 min on a horizontal shaker and then passed through filter paper. A 4 mL aliquot of the upper phase was transferred into a centrifuge tube and 4 mL of hexane was added. After vortexing, the mixture was centrifuged at 3,000 rpm for 5 min at ambient temperature and the hexanic upper phase was discharged. The defatting step with 4 mL of hexane was then repeated a second time. Finally, 3 mL of the extraction solution (equivalent to 0.6 g sample) previously diluted with 44 mL of PBS buffer (pH 7.4) was loaded onto an Ochraprep® IAC.

The extract of each sample was then passed through the IAC at a flow rate of 1 drop/s. After a washing step with 20 mL of ultrapure water, the column was dried for several seconds using draw vacuum. OTA was eluted in a glass tube with 2 mL of methanol acidified, with 2% acetic acid. The eluate collected was reduced to dryness under a gentle stream of nitrogen at 45 °C. The residue was redissolved in 500 µL of methanol acidified with 2% acetic acid/water (1:1 *v/v*). After vortexing, the eluate was transferred in a glass vial before LC-MS/MS analysis.

5.5. Quantification

For the quantification of OTA in cheese, calibration curves were created by first preparing a set of OTA standard solutions in solvents at different concentrations and a constant amount of IS was added to all standards. After LC-MS/MS analysis, the curves were constructed based on the peak area ratio between OTA and U-[¹³C₂₀]-OTA (IS) of

each standard solution analysed. The OTA contents of the samples were calculated by extrapolating the peak-area ratio to the calibration curve.

5.6. Performance Evaluation

OTA solutions in solvent, blanks and spiked samples were used to check the performance of the adopted analytical method. Linearity was evaluated by analyzing OTA solutions in solvents at concentrations of 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 and 20 µg/kg, and matrix-matched OTA solutions at concentrations of 1, 5, 10, 20, and 40 µg/kg. The respective calibration curves (in solvent and in matrix) were generated and the coefficients of determination (R^2) calculated. The linearity of the calibration curves was considered satisfactory if $R^2 > 0.99$. Specificity was proved using 20 blank samples, which were analysed and evaluated for interference. The calculation of recovery was made by comparing the peak area ratio between OTA and U-[$^{13}\text{C}_{20}$]-OTA in spiked samples and the peak area ratio between OTA and U-[$^{13}\text{C}_{20}$]-OTA of pure standard solutions at the same concentration levels. The repeatability was calculated as the relative standard deviation (RSD%) of results obtained after fortifying six blank samples at three concentration levels (1, 10, 20 µg/kg) for a total of 18 determinations. The spiked samples were prepared and analysed with the same instruments, on the same day, and by the same operators. The laboratory reproducibility was evaluated by preparing and analyzing six blank samples fortified at three concentration levels (1, 10, 20 µg/kg). The procedure was carried out on three different days by different operators using the same chromatographic apparatus. The RSD% of the replicate measurements (54 determinations in total) was calculated. The limit of quantification (LOQ) and the limit of detection (LOD) were calculated on the basis of a signal-to-noise ratio at the OTA retention time of 10:1 and 3:1, respectively.

Author Contributions: Conceptualisation, P.R. and G.F.; planning and execution of sampling, P.R. and A.A.; methodology, E.C.; validation, E.C.; formal analysis, G.M.S.; investigation, E.C., A.A., A.G. and P.R.; resources, G.F. and P.R.; data interpretation, G.F. and E.C.; writing—original draft preparation, A.A.; writing—review and editing, A.A., E.C., A.G. and P.R.; supervision, P.R. and G.F.; project administration, P.R.; funding acquisition, G.F. and P.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by IZSLER funds and Alma Mater Studiorum-University of Bologna, RFO 2019.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors thank their colleague Andrea Carminati (University of Turin) for the linguistic review of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Seleiman, M.F.; Selim, S.; Alhammad, B.A.; Alharbi, B.M.; Cezar Juliatti, F. Will novel coronavirus (Covid-19) pandemic impact agriculture, food security and animal sectors? *Biosci. J.* **2020**, *36*, doi:10.14393/BJ-v36n4a2020-54560.
2. Laborde, D.; Martin, W.; Vos, R. Impacts of COVID-19 on global poverty, food security, and diets: Insights from global model scenario analysis. *Agric. Econ.* **2021**, *52*, 375–390, doi:10.1111/agec.12624.
3. Downs, S.M.; Ahmed, S.; Fanzo, J.; Herforth, A. Food environment typology: Advancing an expanded definition, framework, and methodological approach for improved characterization of wild, cultivated, and built food environments toward sustainable diets. *Foods* **2020**, *9*, 532, doi:10.3390/foods9040532.
4. Djekic, I.; Nikolić, A.; Uzunović, M.; Marijke, A.; Liu, A.; Han, J.; Brnčić, M.; Knežević, N.; Papademas, P.; Lemoniati, K.; et al. Covid-19 pandemic effects on food safety-Multi-country survey study. *Food Control* **2021**, *122*, 107800, doi:10.1016/j.foodcont.2020.107800.
5. Formaggio.it. Formaggio e Storia. Available online: <http://www.formaggio.it/formaggio-e-storia/> (accessed on 22 July 2021).

6. Regio Decreto Legge 15 Ottobre 1925, n. 2033. Repressione delle frodi nella preparazione e nel commercio di sostanze di uso agrario e di prodotti agrari. *Gazz. Uff.* **1925**, 281, 4771–4778.
7. CLAL.it. La Classificazione dei Formaggi. Available online: https://www.clal.it/downloads/schede/CLAL-Classificazione_formaggi_italiani.pdf (accessed on 22 March 2021).
8. Atlante Caseario. Available online: <https://www.atlantecaseario.com/formaggi.php> (accessed on 18 February 2021).
9. Ministero Delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, Dipartimento Delle Politiche Competitive del Mondo Rurale e Della Qualità-Direzione Generale Dello Sviluppo Agroalimentare e Della Qualità. Formaggio. Available online: <https://www.politicheagricole.it/flex/cm/pages/ServeAttachment.php/L/IT/D/6%252Fb%252F0%252FD.4f86cd3c96d815d787a8/P/BLOB%3AID%3D4675/E/pdf> (accessed on 22 July 2021).
10. Almena-Aliste, M.; Mietton, B. Cheese Classification, Characterization, and Categorization: A Global Perspective. *Microbiol. Spectr.* **2014**, 2, doi:10.1128/microbiolspec.CM-0003-2012.
11. European Commission (EC). Quality Schemes Explained. Available online: https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/food-safety-and-quality/certification/quality-labels/quality-schemes-explained_en (accessed on 22 July 2021).
12. Ministero delle Politiche Agricole e Forestali. Decreto 8 settembre 1999, n.350 Regolamento recante norme per l'individuazione dei prodotti tradizionali di cui all'articolo 8, comma 1, del decreto legislativo 30 aprile 1998, n.173. *Gazz. Uff.* **1999**, 240, 30–31.
13. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Staple Foods: What Do People Eat? Available online: <http://www.fao.org/3/u8480e/u8480e07.htm> (accessed on 22 July 2021).
14. CLAL.it. Dairy by Country. Available online: <https://www.clal.it/en/index.php> (accessed on 22 March 2021).
15. Anli, E.; Alkis, İ.M. Ochratoxin A and brewing technology: A review. *J. Inst. Brew.* **2010**, 116, 23–32, doi:10.1002/j.2050-0416.2010.tb00394.x.
16. Capozzi, V.; Fragasso, M.; Romaniello, R.; Berbegal, C.; Russo, P.; Spano, G. Spontaneous food fermentations and potential risks for human health. *Fermentation* **2017**, 3, 49, doi:10.3390/fermentation3040049.
17. Dall'Asta, C.; Lindner, J.D.D.; Galaverna, G.; Dossena, A.; Neviani, E.; Marchelli, R. The occurrence of ochratoxin A in blue cheese. *Food Chem.* **2008**, 106, 729–734, doi:10.1016/j.foodchem.2007.06.049.
18. Galli, B.D.; Martin, J.G.P.; da Silva, P.P.M.; Porto, E.; Spoto, M.H.F. Sensory quality of Camembert-type cheese: Relationship between starter cultures and ripening molds. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, 234, 71–75, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.025.
19. Marín, P.; Palmero, D.; Jurado, M. Occurrence of moulds associated with ovine raw milk and cheeses of the Spanish region of Castilla La Mancha. *Int. J. Dairy Technol.* **2015**, 68, 565–572, doi:10.1111/1471-0307.12208.
20. Sunesen, L.O.; Stahnke, L.H. Mould starter cultures for dry sausages—Selection, application and effects. *Meat Sci.* **2003**, 65, 935–948, doi:10.1016/S0309-1740(02)00281-4.
21. Delgado, J.; Peromingo, B.; Nunez, F.; Asensio, M.A. Use of molds and their antifungal proteins for biocontrol of toxigenic molds on dry-ripened cheese and meats. *Curr. Opin. Food Sci.* **2016**, 11, 40–45, doi:10.1016/j.cofs.2016.09.003.
22. Hymery, N.; Vasseur, V.; Coton, M.; Mounier, J.; Jany, J.L.; Barbier, G.; Coton, E. Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2014**, 13, 437–456, doi:10.1111/1541-4337.12069.
23. Decker, M.; Nielsen, P.V. The inhibitory effect of *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* on the associated funga of white mould cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **2005**, 104, 51–60, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.002.
24. Marcellino, N.; Benson, D. The Good, the Bad, and the Ugly: Tales of Mold-Ripened Cheese. In *Cheese and Microbes*; Donnelly, C., Ed.; ASM Press: Washington, DC, USA, 2014; pp. 95–131, doi:10.1128/microbiolspec.CM-0005-2012.
25. Sengun, I.; Yaman, D.B.; Gonul, S. Mycotoxins and mould contamination in cheese: A review. *World Mycotoxin J.* **2008**, 1, 291–298, doi:10.3920/WMJ2008.x041.
26. Benkerroum, N. Mycotoxins in dairy products: A review. *Int. Dairy J.* **2016**, 62, 63–75, doi:10.1016/j.idairyj.2016.07.002.
27. Dobson, A.D. Mycotoxins in cheese. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 4th ed.; McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W., Eds; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2017; pp. 595–601, doi:10.1016/B978-0-12-417012-4.00023-5.
28. Ushkalov, V.; Danchuk, V.; Midyk, S.; Voloshchuk, N.; Danchuk, O. Mycotoxins in Milk and Dairy Products. *Food Sci. Technol.* **2020**, 14, 137–149, doi:10.15673/fst.v14i3.1786.
29. Garnier, L.; Valence, F.; Mounier, J. Diversity and control of spoilage fungi in dairy products: An update. *Microorganisms* **2017**, 5, 42, doi:10.3390/microorganisms5030042.
30. Kure, C.F.; Skaar, I. The fungal problem in cheese industry. *Curr. Opin. Food Sci.* **2019**, 29, 14–19, doi:10.1016/j.cofs.2019.07.003.
31. Kure, C.F.; Skaar, I.; Brendehaug, J. Mould contamination in production of semi-hard cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, 93, 41–49, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.005.
32. Montagna, M.T.; Santacroce, M.P.; Spilotros, G.; Napoli, C.; Minervini, F.; Papa, A.; Dragoni, I. Investigation of fungal contamination in sheep and goat cheeses in southern Italy. *Mycopathologia* **2004**, 158, 245–249, doi:10.1023/b:myco.0000041897.17673.2c.
33. Heussner, A.H.; Bingle, L.E. Comparative ochratoxin toxicity: A review of the available data. *Toxins* **2015**, 7, 4253–4282, doi:10.3390/toxins7104253.
34. Kumar, P.; Mahato, D.K.; Sharma, B.; Borah, R.; Haque, S.; Mahmud, M.C.; Shah, A.K.; Rawal, D.; Bora, H.; Bui, S. Ochratoxins in food and feed: Occurrence and its impact on human health and management strategies. *Toxicon* **2020**, 187, 151–162, doi:10.1016/j.toxicon.2020.08.031.
35. Bayman, P.; Baker, J.L. Ochratoxins: A global perspective. *Mycopathologia* **2006**, 162, 215–223, doi:10.3390/toxins7104253.

36. Denli, M.; Perez, J.F. Ochratoxins in feed, a risk for animal and human health: Control strategies. *Toxins* **2010**, *2*, 1065–1077, doi:10.3390/toxins7104253.
37. Reddy, L.; Bhoola, K. Ochratoxins—Food contaminants: Impact on human health. *Toxins* **2010**, *2*, 771–779, doi:10.3390/toxins7104253.
38. IARC. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. *Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* **1993**, *56*, 489–521.
39. Castegnaro, M.; Canadas, D.; Vrabcheva, T.; Petkova-Bocharova, T.; Chernozemsky, I.N.; Pfohl-Leszkwicz, A. Balkan endemic nephropathy: Role of ochratoxins A through biomarkers. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 519–529, doi:10.1002/mnfr.200500182.
40. Peraica, M.; Domijan, A.M.; Miletić-Medved, M.; Fuchs, R. The involvement of mycotoxins in the development of endemic nephropathy. *Wien. Klin. Wochenschr* **2008**, *120*, 402–407, doi:10.1007/s00508-008-0981-x.
41. Vrabcheva, T.; Petkova-Bocharova, T.; Grosso, F.; Nikolov, I.; Chernozemsky, I.N.; Castegnaro, M.; Dragacci, S. Analysis of ochratoxin A in foods consumed by inhabitants from an area with balkan endemic nephropathy: A 1 month follow-up study. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 2404–2410, doi:10.1021/jf030498z.
42. Zaied, C.; Bouaziz, C.; Azizi, I.; Bensassi, F.; Chour, A.; Bacha, H.; Abid, S. Presence of ochratoxin A in Tunisian blood nephropathy patients. Exposure level to OTA. *Exp. Toxicol. Pathol.* **2011**, *63*, 613–618, doi:10.1016/j.etp.2010.05.001.
43. Khelifa, K.H.; Ghali, R.; Mazigh, C.; Aouni, Z.; Machgoul, S.; Hedhili, A. Ochratoxin A levels in human serum and foods from nephropathy patients in Tunisia: Where are you now? *Exp. Toxicol. Pathol.* **2012**, *64*, 509–512, doi:10.1016/j.etp.2010.11.006.
44. Bui-Klimke, T.; Wu, F. Evaluating weight of evidence in the mystery of Balkan endemic nephropathy. *Risk Anal.* **2014**, *34*, 1688–1705, doi:10.1111/risa.12239.
45. Stefanović, V.; Polenaković, M. Fifty years of research in Balkan endemic nephropathy: Where are we now? *Nephron Clin. Pract.* **2009**, *112*, c51–c56, doi:10.1159/000213081.
46. Stiborová, M.; Arlt, V.M.; Schmeiser, H.H. Balkan endemic nephropathy: An update on its aetiology. *Arch. Toxicol.* **2016**, *90*, 2595–2615, doi:10.1007/s00204-016-1819-3.
47. Stoev, S.D. Balkan Endemic Nephropathy—Still continuing enigma, risk assessment and underestimated hazard of joint mycotoxin exposure of animals or humans. *Chem. Biol. Interact.* **2017**, *261*, 63–79, doi:10.1016/j.cbi.2016.11.018.
48. Abrunhosa, L.; Paterson, R.R.; Venâncio, A. Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. *Toxins* **2010**, *2*, 1078–1099, doi:10.3390/toxins2051078.
49. Alshannaq, A.; Yu, J.H. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2017**, *14*, 632, doi:10.3390/ijerph14060632.
50. Ostry, V.; Malir, F.; Ruprich, J. Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin. *Toxins* **2013**, *5*, 1574–1586, doi:10.3390/toxins5091574.
51. Kőszegi, T.; Poór, M. Ochratoxin A: Molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level. *Toxins* **2016**, *8*, 111, doi:10.3390/toxins8040111.
52. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Schrenk, D.; Bodin, L.; Chipman, J.K.; Del Mazo, J.; Grasl-Kraupp, B.; Hogstrand, C.; Hoogenboom, L.; Leblanc, J.C.; Nebbia, C.S.; et al. Risk assessment of ochratoxin A in food. *EFSA J.* **2020**, *18*, 6113, doi:10.2903/j.efsa.2020.6113.
53. Boudra, H.; Barnouin, J.; Dragacci, S.; Morgavi, D.P. Aflatoxin M1 and ochratoxin A in raw bulk milk from French dairy herds. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 3197–3201, doi:10.3168/jds.2006-565.
54. Altafini, A.; Armorini, S.; Zaghini, A.; Sardi, L.; Roncada, P. Tissue distribution of ochratoxin A in pigs after administration of two-levels contaminated diets. *World Mycotoxin J.* **2017**, *10*, 263–272, doi:10.3920/WMJ2016.2152.
55. Dall’Asta, C.; Galaverna, G.; Bertuzzi, T.; Moseriti, A.; Pietri, A.; Dossena, A.; Marchelli, R. Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscle, salami and dry-cured ham from pigs fed with contaminated diet. *Food Chem.* **2010**, *120*, 978–983, doi:10.1016/j.foodchem.2009.11.036.
56. Pleadin, J.; Kovačević, D.; Perši, N. Ochratoxin A contamination of the autochthonous dry-cured meat product “Slavonski Kulen” during a six-month production process. *Food Control* **2015**, *57*, 377–384, doi:10.1016/j.foodcont.2015.05.013.
57. Li, X.; Zhao, L.; Fan, Y.; Jia, Y.; Sun, L.; Ma, S.; Ji, C.; Ma, Q.; Zhang, J. Occurrence of mycotoxins in feed ingredients and complete feeds obtained from the Beijing region of China. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2014**, *5*, 1–8, doi:10.1186/2049-1891-5-37.
58. Duarte, S.C.; Lino, C.M.; Pena, A. Ochratoxin A in feed of food-producing animals: An undesirable mycotoxin with health and performance effects. *Vet. Microbiol.* **2011**, *154*, 1–13, doi:10.1016/j.vetmic.2011.05.006.
59. Mobashar, M.; Hummel, J.; Blank, R.; Südekum, K.H. Ochratoxin A in ruminants—a review on its degradation by gut microbes and effects on animals. *Toxins* **2010**, *2*, 809–839, doi:10.3390/toxins2040809.
60. Becheva, Z.R.; Atanasova, M.K.; Ivanov, Y.L.; Godjevargova, T.I. Magnetic Nanoparticle-Based Fluorescence Immunoassay for Determination of Ochratoxin A in Milk. *Food Anal. Methods* **2020**, *13*, 2238–2248, doi:10.1007/s12161-020-01848-7.
61. González-Osnaya, L.; Soriano, J.M.; Moltó, J.C.; Mañes, J. Simple liquid chromatography assay for analyzing ochratoxin A in bovine milk. *Food Chem.* **2008**, *108*, 272–276, doi:10.1016/j.foodchem.2007.10.013.
62. European Commission (EC). Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenon, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding (Text with EEA relevance) (2006/576/EC). *OJEU* **2006**, *229*, 7–9.
63. European Commission (EC). Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (Text with EEA relevance). *OJEU* **2006**, *364*, 5–24.

64. Anelli, P.; Haidukowski, M.; Epifani, F.; Cimmarusti, M.T.; Moretti, A.; Logrieco, A.; Susca, A. Fungal mycobiota and mycotoxin risk for traditional artisan Italian cave cheese. *Food Microbiol.* **2019**, *78*, 62–72, doi:10.1016/j.fm.2018.09.014.
65. Duarte, S.C.; Lino, C.; Pena, A. Mycotoxin food and feed regulation and the specific case of Ochratoxin A: A review of the worldwide status. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* **2010**, *27*, 1440–1450, doi:10.1080/19440049.2010.497166.
66. Turkoglu, C.; Keyvan, E. Determination of aflatoxin M1 and ochratoxin A in raw, pasteurized and UHT milk in Turkey. *Acta Sci. Vet.* **2019**, *47*, 1626, doi:10.22456/1679-9216.89667.
67. European Commission (EC). Commission Regulation EC No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *OJEU* **2006**, *70*, 12–34.
68. Valenta, H.; Goll, M. Determination of ochratoxin A in regional samples of cow's milk from Germany. *Food Addit. Contam.* **1996**, *13*, 669–676, doi:10.1080/02652039609374452.
69. Skaug, M.A. Analysis of Norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A. *Food Addit. Contam.* **1999**, *16*, 75–78, doi:10.1080/026520399284235.
70. Pattono, D.; Gallo, P.F.; Civera, T. Detection and quantification of ochratoxin A in milk produced in organic farms. *Food Chem.* **2011**, *127*, 374–377, doi:10.1016/j.foodchem.2010.12.051.
71. Keyvan, E.; Yurdakul, O.; Kocasari, F.; Tutun, H.; Demirtaş, A.; Kahraman, H.A.; Şen, E. Detection of ochratoxin A in bulk tank milk. *Kocatepe Vet. Derg.* **2018**, *11*, 255–259, doi:10.30607/kvj.424808.
72. Pattono, D.; Grosso, A.; Stocco, P.P.; Pazzi, M.; Zeppa, G. Survey of the presence of patulin and ochratoxin A in traditional semi-hard cheeses. *Food Control.* **2013**, *33*, 54–57, doi:10.1016/j.foodcont.2013.02.019.
73. Dipartimento delle politiche competitive, della qualità agroalimentare, ippiche e della pesca. Provvedimento 14 ottobre 2019 Modifica del disciplinare di produzione della denominazione «Grana Padano» registrata in qualità di denominazione di origine protetta. *Gazz. Uff.* **2019**, *249*, 11–16.
74. Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali. Proposta di modifica del disciplinare di produzione della denominazione di origine protetta «Parmigiano Reggiano». *Gazz. Uff.* **2017**, *185*, 94–100.
75. Biancardi, A.; Piro, R.; Galaverna, G.; Dall'Asta, C. A simple and reliable liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of ochratoxin A in hard cheese. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2013**, *64*, 632–640, doi:10.3109/09637486.2013.763911.
76. Decontardi, S.; Mauro, A.; Lima, N.; Battilani, P. Survey of *Penicillia* associated with Italian grana cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *246*, 25–31, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.019.
77. Younis, G.; Ibrahim, D.; Awad, A.; El Bardisy, M.M. Determination of aflatoxin M1 and ochratoxin A in milk and dairy products in supermarkets located in Mansoura City, Egypt. *Adv. Anim. Vet. Sci.* **2016**, *4*, 114–121, doi:10.14737/journal.aavs/2016/4.2.114.121.
78. Zhang, X.; Cudjoe, E.; Vuckovic, D.; Pawliszyn, J. Direct monitoring of ochratoxin A in cheese with solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 7505–7509, doi:10.1016/j.chroma.2009.03.009.

3. ANTIPARASSITARI

3.1. IL FIPRONIL, GENERALITÀ

Il fipronil (FIP), il cui nome IUPAC è (\pm) 5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4 [trifluoromethyl) sulfinyl]-1*H*-pyrazole-3-carbonitrile, di formula bruta $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$ e peso molecolare 437.1, convenzionalmente indicato con l'acronimo MB 46030, è una molecola chirale ad uso insetticida/acaricida ad ampio spettro di azione, appartenente alla classe dei fenilpirazoli (Figura 19). Chimicamente, contiene un sostituito trifluoro-metil-sulfinile che non è presente in nessun altro prodotto ad uso insetticida o agro-chimico, caratteristica che gli attribuisce una notevole potenza insetticida (Taillebois et al., 2015). Si presenta fisicamente come una polvere bianca cristallina, solubile in acqua distillata e solventi organici, quali metanolo, hexane, acetone, propanolo e diclorometano. Risulta facilmente degradabile alla luce, quindi fotolabile, ma stabile se sottoposto ad alte temperature (30-150 °C) e non infiammabile. È noto anche per essere una molecola, metaboliti compresi, altamente liposolubile.

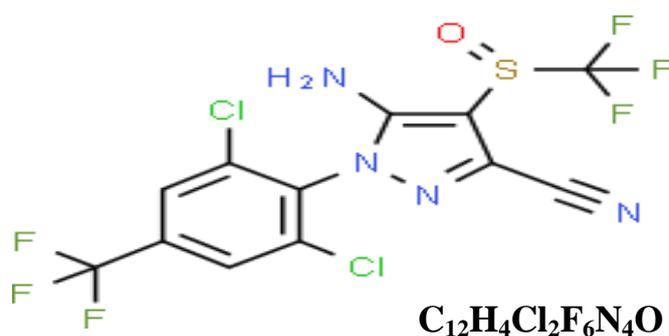


Figura 19. Formula chimica e struttura del fipronil.

Fu registrato per la prima volta negli Stati Uniti nel 1996, dalla Rhone Poulenc Ag Company (ora nota come Bayer Crop Science), e usato inizialmente per controllare sia i parassiti agricoli sia quelli non agricoli come la piralide del riso, afidi, locuste, zecche, pulci, termiti, formiche, scarafaggi, zanzare, ecc. (Tingle et al., 2003). Ampiamente noto per essere utilizzato come insetticida sugli animali domestici quali cani e gatti (Frontline®, Frontline Combo®, Effitix®, ecc), contenuto in collari antiparassitari o formulazioni *spot-on*, in formulazioni come molecola singola o associazioni con altre tra cui la più nota il methoprene o permetrine, il suo uso è vietato negli animali produttori di alimenti in tutta la UE. Nonostante il suo uso sia illecito, costituisce un paradosso che la molecola sia ampiamente reperibile e facilmente accessibile a chiunque nei comuni negozi per pet, o persino nei supermercati e online, sia in Italia sia all'estero (Figura 20-

24). L'utilizzo del fipronil è autorizzato come sostanza attiva (insetticida) nei prodotti fitosanitari ai sensi del Regolamento (CE) N. 1107/2009.



20



21



22



23



24

Figura 20-24. Prodotti commerciali contenenti fipronil reperibili on-line dall'estero (20-23) e Frontline (fipronil) per pet, commercializzato in Italia e in libera vendita (24).

In particolare, l'uso di prodotti fitosanitari contenenti fipronil va limitato al trattamento delle sementi da seminare in serra e al trattamento delle sementi di porri, cipolle, scalogni e ortaggi del genere *Brassica* da seminare in campi e da raccogliere prima della fioritura. La vendita di sementi trattate con fipronil, è vietata Regolamento (UE) N. 781/2013, che ha tra gli scopi principali quello della tutela di insetti impollinatori, quali le api. Secondo recenti studi, il fipronil costituisce anche un forte inquinante di falda e ambientale (Simon-Delso et al., 2015). Residui di fipronil e dei suoi principali metaboliti infatti, sono stati ritrovati in molti campioni ambientali tra cui polveri prelevate da abitazioni (Salis et al., 2017), acqua e acque reflue (Teerlink et al., 2017), suolo, vegetali e persino prodotti animali, con rischi potenziali per la salute dell'uomo, animali (compresi animali

no-target) ed ecosistemi (Pisa et al., 2014; Bonmatin et al., 2015; Gibbons et al., 2015; Magalhaes et al., 2018), per i suoi effetti dovuti alla notevole persistenza. Relativamente alla sua persistenza ambientale, il fipronil può avere un'emivita ambientale nel suolo variabile da 122 a 128 giorni, calcolate in condizioni sperimentali di laboratorio, mediamente confermate in campo con tempistiche di degradazione dai 3 a 7,3 mesi (Bonmatin et al., 2015). La sua degradazione ambientale dipende quindi da vari fattori, come l'umidità del suolo, il pH, il contenuto di materia organica, la temperatura, l'intensità della luce solare, la popolazione microbica, ecc. Secondo la normativa vigente, per il fipronil e altre sostanze quali amitrolo, flufenacet, pendimetalin, propizamide e piridato, i Livelli Massimi di Residui (MRL) di pesticidi in o su alimenti e mangimi di origine vegetale e animale, sono stati stabiliti nell'allegato II e nell'allegato III, parte B, del Regolamento (CE) n. 396/2005. Per le sostanze dinocap e fipronil stesso, gli MRL sono stati stabiliti nell'allegato III di, parte A, di detto Regolamento. Proprio nei riguardi di quest'ultimo, l'EFSA ha presentato un parere motivato sugli MRL vigenti, raccomandando di diminuire gli MRL per alcuni alimenti, in particolare per i cavoli a infiorescenza e a testa, grasso, reni e fegato di suini, bovini, ovini e caprini, fegato e uova di volatili (galline, anatre, oche, tacchini, faraone, struzzi e piccioni). Per quanto concerne le uova di gallina destinate al consumo umano, il Regolamento (UE) 1792/2019 fissa l'MRL a 0,005 mg/kg, concentrazione corrispondente al limite di quantificazione (LOQ) delle metodiche di analisi oggi utilizzate. Il valore di 0,005 mg/kg, è espressione della sommatoria di fipronil e fipronil-sulfone, suo principale metabolita, altrettanto tossico, rilevato solo nel tuorlo, seppur non si possa escludere un suo reperimento anche nell'albume.

3.2. MECCANISMO DI AZIONE, METABOLITI E TOSSICITÀ

Le proprietà insetticide del fipronil sono basate sulla sua neurotossicità; infatti, sulla base del suo meccanismo di azione è da considerarsi una neurotossina. Alla neurotossicità, è associato inoltre un potente effetto citotossico. La molecola interferisce con il passaggio degli ioni cloruro attraverso il canale cloro regolato dall'acido γ -aminobutirrico (GABA), esplicando il suo effetto alterando i canali cloro dei recettori GABA, e quelli del glutammato (Hainzl et al., 1998; Naharashi et al 2007, El Hassani et al. 2009). Da osservazioni puramente sperimentali, sembra che il fipronil agisca anche sui recettori per l'acetilcolina, ma mancano ancora dati ufficiali pubblicati. Attraverso queste azioni, il fipronil interrompe la trasmissione degli impulsi nervosi, causando un'eccitazione neuronale anomala con conseguente grave paralisi che porta alla morte dell'insetto (Kidd & James, 1991). I recettori GABA sono presenti sia nei vertebrati sia negli insetti (Zhao et al., 2003). Il fipronil è molto più attivo sui recettori GABA degli insetti rispetto a quelli dei mammiferi, e ciò è

dovuto alla maggiore affinità della molecola con i recettori degli insetti. L'affinità dei recettori GABA degli scarafaggi ad esempio, è 59 volte superiore a quella dei recettori GABA dei topi (Zhao et al., 2003). L'effetto tossico acuto quindi è improbabile nei mammiferi esposti alla molecola, ad eccezione dei gatti, i quali manifestano una reazione di tossicità acuta quando vengono esposti ad alte concentrazioni. Come accennato, il fipronil è una molecola chirale. Entrambi gli enantiomeri sono presenti in quantità equivalenti in quasi tutti i prodotti sul mercato, ma la tossicità dei due non è uguale; ad esempio, sulla *Daphnia ceriodaphnia* la tossicità dell'enantiomero (+) è due volte maggiore rispetto a quella dell'enantiomero (-). Tuttavia, la selettività di alcuni metaboliti e prodotti di degradazione del fipronil può essere più debole di quella della molecola madre, circostanza che contribuisce a ridurre la selettività della sostanza (Hainzl et al., 1998). La minor selettività non ne pregiudica la tossicità; infatti, questa modalità d'azione è mantenuta da alcuni dei prodotti della biotrasformazione del fipronil, quali fipronil-sulfone e fipronil-desulfinyl, che pertanto conservano l'azione tossica (Hainzl & Casida 1996). Ad esempio, una eccezione è rappresentata dall'attività del desulfinyl-fipronil sui recettori GABA di specie diverse dagli insetti, come i mammiferi, che è dieci volte più forte di quella del fipronil stesso (Hainzl & Casida 1996).

La tossicocinetica e il metabolismo del fipronil sono molto complessi, e presentano variabilità specie-specifiche, sia per dose assunta sia per i metaboliti prodotti. Quattro sono i principali metaboliti provenienti da processi di biotrasformazione del fipronil: fipronil-sulfide (MB 45950), derivante dalla sua riduzione, fipronil-sulfone (MB 46136) metabolita derivante dall'ossidazione della molecola madre, desulfinyl-fipronil (MB 46513) derivato dalla fotolisi e infine il fipronil-ammide (RPA 200766), originato da reazioni di idrolisi (Figura 25). In verità, in alcune specie come il ratto, l'ovino o il pollo, possono essere prodotti da 5 a 17 diversi metaboliti, costituiti da componenti polari, coniugati N-glucoronidi e solfati. Nonostante il suo profilo tossicologico sia considerato relativamente sicuro per i mammiferi per quanto riguarda il suo effetto tossico acuto, il fipronil, secondo molti studi oggi pubblicati, può avere effetti indesiderati indipendenti su siti diversi dal sistema nervoso, quali reni, fegato e tiroide, influenzare direttamente la funzione riproduttiva come dimostrato su ratti e topi, dove causa sterilità (Khan et al., 2015), difficoltà di impianto embrionale e alterazioni del comportamento materno (Zuzana et al., 2018), oppure su organismi non bersaglio (de Oliveira et al. 2012; Leghait et al. 2010; Ohi et al. 2004), uomo compreso. Fegato, reni e tiroide risultano essere gli organi più colpiti, dove a seguito della esposizione acuta o cronica alla molecola, mostrando a livello cellulare forte stress ossidativo, con produzione di ROS e aumento significativo della perossidazione lipidica (LPO), alterazione dei meccanismi anti-ossidanti con alterazione della produzione di glutazione e tiolo (Verma et al. 2007; El-Gendy et al. 2010; Badgular et al. 2015), seguito da spleno-epatomegalia (Badgular et al. 2015) e

alterazione della regolazione degli ormoni tiroidei T3-T4. Rappresenta, pertanto, un potente interferente endocrino. Anche su linee cellulari umane neuronali SH-SY5Y, è stato evidenziato nelle cellule esposte al fipronil stress ossidativo e apoptosi (Ki et al., 2012; Romero et al., 2016). Attualmente, diversi studi stanno puntando a verificare e accertare che il fipronil abbia effetti cancerogeni, ma sempre su ratti e topi, è stato accertato se non altro, l'effetto mutageno e genotossico (de Oliveira et al., 2010). È stata individuata una DL50 di 92 mg/kg per il ratto, come tossicità acuta per via orale, mentre di 0,36 ml/l per inalazione. La DL50 per via cutanea invece, è nota solo per il coniglio, pari a 354 mg/kg. Nelle specie aviarie, i dati pubblicati dimostrano che esiste un'elevata variabilità specie-specifica nella sensibilità al fipronil nelle poche specie aviarie studiate, che varia dall'essere altamente tossica nei Galliformi, con DL50 pari a 11, 3, 31 e 34 mg/kg per quaglia, fagiano e pernice, a non tossico come dimostrato nel germano reale (DL50 > 2150 mg/kg).

3.3. TOSSICOCINETICA DEL FIPRONIL NELLE SPECIE AVIARIE

Ad oggi, la tossicocinetica del fipronil nelle specie aviarie, in particolare nel pollo e nella gallina, non è stata approfonditamente studiata. I pochissimi studi presenti, prendono in sola considerazione la distribuzione e bioaccumulo della molecola e relativi metaboliti nei tessuti, feci o matrici edibili, come uova, grasso e muscolo, a seguito della somministrazione per via orale di dosi ripetute, generalmente su lungo periodo, in media per 28-42 giorni. Non sono altresì bene chiari tutti i metaboliti che la specie *Gallus gallus* produce, nè la concentrazione plasmatica di questi ultimi nel tempo, data la sua persistenza. In verità, i pochi studi presenti, sono imputabili allo scarso interesse ad approfondire le sue caratteristiche cinetiche, in quanto molecola vietata negli animali da produzione.

A seguito della sua somministrazione per via orale, tramite mangime o ovuli (bolo), il fipronil è relativamente ben assorbito a livello gastro-intestinale. L'assorbimento della molecola avviene rapidamente (>80% entro 72 ore dalla assunzione), seguito da una biotrasformazione altrettanto rapida, ma da una escrezione invece piuttosto lenta, data la sua spiccata lipofilia. Anche l'emivita plasmatica è da ritenersi piuttosto lunga, che può oscillare dalle 130 alle 245 ore, come avviene nel ratto, anche se non esistono dati in bibliografia sull'emivita plasmatica di fipronil nel pollo. Una volta assorbito, si distribuisce ampiamente ai tessuti attraverso il circolo ematico, in particolare stomaco e intestino, reni, fegato, muscolo, pancreas, pelle-cute, grasso addominale e sottocutaneo, cervello, ghiandole surrenali, tiroide e nelle femmine, ovaio, utero e uova, quindi a tutti i tessuti, in particolare quelli ad alto contenuto di lipidi. Il muscolo, ma soprattutto la pelle, il

grasso viscerale e sottocutaneo e uova, costituiscono le principali matrici di bioaccumulo di fipronil e relativi metaboliti, in particolare fipronil-sulfone (Canton et al., 2021). La metabolizzazione a livello epatico, comporta principalmente alla molecola madre cambiamenti nei gruppi funzionali attaccati all'anello pirazolo del fipronil. I composti escreti con le feci dal pollo sono fipronil immodificato, fipronil-sulfone, un prodotto di scissione del sulfone stesso (MB 45897), fipronil-desulfinyl, l'ammide, derivata dal gruppo nitrile, un prodotto di riduzione (fipronil-tioetere), e suoi derivati formati da ulteriore scissione. Il fipronil-desulfinil come il fipronil-sulfone, sono stati identificati come i metaboliti principali nelle uova e nei tessuti. Le vie metaboliche del fipronil-desulfinil e del fipronil-sulfone nel pollo sono coerenti con quelle riscontrate in altri animali quali i ratti. Il fipronil-desulfinil o il fipronil-sulfone non metabolizzati vengono distribuiti nelle uova e/o tessuti, compatibilmente con la natura lipofila della molecola, mentre la quota che è soggetta nuovamente a metabolizzazione produce più derivati polari o forma coniugati polari che vengono poi escreti in parte nelle feci e in parte ancora nelle uova, dove si bioaccumulano, come nella cute e nel grasso. La loro permanenza nell'organismo dell'animale è variabile in base alla dose e alla durata di esposizione. Il fipronil è soggetto a ridistribuzione, raggiungendo *plateau* di concentrazioni tissutali del principale metabolita fipronil-sulfone tra i 4 fino ai 14 giorni post somministrazione, tramite applicazione *spot-on*, mentre fino a 24 giorni se somministrato per via orale. Quando somministrato per via dermica sia per via orale, vengono raggiunti picchi di concentrazione nelle uova tra i 14-16 giorni, per poi decrescere progressivamente e molto lentamente (Canton et al., 2021). Secondo lo studio condotto da Canton et al. (2021), è stato stimato un tempo di sospensione plausibile se fosse somministrato fipronil per via dermica in una unica somministrazione, che potrebbe essere compreso tra i 100 e i 120 giorni, rendendo ovviamente inapplicabile il suo utilizzo anche in condizioni d'uso *off-label*. L'escrezione avviene principalmente attraverso feci (fino al 70%) e urine-urati (6-26%), che possono contenere metaboliti sia liberi, prodotti da reazioni metaboliche di Fase I, che coniugati, prodotti tramite reazioni di Fase II (Figura 25). È coinvolta anche l'escrezione biliare (7-18%). La presenza di metaboliti nelle feci infatti, suggerisce che il fipronil sia soggetto a circolo entero-epatico e successiva escrezione biliare. L'urina, che nei mammiferi costituisce un valido bio-marker, è quello principalmente utilizzato per la valutazione della esposizione alla molecola (Vasylieva et al., 2017), ma anche nelle feci associate agli urati, che vengono emessi solitamente contemporaneamente nel pollo e in tutte le specie aviarie, possono essere ricercati metaboliti quali fipronil-sulfone, desulfinyl-fipronil e fipronil-ammide.

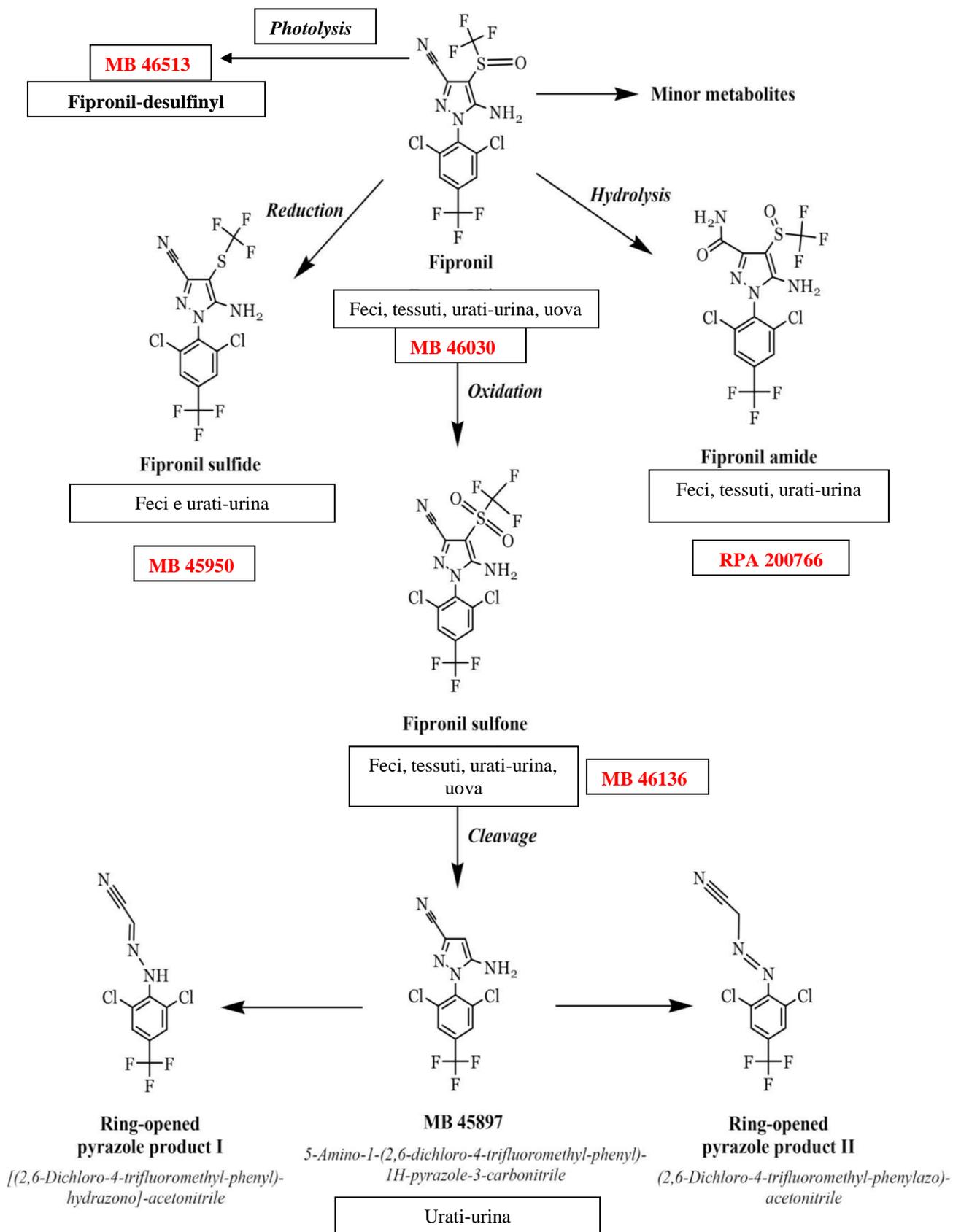


Figura 25. Principali vie metaboliche e metaboliti del fipronil.

3.4. POTENZIALE PRESENZA DI FIPRONIL E METABOLITI IN UOVA DI POLLAME DESTINATE ALL'AUTOCONSUMO

La presenza di fipronil nelle uova destinate al consumo umano fu oggetto del noto scandalo “uova al fipronil”, nel 2017. Il 20 luglio 2017, il Belgio informò la Commissione Europea sull'identificazione di uova contaminate dalla molecola. Da allora, in molti paesi dell'Unione Europea (UE), Italia compresa, e anche in alcuni Paesi Terzi, è stata identificata in diversi campioni ufficiali la positività a fipronil in uova destinate al consumo umano, istituendo di conseguenza un programma di monitoraggio ad hoc nell'UE. Da ciò che è noto, la molecola venne usata nella lotta alle infestazioni da *Dermanyssus gallinae* in allevamenti di galline ovaiole (Stafford et al., 2018), un ecto-parassita ematofago, appartenente alla famiglia degli acari (volgarmente chiamato pidocchio pollino o acaro rosso), la cui attività parassitaria produce gravi perdite economiche e di produttività nei gruppi colpiti. A seguito dell'istituzione di piani di monitoraggio, gli Stati membri hanno fornito risultati per 5.439 campioni di uova e muscolo/grasso di pollo che sono stati analizzati non solo per il fipronil ma anche altre molecole aggiuntive ad uso antiparassitario, autorizzate e non (amitraz, foxim, nicotina, ecc.) allo scopo di monitorare l'eventuale utilizzo improprio negli allevamenti di pollame contro gli acari rossi (EFSA, 2018). Tra questi campioni, 742 contenevano residui eccedenti l'LMR previsto per legge. I superamenti dell'MRL erano quasi esclusivamente correlati al fipronil ed erano associati a uova di gallina non trasformate (601 campioni), grasso viscerale prelevato da galline ovaiole (134 campioni), muscolo delle stesse (5 campioni) e polvere di uova essiccate liofilizzate (2 campioni), utilizzate per produrre prodotti alimentari contenenti uova. Nello specifico, i campioni eccedenti l'MRL, provenivano da Paesi Bassi (664 campioni), Italia (40 campioni), Germania (13 campioni), Polonia (11 campioni), Ungheria (6 campioni), Francia (5 campioni), Slovenia (2 campioni) e Grecia (1 campione) (EFSA, 2018). Come precedentemente accennato, l'utilizzo del fipronil o prodotti contenenti tale molecola è vietato negli animali da produzione. Concettualmente, risulta quasi un paradosso che la molecola sia parte integrante di molti prodotti, compresi anti-parassitari per cani e gatti, disponibili in libera vendita, quindi facilmente accessibili a chiunque. Non sorprende pertanto che possa essere utilizzato in modo fraudolento senza troppe complicazioni. La facile accessibilità a prodotti contenenti fipronil è possibile anche per i comuni allevatori di razze di pollame ornamentale e da autoconsumo, che potrebbero utilizzarli a scopo anche preventivo, nel trattamento delle ectoparassitosi dei propri polli, ignari dei rischi derivanti dal consumo di uova e carne contaminati, come anche dei rischi derivati dalla vendita di questi prodotti oltre il circuito familiare come concesso dalla normativa vigente. In queste tipologie di allevamenti, dove le strutture sono spesso

in legno o prefabbricate, non è affatto insoliti ritrovare nei periodi primaverili-estivi la presenza di acari e pidocchi di diverse specie, quali *Menopon gallinae*, un acaro mallofago, *Dermanyssus gallinae*, e *Ornithonyssus sylviarum*, volgarmente chiamato acaro del Nord, anch'esso ematofago. Per questi allevamenti, gestiti da amatori o a conduzione familiare, non sempre è abbordabile sostenere la spesa per l'acquisto di farmaci antiparassitari autorizzati nel pollo o nella gallina ovaiole (ByeMite®-Foxim, Exzolt®-fluralaner, ecc.). In queste circostanze, in presenza di parassitosi, la scelta ricade sull'acquisto di prodotti più economici, facilmente accessibili, acquisto di prodotti non autorizzati e non sicuri, registrati prevalentemente solo su altre specie, quali cane o gatto. Per tali ragioni, si è deciso di intraprendere uno studio di bio-monitoraggio in alcuni allevamenti di pollame ornamentale e da autoconsumo sul territorio italiano, attualmente ancora in corso, al fine di rilevare l'eventuale presenza di fipronil in uova prodotte dalle galline allevate. Al fine di indagare più approfonditamente sulla possibilità di rilevare residui di fipronil, è stata considerata l'ipotesi di utilizzare anche le penne degli animali come nuova matrice bio-marker, ipotizzando che queste ultime possano essere utilizzate come matrice valida per rilevare un potenziale utilizzo di fipronil somministrato via *spot-on*.

3.5. MATERIALI E METODI

Da ogni regione di Italia, è stata richiesta ad almeno 1 allevatore rurale-ornamentale, la disponibilità a fornire uova e penne dei propri animali, al fine di indagare per la presenza di fipronil e metaboliti. Diciotto allevatori (18 regioni) hanno dato la loro disponibilità a partecipare. Per verificare eventuali differenze tra i diversi allevatori ma soprattutto tra razze allevate diverse, è stato richiesto ad ogni allevatore di fornire almeno 6 uova prodotte da galline della stessa razza allevata, ma differente di razza tra un allevatore e l'altro. Al contempo, sono state fornite le penne delle stesse galline di cui sono state fornite le uova (almeno 5-10 grammi di pool di penne-piume). Attualmente, hanno fornito i campioni solo 4 regioni, quindi 4 allevatori diversi (Tabella 2) dei 18 partecipanti. Fino al momento delle analisi, i campioni di tuorlo, albume e penne, sono stati conservati in Falcon da 50 ml sterili, a temperatura di -20 °C.

Ogni uovo è stato successivamente analizzato singolarmente, tuorlo e albume separatamente, per la ricerca di fipronil, fipronil-sulfone, fipronil-desulfinyl e idrossi-fipronil. A tal fine, 2 grammi di campione di albume e tuorlo (minimo 0,5 g per le penne-piume) sono stati fortificati con standard TPP a 50 ppb, addizionati di 1 g di NaCl ed estratti con 10 ml di acetonitrile. Dopo omogenizzazione, ultrasonicazione per 10 minuti e centrifugazione per sempre 10 minuti, gli estratti sono stati degrassati con 10 ml di esano. Dopo la rimozione del surnatante, l'estratto è stato portato

a secco, risospeso in 200 µl di fase mobile (40:60 acido formico 0,1%: metanolo) in eppendorf e centrifugato prima del trasferimento in vial per le analisi tramite metodica LC-MS/MS, utilizzando una colonna C18 Raptor ARC-18 5 µm, 120 x 2.1 mm column (Restek) e come fase mobile, un gradiente con acido formico 0,1% acq. (fase A) e metanolo (fase B).

3.6. RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati ottenuti dall'analisi dei campioni di uova (albume e tuorlo) e di penne, sono riportati in Tabella 1. Dalle analisi emerge che, ad eccezione delle uova e penne provenienti dalla regione Lombardia, dove fipronil e metaboliti non risultano rilevati (ad eccezione di un campione di tuorlo, dove la presenza di fipronil-sulfone risulta inferiore al LOQ), nelle altre regioni esaminate si sono rilevate positività per fipronil e metaboliti, in particolare per fipronil, fipronil-sulfone e fipronil-desulfinyl in albume, tuorlo e penne. Gli altri due metaboliti, fipronil-sulfide e idrossi-fipronil, sono non rilevabili in tutti i campioni e matrici esaminati.

In particolare, nel campione di 6 uova e penne proveniente dal Piemonte da razza Marans (Figura 26) si notano concentrazioni medie di fipronil nel tuorlo pari a $0,73 \pm 0,50$ ppm, e del suo principale metabolita fipronil-sulfone pari a $25,60 \pm 22,23$ ppm. In queste due matrici, come riportato in bibliografia, fipronil e fipronil-sulfone si concentrano, coerente con il metabolismo della molecola nella gallina, in particolare il metabolita fipronil-sulfone. Si nota, però, che fipronil e fipronil-sulfone sono rilevati anche nell'albume, diversamente da quanto riportato solitamente in bibliografia, dove si menziona il tuorlo come matrice unica e principale di bio-accumulo, pertanto l'unica analizzata ai fini ispettivi. In 3 campioni di albume (n. 1, 2, 3) infatti, si ritrova fipronil in concentrazioni medie piuttosto omogenee ($0,21 \pm 0,0$ ppm), mentre negli albumi dell'uovo 4 e 6, il fipronil è inferiore al LOQ, e nel campione n.5, non rilevabile. Tuttavia, è presente fipronil-sulfone in concentrazioni medie pari a $4,20 \pm 4,85$ ppm, inferiori rispetto a quelle riscontrate nel tuorlo. Il fipronil-sulfone, ad eccezione del campione n.5 ove è non rilevabile, è presente in tutti i campioni di albume, in concentrazioni comunque inferiore a quelle rilevate nel tuorlo, coerente con la natura lipofila del composto. Questo risultato risulta molto interessante considerando che le uova provengono da galline appartenenti alla stessa razza e allevate con le stesse modalità, sollevando curiosità sulle capacità di metabolizzazione e ridistribuzione della molecola fipronil in galline della medesima razza. In tutte le 6 uova provenienti dal Friuli Venezia Giulia, dove le uova campionate e la razza allevata è la Barnevelder (Figura 27), i tuorli sono risultati negativi per fipronil. Fipronil-sulfone invece è risultato inferiore al LOQ per i campioni di tuorlo 1,2 e 3, mentre è stato rilevato nel campione di tuorlo n.6. Negli altri campioni, fipronil sulfone è risultato non rilevabile. In

compenso però, il campione di penne/piume è risultato positivo a fipronil, fipronil-sulfone e fipronil-desulfinyl.

Tabella 1. Concentrazioni di fipronil e metaboliti rinvenute nelle diverse matrici.

REGIONE	Molecole - concentrazione ppb				IDROSSI-F
	FIPRONIL	F-SULFONE	F-DESULFYNIL	F-SULFIDE	
LOMBARDIA					
Albume 1	nr	nr	nr	nr	nr
Tuorlo 1	nr	nr	nr	nr	nr
Albume 2	nr	nr	nr	nr	nr
Tuorlo 2	nr	< LOQ	nr	nr	nr
Albume 3	nr	nr	nr	nr	nr
Tuorlo 3	nr	nr	nr	nr	nr
Albume 4	nr	nr	nr	nr	nr
Tuorlo 4	nr	nr	nr	nr	nr
Albume 5	nr	nr	nr	nr	nr
Tuorlo 5	nr	nr	nr	nr	nr
Albume 6	nr	nr	nr	nr	nr
Tuorlo 6	nr	nr	nr	nr	nr
PENNE-PIUME	nr	nr	nr	nr	nr
PIEMONTE					
Albume 1	0,22	4,42	nr	nr	nr
Tuorlo 1	0,9	16,17	nr	nr	nr
Albume 2	0,21	3,85	nr	nr	nr
Tuorlo 2	1,38	16,05	nr	nr	nr
Albume 3	0,22	21,28	nr	nr	nr
Tuorlo 3	0,64	56,04	nr	nr	nr
Albume 4	< LOQ	1,6	nr	nr	nr
Tuorlo 4	0,22	9,03	nr	nr	nr
Albume 5	nr	< LOQ	nr	nr	nr
Tuorlo 5	nr	0,15	nr	nr	nr
Albume 6	< LOQ	11,01	nr	nr	nr
Tuorlo 6	1,28	56,21	nr	nr	nr
PENNE-PIUME	nr	nr	nr	nr	nr
FRIULI V.G.					
Albume 1	nr	nr	nr	nr	nr
Tuorlo 1	nr	< LOQ	nr	nr	nr
Albume 2	nr	nr	nr	nr	nr
Tuorlo 2	nr	< LOQ	nr	nr	nr
Albume 3	nr	nr	nr	nr	nr
Tuorlo 3	nr	< LOQ	nr	nr	nr
Albume 4	nr	nr	nr	nr	nr
Tuorlo 4	nr	nr	nr	nr	nr
Albume 5	nr	nr	nr	nr	nr
Tuorlo 5	nr	nr	nr	nr	nr
Albume 6	nr	nr	nr	nr	nr
Tuorlo 6	nr	0,29	nr	nr	nr
PENNE-PIUME	0,76	5,73	1,52	nr	nr
LIGURIA					
Albume 1	< LOQ	3,55	nr	nr	nr
Tuorlo 1	0,34	14,99	nr	nr	nr
Albume 2	nr	nr	nr	nr	nr
Tuorlo 2	nr	2,75	nr	nr	nr
Albume 3	< LOQ	5,54	< LOQ	nr	nr
Tuorlo 3	0,25	29,85	0,33	nr	nr
Albume 4	nr	4,23	nr	nr	nr
Tuorlo 4	0,35	15,95	< LOQ	nr	nr
Albume 5	< LOQ	0,35	nr	nr	nr
Tuorlo 5	< LOQ	0,57	nr	nr	nr
Albume 6	< LOQ	3,18	nr	nr	nr
Tuorlo 6	0,24	17,96	nr	nr	nr
PENNE-PIUME	nr	nr	nr	nr	nr

nr: non rilevato; LOQ = 0,15 ppb

Questo risultato potrebbe indicare un potenziale ruolo delle penne come marker della esposizione alla molecola fipronil. In particolare, la presenza di fipronil-desulfinyl è plausibile se il fipronil fosse stato applicato per via *spot-on*, quindi in gran parte esposto alla luce una volta cosparso dagli animali sulle parti più superficiali del piumaggio. Nelle uova provenienti dall'allevamento ligure, dove la razza allevata e le uova campionate sono prodotte da galline Wyandotte (Figura 28), la presenza di fipronil e metaboliti, ricalca molto similmente quella evidenziata nell'allevamento del Piemonte. Più precisamente, il metabolita fipronil-sulfone, ad eccezione di un campione di albume (n.2 dove non è presente neanche fipronil se non nel tuorlo) è sempre presente sia negli albumi che nei tuorli, con maggiori concentrazioni nel tuorlo. Stranamente, in alcuni campioni di tuorlo non sono state rilevate concentrazioni di fipronil ($0,27 \pm 0,04$ ppm) ma solo del suo principale metabolita. Stessa cosa, tutti gli albumi, ad eccezione del campione 2 e 4 dove non è stato rilevato, avevano concentrazioni di fipronil inferiori al LOQ. In un campione di tuorlo (n.3) è stato rilevato anche fipronil-desulfinyl, mentre nel rispettivo albume, fipronil-desulfinyl era inferiore al LOQ. Il campione di tuorlo n.4, ha riscontrato concentrazioni di fipronil-desulfinyl inferiori al LOQ. Non sono stati rilevate concentrazioni di fipronil e metaboliti nelle penne/piume.

Quelli presentati sono i primi dati ottenuti dalle analisi del primo campionamento di uova provenienti da allevamenti di pollame ornamentale, sollevando un potenziale problema di utilizzo illecito di fipronil in queste tipologie di allevamento. Questo non sorprende considerando la facile accessibilità alla molecola, e costituisce inevitabilmente un rischio alimentare qualora queste uova o carni fossero destinate al consumo umano (famigliare e non). Con le successive analisi, oggi ancora in corso, verrà illustrato un quadro molto più chiaro relativamente all'uso di fipronil e rischio alimentare derivato dal potenziale consumo di questi prodotti, verificando al contempo, la validità di nuove matrici bio-marker di esposizione come le penne e le piume, e il bio-accumulo di altri metaboliti in queste matrici, ad oggi non ancora studiati.

Figura 26.
Gruppo di
galline
Marans.





Figura 27. Gruppo riproduttore di galline di razza Barnevelder.



Figura 28. Gruppo riproduttore di galline Wyandotte al pascolo.

4. VALUTAZIONE *IN VITRO* DELLA ATTIVITÀ DI FIPRONIL E FOXIM SU POPOLAZIONI NATURALI DI *DERMANYSSUS GALLINAE* DA ALLEVAMENTI RURALI/ORNAMENTALI

4.1. Premessa

Dermanyssus gallinae (De Geer, 1778), volgarmente chiamato “acaro rosso” o “pidocchio pollino” nonostante sia un acaro, è un importante ectoparassita ematofago delle specie aviarie, la cui massiva presenza nel pollame si traduce in un forte impatto negativo sulla salute e benessere degli animali, in particolare delle galline ovaiole, ove riduce drasticamente la produzione

di uova, la qualità delle stesse e, in casi di infestazioni massive, può causare gravi anemie e addirittura la morte. È inoltre riconosciuto come potenziale vettore di alcuni agenti patogeni sia per gli animali che per l'uomo, quali ad esempio *Salmonella* spp., *Chlamydia* spp. e *Pasteurella* spp. (Abbas et al., 2014; Knežević et al., 2017). Quest'ultimo, infatti, in casi non del tutto eccezionali può essere a sua volta assalito dall'acaro (proprietari, lavoratori, tecnici di allevamento, ecc) con conseguenti dermatiti, anche gravi.

Le abitudini di *D. gallinae* sono prevalentemente notturne: durante questo periodo cerca i suoi ospiti per assumere pasti di sangue che in genere durano meno di due ore, dopodiché si ritira nelle fessure e anfratti di pareti, posatoi o nidi (Kilpinen et al., 2005; Sparagano et al., 2009). A temperature comprese tra 10-37 °C (con 25 °C considerati come ottimali) e umidità relativa compresa tra 70 e 90%, il ciclo di vita di *D. gallinae* può essere anche più breve di 7 giorni (Maurer & Baumgärtner, 1992; Abbas et al., 2014). In ambiente rurale-ornamentale, l'acaro rosso è pressoché onnipresente e difficile da debellare (Kenyon, 2017), considerando la moltitudine di specie allevate presenti, potenziali contatti con selvatici ospiti del parassita ma, soprattutto, per le strutture di allevamento che, come accennato in precedenza, sono quasi sempre rappresentate da pollai in legno, box prefabbricati, nidi in legno, paglia ecc., che ne consentono la sopravvivenza in stadi di quiescenza anche durante le stagioni più rigide. Si tratta quindi di strutture difficilmente disinfettabili e molti antiparassitari sono impossibili da applicare su di esse (forte impregnamento del legno, condizionamento o prolungamento dell'attività residuale dei prodotti ecc.), senza tralasciare l'inevitabile impatto ambientale, soprattutto nel caso di applicazioni ripetute. Da sempre, il controllo di questi parassiti del pollame dipende in gran parte dall'uso di acaricidi/insetticidi (come organofosfati, carbammati, lattoni macrociclici, piretroidi e spinosine) nebulizzati sulle strutture, pollai e nidi o sugli animali stessi (Liebish & Liebish, 2003). Tuttavia, la legislazione sempre più restrittiva ha determinato dei vincoli relativi all'utilizzo di molti principi attivi, e fra gli allevatori che tentano di controllare questi parassiti si è assistito in alcuni casi a un uso illegale o *off-label* di pesticidi vietati, come carbaryl o, soprattutto per gli allevatori amatoriali, di fipronil, con rischio di residui della catena alimentare (Marangi et al., 2012; Flochlay et al., 2017). Inoltre, esattamente come avviene per l'uso improprio o errato degli antimicrobici, ripetute applicazioni di acaricidi, a volte non specificamente etichettati per l'uso contro *D. gallinae*, specialmente se non applicati correttamente e in particolare se a dosaggi errati, possono portare all'insorgere di resistenze in popolazioni di *Dermanyssus*, generazione dopo generazione (Abbas et al., 2014). Fenomeni di farmaco-resistenza a molecole approvate e non per l'uso sul pollame, inclusi alfa-cipermetrina, bifentrin, carbammati, carbaril, cipermetrina, deltametrina, diclorodifeniltricloroetano (DDT), diclorvos, fenitrothion, fipronil, flumetrina, flurathiocarb, malathion, permetrina, fenotrina,

tetrametrina e triclofon, sono stati segnalati da molti paesi, tra cui Cecoslovacchia, Corea, Francia, Serbia, Italia, e Svezia (Thind & Ford, 2007; Pavličević et al., 2016). Nel corso del 2017, il composto isossazolinico fluralaner (Exzolt®) è stato approvato per il controllo di *D. gallinae* nelle galline ovaiole, tramite somministrazione in acqua da bere e con tempo di sospensione di 0 giorni per le uova da consumo. Questo nuovo prodotto di ultima generazione, anche se il principio attivo Fluralaner è da anni ampiamente utilizzato come antiparassitario nel cane (Bravecto®), ha rivoluzionato i piani di controllo del parassita in allevamento, fornendo un valido e insostituibile aiuto. Il suo utilizzo risulta però proibitivo per molti allevatori amatoriali, sia in termini quantitativi che di costo, senza tralasciare le complicità derivate dalla sua prescrizione medico veterinaria. Pertanto, queste categorie di allevatori tendono a rivolgersi verso antiparassitari più a buon mercato come il foxim (autorizzato nel pollame) ma potenzialmente anche a molecole non autorizzate, di facile accesso, come il fipronil.

Dati relativi a potenziali resistenze verso queste molecole sono stati espressamente richiesti dall'Istituto Superiore di Sanità, nell'ambito di progetti relativi alla farmaco resistenza; tuttavia, in Italia, studi sulla resistenza da parte di popolazioni di *D. gallinae* provenienti da allevamenti amatoriali/rurali a molecole quali fipronil e foxim, non sono presenti in letteratura.

Lo scopo di questo studio è stato appunto quello di valutare *in vitro* su diverse popolazioni naturali di *D. gallinae* provenienti da allevamenti rurali/ornamentali, la sensibilità a una molecola il cui uso è vietato, quale il fipronil (che agisce sui recettori GABA degli artropodi, ma sembra anche su quelli per l'acetilcolina) capostipite della classe dei fenilpirazoli, e una autorizzata quale il foxim, facilmente reperibile e a basso costo, ampiamente utilizzata negli allevamenti rurali e ornamentali, talvolta erroneamente, e che agisce sui recettori per l'acetilcolina.

4.2. MATERIALI E METODI

4.2.1. Popolazioni naturali di *Dermanyssus gallinae* testate

Sono stati testati 14 campioni di acari del genere *Dermanyssus* provenienti da diversi allevamenti rurali/ornamentali di pollame, locati in diverse regioni di Italia (Figura 29). Gli acari, sia adulti di entrambi i sessi che stadi giovanili, sono stati prelevati direttamente dagli allevatori da pollai (anfratti, posatoi e nidi) e/o dagli animali durante le ore notturne e inviati in contenitori a tenuta ermetica. I campionamenti sono stati effettuati nell'arco del periodo estivo/autunnale 2020. Nel caso in cui non fosse possibile procedere con le prove di sensibilità immediatamente al loro arrivo, gli acari venivano mantenuti in vita *in vitro*, per un massimo di 5-7 giorni, secondo il metodo descritto da Nunn et al. (2020).

Non è noto se negli allevamenti oggetto di campionamento nel periodo antecedente il prelievo sia stato usato in maniera illecita il fipronil in ambiente o direttamente sugli animali, ma dall'anamnesi risulta che in tutti gli allevamenti è stato usato almeno 1 volta il foxim come antiparassitario, al dosaggio indicato dal produttore.

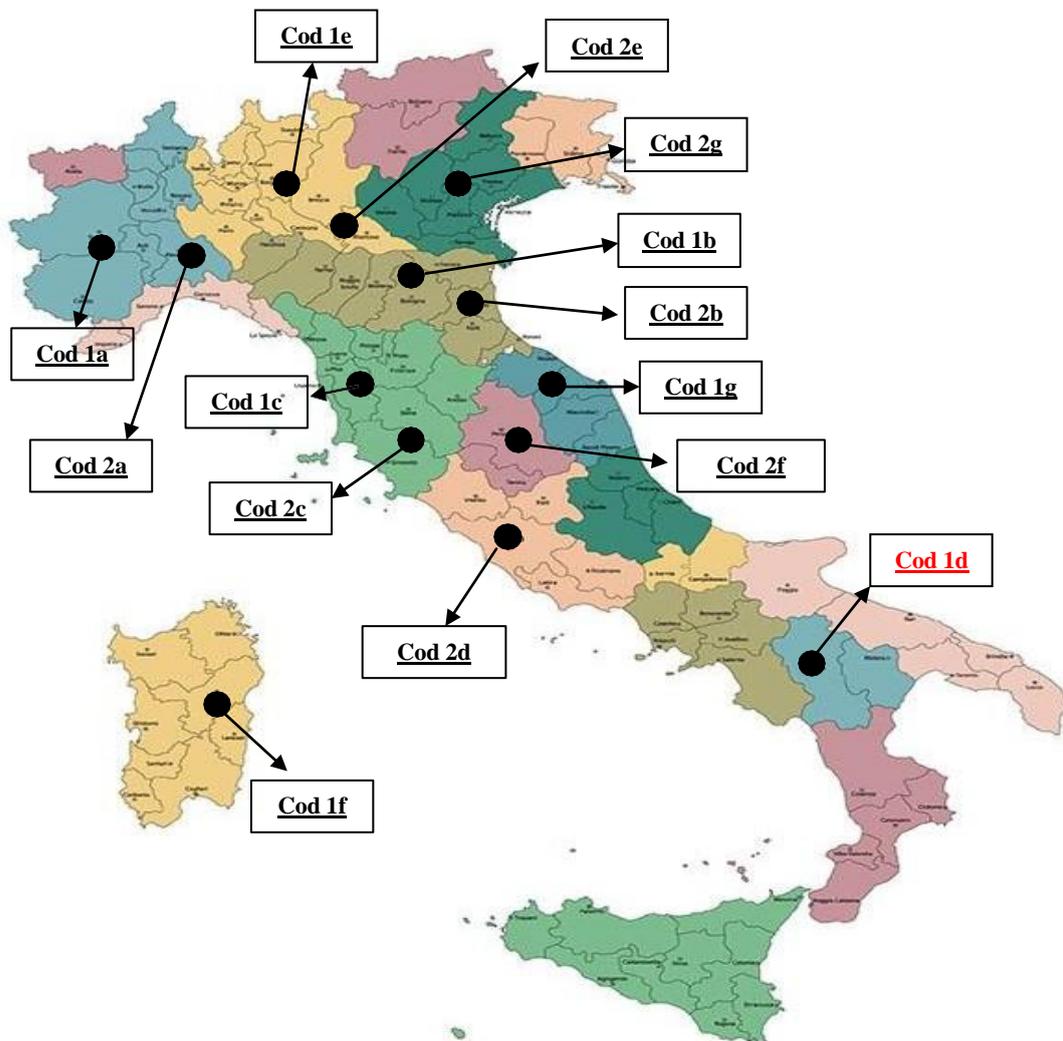


Figura 29. Localizzazione degli allevamenti rurali che hanno conferito i campioni di acari *Dermanyssus*

4.2.2. Soluzioni da testare

Sono state utilizzate soluzioni commerciali di fipronil e foxim, le quali sono state diluite per fornire un intervallo di 4 concentrazioni, come di seguito illustrato:

Fipronil (Frontline®, 250 mg/100 ml): a partire dal prodotto commerciale, sono state effettuate diluizioni seriali 1:5, ottenendo 4 concentrazioni finali di utilizzo: 500 ppm – 100 ppm – 20 ppm – 4 ppm.

Foxim (ByeMite®, 500 mg/ml): dal prodotto commerciale sono state effettuate diluizioni seriali 1:5, partendo da una soluzione di 10 mg/ml, ottenendo 4 concentrazioni finali di utilizzo: 10000 ppm – 2000 ppm – 400 ppm – 80 ppm. Si specifica che, secondo indicazioni del produttore, la concentrazione ritenuta efficace a causare la morte degli acari è di 2000 ppm.

Per le diluizioni di entrambi i prodotti, è stata utilizzata acqua distillata sterile. Quest'ultima è stata utilizzata anche come controllo negativo.

4.2.3. Esecuzione del test

La prova è stata effettuata valutando l'effetto per contatto delle diverse concentrazioni del prodotto distribuite su carta da filtro. Sono state utilizzate piastre Petri di 6 cm di diametro sul cui fondo era stato posizionato un disco di carta da filtro dello stesso diametro (Figura 30). Utilizzando una pipetta, su ciascun filtro sono stati posti, con movimento a spirale per assicurare una uniforme distribuzione del pesticida, 200 µl di ogni diluizione. Ogni prova è stata effettuata in triplicato, ovvero per ogni popolazione di acari sono state allestite 3 piastre per ogni diluizione di ogni molecola da testare e per il controllo negativo. Ogni piastra è stata identificata con data, prodotto e diluizione testata. Successivamente, sono stati immessi gli acari, per un massimo 20-35 unità per piastra (Marangi et al., 2008), prelevati direttamente dai contenitori di spedizione. Per facilitare le operazioni di distribuzione degli acari (la cui attività e velocità di movimento era piuttosto elevata), i contenitori sono stati brevemente posizionati vicino a panetti di ghiaccio al fine di indurre uno stato di leggero torpore. Gli acari immessi, considerando la variabilità degli stati di sviluppo dei campioni forniti, comprendevano contemporaneamente sia adulti che ninfe. Subito dopo l'inserimento di *Dermanyssus*, le capsule Petri sono state chiuse ermeticamente con ParaFilm, per impedire la fuoriuscita degli acari, e incubate in termostato a 27 °C ± 2 per 24 ore, mantenendole capovolte per evitare formazione di condensa sul coperchio.



Figura 30: Piastre con diluizioni dei prodotti da testare e controllo con acqua distillata con all'interno gli acari. Ogni serie è stata ripetuta in triplicato.

4.2.4. Lettura e analisi dei risultati

La lettura delle piastre e relativo conteggio degli acari sono state effettuate macroscopicamente con l'occasionale ausilio di una lente di ingrandimento. Per ciascuna piastra, controllo compreso, è stato effettuato il conteggio del numero totale di acari vivi e di acari morti presenti, considerando come morti gli acari che non presentavano alcun movimento per un'osservazione continuativa di pochi secondi. I dati numerici ottenuti sono stati inseriti in un foglio Excel® MS.

Le variabili analizzate sono state le seguenti: l'appartenenza alle diverse aziende, il principio attivo testato e la diluizione dello stesso, il numero di acari vivi e morti e il totale per ciascuna piastra, e infine la letalità ottenuta in ogni piastra ($N. \text{ acari morti} / \text{numero di acari totali} \times 100$).

Il test non parametrico di Mann-Whitney è stato usato per valutare la differenza tra le variabili continue con una distribuzione non normale. La comparazione tra gruppi di variabili categoriche è stata valutata con il test di Pearson χ^2 . La significatività statistica è stata considerata con valori di $p \leq 0,05$.

4.3. RISULTATI

In totale sono state testate 14 popolazioni di acari. In media il numero degli acari trattati non cambia in relazione al trattamento ricevuto, indicando una omogenea distribuzione degli acari stessi all'interno delle piastre.

La letalità fisiologica, ricavata dalla letalità media delle piastre di controllo, è risultata del 22,2%, mentre letalità media post trattamento è risultata del 77,3% per il fipronil e 92,7% per il foxim. In Tabella 2 è riportata la letalità media in funzione della dose di principio attivo messo a contatto con gli acari.

Trattamento	Concentrazione (ppm)	Letalità
Fipronil	500	99,8%
Fipronil	100	91,2%
Fipronil	20	72,4%
Fipronil	4	43,4%
Foxim	10000	95,4%
Foxim	2000	98,4%
Foxim	400	93,1%
Foxim	80	83,4%
Controllo	0	22,2%

Tabella 2: letalità media in funzione della dose di principio attivo messo a contatto con gli acari

Considerando la letalità media come variabile continua, sembra che il foxim, alle dosi testate, abbia una efficacia maggiore se comparata alle dosi testate per il fipronil, rispettivamente 92,7% contro 77,3% ($Z = -3,414$; $p \leq 0,001$). Il rapporto tra morti e vivi nelle diverse categorie di dosaggio, considerando il trattamento con fipronil, mostra una differenza significativa ($\chi^2 = 1200$; $p \leq 0,0001$); lo stesso vale per il foxim ($\chi^2 = 248,54$; $p \leq 0,0001$), per cui l'efficacia del trattamento è significativamente correlata alla dose del principio attivo utilizzato per entrambe le molecole. Inoltre, confrontando direttamente la mortalità media fisiologica con il dosaggio minimo utilizzato per ciascuna molecola, la differenza è risultata comunque significativa, cioè l'effetto dovuto al farmaco è comunque presente anche se il dosaggio è minimo (Figura 31).

```
. tabi 543 433\901 256, chi row
```

Key			
frequency	row percentage		
row	col		Total
	1	2	
1	543 55.64	433 44.36	976 100.00
2	901 77.87	256 22.13	1,157 100.00
Total	1,444 67.70	689 32.30	2,133 100.00

Pearson chi2(1) = 119.7295 Pr = 0.000

```
. tabi 170 887 \ 901 256, chi row
```

Key			
frequency	row percentage		
row	col		Total
	1	2	
1	170 16.08	887 83.92	1,057 100.00
2	901 77.87	256 22.13	1,157 100.00
Total	1,071 48.37	1,143 51.63	2,214 100.00

Pearson chi2(1) = 844.4899 Pr = 0.000

Figura 31: Comparazione tra il dosaggio minimo del fipronil con la mortalità fisiologica di *Dermanyssus* (a sinistra) e comparazione tra il dosaggio minimo del foxim con la mortalità fisiologica di *Dermanyssus* (a destra).

In Figura 32 è rappresentata graficamente mediante Boxplot la letalità media complessiva degli acari provenienti dalle diverse aziende ai diversi dosaggi di trattamento per i due principi attivi. Si può notare una maggiore variabilità della letalità nelle diverse popolazioni di acari all'aumentare della diluizione di fipronil, mentre tale variabilità è notevolmente inferiore per quanto riguarda il foxim. Per quest'ultimo principio attivo sono però presenti diversi *outliers*, in particolare per gli acari provenienti dall'allevamento cod_1d, dove sono evidenti per le diluizioni 2000, 400 e 800 ppm.

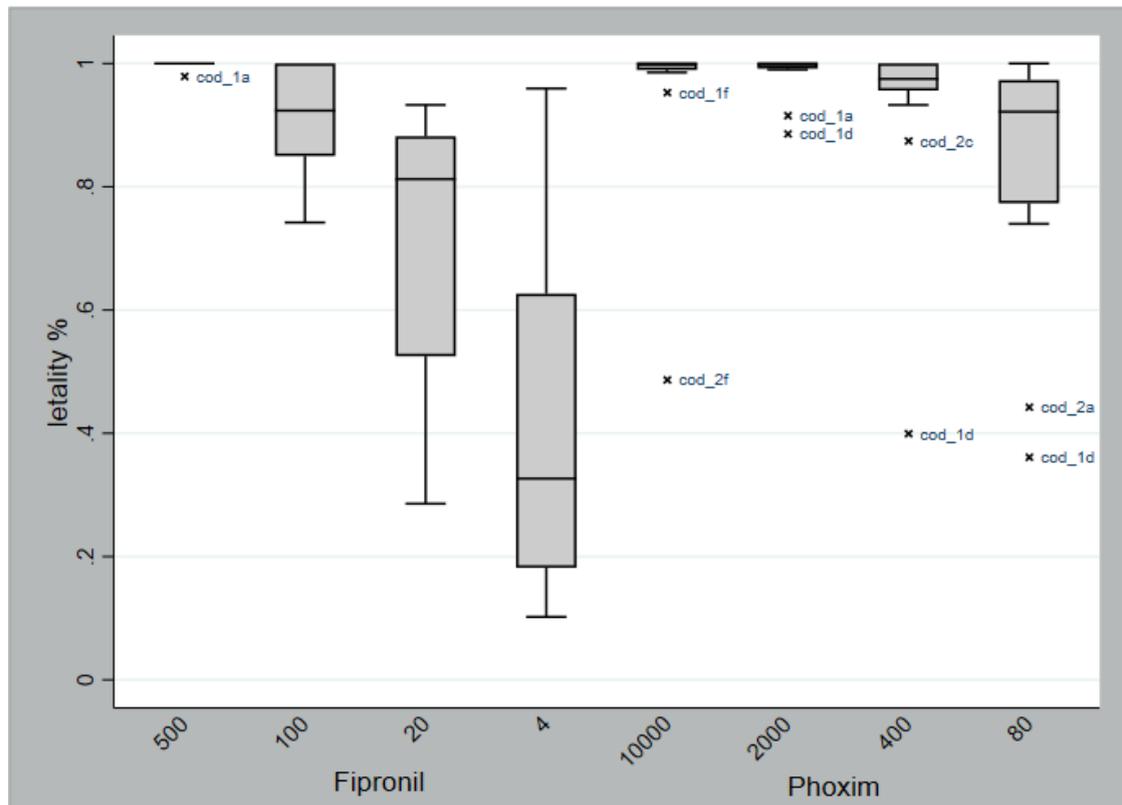


Figura 32: Boxplot della letalità media complessiva per gli acari provenienti dalle diverse aziende ai diversi dosaggi di trattamento per i due principi attivi, dove si evidenziano gli outliers.

4.4. DISCUSSIONE

Dermanyssus gallinae costituisce una problematica notevole negli allevamenti avicoli, tanto che un pò in tutta Europa sono stati utilizzati una grande varietà di acaricidi, leciti e non leciti, e sono stati riportati dalla stampa nazionale e internazionale, diversi casi di riscontro di residui di acaricidi nelle uova, con particolare riferimento al fipronil. Come riportato in premessa, l'uso

indiscriminato e non corretto di prodotti acaricidi può stimolare la selezione di popolazioni di acari resistenti.

Nelle prove effettuate in questo studio sono state utilizzate popolazioni naturali di *Dermanyssus gallinae* provenienti da vari allevamenti di polli rurali/ornamentali. In questi allevamenti l'anamnesi riporta l'utilizzo, più o meno saltuario di foxim nei confronti di ectoparassiti. Non è noto invece l'eventuale uso illecito di fipronil. I principi attivi testati (foxim e fipronil) sono stati utilizzati a concentrazioni differenti fra loro. In particolare, per il foxim, la concentrazione di 2000 ppm è quella indicata dal produttore come concentrazione efficace contro *Dermanyssus*, mentre per il fipronil, si è partiti dalla massima concentrazione di principio attivo del prodotto commerciale. In entrambi i casi, comunque, le diluizioni testate sono state allestite con un rapporto 1:5. La letalità, e di conseguenza l'efficacia del trattamento, è risultata significativamente correlata alla concentrazione del principio attivo utilizzato. Per il fipronil, la letalità più elevata è stata riscontrata alla massima concentrazione testata, mentre all'aumentare della diluizione del prodotto si è assistito a un significativo decremento di letalità associato a una via via maggiore variabilità di risposta nelle popolazioni di acari provenienti dai diversi allevamenti. Non di meno il fipronil, capostipite della classe dei fenilpirazoli, è segnalata come efficace, *in vitro* nei confronti di *Dermanyssus* (Kim et al., 2007), ma essendo una molecola vietata nell'allevamento avicolo, non dovrebbe essere entrata in contatto con popolazioni naturali di acari, inducendole a sviluppare resistenza. Per questo motivo l'ampio range di variabilità di risposta ai dosaggi più bassi meriterebbe ulteriori approfondimenti.

Il foxim è risultato efficace (ovvero si è rilevata una elevatissima letalità) alla concentrazione suggerita dal produttore (2000 ppm) e a quella più elevata, in accordo con quanto riportato nello studio di Zdybel et al. (2011), dove vengono testate diverse concentrazioni di prodotti a base di foxim, che risulta avere una letalità pari al 95-100%, quando usato a una concentrazione tra lo 4000 e 6000 ppm. Anche in questo caso si è assistito a una diminuzione di efficacia all'aumentare delle diluizioni, anche se in grado inferiore rispetto a quanto osservato per il fipronil. Questo comportamento è stato evidenziato anche per un altro ectoparassita ematofago del pollame, quale *Ornithonyssus sylviarum*, quando esposto a concentrazioni decrescenti di foxim (Mullens et al., 2017). Per il foxim, tuttavia, la variabilità di risposta fra i diversi allevamenti è inferiore rispetto a quanto riscontrato per il fipronil. Da sottolineare però come per alcune popolazioni di acari siano state riscontrate, ad alcune concentrazioni, sensibilità decisamente inferiori rispetto alle altre, evidenziate come *outliers* in Figura 32. Gli *outliers* possono essere interpretati come una mancata efficacia del trattamento in alcune aziende per svariati motivi, tra cui anche una possibile resistenza al principio attivo in conseguenza di un suo errato uso (dosaggio e periodicità di trattamento). Una

interpretazione di questo tipo potrebbe essere applicata, in particolare, al pattern dell'azienda cod_1d (Figura 29, in rosso). In questa azienda, situata in Basilicata, la presenza di *Dermanyssus* viene segnalata come costante nel tempo, nonostante l'attuazione di trattamenti mensili con foxim. Questo potrebbe avvalorare l'ipotesi che si sia instaurato in questa popolazione di acari un certo grado di resistenza al prodotto, acquisito nel tempo, generazione dopo generazione, come già studiato e visto in popolazioni di altre specie di acari, quali *Tetranychus cinnabarinus* (Lin et al., 2009). Anche lo stesso numero di *outliers*, maggiore per quanto riguarda il foxim rispetto al fipronil, potrebbe far ipotizzare una maggiore tendenza allo sviluppo di resistenza al primo rispetto al secondo, che presenta però una più ampia variabilità di risposta alle concentrazioni più basse. Per contro, non sono presenti sufficienti dati comparabili con i nostri ottenuti nei riguardi dell'uso del fipronil. Non da meno, risulta di fondamentale importanza associare a valutazioni *in vitro*, test molecolari al fine dell'identificazione dei geni di resistenza o della loro alterazione, (Katsavou et al., 2019).

Anche se questo studio è assolutamente preliminare, i risultati ottenuti sembrano evidenziare l'importanza dell'uso del prodotto registrato somministrato al corretto dosaggio e di come, però, sarebbe necessario disporre di molecole alternative per evitare l'insorgenza di fenomeni di farmaco resistenza

Una potenziale alternativa all'utilizzo di molecole di sintesi sono i fitoestratti ad attività pesticida. L'uso di diversi estratti vegetali, oli essenziali e composti correlati, derivati da piante come *Eugenia caryophyllata*, *Cinnamomum camphora*, *Asarum heterotropoides*, *Cnidium officinale* o alcuni olii vegetali, tra cui olio Neem, olio essenziale di cassia e olio essenziale di cannella, contenente il principio attivo cinnamaldeide, sono risultati efficaci contro *D. gallinae* (Kim et al., 2016; Kim et al., 2018).

L'utilizzo di pesticidi biologici è generalmente molto apprezzato dagli allevatori, sia amatoriali che non, che vedono con favore l'effetto insetticida associato a un impatto ambientale nullo e, generalmente, senza problema di residui nelle uova e nelle carni. L'efficacia dei prodotti naturali deve però essere ulteriormente testata. Ad esempio, prove preliminari *in vitro* effettuate durante questo studio con la stessa metodica qui descritta e anche per nebulizzazione con spray, per testare l'efficacia acaricida di alcuni fitoestratti contenenti alta percentuale di polifenoli, non hanno rilevato alcun effetto di tali sostanze, per le quali le minime percentuali di letalità riscontrate non si discostavano assolutamente da quelle del controllo (dati non mostrati).

Questa indagine preliminare ha permesso di focalizzare l'attenzione sulla possibile comparsa di resistenza di popolazioni naturali di *Dermanyssus* alle molecole appartenenti alla famiglia degli organofosfati quali il foxim, spesso usati negli allevamenti. È stata inoltre evidenziata una notevole

variabilità di risposta nei confronti del fipronil, in particolare alle concentrazioni più basse, ponendo in evidenza il rischio di una eventuale selezione di popolazioni resistenti per un uso illecito e/o scorretto alla molecola.

5. TOSSICOLOGIA DEI FITOESTRATTI

5.1. BOSWELLIA SERRATA E SALIX ALBA: UTILIZZO COME INTEGRATORE NELL'ALLEVAMENTO DELLA GALLINA OVAIOLA DI RAZZA LIVORNESE CON METODO RURALE FREE-RANGE

Nel corso degli ultimi anni, è notevolmente cresciuta l'attenzione verso nuove strategie alternative, alimentari e sanitarie, per ridurre l'uso di antibiotici nelle produzioni animali, come promotori di crescita (Dibner & Richards, 2005; Trovato, 2012). L'agricoltura biologica, in particolare per le galline ovaiole, rappresenta infatti un'attività sempre più importante nel mondo, in parte a causa di una crescente consapevolezza delle problematiche ambientali e relative al benessere animale, e in parte a causa della crescente domanda dei consumatori di prodotti più 'naturali'. Verosimilmente infatti, la maggior parte dei consumatori preferisce consumare uova derivate da galline allevate all'aperto, con la percezione che queste ultime siano in uno stato di benessere maggiore e produttrici quindi di uova più sane di quelle ottenute da sistemi di gabbie convenzionali o modificati, ma come accennato precedentemente, anche la popolarità dell'allevamento di pollame da cortile è notevolmente aumentata, insieme al crescente interesse del pubblico per la produzione alimentare locale e per i sistemi di allevamento meno intensivi (Antell et al., 2006; Huang et al., 2019). I fitobiotici o fitoestratti sono ampiamente utilizzati nella moderna produzione di pollame per migliorare il benessere e la produttività degli animali allevati. La loro popolarità è associata ai loro effetti sulla salute dell'animale e del miglioramento qualitativo del prodotto (Al-Yasiry et al., 2017ab), anche dal punto di vista nutraceutico, come nel caso delle tanto ricercate uova a basso contenuto di colesterolo. Includono, ad esempio, additivi per mangimi approvati per l'uso nella produzione di pollame come la *Boswellia serrata* e l'estratto di *Salix alba* (EURFA, 2016).

La resina di *Boswellia serrata* (Fam. Burseraceae), si ottiene da un albero di medie dimensioni (fino anche a 5 metri di altezza), originario dell'India, del Nord Africa e del Medio Oriente, caratterizzato da una corteccia tipicamente color cenere, ampiamente utilizzato nella medicina ayurvedica per il trattamento delle malattie infiammatorie, comprese quelle che colpiscono il tratto gastrointestinale (es. diarrea, dissenteria e malattie infiammatorie intestinali), grazie ai composti bioattivi in esso contenuti. Le resine gommose profumate essudate da molte specie di *Boswellia* sono conosciute comunemente come incenso. La resina è composta principalmente da acidi triterpenici pentaciclici e tetraciclici (Camarda et al., 2007; Sharma et al., 2009). Sono noti e di

maggior importanza, sei acidi boswellici: acido alfa-boswellico (α -BA), acido acetil-alfa-boswellico (A α BA), acido acetil-beta-boswellico (A β BA), acido acetil-11-cheto-boswellico (AKBA), beta-boswellico acido (β -BA) e l'acido 11-cheto-boswellico (KBA) (Figura 33). Questi composti sono responsabili di effetti antinfiammatori (Azemi et al., 2012; Hartmann et al., 2014; Umar et al., 2014), antisettici, analgesici, antibatterici, antitumorali, epatoprotettivi, ipolipemizzanti, ipocolesterolemizzanti, immunomodulatori e antiproliferativi sull'organismo animale e umano, che caratterizzano questa pianta (Ammon, 2010; Beghelli et al., 2017; Bertocchi et al., 2018). L'integrazione di questo fitoestratto nelle diete per pollame, in particolare solo nelle diete di polli da carne dove ne sono stati studiati gli effetti, migliora le prestazioni di allevamento, con aumento del peso alla macellazione associato a miglior indici di conversione alimentare, poiché migliora la digeribilità dei nutrienti della dieta grazie alla stabilizzazione della flora gastro-intestinale, in particolare del tenue (Kiczorowska et al., 2016; Tabatabaei, 2016). Inoltre, alcuni studi hanno riportato un effetto ipocolesterolemizzante ed epatoprotettore, e il suo conseguente effetto sulla qualità della carne di pollame, migliorando la quota di acidi grassi polinsaturi e acidi grassi totali nel muscolo del petto e della coscia, e nella composizione del grasso viscerale (Apperson e Cherian, 2017; Chowdhury et al., 2018) e nel contenuto di metalli e oligo-elementi (Al-Yasiry et al., 2017c). L'attività antinfiammatoria che caratterizza *Boswellia serrata*, usata ad esempio anche nel trattamento dell'osteoartrite del cane, è esercitata anche da altri fitoestratti, come il *Salix alba*.

Salix alba, comunemente noto come salice bianco, è una pianta usata nella medicina popolare per il trattamento di infiammazioni croniche e acute, infezioni, dolori e febbre. La caratterizzazione fitochimica dell'estratto di corteccia di questa pianta contiene principalmente salicina, un precursore dell'agente antinfiammatorio acido acetilsalicilico (Csonka et al., 2016), che tutti noi conosciamo con il nome comune di aspirina. Contiene anche composti fenolici e flavonoidi come acido salicilico, salidroside, saligenina, tremulodina, acetil-salicortina e tremulacina (Gawlik-Dziki et al., 2014; Maistro et al., 2019). Molti studi *in vivo* e *in vitro* che hanno dimostrato le proprietà antiossidanti degli estratti di salice. Nei ratti diabetici, l'estratto potrebbe ridurre la perossidazione lipidica e i livelli di citochine infiammatorie (Bucolo et al., 2013) e l'effetto antiossidante oltre che infiammatorio, è stato dimostrato nei ratti con artrite indotta (Khayyal et al., 2005). Oltre alle proprietà antiossidanti e antinfiammatorie, la corteccia di salice viene utilizzata negli integratori alimentari coadiuvanti la perdita di peso. Inoltre, nei conigli normolipidemicici, la somministrazione in acqua da bere dell'estratto di salice ha ridotto il livello di colesterolo totale, e questo effetto è paragonabile a quello ottenuto dalla somministrazione di simvastatina (Karimi et al., 2015; Zabihi et al., 2017). Sono disponibili pochi dati invece sull'uso di estratto di salice negli animali da allevamento, in particolare nelle specie aviarie, nonostante l'acido acetilsalicilico e il salicilato di

sodio siano considerati sicuri per il pollame e spesso utilizzati in medicina aviaria (Poźniak et al., 2012). In particolare, l'uso di salicilati derivati da *Salix alba*, sono utilizzati per ridurre lo stress termico nei polli da carne (Saracila et al., 2019). Inoltre, l'integrazione alimentare con estratto di corteccia di salice all'1%, ha avuto un effetto ipocolesterolemizzante e ipoglicemizzante in polli da carne sottoposti a stress da calore (Saracilla et al., 2018), probabilmente dovuto al meccanismo dei polifenoli di interagire nella regolazione dell'omeostasi del glucosio e nel miglioramento della sensibilità insulinica dell'animale (Kim et al., 2016).

Tuttavia, a nostra conoscenza, non sono disponibili dati scientifici sugli effetti di *Boswellia serrata* e *Salix alba* sulle galline ovaiole, in particolare quando allevate all'aperto in condizioni di maggior benessere. Si è deciso, pertanto, di condurre uno studio, oggi ancora in corso, sugli effetti di un integratore a base di *Boswellia serrata* e *Salix alba*, sulle prestazioni zootecniche, benessere, biochimica e qualità delle uova prodotte, di galline ovaiole di razza Livornese allevate con metodo free-range.

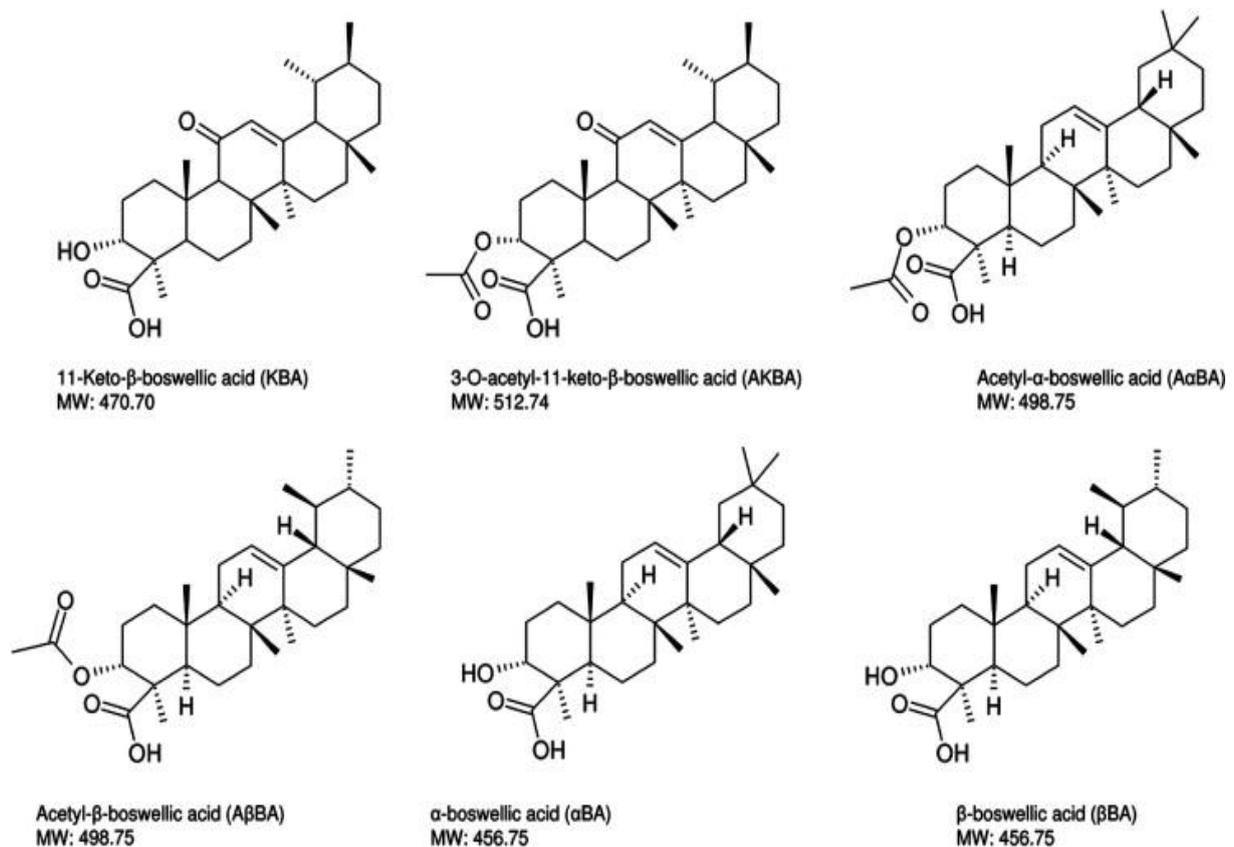


Figura 33. Struttura chimica dei 6 principali acidi boswellici contenuti in *B. serrata*.

5.2. MATERIALI E METODI

5.2.1. ANIMALI E AMBIENTE DI ALLEVAMENTO

Per questo studio, 120 pollastre di razza Livornese dell'età di 120-123 giorni (4 mesi di età), *Salmonella* free e non debeccate, sono state divise in due gruppi sperimentali, Trattato ($n=60$) e Controllo ($n = 60$), e allevate con metodo rurale free-range presso un allevamento situato sulle colline del Mugello, in Toscana.

Durante l'esperimento, il fotoperiodo e la temperatura naturali sono stati mantenuti per consentire agli animali di continuare il loro sviluppo somatico fino alla maturità sessuale e quindi alla deposizione. Le strutture ospitanti le galline sono in legno, con paddock esterni per il razzolamento, recintati e chiusi superiormente con una rete anti rapace e situati all'interno di un bosco privo di sottobosco erboso per evitare interferenze con la normale assunzione di mangime (Figura 34, 35). In ogni pollaio sono disponibili i nidi per la deposizione (1 nido/5 galline) e 20 cm/gallina a disposizione di posatoio (Figura 36). Le galline hanno libero accesso diurno al paddock (dalle 07:00 alle 18:30) fino al rientro notturno nel pollaio. Mangiatoie a tramoggia e abbeveratoi a sifone (2 per tipologia all'aperto per ogni gruppo, poi portate all'interno dei pollai la notte, per la prima assunzione di cibo e acqua al mattino prima dell'uscita) forniscono mangime e acqua *ad libitum*. Nei giorni di pioggia, per impedire agli animali di assumere acqua piovana, vengono chiusi all'interno dei pollai, con abbeveratoi interni. La prova sperimentale ha avuto inizio a metà agosto 2021, e proseguirà fino a metà gennaio 2022 (5 mesi), e autorizzata ai sensi di legge, con autorizzazione n° 602/2021-PR (Prot. N° 67080.15).



Figura 34. Pollastre i primi giorni dall'arrivo nell'allevamento, nel paddock di sottobosco, recintato superiormente con rete anti-rapace.



Figura 35. Pollastre gruppo Controllo al razzolo, vicine alla deposizione (cresta più sviluppata).



Figura 36. Pollastre al rientro serale, sui posatoi per il riposo notturno.

5.2.2. ALIMENTAZIONE

Per una settimana dopo l'arrivo in allevamento, entrambi i gruppi hanno ricevuto una nuova dieta (mangime Cargill s.r.l, Tabella 3) offerta gradualmente in sostituzione della dieta assunta in svezzatoio, per abituare gli animali e ridurre al minimo lo stress da cambiamento di dieta,

senza l'aggiunta, nel mangime del gruppo Trattato, di fitoestratti. Successivamente alla settimana di ambientamento e cambio dieta, nel mangime del gruppo Trattato sono stati aggiunti i fitoestratti, in ragione di 300 g di estratti puri/100 kg di mangime, contenente un 5% di estratto secco di *B. serrata* e 5% di estratto secco di *S. alba* (contenente 30% di salicina).

In base alle fasi fisiologiche delle galline, lo studio sarà suddiviso in almeno 3 diversi periodi, a partire dalla data di somministrazione dell'integratore, 7 giorni dopo l'ambientamento. Il primo periodo (P1) andrà dalla data di inizio della somministrazione alla deposizione, che dovrebbe avvenire entro i 6 mesi di età delle galline. Nel corso del P1, le galline affronteranno le fasi fisiologiche più critiche dello sviluppo della gallina ovaioia, quali la fine crescita somatica e di pre-deposizione. Indicativamente quindi, si prevede la somministrazione del mangime integrato con i fitoestratti al gruppo Trattato per almeno 2 mesi. Il secondo periodo (P2), andrà dall'inizio della deposizione fino ad almeno 30 giorni post deposizione, dove le galline del gruppo Trattato, continueranno a ricevere l'integratore. Il terzo periodo (P3), si prevede essere di almeno 2 mesi, dove sarà sospesa l'integrazione con i fitoestratti, al fine di valutare eventuali variazioni delle performance e biochimiche. Il gruppo di Controllo riceverà la stessa dieta senza supplementi durante tutta la sperimentazione. Tutte le galline non sono state ad oggi, sottoposte ad alcun programma medico o trattamento medico d'emergenza.

Tabella 3. Composizione analitica del mangime somministrato ai gruppi sperimentali.

Composizione (Cereali e derivati)	Composizione analitica (%/Kg)	Additivi (mg; IU; OTU/Kg)
Mais, Farina glutinata di mais, Farina di estrazione di soia tostata, carbonato di Calcio, soia tostata, glutine di mais, rottore di riso, crusca di frumento, olio di soia, Fosfato di- calcico, cloruro di sodio	Proteine grezze: 17% - Fibra grezza: 5% - Grassi grezzi: 3.51% - Ceneri: 13.27% - Ca: 4.02% - P: 0.58% - Na: 0.15% - Lisina: 0.85% - Metionina: 0.35%	Vit. A: 9.950 IU - Vit. D3: 2.701 IU - Vit. E 38 mg - Vit.K3: 2 mg - Vit.B1: 1.5 mg - Vit. B2: 4.5 mg - Vit. B6: 2.5 mg - Vit. B12: 0.008 mg - Niacina: 35mg - Ca-D-pantotenato: 10mg - Acido Folico: 1 mg - Biotina: 0.1 mg - Cu: 5 mg - Mn: 50 mg - Se: 0.075 mg - Zn: 40 mg - Cantaxantina: 2 mg - 6-phytase: 213 OTU

5.2.3. VALUTAZIONE DELLE PERFORMANCE PRODUTTIVE

I dati sulle performance zootecniche saranno registrati durante tutto il periodo di prova per ogni gruppo sperimentale. Da ogni gruppo, sono state selezionate casualmente 8 galline come unità campionaria, secondo *power analysis* preliminare ($n=8$), rappresentativa del gruppo stesso, correttamente identificate con anelli numerati inamovibili, utilizzate per la valutazione e controllo del peso corporeo registrato settimanalmente, e per il prelievo ematico a determinati punti

sperimentali. Per ciascun gruppo invece, in base ai consumi di mangime e acqua, vengono calcolati i consumi a capo di mangime (gr/capo) e acqua (ml/capo) giornalieri, e cumulativi per gruppo. Sulla base di questi ultimi e il peso corporeo, sarà determinato l'indice di conversione alimentare (ICA), fino alla deposizione, per poi essere espresso come efficienza alimentare. Dall'inizio della deposizione, il numero di uova deposte (N° uova), curva di produzione - tasso di deposizione (%) espressa graficamente, massa di uova prodotte (gr/gr), espressa come produzione di uova (tasso di deposizione) × peso uovo/100, saranno registrati per ogni gruppo, valutando al contempo, il peso medio e incremento delle uova prodotte, calcolato su un campione casuale di almeno 20 uova/gruppo, scartando quelle a doppio tuorlo.

5.2.4. MORTALITÀ E VALUTAZIONI COMPORIMENTALI

La mortalità verrà registrata anch'essa giornalmente, durante tutta la sperimentazione per ciascun gruppo. Durante l'esperimento sarà data particolare attenzione alla osservazione del comportamento delle galline, inteso come comportamento sociale (gerarchia sociale), attitudine a sfruttare il paddock esterno e l'intraprendenza nell'esplorare l'ambiente esterno e, eventualmente, alterazioni dovute alla somministrazione dell'integratore. Per ogni gruppo sarà anche calcolato il tasso di prolassi in fase di deposizione come anche la percentuale giornaliera di uova deposte sulla lettiera del pollaio.

5.2.5. VALUTAZIONI CON *SCALA ROCHE*, QUALITÀ E TEST MICROBIOLOGICI SULLE UOVA

La valutazione del colore del tuorlo e sua intensità tramite l'ausilio della *Scala Roche*, comprende una gamma di colori di varia intensità dal giallo paglierino all'arancione intenso, espressi con un punteggio da 1 a 15 punti colore, come colori prodotti in condizioni di alimentazione convenzionali o naturali. Saranno sottoposte settimanalmente a valutazione almeno 5 uova per gruppo, per un totale di 10 uova/settimana. Il punteggio del colore del tuorlo sarà attribuito individualmente a ogni singolo uovo, in condizioni di luce naturale di laboratorio. I tuorli utilizzati per la valutazione del colore tramite *Scala Roche*, saranno singolarmente valutati, tramite ausilio di kit-commercio, del loro contenuto di colesterolo al fine di valutare eventuali variazioni dello stesso, per effetto dell'integratore. Per quanto concerne le valutazioni microbiologiche, è prevista dalla 4° settimana di deposizione, e almeno ogni 5-6 settimane, il test microbiologico per la rilevazione di *Salmonella* spp. Dieci uova per ogni gruppo saranno sottoposte a test microbiologico, come pool di guscio e tuorlo, analizzati separatamente, secondo le procedure UNI-EN-ISO 6579-1:2017.

5.2.6. PARAMETRI BIOCHIMICI

Dalle 8 galline selezionate per gruppo, sono stati prelevati campioni di sangue (2,5 ml) dalla vena brachiale utilizzando una siringa sterile con ago 23G-0,60 mm, a determinati punti sperimentali (punti prelievo). I tempi previsti sono 4: all'inizio della prova con l'integratore (T0), alla 5° settimana quindi a un mese dalla somministrazione dell'integratore (T1), alla 12° (T2) e a fine prova (T3). Ogni campione ematico è stato diviso in 2 aliquote, in due provette differenti, una senza anticoagulante e una con EDTA (Vacutest Kima, Arzegrande, Italia). Per l'analisi citofluorimetrica, nelle provette con EDTA sono immessi da 0,2 - 0,3 ml di sangue intero per la valutazione del rapporto eterofili/leucociti (H/L), al fine di usare questo rapporto per la valutazione del benessere delle galline. Il siero invece, è stato ottenuto dall'altra aliquota, mediante centrifugazione a 1500 x g a 4 °C per 10 minuti e conservato in provette plastica da 2 ml a - 80 °C fino alle analisi biochimiche. È stato scelto per tale valutazione un profilo di 13 analiti: alanina aminotransferasi (ALT), aspartato aminotransferasi (AST), fosfatasi alcalina (ALP), bilirubina, glucosio, colesterolo, trigliceridi, proteine totali, albumina, globuline (e loro rapporto), acido urico, calcio, fosforo (e loro rapporto). Le analisi sono state eseguite utilizzando kit commerciali disponibili (Olympus Systems Reagents), con un analizzatore biochimico automatizzato (Olympus AU400, Mishima Olympus Co. Ltd, Shizuoka, Giappone) utilizzato di routine in ambito clinico per le analisi del sangue.

5.2.7. ANALISI CITOFUORIMETRICA

Per la determinazione del rapporto Eterofili e Linfociti (H/L) in Citometria a Flusso, i campioni ematici saranno fissati aggiungendo "IntraPrep Reagent 1" (Beckman Coulter, Life Sciences, Indianapolis, IN, USA) seguendo le istruzioni della ditta fornitrice (50 µl di sangue e 100 µl di "IntraPrep Reagent 1") e mantenuti a + 4 °C per 48 ore. Ciascun prelievo sarà ulteriormente diviso in due campioni identici da processare con le medesime modalità, per avere dei duplicati tecnici. I campioni saranno poi marcati con un anticorpo anti-CD45 coniugato ad Allophycocyanina (APC) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) secondo il metodo descritto da Seliger et al. (2012). Venti microlitri di sangue fissato verranno diluiti con 980 µl (1:50) di tampone fosfato salino, PBS 1X, quindi 100 µl di sangue diluito marcati con 0.5 µl di anticorpo anti-CD45-APC per 45 min a + 4 °C al buio. Come controlli negativi, campioni non marcati con anticorpo saranno utilizzati per valutare la colorazione di fondo e l'autofluorescenza. Terminata l'incubazione con anticorpo, verranno aggiunti 400 µl di PBS 1X e mantenuti in ghiaccio e al riparo dalla luce fino a lettura al citofluorimetro MacsQUANT® Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany); 100

ul totali saranno quindi processati per ciascun campione. L'analisi dei dati citofluorimetrici ottenuti sarà valutata con il software Flowlogic (Inivai Technologies, Mentone Victoria, Australia) seguendo una precisa strategia di *gating*. Nello specifico i detriti cellulari e gli artefatti saranno esclusi dalle successive analisi sulla base delle caratteristiche morfologiche (dimensioni cellulari e complessità cellulare) evidenziate nel cosiddetto cistogramma, ovvero un grafico in cui vengono riportati il Forward Scatter (FSC-dimensioni) in ascissa e il Side Scatter (SSC-complessità) in ordinata. L'esclusione dei doppietti sarà eseguita utilizzando i parametri FSC-area vs FSC-altezza (FSC-H). La popolazione di singoletti positiva per CD45 (leucociti) sarà selezionata in base alla fluorescenza. Dopo l'esclusione dei trombociti in base alle caratteristiche fisiche e di fluorescenza, la popolazione presente sarà analizzata per le caratteristiche morfologiche come descritto da Naghizaden et al. (2019). Nel cistogramma ottenuto seguendo questa strategia saranno definite le due popolazioni, eterofili (H) e linfociti (L), calcolando il rapporto tra la percentuale di eterofili e quella di linfociti per ciascun campione.

5.2.8. ELETTROFORESI PROTEINE SIERICHE

L'elettroforesi per le proteine sieriche sarà eseguita mediante Novex Mini-Cell (Invitrogen) utilizzando un gel precast di poliacrilamide con gradiente 4-12%. A tal fine, i reagenti previsti saranno: NuPAGE SDS running buffer MOPS 20X (ThermoFisher Scientific), NuPAGE LDS Sample Buffer 4X (ThermoFisher Scientific), 10X Bolt Sample Reducing Agent (ThermoFisher Scientific), NuPAGE Antioxidant (ThermoFisher Scientific), PageBlue Protein Staining Solution (ThermoFisher Scientific), SeeBlue Pre-stained Protein (Life Technologies) ed acqua bi-distillata. A 30 µl di siero per ogni campione saranno addizionati con 570 µl di acqua bi-distillata. Una volta diluiti, per ogni campione verrà prelevato un volume contenente 15 µg di proteine. Ad ogni campione saranno aggiunti 8,5 µl di SDS-Page buffer (6 µl LDS running buffer, 2,5 µl reducing agent) e acqua bi-distillata al fine di raggiungere un volume finale di 24 µl, per poi incubarlo a 70 °C per 10 minuti. Successivamente, ogni campione verrà centrifugato.

Per la preparazione del gel di poliacrilamide (SDS-Page), 24 µl di ogni campione verranno caricati nei pozzetti, e 10 µl di SeeBlue Pre-stained Protein saranno aggiunti nel decimo e ultimopozzetto usandolo come marker per la determinazione della massa molecolare (MM) delle proteine. La SDS-Page verrà eseguita a 200 Volt per 45 minuti. Cinquanta ml di MOPS 20X aggiunti a 950 ml di acqua bi-distillata saranno utilizzati per preparare il running buffer. Di questi, 200 ml addizionati con 500 µl di NuPage Antioxidant, saranno utilizzati per preparare il tampone della camera interna della cella elettroforetica. In seguito alla fase di colorazione, ogni gel verrà acquisito

mediante ChemiDocMP (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), ed i ferogrammi saranno ottenuti usando il software ImageLab 5.2.1 (Bio-Rad, Hercules, California, CA, USA).

5.3. RISULTATI

I risultati presentati sono relativi ai primi due mesi di sperimentazione. In particolare, sono presentati i risultati relativi all'andamento dei parametri di performance, quali peso corporeo, consumo giornaliero di acqua, mangime e ICA, e i dati biochimici e citofluorimetrici ottenuti dai primi due prelievi ematici (T0, T1). Non essendo ancora in deposizione, non sono disponibili i dati relativi alla produzione e alla qualità delle uova.

5.3.1. PERFORMANCE, MORTALITÀ E OSSERVAZIONI COMPORTAMENTALI

I dati di performance corrispondono a valori medi e deviazione standard (DS) ottenuti nelle prime 8 settimane di prova. I dati sono stati elaborati utilizzando un test statistico non parametrico quale il Kruskal-Wallis, al fine di evidenziare eventuali differenze statisticamente significative tra i due gruppi, considerando statisticamente significativi i valori per $p \leq 0,05$.

Il peso corporeo per il gruppo Trattato era di $1,128 \pm 0,144$ Kg peso vivo, rispetto al gruppo Controllo che ha registrato un peso medio sensibilmente maggiore di $1,155 \pm 0,158$ Kg peso vivo, seppur non statisticamente significativo (Grafico 1).

Il consumo medio di mangime (Grafico 2) e acqua (Grafico 3) nelle prime 8 settimane di prova è stato di $82,76 \pm 12,35$ gr/gallina/giorno con $154,30 \pm 14,57$ ml/gallina/giorno di acqua per il gruppo Trattato, e di $79,40 \pm 12,40$ grammi/gallina/giorno con $132,67 \pm 17,19$ ml/gallina/giorno di acqua per il gruppo di Controllo, senza osservare differenze statisticamente significative tra i due gruppi per quanto riguarda il consumo di alimento. Per quanto concerne i consumi di acqua, si evidenziano invece differenze statisticamente significative ($p \leq 0,015$) tra i due gruppi, dove il gruppo Trattato ha consumato un maggior quantitativo di acqua. Ad 8 settimane di trial, l'indice di conversione alimentare (ICA) di 1,54 e di 1,10 rispettivamente, ma non statisticamente significativo. Da ciò che si denota è che il gruppo Trattato, seppur non consumi quantitativi di mangime più elevati, mostrano tuttavia un peso corporeo medio inferiore al gruppo Controllo, consumano più acqua di bevanda e hanno un ICA peggiore. Al momento della valutazione, l'ICA del gruppo Trattato è coerente e proporzionale al consumo maggiore di alimento, seppur non eccessivamente elevato rispetto al gruppo di Controllo, a discapito, però, di un peso corporeo medio inferiore, quindi un decremento di peso rispetto a un aspettato aumento. Tale decremento di peso rispetto al normale sviluppo somatico della gallina che dovrebbe prepararsi alla deposizione, non è

stato associato a differenze o alterazioni dei parametri biochimici, in particolare dei parametri epatici e renali, che denotino valori alterati indice di fenomeni di intossicazione o stato di malessere. Verosimilmente, potrebbe essere imputabile a un effetto di aumento del metabolismo basale (Shara & Stohs, 2015) dovuto a effetti dell'integratore, ancora non noti e che saranno oggetto di approfondimento. A sostegno ulteriore di questa tesi, sono i riscontri avuti sul gruppo Controllo che, oltre a essere lineari nello sviluppo somatico, al progressivo abbassamento delle temperature dovute ai cambiamenti stagionali, non hanno aumentato l'ingestione di alimento.

Durante le 8 settimane di trial, non si è verificato alcun caso di mortalità in entrambi in gruppi (0,0%) mentre sono state evidenziate modificazioni del comportamento. In particolare, dopo 2 settimane dall'inizio della somministrazione del mangime integrato con i due fitoestratti, le galline del gruppo Trattato hanno manifestato stati di estrema quiete e sonnolenza durante le ore diurne, riducendo progressivamente l'attività di razzolamento. La tendenza del gruppo era quella di sostare molte ore a terra sulla lettiera o sui posatoi a dormire, senza destare particolare preoccupazione o agitazione al passaggio degli addetti. Nonostante questo, l'assunzione di mangime e acqua non ha subito variazioni. Il comportamento indolente del gruppo si è mantenuto per circa 3 settimane, per poi scomparire progressivamente.

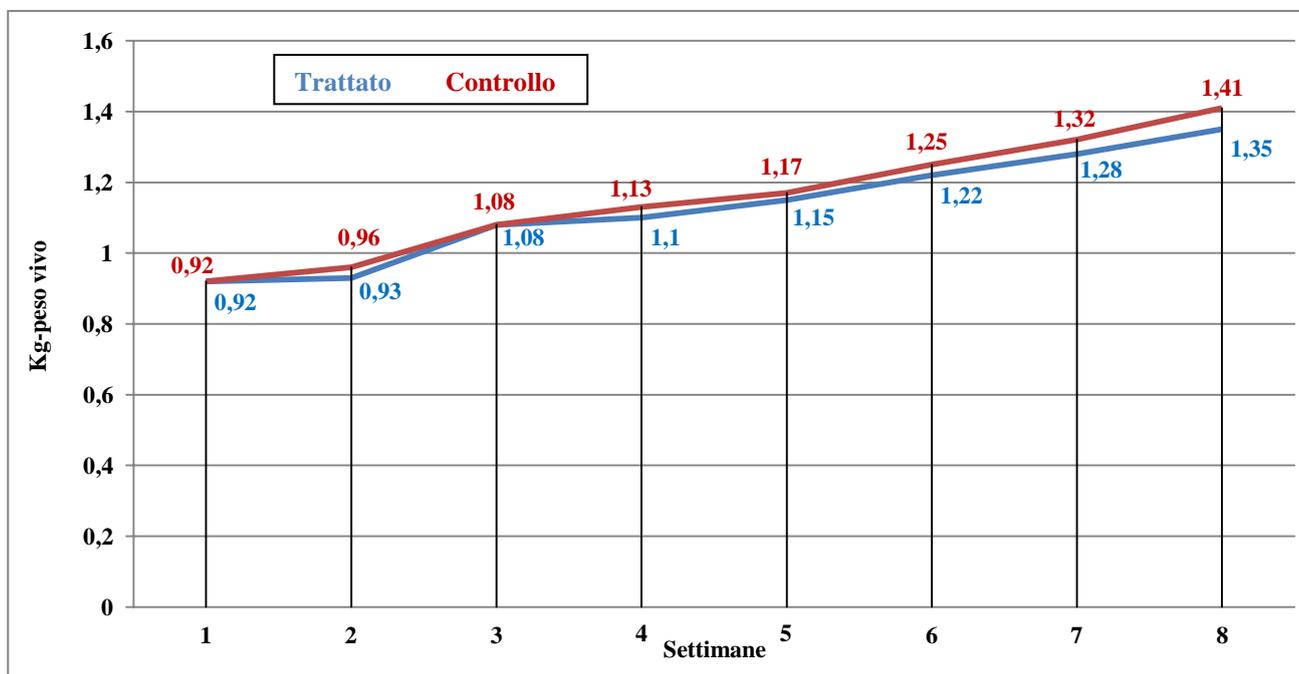


Grafico 1. Andamento settimanale del peso vivo medio ottenuto dalla pesata delle 8 galline campione.

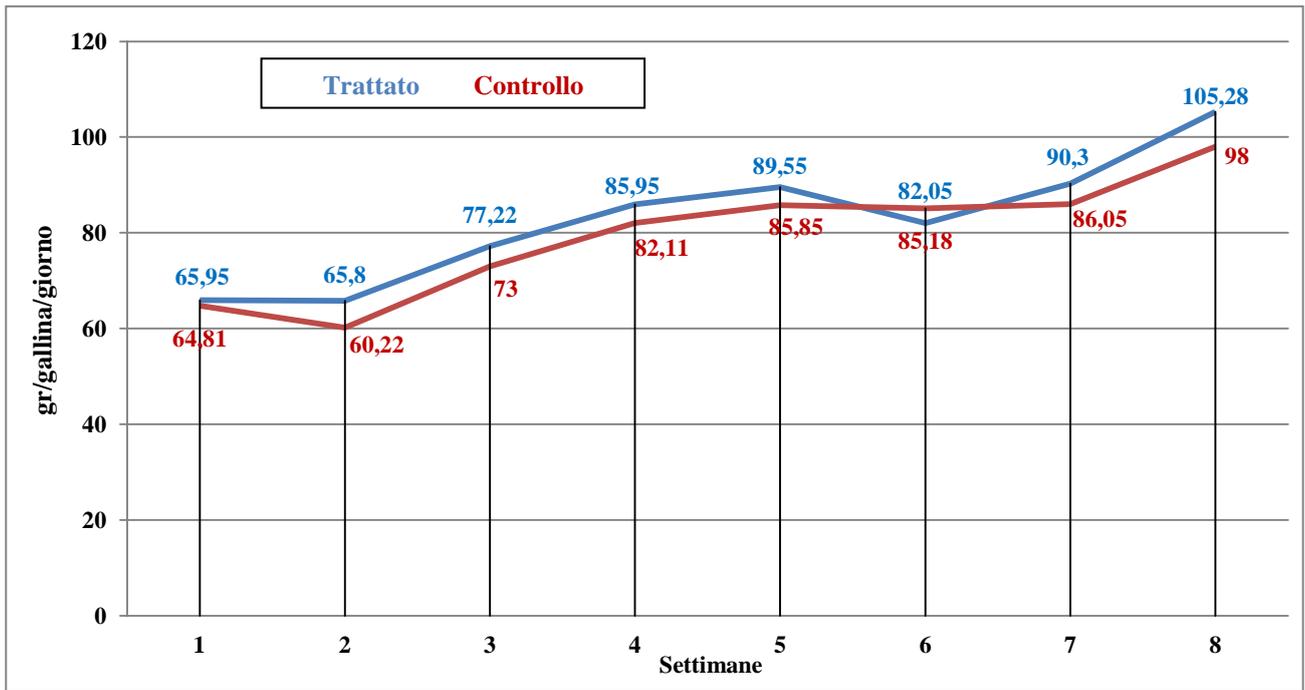


Grafico 2. Andamento del consumo medio settimanale a capo di mangime.

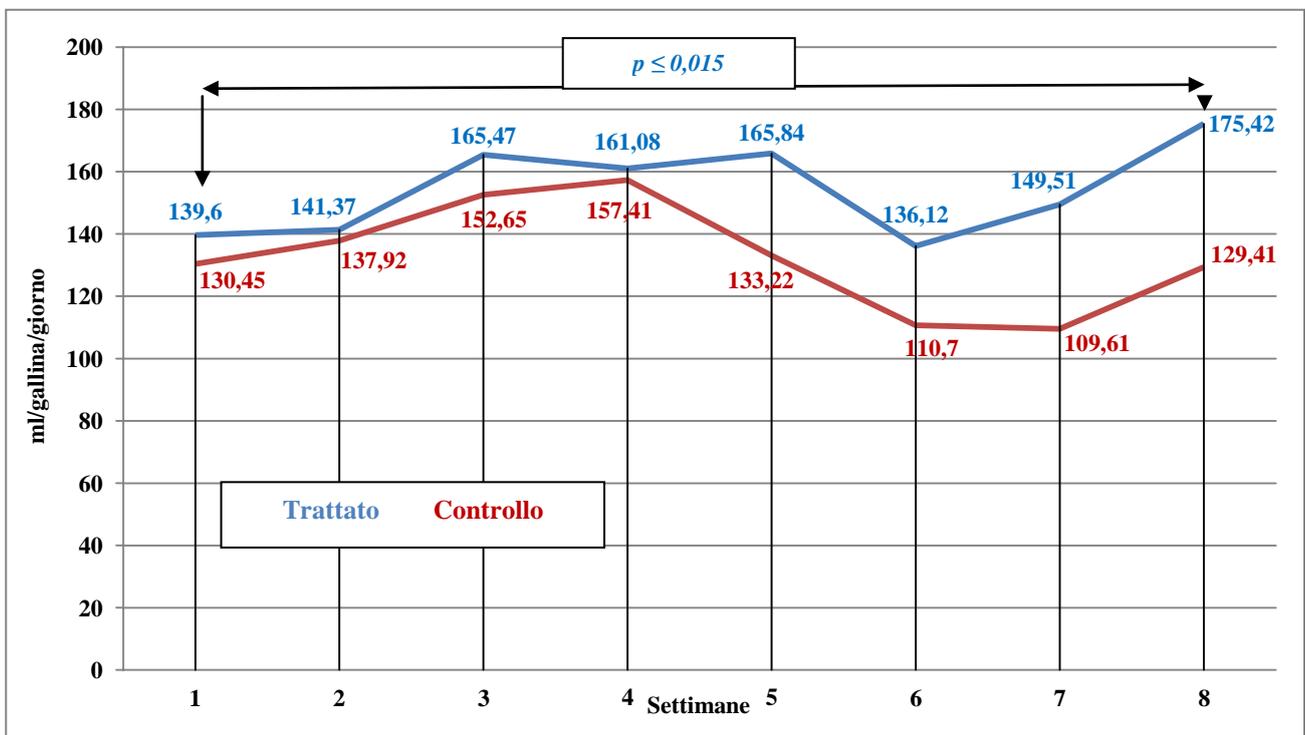


Grafico 3. Andamento del consumo medio settimanale a capo di acqua.

5.3.2. PARAMETRI BIOCHIMICI

In Tabella 4, sono riportati i valori medi e DS degli analiti sierici ottenuti dalle 8 galline campionate per ogni gruppo sperimentale, ai tempi T0 e T1. I profili biochimici preliminari relativi al tempo di prelievo T0, corrispondono al profilo biochimico delle galline una settimana dopo l'accasamento, coincidente con il giorno di inizio di somministrazione dei fitoestratti, mentre il tempo di prelievo T1 corrisponde al profilo biochimico a un mese di somministrazione dell'integratore. L'analisi statistica dei dati ottenuti dai primi due prelievi ematici, sono stati analizzati utilizzando, come test statistico non parametrico, il Kruskal-Wallis test, considerando statisticamente significativi i valori per $p \leq 0,05$. Il profilo biochimico degli analiti sierici riportato nella presente tesi rappresenta, ad oggi, il primo effettuato su galline di razza Livornese. In bibliografia infatti, le variazioni o differenze dei profili biochimici tra razza e ibridi commerciali sono pressoché inesistenti, lasciando spazio prevalentemente a dati riferibili ai soli ibridi di ovaioia commerciale. Al T0, sono state riscontrate differenze statisticamente significative soltanto per quanto riguarda i valori di albumina, per il gruppo Controllo, che potrebbero indicare un precoce ingresso in deposizione, mentre al T1, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra i due gruppi, per nessun parametro. Sempre al tempo di prelievo T1, l'assenza di differenze e alterazione dei parametri epatici e renali, confrontati anche con i valori riportati in altri studi (Al-Yasiry et al., 2017c), indicano, per il gruppo Trattato, l'assenza di effetti epatotossici e renali dovuto alla supplementazione con i fitoestratti.

Tabella 4. Valori dei parametri biochimici al tempo di prelievo T0 e T1, espressi come media (8 galline) \pm DS, del gruppo Trattato (T) e Controllo (C)

Parametri Biochimici	T0		T1	
	C	T	C	T
AST (*)	207,50 \pm 40,00	243,13 \pm 21,94	216,50 \pm 20,42	207,50 \pm 12,55
ALT (^)	1,25 \pm 0,46	1,71 \pm 0,76	1,88 \pm 0,64	2,38 \pm 0,92
SAP (j)	1159,50 \pm 310,75	1510,40 \pm 367,34	713,29 \pm 182,96	673,00 \pm 98,53
BILIRUBINA TOT (j)	0,01 \pm 0,00	0,02 \pm 0,01	0,05 \pm 0,04	0,02 \pm 0,01
COLESTEROLO TOT (j)	132,38 \pm 17,29	122,00 \pm 13,60	115,00 \pm 6,78	112,88 \pm 12,33
TRIGLICERIDI (j)	94,50 \pm 44,67	82,13 \pm 19,19	116,75 \pm 17,14	105,50 \pm 9,32
GLUCOSIO (j)	223,25 \pm 22,17	217,13 \pm 9,63	157,13 \pm 14,47	169,63 \pm 21,99
PROTEINE TOT (‡)	4,27 \pm 0,31	3,93 \pm 0,29	4,84 \pm 0,36	4,62 \pm 0,41
ALBUMINA (‡)	1,63 \pm 0,10 *	1,50 \pm 0,08	1,92 \pm 0,12	1,84 \pm 0,15
GLOBULINE (‡)	2,58 \pm 0,18	2,62 \pm 0,49	2,92 \pm 0,26	2,78 \pm 0,32
ALB/GLOB (‡)	0,65 \pm 0,06	0,61 \pm 0,05	0,66 \pm 0,03	0,67 \pm 0,07
FOSFORO (P) (^)	5,59 \pm 0,99	4,74 \pm 0,60	6,23 \pm 0,55	5,93 \pm 0,72
CALCIO (Ca) (^)	10,60 \pm 1,37	11,94 \pm 0,79	10,81 \pm 0,83	9,85 \pm 1,73
Ca*P	58,71 \pm 8,74	56,59 \pm 8,07	67,48 \pm 9,06	58,16 \pm 10,92
ACIDO URICO (^)	5,07 \pm 1,07	4,78 \pm 1,07	7,02 \pm 1,34	6,51 \pm 1,30

(*) U/L; (^ j) mg/dL; (‡) g/dL; (+) $p \leq 0,05$

5.3.3. ANALISI CITOFLUORIMETRICA E RAPPORTO H/L

Dalle analisi condotte sui campioni di sangue prelevati ai tempi T0 e T1, i detriti cellulari, che appaiono nell'angolo in basso a sinistra del citogramma (Figura 37), e gli artefatti, che presentano valori di FSC-A particolarmente elevati (Figura 37, a destra nel citogramma), sono stati esclusi. Sono stati riconosciuti gli eritrociti nucleati che appaiono come una strisciata all'estrema sinistra del citogramma come già descritto in letteratura in altri studi (Uchiyama et al., 2005). Tutta la popolazione di cellule nucleate evidenziata è stata valutata per escludere i doppietti, ovvero gli eventi con picchi di area doppia a fronte di una determinata altezza, che corrispondono ad altri interferenti (Figura 38). La popolazione di singoletti è stata valutata per l'espressione dell'antigene pan-leucocitario CD45. Come descritto da Saliger et al (2012), l'autofluorescenza degli eritrociti determina un elevato background che maschera la positività bassa per CD45 dei trombociti, rendendone spesso complicata l'identificazione. Selezionando la popolazione con valori di fluorescenza per APC più elevata ed escludendo, in questo range di fluorescenza, la popolazione con valori di SSC più bassi (cellule a bassa complessità) vengono esclusi i trombociti oltre agli eritrociti. La popolazione positivamente selezionata è stata valutata sulla base dei parametri morfologici in base ai quali distinguiamo i linfociti (FSC ed SSC bassi) e gli eterofili (FSC ed SSC alti) e conseguentemente, calcolato il rapporto H/L (Figura 39,40). I dati ottenuti al T0 e T1 sono stati confrontati statisticamente applicando un test non parametrico preliminare quale il Mann-Whitney Test, considerando statisticamente significativi i valori per $p \leq 0,05$ (Figura 41).

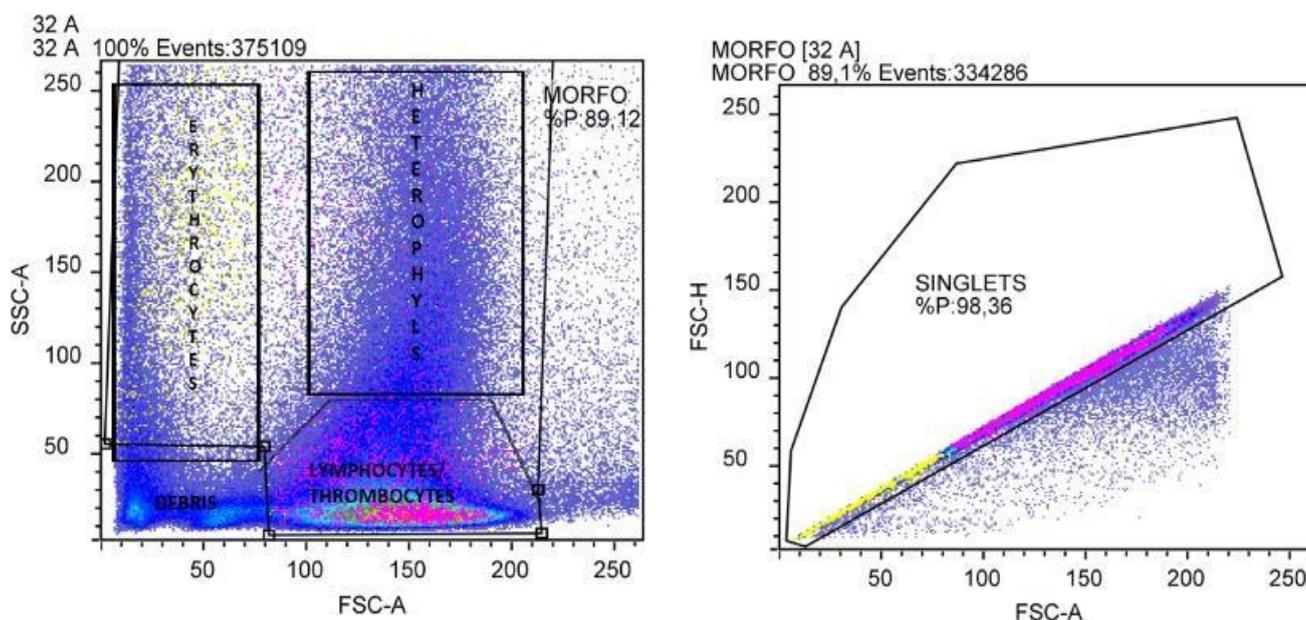


Figura 37,38. A sinistra, citogramma completo, con identificazione delle popolazioni su base morfologica (inclusi i detriti). A destra, citogramma ottenuto dopo esclusione dei detriti, con identificazione delle zone relative alle sottopopolazioni cellulari ematiche (evidente la strisciata corrispondente agli eritrociti nucleati (sulla sinistra).

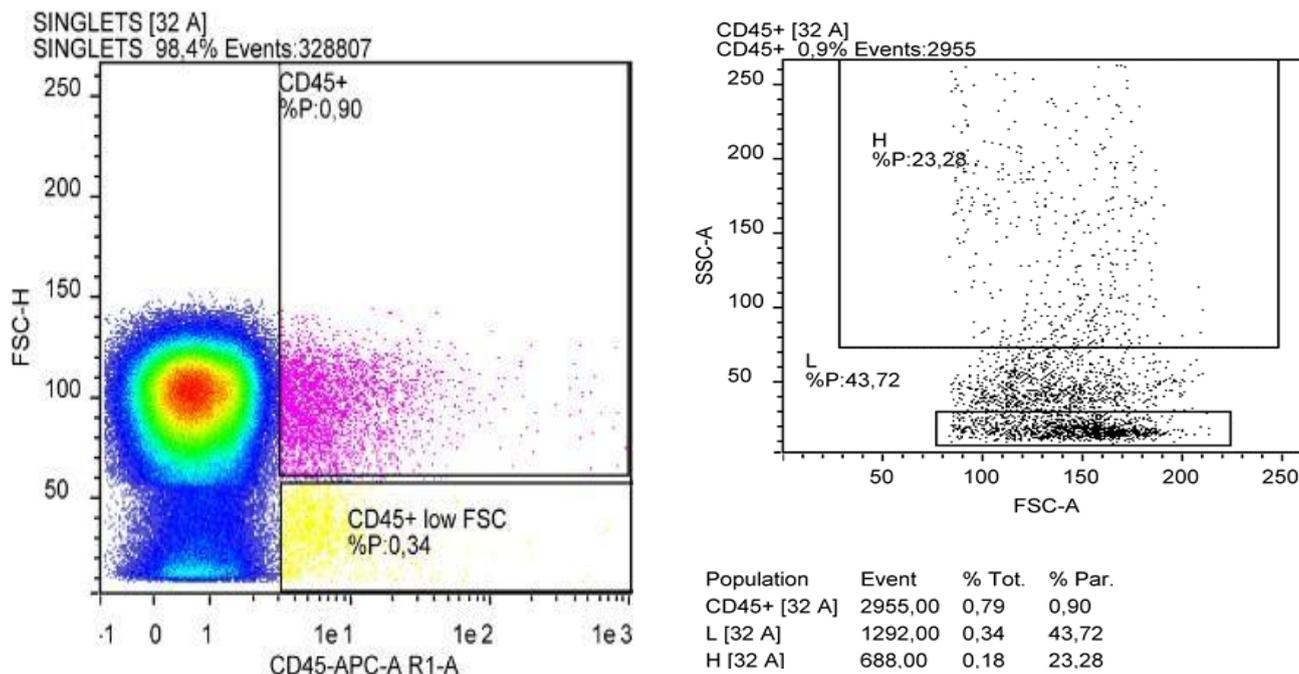


Figura 39, 40. A sinistra, dot-plot. Sulla ascissa, è visibile la fluorescenza di APC-bright e in ordinata FSC, ovvero la grandezza delle cellule, con esclusione della popolazione a bassa fluorescenza (APC-dim). In giallo, sottopopolazione corrispondente ai trombociti/eritrociti, in rosa è evidenziata la popolazione di interesse. A destra, citogramma ottenuto dopo l'elaborazione della popolazione di interesse, elaborata in base ai parametri morfologici, dove sono distinguibili le sottopopolazioni dei linfociti ed eterofili (CD45+), inclusi nei riquadri.

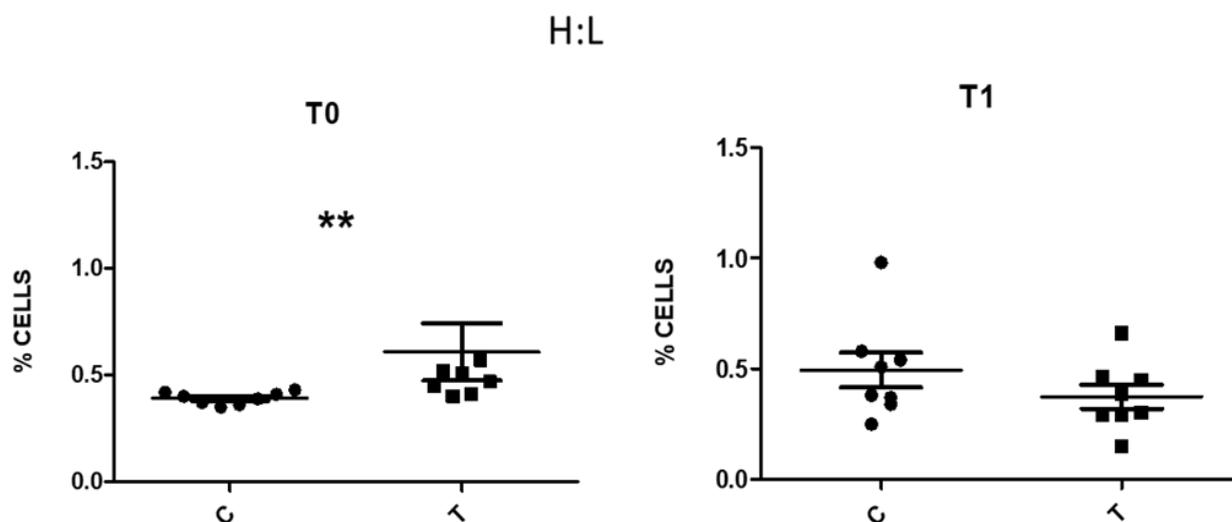


Figura 41. Plot risultanti dall'elaborazione statistica, come confronto tra i due tempi di prelievo T0 e T1.

Al momento delle analisi, le differenze casuali esistenti tra i gruppi prima della supplementazione mostrano un rapporto H/L maggiore nel gruppo Trattato rispetto al Controllo valore che risulta anche superiore al valore indicativo dello stato di stress dell'animale, fissato a 0,4, secondo quanto indicato in letteratura. Al T1, i valori risultano opposti, con i valori dei soggetti del gruppo Controllo che aumentano, superando anche il valore indicativo, mentre i valori dei soggetti

del gruppo Trattato si riducono significativamente rientrando nei range considerati normali. Le modificazioni osservate indicano che al momento, vi è un potenziale effetto benefico dell'integratore di *Boswellia serrata* e *Salix alba*.

5.3.4. ELETTROFORESI PROTEINE SIERICHE

Nell'elettroforesi delle sieroproteine in SDS-PAGE, si evidenzia la presenza di un profilo proteomico conforme a quelli rinvenuti in altre galline in bibliografia, in uno studio condotto da Kaab et al. (2019) (Figura 42), sebbene non di razza Livornese. Ad oggi, risulta essere il primo profilo proteomico ottenuto su galline di questa razza. Sia il gel da noi ottenuto che l'unico riportato in bibliografia, mostrano bande ben marcate riconducibili alla presenza di vitellogenina 2 (160 kDa) e, ad un peso molecolare più elevato (> 198 kDa), quella che in bibliografia è indicata come apolipoproteina B. Ad un peso molecolare inferiore, pari a 23 kDa, si evidenzia la presenza dell'apolipoproteina A1 (Figura 43,44). Al momento, non sono state rilevate differenze nel profilo proteomico al tempo di prelievo T0 e T1 tra il gruppo Controllo e Trattato, per i motivi precedentemente menzionati. Tuttavia, sono state registrate sensibili differenze nell'intensità delle bande, riconducibili alla vitellogenina tra T0 e T1 (rappresentata in entrambi i ferogrammi della Figura 43/1 e Figura 44/1, come terzo picco), ove in quest'ultimo, vi è una maggiore presenza della suddetta proteina, segno di preparazione all'entrata in deposizione. Nelle analisi elettroforetiche che saranno eseguite nei tempi di prelievo successivi, verosimilmente ci si aspetta di osservare un aumento fisiologico, in concomitanza alla preparazione dell'entrata in produzione dei soggetti, nel profilo proteomico dell'intensità di alcune bande, in particolare per quanto riguarda la vitellogenina, albumina e lipoproteine. Eventuali differenze del profilo proteico tra i due gruppi, riconducibili all'assunzione del fitoestratto, saranno valutate nei successivi tempi programmati al fine di completare lo studio.

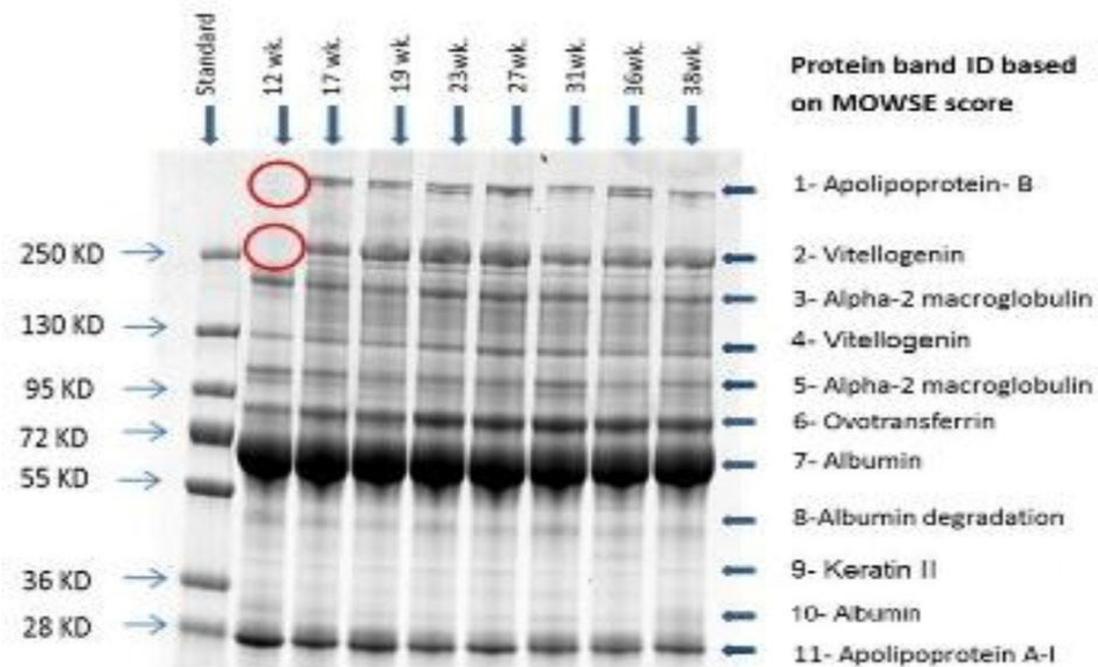


Figura 42. Elettroforesi proteine sieriche SDS-Page riportato nello studio di Kaab et al. (2019), con identificazione del peso molecolare delle proteine identificate.

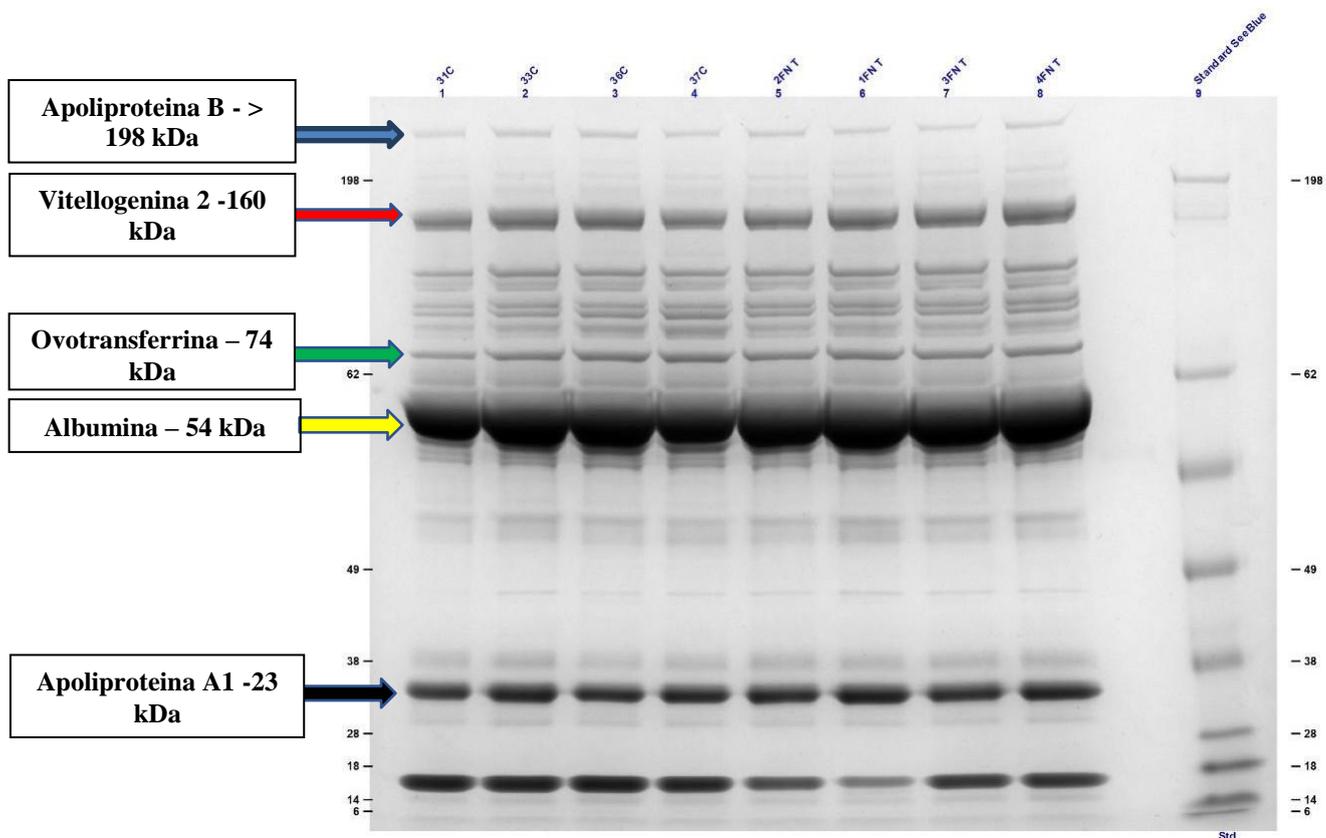


Figura 43. Gel ottenuto dall'elettroforesi proteine del siero a T0 con utilizzo di ChemiDocMP e del software ImageLab 5.2.1., delle 8 galline campionate.

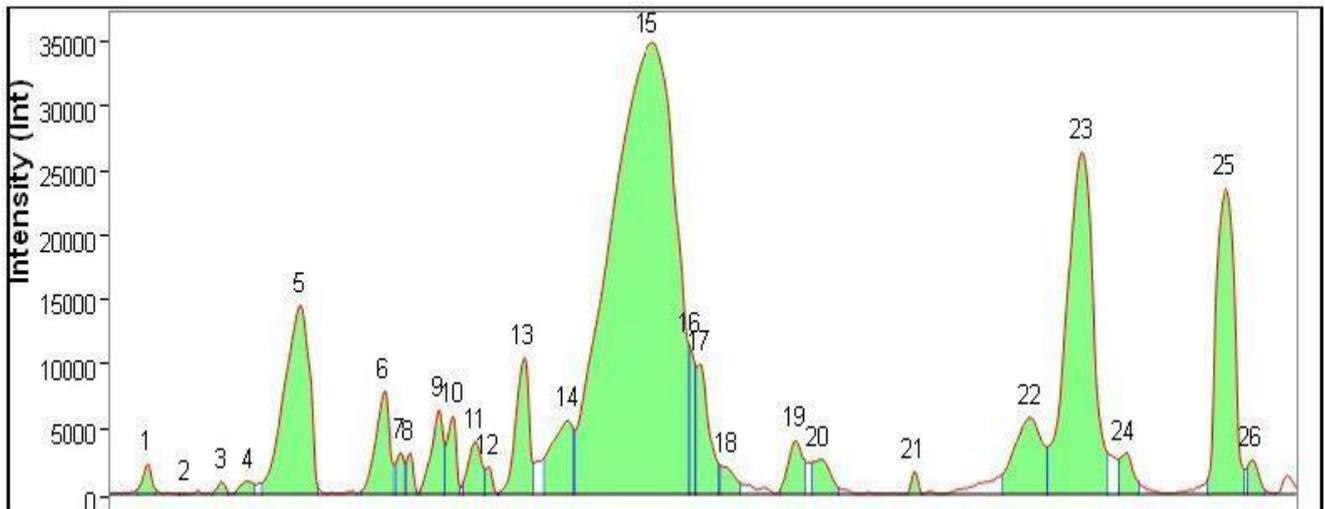


Figura 43/1. Ferogramma delle siero proteine in SDS-Page del soggetto identificato come 3FN campionato al T0, corrispondente alla lane 7, ottenuta mediante utilizzo del software ImageLab 5.2.1.

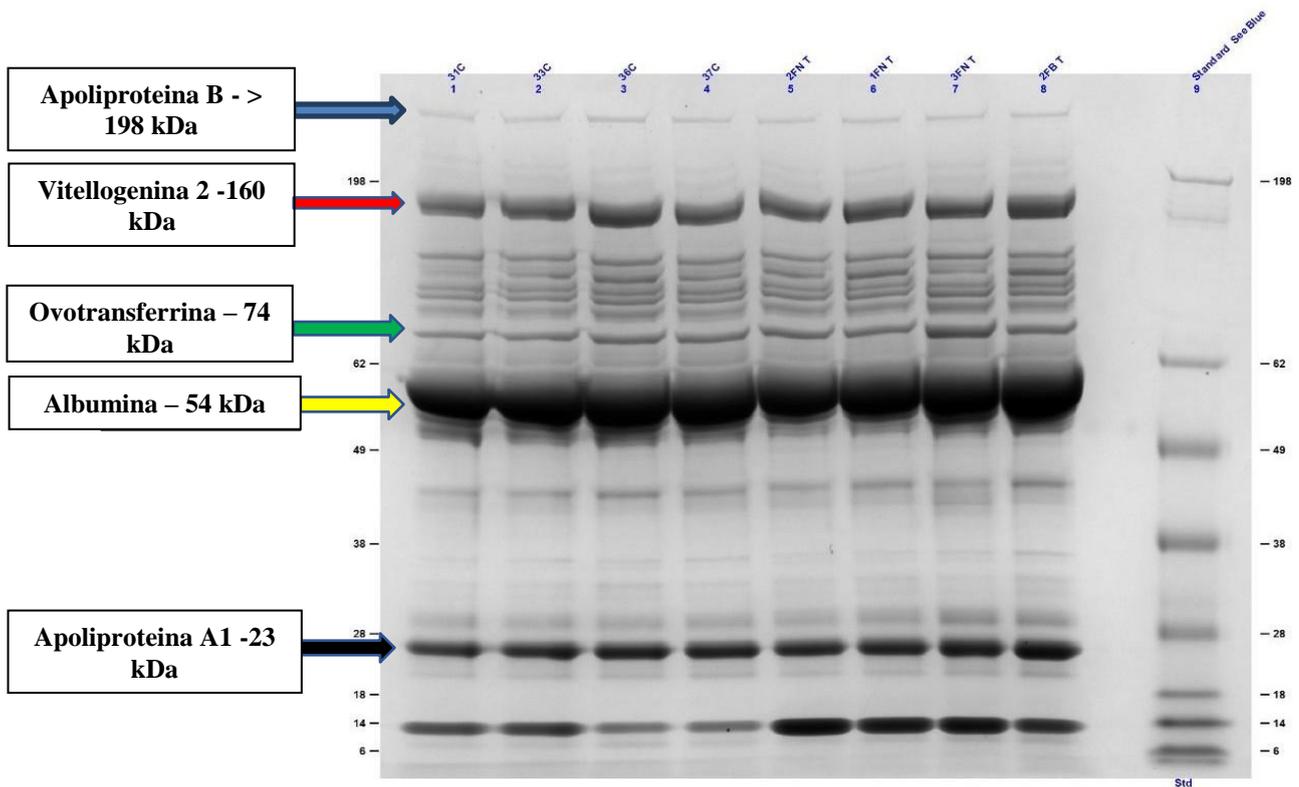


Figura 44. Gel ottenuto dall'elettroforesi proteina del siero a T1 con utilizzo di ChemiDocMP e del software ImageLab 5.2.1., delle 8 galline campionate.

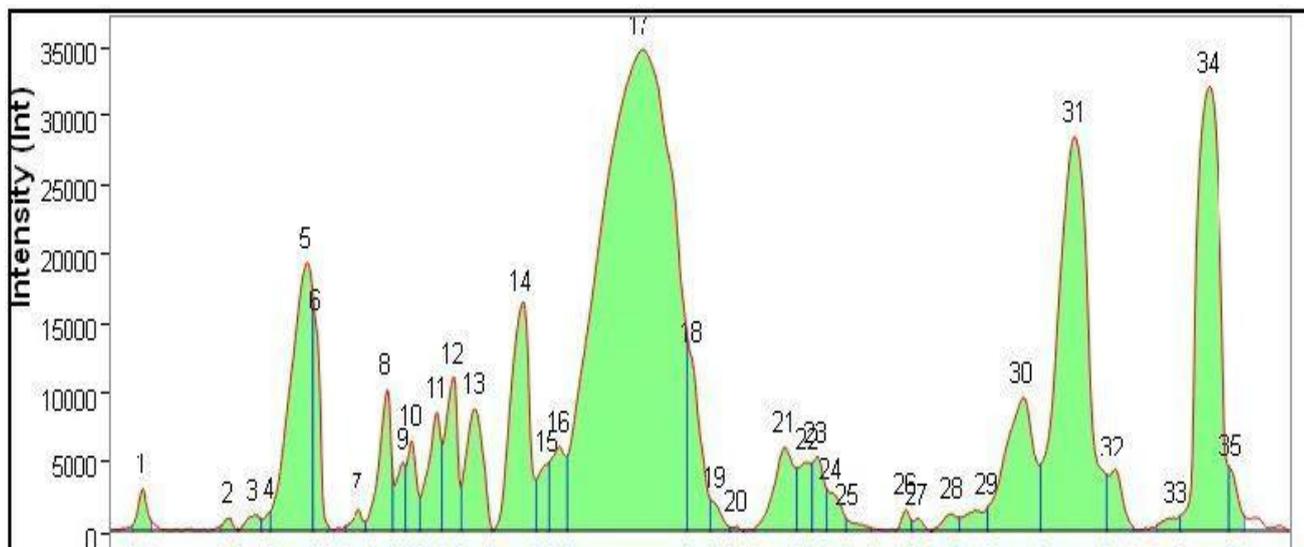


Figura 44/1. Ferogramma delle siero proteine in SDS-Page del soggetto identificato come 3FN campionato al T1, corrispondente alla lane 7, ottenuta mediante utilizzo del software ImageLab 5.2.1.

6. TOSSICOLOGIA DEI METALLI

6.1. METALLI PESANTI PRESENTI NELLE UOVA DA CONSUMO

Le uova sono uno degli alimenti più comuni nella dieta umana, sia tal quali che ovoidotti, o come ingrediente base di tante altre pietanze. Sono note per essere una ricca fonte di importanti nutrienti, quali proteine di alto valore biologico (> 96), grassi, minerali e oligoelementi. Tra questi ultimi, ne sono compresi una vasta gamma, che si distribuiscono in modo eterogeneo nelle matrici costituenti l'uovo, edibili e non, come albume, tuorlo e guscio. Secondo uno studio condotto da Yair e Uni (2011), minerali come cloro, potassio, sodio e zolfo sono presenti in quantità più elevate nell'albume, mentre altri minerali, come ferro (Fe), rame (Cu), manganese (Mn), e zinco (Zn), sono presenti in maggiori concentrazioni nel tuorlo. Per quanto concerne il Fe ad esempio, l'uovo ne è, come per il fosforo, un alimento piuttosto ricco. La biodisponibilità del Fe però, è relativamente bassa (Watkins, 1995), in quanto presente nella forma ferrica legato a proteine dell'albume (ovotrasferrina) e del tuorlo (fosvitina). Tra gli oligoelementi quali il fosforo, nell'uovo è presente in alta concentrazione, che copre circa il 16 % del livello di Assunzione di Riferimento dei Nutrienti (LARN). Secondo Meluzzi et al. (2016) invece, le quantità di selenio, ferro e zinco coprono rispettivamente il 9,8, 9,5 e 11% dei LARN. Tra i metalli che possono ritrovarsi nelle uova, sono inclusi potenzialmente anche quelli pesanti o tossici, che in esse si bioaccumulano.

I metalli possono essere classificati in essenziali e non-essenziali o tossici, inclusi i metalli pesanti (MP). Si definiscono essenziali i metalli indispensabili per gli organismi viventi; tra di essi distinguiamo i macronutrienti, il cui fabbisogno giornaliero è nell'ordine di grammi, quali calcio

(Ca), magnesio (Mg), potassio (K), sodio (Na) e fosforo (P), che svolgono un ruolo fondamentale nel metabolismo cellulare, e i micronutrienti, il cui fabbisogno può essere nell'ordine dei milligrammi, come ferro (Fe), rame (Cu), zinco (Zn), vanadio (V), cromo (Cr), manganese (Mn), cobalto (Co), arsenico (As), selenio (Se) e molibdeno (Mo). Questi ultimi, invece, agiscono come cofattori enzimatici e gruppi prostetici di numerose proteine. Si definiscono invece non essenziali o tossici quei metalli di cui non si conosce nessuna funzione biologica e il cui apporto può risultare dannoso per la salute dell'uomo o animali, quali piombo (Pb), mercurio (Hg), cadmio (Cd), alluminio (Al), berillio (Be) e nichel (Ni). È importante sottolineare che anche i metalli essenziali, possono risultare tossici ad elevate concentrazioni (Lucisano e Severino, 2014; Shaheen, et al., 2016). Con MP vengono indicati tutti quei metalli che, chimicamente, hanno l'attitudine a formare complessi molecolari a livello cellulare e produrre effetti tossici a breve o lungo termine. Essi possono naturalmente ridistribuiti nell'ambiente sia mediante cicli geologici che biologici, comprese le attività umane (attività industriali, agricole, ecc.). Queste attività possono portare alla diffusione di quantitativi di metalli nell'ambiente piuttosto considerevoli, con conseguente bioaccumulo negli organismi vegetali ed animali (compreso il fenomeno della biomagnificazione), che possono portare a gravi contaminazioni della catena alimentare (Bacci e Gaggi, 1998; Aendo et al., 2018). Secondo quanto definito dalla nomenclatura IUPAC (2002), vengono definiti metalli pesanti i seguenti elementi: alluminio (Al), argento (Ag), bario (Ba), berillio (Be), cadmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), ferro (Fe), manganese (Mn), mercurio (Hg), molibdeno (Mo), nichel (Ni), piombo (Pb), rame (Cu), stagno (Sn), titanio (Ti), tallio (Tl), vanadio (V), zinco (Zn) e alcuni metalloidi con proprietà simili, quali l'arsenico (As) e il selenio (Se). I valori dei minerali e metalli nell'uovo appaiono notevolmente variabili da Paese a Paese per la normale variabilità biologica dei dati, per fattori alimentari e genetici delle galline allevate (razze diverse o ibridi diversi) e per metodi di allevamento (free-range, biologico, a terra, ecc.). Le uova di galline allevate in allevamenti rurali o domestici, nonché estensivi free-range, verosimilmente sono più a rischio di contaminazioni ambientali di varia origine, come metalli, pesticidi ecc (Giannenas et al., 2009; Van Overmeire et al., 2006). La loro vendita quindi, al di fuori del circuito familiare, può costituire un rischio, non essendo soggetti a controlli ufficiali in merito all'aspetto metalli tossici. A tal proposito, è bene sottolineare che la Commissione Europea ha posto dei limiti massimi negli alimenti, per piombo, cadmio e mercurio, ma non nelle uova (Reg. CE n. 1881/2006 modificato dal Reg. UE 2020/1322). Gli effetti biologici di questi metalli e di altri oligoelementi sono ancora poco conosciuti, e i dati disponibili sulla loro tossicità sono ancora scarsi e inadeguati per stabilire una concentrazione massima consentita negli alimenti. Tuttavia, l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) ha emesso una serie di pareri scientifici in merito, raccomandando di

monitorare la presenza di alcuni oligoelementi in vari tipi di alimenti e di ridurre, per quanto possibile, l'esposizione ad essi. Tuttavia, come accennato, non esiste ad oggi una normativa europea in materia di “massimo quantitativo di metalli pesanti presenti nelle uova”. L'Unione Europea (UE) ha stabilito, nel corso degli anni, i limiti massimi di alcune sostanze contaminanti in molti prodotti alimentari, al fine di ridurre la presenza fino a livelli ritenuti accettabili. I principi fondamentali della legislazione UE sui contaminanti negli alimenti sono contenuti nel Regolamento 315/93/CEE. I tenori massimi di alcuni metalli pesanti nei prodotti alimentari sono stabiliti dal Regolamento CE 1881/2006, tra cui piombo, cadmio e mercurio. In questo contesto, il Regolamento (CE) n. 178/2002 implementa le norme applicabili alla sicurezza degli alimenti e dei mangimi che circolano nel mercato interno e istituisce l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) la quale ha ricevuto richieste dalla Commissione europea o dagli Stati membri per effettuare valutazioni del rischio su diversi metalli come contaminanti, tra cui arsenico, cadmio, cromo, piombo, mercurio, nichel e uranio.

L'uovo, per sua composizione chimica risulta, come si è visto per altre sostanze quali fitonutrienti e metaboliti, è potenziale matrice di bioaccumulo anche di metalli tossici, qualora le galline ne sia esposte. Le fonti di esposizione a metalli pesanti per le galline ovaiole possono essere diverse, tra cui la dieta, l'ambiente di allevamento e le modalità. Le uova prodotte in allevamenti intensivi, dove le galline sono allevate a terra o in gabbie modificate, sono deposte da galline alimentate con mangimi commerciali opportunamente integrati, dove l'animale non ha contatti con l'ambiente esterno. Diversamente, le galline allevate con metodo free-range, rurale o biologico, hanno contatti con l'ambiente esterno (aria, terra, pascolo, erba, ecc.) il che si traduce nella produzione di uova potenzialmente contaminate da sostanze chimiche, metalli pesanti o prodotti di degradazione (De Freitas et al., 2013; Van Overmeire et al., 2006; Van Overmeire et al., 2009).

Data la scarsità di dati presenti riguardo il contenuto di metalli, in particolare metalli pesanti nelle uova, scopo di questa ricerca è stato quello di valutare nelle diverse matrici costituenti l'uovo, il contenuto di metalli pesanti quali Pb, Hg, As, Ni, Al, U e Cr, in uova di diverse razze, provenienti da un allevamento rurale free-range, confrontate con le concentrazioni rilevate in campioni di uova provenienti da diverse tipologie di allevamento intensivo.

6.2. MATERIALI E METODI

6.2.1. CAMPIONAMENTO E GESTIONE DEI CAMPIONI

Per tale ricerca, sono state analizzate un totale di 201 uova. Di queste, 141 uova sono state campionate da un allevamento alternativo, rurale free-range Pugliese, così suddivise per tipo e

razza-ibrido: 30 uova bianche, di razza Livorno (codice B-T1), 30 uova chocolate, deposte da galline di razza Marans (codice: CIO-T2), 30 uova azzurre, deposte da galline di razza Araucana (codice: AZZ-T3), 21 uova brune, deposte dall'ibrido commerciale Lohmann brown (codice: BRU-T4) e 30 uova Olive Egger, deposte dall'ibrido Araucana \times Marans, tipicamente di colore verde oliva (codice: VER-T5) (Figura 45).

Per il campionamento relativo alle uova provenienti da galline allevate con metodi intensivi, sono state acquistate direttamente dalla GDO un totale di 60 uova di cinque marche differenti, così suddivise: 12 uova provenienti da allevamento all'aperto free-range (codice: IND-FR), 36 uova da allevamento a terra (3 diversi allevamenti di marca diversa, codice: IND-T1, IND-T2 e IND-T3) e 12 uova da allevamento biologico (IND-BIO).

Ogni uovo è stato separato nelle tre matrici principali, tuolo, albume e guscio, congelate separatamente a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, in Falcon da 50 ml.



Figura 45. Uova di diverso colore campionate per le analisi dei metalli

6.2.2. METODO DI ANALISI

Le analisi chimiche sono state eseguite presso il Laboratorio Chimico dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, sede di Bologna.

Guscio, albume e tuorlo d'uovo sono stati analizzati separatamente dopo essere stati sottoposti a liofilizzazione. Da 3 a 5 g di campione di albume e tuorlo e 0,5 g di guscio sono stati pesati in tubi di polipropilene (Digi-Tubes SCP Science) e sono stati sottoposti a un processo di

mineralizzazione ad umido mediante aggiunta di 10 ml di acido nitrico concentrato (JT Baker Instra-Analizzato™). Dopo aver riscaldato a 75 ± 10 °C per 750 minuti over-night, i campioni sono stati lasciati raffreddare e ridiluiti con 20 ml di acqua deionizzata ad elevata purezza (Evoqua Water Technologies) con una soluzione di acido nitrico al 2% e acido cloridrico allo 0,5% (Sigma, Suprapur). Le analisi sono state eseguite mediante spettrometria di massa plasma-accoppiata induttivamente (ICP-MS 7700 Series Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA, USA) utilizzando un autocampionatore CETAC ASX-500 (Cetac Technologies Omaha). I parametri operativi includevano una potenza Rf di 1,55 kW, un flusso di gas plasma (argon) di 15 L/min, un flusso di gas di trasporto (argon-Ar) di 1,01 ml/min, un flusso di gas cellulare (elio-He) per "He" di 5 ml/min e un flusso di gas per la modalità "HeHe" di 10 ml/min. Gli isotopi (m/z) monitorati in "modalità He" erano Hg202, Pb208, e As75, che è stato monitorato in modalità "HeHe". Le concentrazioni sono state calcolate utilizzando le curve di calibrazione del solvente e gli standard di calibrazione. È stata preparata la soluzione di diluizione dei materiali di riferimento, cioè una soluzione acquosa di acido nitrico al 2% con aggiunta di acido cloridrico allo 0,5%. Per ogni serie di analisi è stata analizzata una curva di calibrazione da 0,01 a 100 µg/ml: il coefficiente di correlazione è stato uguale o maggiore di 0,999 per ogni elemento sottoposto ad analisi. Una miscela di standard interni (ciascuno avente una concentrazione di 1 µg/ml) è stata infusa continuamente da una seconda via di ingresso in ICP-MS per quantificare i campioni (codice 5183-4681 Agilent Technologies Inc Santa Clara, CA). L'accuratezza del metodo è stata determinata analizzando il materiale di riferimento certificato (Community Bureau of Reference-BCR-185R Bovine Liver) in ogni lotto. I valori di concentrazione dei materiali di riferimento rientravano nell'intervallo di confidenza dato dal BCR (Bruxelles), e il limite di rilevabilità (LOD) è stato fissato a 0,002 mg/kg, e il limite di determinazione (LOQ) è stato fissato a 0,005 mg/kg per tutti i metalli e le matrici. Per ogni serie di analisi, un campione bianco (acido utilizzato per la mineralizzazione del campione) è stato mineralizzato e trattato come sopra descritto. All'inizio di ogni ciclo di misura è stata eseguita un'operazione di tuning con una miscela multielemento per verificare l'accuratezza dell'identificazione dei valori del rapporto m/z e l'accuratezza dello strumento. Le concentrazioni dei vari metalli nelle diverse matrici rilevate con il metodo sopra descritto, sono state espresse sulla sostanza secca. Invece, le concentrazioni finali su cui è stata condotta la valutazione statistica, sono state riferite alla materia fresca, espressa in mg/kg.

6.3. RISULTATI

I risultati ottenuti dalle analisi delle 3 matrici, tuorlo, albume e guscio, sono riassunti nelle Tabelle 5, 6 e 7.

Il test statistico non parametrico Kruskal-Wallis, è stato utilizzato per analizzare i dati delle concentrazioni dei metalli. I valori medi delle concentrazioni dei metalli sono stati espressi come media \pm DS, e l'analisi statistica sui dati è stata eseguita per ogni gruppo di uova e tipo, per ogni singolo metallo, confrontando le differenze tra i colori delle uova per le galline rurali free-range e tra le diverse tipologie di uova industriali. I dati sono stati considerati statisticamente significativi per $p \leq 0,05$.

Tabella 5. Concentrazioni e medie espresse in mg/kg per ogni metallo, rilevate nei tuorli per ogni tipologia di uovo.

TUORLO	METALLO	METALLO	METALLO	METALLO	METALLO	METALLO	METALLO
TIPO	Hg (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Ni (mg/kg)	As (mg/kg)	Al (mg/kg)	Cr (mg/kg)	U (mg/kg)
B-T1	< 0.005	0.117 ^{abde} \pm 0.034	0.152 ^{ad} \pm 0.260	0.009 \pm 0.006	1.360 \pm 0.659	0.032 \pm 0.028	0.011 \pm 0.003
CIO-T2	< 0.005	0.084 ^{be} \pm 0.054	0.088 ^b \pm 0.053	0.007 \pm 0.005	0.986 \pm 0.410	0.036 \pm 0.033	0.011 \pm 0.004
AZZ-T3	< 0.005	0.140 ^{bcad} \pm 0.053	0.065 ^{ca} \pm 0.026	0.009 \pm 0.007	1.267 \pm 0.950	0.034 \pm 0.031	0.011 \pm 0.005
BRU-T4	< 0.005	0.023 ^{dbe} \pm 0.012	0.060 ^d \pm 0.021	0.006 \pm 0.003	1.514 \pm 1.222	0.020 \pm 0.021	0.011 \pm 0.004
VER-T5	< 0.005	0.061 ^e \pm 0.092	0.065 ^e \pm 0.028	0.002 \pm 0.075	1.157 \pm 0.496	0.038 \pm 0.031	0.012 \pm 0.005
Media	/	0.089 \pm 0.252	0.078 \pm 0.038	0.011 \pm 0.035	1.240 \pm 1.778	0.033 \pm 0.029	0.011 \pm 0.00
IND-FR	< 0.005	0.181 \pm 0.051	0.040 \pm 0.021	0.012 \pm 0.020	0.014 \pm 0.031	0.006 \pm 0.003	0.016 \pm 0.003
IND-T1	< 0.005	0.186 \pm 0.063	0.024 \pm 0.034	< 0.005	< 0.005	< 0.005	0.019 \pm 0.005
IND-T2	< 0.005	0.181 \pm 0.036	0.027 \pm 0.029	< 0.005	0.415 \pm 1.176	< 0.005	0.016 \pm 0.004
IND-T3	< 0.005	0.181 \pm 0.036	0.006 \pm 0.003	< 0.005	0.026 \pm 0.073	< 0.005	0.017 \pm 0.004
IND-BIO	< 0.005	0.203 \pm 0.031	0.028 \pm 0.027	< 0.005	< 0.005	< 0.005	0.019 \pm 0.003
Media	/	0.186 \pm 0.044	0.025 \pm 0.026	0.006 \pm 0.009	0.093 \pm 0.530	0.005 \pm 0.001	0.017 \pm 0.00

^{abcde}: $p < 0,05$

Nei tuorli, le concentrazioni di mercurio (Hg) rilevate in tutte le tipologie di uova di galline rurali e industriali erano al di sotto del LOQ (Tabella 5). Relativamente a Hg, il fatto di non ritrovarlo in matrici ad alto contenuto lipidico, può essere coerente con il metabolismo del metallo che trova spiccata liposolubilità solo per la forma metilata dello stesso, ovvero metil-mercurio. Al contrario, il piombo è stato rilevato nel tuorlo di tutti i tipi di uova, con concentrazioni medie superiori per le uova industriali rispetto a quelle delle uova rurali, il che può sorprendere vista la maggior possibilità di contaminazione per le galline allevate all'aperto. In effetti, le uova biologiche hanno concentrazioni medie del metallo più elevate delle altre tipologie di uova (Tabella 5). La presenza di Pb nella matrice tuorlo, è coerente con il metabolismo del metallo che lo vede altamente liposolubile.

Nei tuorli delle uova di galline rurali invece, sono state rilevate concentrazioni di Ni, evidenziando peraltro differenze statisticamente significative tra le diverse tipologie. Nel tuorlo delle uova industriali, le concentrazioni medie di Ni erano inferiori a quelli delle uova rurali

(Tabella 5). In particolare, le uova di gallina Araucana, una razza allevata a scopi ornamentali produttrice di uova di color azzurro caratteristico, hanno rilevato differenze statisticamente significative dalle uova di Livornese ($p \leq 0,05$) e queste ultime, hanno mostrato differenze statisticamente significative rispetto alle uova di Warren Brown ($p \leq 0,05$), gallina ibrida allevata in modo rurale. Concentrazioni di As, appena superiori al LOQ, sono state rilevate solo in alcuni campioni di tuorlo di uova di galline rurali. Per le uova industriali, solo in 2 campioni di tuorlo (IND- FR) i livelli di As erano sopra il LOQ. La presenza a concentrazioni molto basse nel tuorlo è coerente con la scarsa liposolubilità del metallo, che trova più affinità con la frazione proteica ma soprattutto per il guscio, in quanto si lega agli ioni calcio.

L'alluminio, è il metallo presente in quantità maggiore nei campioni di uova rurali, ma non sono state trovate differenze statisticamente significative tra le diverse uova deposte dalle diverse razze e ibridi rurali. La concentrazione media di Al nei tuorli delle uova di galline rurali risulta maggiore rispetto a quelle industriali, dove l'allevamento biologico (IND-BIO) e l'allevamento a terra IND-T1 hanno rilevato concentrazioni di Al inferiori al LOQ, mentre negli altri tipi di uova, solo 4 campioni totali sono risultati positivi (Tabella 5). Il cromo (Cr) è stato rilevato in tutti i tuorli delle uova Livornese, Marans, Araucana e Olive Egger, ma solo 11/21 campioni di tuorlo di uova dell'ibrido Warren Brown sono risultati positivi. Nei tuorli delle uova industriali, solo un campione era positivo al Cr (IND-FR). Molto interessante invece, risultano essere le concentrazioni di uranio (U), che è stato rilevato in entrambe le tipologie di tuorlo, rurale e industriale, di cui sono pressoché assenti dati bibliografici in merito.

Tabella 6. Concentrazioni e medie espresse in mg/kg per ogni metallo, rilevate negli albumi di ogni tipologia di uovo.

ALBUME	METALLO	METALLO	METALLO	METALLO	METALLO	METALLO	METALLO
TIPO	Hg (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Ni (mg/kg)	As (mg/kg)	Al (mg/kg)	Cr (mg/kg)	U (mg/kg)
B-T1	< 0.005	0.012 ^a ± 0.018	0.187 ^{ade} ± 0.044	0.094 ± 0.109	3.059 ± 3.857	0.181 ± 0.152	< 0.005
CIO-T2	< 0.005	0.014 ^b ± 0.023	0.180 ^{bc} ± 0.053	0.116 ± 0.110	3.157 ± 2.988	0.206 ± 0.182	< 0.005
AZZ-T3	< 0.005	0.069 ^{ca} ± 0.143	0.196 ^{cabce} ± 0.454	0.137 ± 0.116	3.896 ± 5.419	0.125 ± 0.121	0.017 ± 0.016
BRU-T4	< 0.005	0.027 ^d ± 0.045	0.133 ^{de} ± 0.094	0.096 ± 0.125	8.719 ± 11.116	0.245 ± 0.134	< 0.005
VER-T5	< 0.005	0.070 ^c ± 0.185	0.167 ^c ± 0.456	0.113 ± 0.113	3.058 ± 6.646	0.177 ± 0.386	0.037 ± 0.027
Media	/	0.039 ± 0.111	0.175 ± 0.297	0.112 ± 0.125	4.100 ± 6.456	0.162 ± 0.223	/
IND-FR	1.077 ± 3.703	0.090 ^a ± 0.138	< 0.005	0.039 ± 0.024	< 0.005	0.021 ± 0.040	< 0.005
IND-T1	< 0.005	0.034 ^{bd} ± 0.040	0.027 ± 0.075	0.042 ± 0.037	< 0.005	0.056 ± 0.234	< 0.005
IND-T2	0.050 ± 0.048	0.551 ^{cd} ± 0.570	0.102 ± 0.164	0.057 ± 0.139	6.851 ± 9.242	< 0.005	< 0.005
IND-T3	0.101 ± 0.019	1.270 ^d ± 0.259	0.105 ± 0.165	0.043 ± 0.019	10.273 ± 6.801	0.176 ± 0.263	< 0.005
IND-BIO	0.095 ± 0.036	1.495 ^{ebc} ± 0.446	0.111 ± 0.131	0.033 ± 0.029	14.011 ± 6.276	0.106 ± 0.187	< 0.005
Media	0.265 ± 1.637	0.688 ± 0.686	0.070 ± 0.128	0.043 ± 0.065	6.257 ± 7.960	0.072 ± 0.166	/

^{abcde}: $p \leq 0,05$

Negli albumi delle uova di galline rurali, non sono state rilevate concentrazioni di Hg superiori al LOQ, mentre i livelli di Hg sono stati trovati in uova industriali sia free-range (IND-FR), a terra (IND-T2, T3) e in da agricoltura biologica (IND-BIO). Nell'albumi delle uova provenienti dall'allevamento industriale a terra IND-T1 invece, le concentrazioni erano inferiori al LOQ.

Concentrazioni di Pb sono state rilevate invece in tutti i campioni di albumi delle uova di galline rurali. In particolare, gli albumi delle uova di gallina Araucana erano i più contaminati delle altre (Tabella 6), anche se la media di concentrazione del metallo è risultata comunque più elevata negli albumi delle uova industriali rispetto alle rurali. Degni di nota, sono gli albumi delle uova biologiche (IND-BIO) che sono risultati molto più contaminati rispetto alle altre tipologie saggate, anche con medie maggiori rispetto alle uova dell'allevamento IND-T3.

L'albumi delle uova di galline rurali è stato anche trovato contaminato da Ni, rilevando differenze statisticamente significative tra i diversi tipi di uova (Tabella 6), con concentrazioni medie comunque superiori a quelle industriali. Le concentrazioni di Ni nell'albumi, sia delle uova rurali che industriali erano circa equivalenti alle concentrazioni rilevate nei tuorli (Tabella 5).

Tutti gli albumi delle uova rurali e industriali sono risultati contaminati da As, anche se le concentrazioni medie negli albumi delle uova industriali erano sensibilmente inferiori. Rispetto ai tuorli, l'albumi risulta maggiormente contaminato.

L'alluminio è risultato essere il metallo che maggiormente contamina gli albumi, anche rispetto ai tuorli e per tutte le tipologie di uova. Le concentrazioni medie, in questo caso, sono risultate molto più elevate per le uova provenienti da allevamento industriale, seppur negli albumi delle uova IND-FR e IND-T1 le concentrazioni fossero inferiori al LOQ. Per quanto riguarda il Cr, è stata riscontrata la sua presenza in tutti i campioni rurali e in numerosi campioni industriali, con concentrazioni medie del metallo maggiori negli albumi delle uova rurali.

Diversamente da quanto rilevato nei tuorli, quasi tutti gli albumi di entrambi i tipi di uova, rurali e industriali, hanno rilevato concentrazioni di U inferiori al LOQ.

Tabella 7. Concentrazioni e medie espresse in mg/kg per ogni metallo, rilevate nei gusci di ogni tipologia di uovo.

GUSCIO	METALLO	METALLO	METALLO	METALLO	METALLO	METALLO	METALLO
TIPO	Hg (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Ni (mg/kg)	As (mg/kg)	Al (mg/kg)	Cr (mg/kg)	U (mg/kg)
B-T1	< 0.005	0.014 ± 0.016	1.536 ± 1.055	0.250 ± 0.253	1.613 ± 1.036	0.011 ^{abde} ± 0.015	< 0.005
CIO-T2	0.0051 ± 0.0007	0.014 ± 0.024	2.018 ± 1.641	0.205 ± 0.205	1.546 ± 1.533	0.053 ^b ± 0.039	< 0.005
AZZ-T3	0.007 ± 0.006	0.045 ± 0.147	2.068 ± 1.751	0.179 ± 0.177	1.059 ± 2.584	0.091 ^{ca} ± 0.116	< 0.005
BRU-T4	0.008 ± 0.003	0.012 ± 0.011	2.151 ± 1.169	0.113 ± 0.165	1.588 ± 2.593	0.048 ^d ± 0.070	< 0.005
VER-T5	0.005 ± 0.0002	0.021 ± 0.032	1.809 ± 1.466	0.236 ± 0.233	0.398 ± 0.899	0.055 ^e ± 0.061	< 0.005
Media	0.006 ± 0.003	0.021 ± 0.070	1.901 ± 1.453	0.202 ± 0.213	1.112 ± 1.855	0.051 ± 0.073	/
IND-FR	0.012 ^{abcde} ± 0.003	0.025 ^a ± 0.028	3.125 ^{abc} ± 0.464	0.009 ^{ad} ± 0.002	0.171 ± 0.574	0.031 ± 0.045	< 0.005
IND-T1	0.008 ^b ± 0.003	0.012 ^{bd} ± 0.005	3.670 ^b ± 0.413	0.011 ^b ± 0.006	0.796 ± 1.833	0.024 ± 0.025	< 0.005
IND-T2	0.008 ^c ± 0.002	0.016 ^c ± 0.008	3.580 ^c ± 0.240	0.009 ^c ± 0.003	0.787 ± 0.419	0.021 ± 0.026	< 0.005
IND-T3	0.009 ^d ± 0.002	0.155 ^d ± 0.453	3.298 ^d ± 0.744	0.012 ^d ± 0.003	3.254 ± 6.303	0.057 ± 0.109	< 0.005
IND-BIO	0.006 ^{ed} ± 0.002	0.054 ^e ± 0.096	3.904 ^{ead} ± 0.630	0.009 ^{ed} ± 0.003	4.819 ± 7.007	0.166 ± 0.485	< 0.005
Media	0.009 ± 0.002	0.052 ± 0.207	3.515 ± 0.580	0.010 ± 0.003	1.965 ± 4.526	0.060 ± 0.222	/

^{abcde}: $p \leq 0,05$

Per quanto riguarda i gusci invece, le concentrazioni di Hg sono state rilevate in tutti i gusci delle uova industriali e rurali, seppur in concentrazioni di poco superiori al LOQ. I gusci delle uova di razza Livornese, Hg era inferiore al LOQ, e nel complesso, sono stati rilevati positivi solo 19/141 campioni di gusci di uova di galline rurali. Sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra le diverse tipologie di uova industriali, in particolare verso le uova dell'allevamento free-range (IND-FR) che sono risultate più contaminate delle altre ($p \leq 0,05$) (Tabella 7).

Tutti i gusci d'uovo delle galline rurali e delle galline industriali hanno rilevato concentrazioni di Pb, e un gruppo di uova proveniente da uno dei tre allevamenti a terra saggiati (IND-T3), è risultato il più contaminato e con differenze statisticamente significative ($p \leq 0,05$) verso le uova dell'allevamento IND-T1. Nel complesso, le uova provenienti da allevamenti intensivi sono risultate più contaminate, come si evince dalla media di concentrazione.

Concentrazioni di Ni sono state rilevate nei gusci di tutti i tipi di uova, sia rurale che industriale, con medie di concentrazione molto più elevate nelle uova industriali, dove peraltro, si sono evidenziate differenze statisticamente significative tra le diverse tipologie, rilevando le uova biologiche come le più contaminate.

L'arsenico è stato rinvenuto in concentrazioni maggiori nei gusci delle uova rurali e industriali, con concentrazioni medie maggiori per le rurali. I gusci d'uovo provenienti da campioni di uova industriali biologiche e free-range sono risultati sensibilmente meno contaminati degli altri, evidenziando differenze statisticamente significative tra le uova biologiche, free-range e l'allevamento a terra IND-T3.

L'alluminio, ad eccezione delle uova Olive Egger, dove solo 11/30 campioni erano positivi, è stato rilevato in tutte le uova di galline rurali. Al contrario, un piccolo numero di campioni è risultato positivo ad Al per le uova industriali, con concentrazioni maggiori per le uova provenienti dal sistema biologico.

Le concentrazioni di Cr sono state rilevate nei gusci d'uovo delle galline rurali e nei gusci d'uovo delle uova industriali a livelli simili, seppur i gusci di uova bianche Livornesi (rurali) siano risultate meno contaminate delle altre presentando differenze statisticamente significative nei confronti delle altre uova colorate.

Rispetto agli albumi, tutti i gusci d'uovo di tutti i tipi di uova, mostrano concentrazioni di U inferiori al LOQ.

6.4. DISCUSSIONE

I dati in bibliografia sulla presenza e andamento del bioaccumulo di metalli tossici nell'uovo sono piuttosto scarsi, e nei pochi studi pubblicati, generalmente vengono prese in considerazione le concentrazioni dei metalli rilevate nell'albume e nel tuorlo come pool di matrici, e non singolarmente. Questo è plausibilmente dovuto al fatto che l'uomo consumatore, consuma sia tuorlo che albume contemporaneamente. I dati ottenuti in questo studio sono invece divisi per matrice, al fine di evidenziare al meglio anche la affinità di uno o dell'altro metallo di bioaccumularsi in determinate matrici.

Per quanto concerne il mercurio, l'Hg inorganico si ritrova negli ecosistemi a causa di fonti naturali o antropogeniche. La sua forma metilata, il metilmercurio (MeHg) costituisce la forma chimica che è nota bioaccumularsi nel tessuto adiposo (Reinfelder et al., 1998). Nelle uova da allevamento rurale free-range la concentrazione di Hg nei gusci, nel tuorlo e nell'albume, per la maggior parte dei campioni analizzati, era al di sotto del limite di quantificazione (LOQ) o ritrovato in bassissime concentrazioni, per lo più nel guscio. Questo non costituisce per il consumatore un rischio, considerato che, ovviamente, il guscio non è edibile. Non è stato rilevato nel tuorlo, matrice ad alto contenuto di grassi, il che induce a pensare che il mercurio assunto dalle galline dall'ambiente, sia del tutto inorganico. Hg è stato rilevato a concentrazioni più elevate nell'albume delle uova industriali, in particolare nelle uova provenienti dall'allevamento free-range, biologiche e in particolare in un allevamento a terra (Tabella 4). Questa maggiore concentrazione potrebbe essere dovuta ad un maggior inquinamento del suolo nella zona geografica dell'allevamento o alla contaminazione di mangimi somministrati alle galline ovaiole (Hashemi et al., 2018; Hashemi et al., 2019). Non ci sono riscontri in letteratura sulla concentrazione di Hg nei gusci. Il guscio potrebbe

costituire la matrice di bioaccumulo principale del metallo, che metabolicamente durante la formazione del guscio, viene trasportato legato al calcio (osteocalcina), entrando nella composizione del guscio finale (Dowd et al., 2001). Tuttavia, è possibile ipotizzare che la variabilità di concentrazioni di Hg tra le uova rurali free-range sia dovuta ad un fattore legato alla genetica delle razze e degli ibridi in fase di deposizione. Infatti, lo studio condotto da Hashemi et al. (2018) dimostra che la concentrazione di Hg nelle uova di ibridi commerciali geneticamente diversi tra loro non è omogenea tra le uova analizzate. In ogni caso, le uova sia rurali che industriali, possono costituire una fonte di assunzione di Hg non trascurabile.

Diversamente dal mercurio, per il quale non è stato stabilito un limite massimo consentito nelle uova, nel 2010, l'EFSA ha condotto uno studio sulla concentrazione di Pb negli alimenti, uova comprese, aggiornato poi solo nel 2013, dove viene indicata una media di concentrazione del metallo di 0,14 mg/kg (tuorlo+albume) tra i Paesi dell'UE. Nei campioni di uova da allevamento rurale, seppur sia evidenziabile una variabilità tra le diverse tipologie di uova di galline di razza, imputabile alla diversa età e tempo di deposizione, le concentrazioni di Pb in tutte le matrici analizzate erano inferiori rispetto a quelle delle uova industriali, e inferiori anche a quelle rilevate in altri studi (Fakayode & Olu-Owolabi, 2003). Rientrano, tuttavia, nei range di concentrazione rilevati in studi effettuati su uova provenienti da allevamenti rurali, come dimostrato da De Freitas et al. (2013) e Van Overmeire et al. (2006). In particolare, le maggiori concentrazioni di Pb si sono rilevate nel tuorlo e nell'albume delle uova industriali, dove nel tuorlo in particolare, le concentrazioni tra le diverse tipologie di uova erano pressoché equivalenti. Da diversi studi presenti in bibliografia, le uova accumulano Pb sia nelle componenti edibili che nel guscio; in accordo con uno studio condotto da Trampel et al. (2003) e Hirai et al. (1991), i risultati hanno dimostrato che nei tuorli di uova deposte da galline rurali il Pb si rilevava in maggiori concentrazioni, rispetto all'albume e il guscio. Tale situazione è stata confermata ma solo per quanto riguarda le uova provenienti da allevamento intensivo. La presenza di concentrazioni più elevate del metallo nelle uova industriali potrebbe essere imputabile anche alle strutture di allevamento, come voliere, gabbie, mangiatoie ecc, solitamente costituite da leghe metalliche, ma anche al quantitativo maggiore di calcio con la dieta, richiesto per sorreggere la produzione. Infatti, la presenza di Pb nel guscio è dovuta al fatto che il catione divalente del piombo (Pb^{2+}) si lega al calcio (Bautista et al., 2014). Esiste, inoltre, una forte relazione tra la concentrazione di piombo ematica e quella presente nel tuorlo, in quanto durante la formazione dell'uovo, insieme al calcio viene mobilizzato anche il Pb dall'osso e rilasciato nel sangue. Si può quindi affermare che una maggiore assunzione di Ca, tipico delle galline industriali che assumono percentuali di Ca nella dieta intorno al 4,5-6% attraverso la dieta, riduce la concentrazione di Pb nel sangue e quindi anche nel tuorlo (Grace e MacFarlane,

2016). Le analisi effettuate sui gusci per la rilevazione di concentrazioni di nichel, indicano che un comportamento cinetico analogo al Pb e nei confronti del calcio, è tenuto anche dal nichel stesso (Denkhaus e Salnikow, 2002). Infatti, seppur in letteratura non siano presenti studi sulle concentrazioni di Ni rilevate nelle singole componenti dell'uovo, in tutti i campioni analizzati la concentrazione maggiore di Ni è stata rilevata nei gusci. Anche in questo caso, le uova industriali sono risultate maggiormente contaminate, in particolare le uova provenienti dall'allevamento biologico, che hanno presentato inoltre, differenze statisticamente significative verso gli altri allevamenti. Ciò può essere imputabile primariamente all'ambiente di allevamento, considerando i contatti con l'ambiente esterno, suolo e atmosfera, che possono avere le galline allevate con metodo biologico. Il tuorlo, ma in particolare l'albume, è risultata essere la matrice edibile contenente concentrazioni di Ni non trascurabili, in particolare per quanto riguarda le uova delle razze allevate con metodo rurale free-range. L'accumulo nell'albume potrebbe essere dovuto all'alta affinità di legame del Ni con l'albumina, come dimostrato nello studio condotto da Denkhaus e Salnikow (2002). Nonostante il guscio delle uova industriali sia risultato maggiormente contaminato, non vi è corrispondenza con le concentrazioni di Ni nell'albume delle stesse, che è stato rilevato con concentrazioni inferiori rispetto agli albumi delle uova rurali. Risulta difficile spiegare tale fenomeno, se non imputarlo, come accennato precedentemente, al fattore calcio assunto e età degli animali. Sebbene il meccanismo di bioaccumulo del Ni nelle galline e nelle uova non sia chiaro, la variabilità dei risultati riscontrati nelle componenti di tutte le uova potrebbe essere correlata all'età dell'animale, al suo metabolismo o alla dieta, ma ancora più probabile all'uso di insetticidi in alcuni allevamenti (Hashemi et al., 2018; Esposito et al., 2016). Anche il suolo e/o l'acqua d'abbeverata contaminate potrebbero essere la causa dell'accumulo di Ni nell'uovo (Hashemi et al., 2018). L'uomo e gli animali sono esposti al metallo attraverso l'inalazione e l'ingestione. Pertanto, l'EFSA ha stabilito una TDI (tolerable daily intake) pari a 0,013 mg/kg di peso corporeo (Denkhaus e Salnikow, 2002; EFSA, 2020). Dai dati ottenuti, risulta evidente che il valore stabilito dall'EFSA, sarebbe superato abbondantemente dal medio consumo giornaliero di uova siano essere provenienti da allevamento rurale che industriale, costituendo quindi un rischio alimentare per il consumatore.

Il guscio sembra essere matrice di bioaccumulo anche di arsenico e alluminio, anche se per l'arsenico, nell'albume sono state rilevate concentrazioni non trascurabili, in particolare nelle uova rurali. I valori di Al sono comunque superiori per tutte le tipologie di uova, rispetto alla concentrazione media rilevata ad esempio, negli albumi di uova in Iran (0,119 mg/kg) (Farahani et al., 2015). La presenza di concentrazioni più alte nell'albume rispetto a quelle rinvenute in tuorlo o guscio, potrebbe essere riconducibile alla cinetica propria del metallo, il quale una volta assorbito, passa nel plasma dove per il 90% si lega al sito di legame per il Fe della transferrina (Harris &

Messori, 2002), mentre una quota di circa il 10% si localizza nei globuli rossi, nei quali la sua emivita è più lunga rispetto alla porzione plasmatica (Priest, 2004). L'albume e il guscio, possono comunque ritenersi le due principali matrici di bioaccumulo del metallo. La variabilità dei valori tra le diverse tipologie di uova, con concentrazioni più elevate per le uova industriali, può essere dovuta sia alla contaminazione ambientale che al tipo genetico e all'età (bioaccumulo), senza escludere, proprio per quanto concerne l'ambiente, l'età della struttura di allevamento, gabbie e capannoni, che potrebbero aver influito nel rilascio di alluminio nell'ambiente e quindi anche alla contaminazione delle uova. Tuttavia, si potrebbe anche considerare un altro fattore, la profilassi vaccinale. L'utilizzo di vaccini inattivati, allestiti con utilizzo di idrossido di alluminio e fosfato di alluminio come adiuvanti (Gołoś e Lutynska, 2015), generalmente somministrati sottocute o per via intra-muscolare, potrebbero aver influito sulle concentrazioni di alluminio rilevate nelle uova industriali, dove la prassi vaccinale è pressoché costante, rispetto all'ambito rurale.

I valori di As, nel complesso, sono risultati più elevati nelle uova delle galline rurali, in particolari in guscio e albume. Nel tuorlo invece, le concentrazioni di As erano pressoché equivalenti, peraltro senza nessuna differenza statisticamente significativa. Le basse concentrazioni di As nel tuorlo, di tutti i campioni, sono in accordo con i risultati di Nisianakis et al. (2009) (0,015 mg/kg), seppur i i livelli del metallo nelle uova di tutti i campioni siano maggiori rispetto a quelli trovati in letteratura (Esposito et al, 2016; Ghosh et al., 2012). Il tuorlo non sembra essere una matrice di accumulo di As, diversamente dall'albume e guscio. Concentrazioni superiori di As negli albumi sono state rilevate in Iran (0,750 mg/kg) (Farahani et al., 2015). I livelli più alti di As riscontrati nell'albume, possono essere giustificati da una maggior presenza ambientale del metallo nelle sue diverse forme chimiche, e dal fatto che l'età delle galline è vincolante nelle diverse concentrazioni, in quanto secondo l'anamnesi effettuata in allevamento rurale, l'80% dei soggetti in deposizione ha un'età superiore alle 130 settimane, teoria sostenuta anche da Ghosh et al. (2012), secondo il quale la concentrazione di As nelle uova è proporzionale all'età della gallina.

Sempre nell'albume, i risultati ottenuti dimostrano che anche il cromo è maggiormente concentrato negli albumi rispetto a tuorlo e guscio delle uova da allevamento rurale a confronto con le industriali, il che induce a pensare che l'albume sia la principale matrice di bioaccumulo del metallo. Tuttavia, i risultati ottenuti rilevano concentrazioni medie inferiori a quelli registrati in Grecia, in uno studio condotto da Nisianakis et al. (2009) che hanno rilevato nei tuorli concentrazioni di Cr pari a 0,090 mg/kg, mentre in Canada, 0,060 mg/kg) (Kirkpatrick & Coffin, 1975) e in Pakistan (0,732 mg/kg) (Khan & Naem, 2006). Il Cr è un metallo essenziale, se presente nella forma trivalente, ed assunto dall'uomo tra i 0,05 e i 0,20 mg al giorno. Secondo lo studio condotto da EFSA (2014), la concentrazione media presente nelle uova, in Europa, è compresa tra

0,022-0,029 mg/kg, livello abbondantemente superabile se si consumassero uova con concentrazioni equivalenti a quelle quantificate in questo studio.

Notevole interesse, che sarà oggetto di approfondimento, è la presenza di concentrazioni di uranio sia nelle uova industriali che rurali, in particolare nel tuorlo e nell'albume, seppur negli albumi delle uova industriali non sia stato rilevato. In tutte le tipologie di uova, le concentrazioni di U nel guscio erano inferiori al LOQ. Da questi dati puramente preliminari, non confrontabili con altri presenti in bibliografia, si può dedurre che il tuorlo sia la principale matrice di bioaccumulo del metallo. Considerando la pericolosità nota del metallo, soprattutto per quanto riguarda la radioattività, desta particolare preoccupazione il suo rinvenimento in uova destinate al consumo umano. Dai dati ottenuti emerge che sia le uova industriali che rurali, seppur per queste ultime sia plausibile ritrovare per alcuni metalli maggiori concentrazioni date le modalità di allevamento, costituiscono una fonte di esposizione non trascurabile di metalli tossici per l'uomo consumatore. Verosimilmente, è evidenziabile talvolta anche una notevole variabilità tra le concentrazioni rilevate nelle uova di una o dell'altra razza o ibrido allevato, anche quando allevati con le medesime modalità. Questo indica una variabilità, potenzialmente anche metabolica, genotipica dei soggetti, che ne condiziona direttamente il metabolismo dei metalli. Ad oggi, i dati disponibili sulla tossicocinetica dei metalli tossici nel pollame sono ancora piuttosto scarsi, e questi dati costituiscono un ulteriore spunto ai fini di un approfondimento in tale ambito.

BIBLIOGRAFIA

Abbas A., Valez H., Dobson AD. (2009). Analysis of the effect of nutritional factors on OTA and OTB biosynthesis and polyketide synthase gene expression in *Aspergillus ochraceus*. International Journal of Food Microbiology, 135:22-27.

Abbas R., Colwell D., Iqbal Z., Khan A. (2014). Acaricidal drug resistance in poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) and approaches to its management. World's Poultry Science Journal, 70:113-24.

Abrunhosa L., Santos L., Venâncio A. (2006). Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. Food biotechnology, 20:231-242.

Aendo P., Netvichian R., Viriyarampa S., Songserm T., Tulayakul P. (2018). Comparison of zinc, lead, cadmium, cobalt, manganese, iron, chromium and copper in duck eggs from three duck farm systems in Central and Western, Thailand, Ecotoxicology and Environmental Safety, 161: 691-698, ISSN 0147-6513.

Ahn J., Kim D., Jang HS., Kim Y., Shim WB., Chung DH. (2010). Occurrence of ochratoxin A in Korean red paprika and factors to be considered in prevention strategy. Mycotoxin Research, 4:279-286.

Al-Yasiry ARM., Kiczorowska B., Samolińska W., Kowalczyk-Vasilev E., Kowalczyk-Pecka D. (2017a). The effect of *Boswellia serrata* resin diet supplementation on production, hematological, biochemical and immunological parameters in broiler chickens. Animal, 11:1890-1898.

Al-Yasiry ARM., Kiczorowska B., Samolinska W. (2017b). Effect of *Boswellia serrata* resin supplementation on basic chemical and mineral element composition in the muscles and liver of broiler chickens. Biological Trace Element Research, 179:294-303.

Al-Yasiry AR., Kiczorowska MB., Samolinska W. (2017c). The nutritional value and content of mineral elements in meat of broiler chicken feed diets supplemented with *Boswellia serrata*. Journal of Elementology, 22:1027-1037.

Al-Yasiry AR., Kiczorowska MB., Samolinska W., Kowalczyk-Vasilev E. (2018). Growth performance, digestibility, hematology, biochemistry, and some humoral immunity blood parameters of broiler chickens fed different levels of olibanum (*Boswellia serrata*). Animal Production Science, 58:1885-1891.

Aleo MD., Wyatt RD., Schnellmann RG. (1991). Mitochondrial dysfunction is an early event in ochratoxin a but not oosporein toxicity to rat renal proximal tubules. Toxicology and Applied Pharmacology, 107:73-80.

Altafini A., Armorini S., Zaghini A., Sardi L., Roncada P. (2017). Tissue distribution of ochratoxin A in pigs after administration of two-levels contaminated diets. World Mycotoxin Journal, 10:263-272.

Altafini A., Fedrizzi G., Roncada P. (2019). Occurrence of ochratoxin A in typical salami produced in different regions of Italy. Mycotoxin Research, 35:141-148.

Altafini A., Roncada P., Guerrini A., Minkoumba SG., Fedrizzi G., Caprai E. (2021). Occurrence of Ochratoxin A in Different Types of Cheese Offered for Sale in Italy. Toxins, 13:540.

- Ammon HPT. (2010). Modulation of the immune system by *Boswellia serrata* extracts and boswellic acids. *Phytomedicine*, 17:862-867.
- Andre EK., A Ali. (2010). Ochratoxin A: General overview and actual molecular status. *Toxins*, 2:461-493.
- Antell S., Ciszuk P. (2006). Grasverzehr von Legehennen der Kropfinhalt als Indikator für die Futteraufnahme und den AME-Gehalt des aufgenommenen Grases [Forage consumption of laying hens-the crop content as an indicator of feed intake and AME content of ingested forage]. *Archiv für Geflügelkunde*, 70:154-160.
- Anzai N., Jutabha P., Endou H. (2010). Molecular mechanism of Ochratoxin A transport in the kidney. *Toxins*, 2:1381-1398.
- Apperson KD., Cherian G. (2017). Effect of whole flax seed and carbohydrase enzymes on gastrointestinal morphology, muscle fatty acids, and production performance in broiler chickens. *Poultry Science*, 96:1228-1234.
- Armorini S., Al-Qudah KM., Altafini A., Zaghini A., Roncada P. (2015). Biliary ochratoxin A as a biomarker of ochratoxin exposure in laying hens: An experimental study after administration of contaminated diets. *Research in Veterinary Science*, 100:265-70.
- Armorini S., Altafini A., Zaghini A., Roncada P. (2016). Ochratoxin A in artisan salami produced in Veneto (Italy). *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, 9:9-14.
- Azemi ME., Namjoyan F., Khodayar MJ., Ahmadpour F., Darvish PA., Panahi M. (2012). The antioxidant capacity and anti-diabetic effect of *Boswellia serrata* Triana and Planch aqueous extract in fertile female diabetic rats and the possible effects on reproduction and histological changes in the liver and kidneys. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 7:168-175.
- Bacci E., Gaggi C. (1998). Bioconcentrazione, bioaccumulo e biomagnificazione. In Vighi M., Bacci E., *Ecotossicologia*, UTET, Torino, 143-152.
- Badgajar PC., Pawar NN., Chandratre GA., Telang AG., Sharma AK. (2015). Fipronil induced oxidative stress in kidney and brain of mice: protective effect of vitamin E and vitamin C. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 118:10-18.
- Battacone G., Nudda A., Pulina G. (2010). Effects of ochratoxin A on livestock production. *Toxins*, 2:1796-1824.
- Battilani P., Formenti S., Toscani T., Virgili R. (2010). Influence of abiotic parameters on ochratoxin A production by a *Penicillium nordicum* strain in dry-cured meat model systems. *Food Control*, 21:1739-1744.
- Bautista AC., Puschner B., Poppenga RH. (2014). Lead exposure from backyard chicken eggs: a public health risk? *Journal of Medical Toxicology*, 10:311-315.
- Beghelli D., Isani G., Roncada P., Andreani G., Bistoni O., Bertocchi M., Lupidi G., Alunno A. (2017). Antioxidant and ex vivo immune system regulatory properties of *Boswellia serrata* extracts. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 7468064.
- Bertocchi M., Isani G., Medici F., Andreani G., Tubon Usca I., Roncada P., Forni M., Bernardini C. (2018). Anti-Inflammatory Activity of *Boswellia serrata* Extracts: An In Vitro Study on Porcine Aortic Endothelial Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 2504305.

- Bhatnagar D., Yu J., Ehrlich K.C. (2002). Toxins of filamentous fungi. In: Fungal Allergy and Pathogenicity, Breitenbach M., Cremeri R., Lehrer S.B. (eds), 81, 167-206.
- Biró K., Solti L., Barna-Vetró I., Bagó G., Glávits R., Szabó E., Fink-Gremmels J. (2010). Tissue distribution of ochratoxin A as determined by HPLC and ELISA and histopathological effects in chickens. *Avian Pathology*, 31:141-148.
- Bonmatin JM., Giorio C., Girolami V., Goulson D., Kreutzweiser DP., Krupke C., Liess M., Long E., Marzaro M., Mitchell EAD., Noome DA., Simon-Delso N., Tapparo A. (2015). Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environmental science and pollution control series*, 22:35-67.
- Boudra H., Bars PL., Bars JL. (1995). Thermostability of Ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:1156-1158.
- Bozzo G., Bonerba E., Ceci E., Colao V., Tantillo G. (2011). Determination of ochratoxin A in eggs and target tissues of experimentally drugged hens using HPLC-FLD. *Food Chemistry*, 126:1278-1282.
- Bredenkamp MW., Dillen JLM., Van Rooyen PH., Steyn PS. (1989). Crystal structures and conformational analysis of ochratoxin A and B: Probing the chemical structure causing toxicity. *Journal of Chemical Society*, 2:1835-1839.
- Bucolo C., Marrazzo G., Platania CBM., Drago F., Leggio GM., Salomone S. (2013). Fortified extract of red berry, *Ginkgo biloba*, and white willow bark in experimental early diabetic retinopathy. *Journal of Diabetes Research*, Article ID 432695.
- Buckley A., Turner JR. (2018). Cell biology of tight junction barrier regulation and mucosal disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10:a029314.
- Cafsi IE., Bjeoui S., Rabeh IS., Nechi E., Chelbi M., Cafsi EL., Ghram A. (2020). Effects of ochratoxin A on membrane phospholipids of the intestine of broiler chickens, practical consequences. *Animal*, 14:933-941.
- Camarda L., Dayton T., Di SV., Pitonzo R., Schillaci D. (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of some oeleum resin essential oil from *Boswellia* spp. (Burseraceae). *Annali di Chimica (Rome)*, 97:837-844.
- Canton L., Canton C., Ceballos L., Domínguez P., Rodríguez J., Lanusse C., Alvarez L., Moreno L. (2021). Oral and topical extra-label administration of fipronil to laying hens: Assessment of the egg residue patterns. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 1-12.
- Cavin C., Delatour T., Marin-Kuan M., Holzhauser D., Higgins L., Bezencon C., Guignard G., Junod S., Richoz-Payot J., Gremaud E. (2007). Reduction in antioxidant defenses may contribute to ochratoxin A toxicity and carcinogenicity. *Toxicological Sciences*, 96:30-39.
- Chowdhury S., Mandal GP., Patra AK. (2018). Different essential oils in diets of chickens: 1. Growth performance, nutrient utilisation, nitrogen excretion, carcass traits and chemical composition of meat. *Animal Feed Science and Technology*, 236:86-97.
- Cole RJ., Jarvis BB., Schweikert MA. (2003). Ochratoxins and related metabolites. In: *Handbook of Secondary Fungal Metabolites*. Academic Press, San Diego, California, USA.

- Creppy EE., Lugnier AAJ., Fasiolo F., Heller K., Roschenthaler R.; Dirheimer G. (1979). In vitro inhibition of yeast phenylalanyl-tRNA synthetase by ochratoxin A. *Chemico-Biological Interactions*, 24:257-261.
- Creppy EE., Størmer FC., Röschenthaler R., Dirheimer G. (1983). Effects of two metabolites of ochratoxin A, (4R)-4-hydroxyochratoxin A and ochratoxin alpha, on immune response in mice. *Infection and Immunity*, 39:1015-1018.
- Csonka C., Sárközy M., Pipicz M., Dux L., Csont T. (2016). Modulation of hypercholesterolemia-induced oxidative/nitrative stress in the heart. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID3863726.
- De Freitas R., Ramos N.L., Batista B.L., Barbosa Jr. F. (2013). Toxic and essential elements in conventional and home-produced eggs by ICP-MS analysis. *Food Additives & Contaminants, Part B, Surveillance*, 6:30-35.
- De Oliveira PR., Bechara GH., Denardi SE., Oliveira RJ., Mathias MI. (2012). Cytotoxicity of fipronil on mice liver cells. *Microscopy Research and Technique*, 75:28-35.
- De Oliveira DGP., Kasburg RC., Alves ALF. (2020). Efficacy of *Beauveria bassiana* against the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778) (Mesostigmata: Dermanyssidae), under laboratory and hen house conditions. *Systematic & Applied Acarology*, 25:895-905.
- Denkhaus E., Salnikow K. (2002). Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 42:35-56.
- Devreese M., Croubels S., De Baere S., Gehring R., Antonissen G. (2018). Comparative Toxicokinetics and Plasma Protein Binding of Ochratoxin A in Four Avian Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66:2129–2135.
- Dibner, J. J., & Richards, J. D. (2005). Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. *Poultry Science*, 84:634-643.
- Dirheimer G., Creppy EE. (1991). Mechanism of action of ochratoxin A. *IARC Scientific Publications*, 115: 171-186.
- Dowd T., Rosen J.F., Mints Land Gundberg CM. (2001). The effect of Pb²⁺ on the structure and hydroxyapatite binding properties of osteocalcin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1535:153-163.
- EC. (2002). Assessment of Dietary Intake of Ochratoxin A by the Population of EU Member States; Report of the Scientific Cooperation, Task 3.2.7; Directorate-General Health and Consumer Protection, European Commission: Rome, Italy.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2014). Dietary exposure to inorganic arsenic in the European population. *The EFSA Journal*, 12:3597.
- EFSA (European Food Safety Authority) Journal. (2018). Occurrence of residues of fipronil and other acaricides in chicken eggs and poultry muscle/fat. *Scientific opinion*, 16:5164.
- EFSA (European Food Safety Authority) Journal. (2020). Risk assessment of ochratoxin A in food. *Scientific opinion*, 18:6113.

- EFSA (European Food Safety Authority) (2020). EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Update of the risk assessment of nickel in food and drinking water. The EFSA Journal.
- El Hassani AK., Dupuis JP., Gauthier M., Armengaud C. (2009). Glutamatergic and GABAergic effects of fipronil on olfactory learning and memory in the honeybee, *Invertebrate Neuroscience*, 9:91-100.
- El-Gendy AK., Aly NM., Mahmoud FH., Kenawy A., El-Sebae AK. (2010). The role of Vit C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by Imidacloprid. *Food and Chemical Toxicology*, 48:215-221.
- Esposito M., Cavallo S., Chiaravalle E., Miedico O., Pellicanò R., Rosato G., Sarnelli P., Baldi L. (2016). Trace elements in free-range hen eggs in the Campania region (Italy) analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Environmental Monitoring Assessment*, 188:326.
- EURFA. (2016). European Union Register of Feed Additives pursuant Regulation (EC) No 1831/2003. Annex I: List of additives. Edition 244 [Online]. Available at: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/animal-feed-eu-reg-comm-register-feed-additives_1831-03.
- Fakayode SO., Olu-Owolabi IB. (2003). Trace metal content and estimated daily human intake from chicken eggs in Ibadan, Nigeria. *Archives of Environmental Health International Journal*, 58:245-51.
- Farahani S., Eshghi N., Abbasi A., Karimi F., Malekabad ES., Rezaei M. (2015). Determination of heavy metals in albumen of hen eggs from the Markazi Province (Iran) using ICP-OES technique. *Toxin Reviews*, 34:96-100.
- Fazekas B., Tar A., Kovacs M. (2005). Aflatoxin and ochratoxin A content of spices in Hungary. *Food Additives and Contaminants*, 22:856-863.
- Fink-Gremmels J. (2005). Proceedings of the workshop ochratoxin a in food: recent developments and significance. *Food Additives and Contaminants*, 22:1-5.
- Flochlay AS., Thomas E., Sparagano O. (2017). Poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) infestation: a broad impact parasitological disease that still remains a significant challenge for the egg-laying industry in Europe. *Parasites & Vectors*, 10:357.
- Frantisek M., Vladimir O., Annie PL., Jan M., Jakub T. (2016). Ochratoxin A: 50 years of research. *Toxins*, 8:191.
- Gambacorta L., Magista D., Perrone G., Murgolo S., Logrieco AF., Solfrizzo M. (2018). Co-occurrence of toxigenic moulds, aflatoxins, ochratoxin A, *Fusarium* and *Alternaria* mycotoxins in fresh sweet peppers (*Capsicum annuum*) and their processed products. *World Mycotoxin Journal*, 11:159-174.
- Galtier P., Alvinerie M. (1976). In vitro transformation of ochratoxin A by animal microbial floras. *Annals of Veterinary Research*, 7:91-98.

- Galtier P., Charpentreau JL., Alvinerie M., Labouche C. (1979). The pharmacokinetic profile of ochratoxin A in the rat after oral and intravenous administration. *Drug Metabolism & Disposition*, 7:429-434.
- Galtier P., Alvinerie M., Charpentreau JL. (1981). The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. *Food and Cosmetics Toxicology*, 19:735-738.
- Gareis M., Scheuer R. (2000). Ochratoxin A in meat and meat products. *Archiv für Lebensmittelhygiene Archives of Food Hygiene*, 51:102-104.
- Gawlik-Dziki U., Sugier D., Dziki D., Sugier P. (2014). Bioaccessibility in vitro of nutraceuticals from bark of selected *Salix* species. *Scientific World Journal*, 782763.
- Gentles A., Smith EE., Kubena LF., Duffus E., Johnson P., Thompson J., Harvey RB., Edrington TS. (1999). Toxicological evaluations of cyclopiazonic acid and ochratoxin A in broilers. *Poultry Science*, 78:1380-1384.
- Ghimpeteanu OM., Tolescu A., Militaru M. (2012). Aflatoxin and ochratoxin contamination in poultry—a review. Published in *Scientific Works. C Series. Veterinary Medicine*, Vol. LVIII ISSUE 3, 58:308-317.
- Ghosh A., Awal MA., Majumder S. (2012). Arsenic in eggs and excreta of laying hens in Bangladesh: a preliminary study. *Journal of Health Population and Nutrition*, 30:383-393.
- Giannenas I., Nisianakis P., Gavriil A., Kontopidis G., Kyriazakis I. (2009). Trace mineral content of conventional, organic and courtyard eggs analysed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Food Chemistry*, 114:706-711.
- Gibbons D., Morrissey C., Mineau P. (2015). A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environmental science and pollution control series*, 22:103-118.
- Gołoś A., Lutyńska A. (2015). Aluminium-adjuvanted vaccines - a review of the current state of knowledge. *Przegląd Epidemiologiczny*, 69:731-734.
- Goss-Steinmeyer K., Weymann J., Hege HG., Metzler M. (2002). Metabolism and lack of DNA reactivity of the mycotoxin ochratoxin A in cultured rat and human primary hepatocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 13:938-945.
- Grace EJ., MacFarlane GR. (2016). Assessment of the bioaccumulation of metals to chicken eggs from residential backyards. *Science of the Total Environment*, 563:256-60.
- Grenier B., Applegate T. (2013). Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: meta-analysis of published experiments in animals. *Toxins*, 5:396-430.
- Gunaserka AS., Truong T., Goh KS., Spurlock F., Tjeerdema RS. (2007). Environmental fate and toxicology of Fipronil, *Journal of Pest Science*, 32:189-199.
- Hainzl D., Casida JE. (1996). Fipronil insecticide: Novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93:12764-12767.

- Hainzl D., Cole LM., Casida JE. (1998). Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. *Chemical Research in Toxicology*, 11:1529-1535.
- Harris J., Mantle P. (2001). Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry*, 58:709-716.
- Harris W., Messori L. (2002). A comparative study of aluminum (III), gallium (III), indium (III), and thallium (III) binding to human serum transferrin. *Coordination Chemistry Reviews*, 228:237-262.
- Hierro JMH., Garcia-Villanova J., Torreno P., Fonseca IMT. (2008). Aflatoxins and ochratoxin A in red paprika for retail sale in Spain: occurrence and evaluation of a simultaneous analytical method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:751-756.
- Hirai M., Kawamoto T., Kodama Y. (1991). Toxic effects of ingested lead shots in domestic fowls. *Biological Trace Element Research*, 30:291-308.
- Hagelberg S., Hult K., Fuchs R. (1989). Toxicokinetics of Ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *Journal of Applied Toxicology*, 9:91-96.
- Hagelberg S., Hult K., Fuchs R. (2010). Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *Journal of Applied Toxicology*, 9:91-96.
- Ham H., Kim S., Kim MH., Lee S., Hong SK., Ryu JG., Lee T. (2016). Mycobiota of ground red pepper and their aflatoxigenic potential. *Journal of Microbiology*, 54:832-837.
- Hartmann RM., Fillmann HS., Martins MI., Meurer L., Marroni NP. (2014). *Boswellia serrata* has beneficial anti-inflammatory and antioxidant properties in a model of experimental colitis. *Phytotherapy Research*, 28:1392-1398.
- Hashemi M., Sadeghi A., Dankob M., Aminzare M., Raeisi M., Miri HH., Saghi M. (2018). The impact of strain and feed intake on egg toxic trace elements deposition in laying hens and its health risk assessment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190:540.
- Hashemi M., Sadeghi A., Saghi M., Aminzare M., Raeisi M., Rezayi M., Berlin S., Sany T. (2019). Health Risk Assessment for Human Exposure to Trace Metals and Arsenic via Consumption of Hen Egg Collected from Largest Poultry Industry in Iran. *Biological Trace Element Research*, 188:485-493.
- Heussner AH., O'Brien E., Dietrich DR. (2002). Species and sex specific variations in binding of ochratoxin A by renal proteins in vitro. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 54:151-159.
- Hesseltine CW. (1972). Solid State Fermentations. *Biotechnology & Bioengineering*, 9:517-532.
- Huang SA., Carvallo RF., Pitesky EM., Stoute S., Mete A. (2019). Gastrointestinal impactions in backyard poultry. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 31:368-370.
- Huff WW., Wyatt RD., Hamilton PB. (1975). Nephrotoxicity of dietary ochratoxin A in broiler chickens. *Applied Microbiology*, 30:48-51.
- Huff WE., Doerr JA., Hamilton PB. (1977). Decreased bone strength during ochratoxicosis and aflatoxicosis. *Poultry Science*, 56:1719-1724.

- IARC (1993). Ochratoxin A. In IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans: Some Naturally Occurring Substances; Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins; IARC: Lyon, France, Volume 56, pp. 489-521.
- Iqbal SZ., Asi MR., Zuber M., Akhtar J., Saif MJ. (2013). Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in commercial chilli and chilli sauce samples. *Food Control*, 2:621-625.
- Iqbal SZ., S Nisar., Asi MR., Jinap S. (2014). Natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in chicken meat and eggs. *Food Control*, 43:98-103.
- IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). (2002). "Heavy metals"- a meaningless term? Prepared for publication by Duffus J.H. *Pure and Applied Chemistry*, 74:793-807.
- Jestoi M. (2008). Emerging Fusarium-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin. A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48:21-49.
- Kaab H., Bain MM., Bartley K., Turnbull F., Wright HW., Nisbet AJ., Birchmore R., Eckersall PD. (2019). "Serum and acute phase protein changes in laying hens, infested with poultry red mite". *Poultry Science*, 98:679-687.
- Karimi I., Modaresi M., Cheshmekaboodi F., Miraghaee SS. (2015). The Effects of Aromatic Water of *Salix aegyptiaca* L. and its Major Component, 1, 4- Dimethoxybenzene, on Lipid and Lipoprotein Profiles and Ethology of Normolipidemic Rabbits. *International Journal of Clinical Toxicology*, 2:55-63.
- Katsavou E., Vlogiannitis S., Karp-Tatham E., Blake PD., Ilias A., Strube C., Kioulos I, Dermauw W., Van Leeuwene T., Vontas J. (2019). Identification and geographical distribution of pyrethroid resistance mutations in the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. *Pest Management Sciences*, 76: 125-133.
- Kelly JR., Kennedy PJ., Cryan JF., Dinan TG., Clarke G., Hyland NP. (2015). Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9:392.
- Kenyon J. (2017). Red mites in backyard chickens. *In Practice*, Vol. 39, pag. 334-338.
- Khan K., Naeem M. (2006). Simultaneous determination of accumulated hazardous metals in hen's eggs by atomic absorption spectroscopy. *Journal of Applied Sciences*, 6:198-201.
- Khan S., Jan MH., Kumar D., Telang AG. (2015). Firpronil induced spermatotoxicity is associated with oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 124:8-14.
- Khayyal MT., El-Ghazaly MA., Abdallah DM., Okpanyi SN., Kelber O., Weiser D. (2005). Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of a standardized willow bark extract. *Arzneimittelforschung*, 55:677-687.
- Kiczorowska B., Al-Yasiry ARM., Samolińska W., Marek A., Pyzik E. (2016). The effect of dietary supplementation of the broiler chicken diet with *Boswellia serrata* resin on growth performance, digestibility, and gastrointestinal characteristics, morphology, and microbiota. *Livestock Science*, 191:117-124.

- Kidd H., James D. (1991). *The Agrochemicals Handbook*, 3rd edn. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge.
- Ki YW., Lee JE., Park JH., Shin IC., Koh HC. (2012). Reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase induce apoptotic death of SH-SY5Y cells in response to fipronil. *Toxicology Letters*, 211:18-28.
- Kilpinen O., Roepstorff A., Permin A., Nørgaard-Nielsen G., Lawson LG., Simonsen HB. (2005). Influence of *Dermanyssus gallinae* and *Ascaridia galli* infections on behaviour and health of laying hens (*Gallus gallus domesticus*). *British Poultry Science*, 46:26-34.
- Kim S., Na Y., Yi JH., Kim BS., Ahn Yj. (2007). Contact and fumigant toxicity of oriental medicinal plant extracts against *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Veterinary Parasitology*, 145:377-382.
- Kim JR., Perumalsam H., Lee JH., Ahn YJ., Lee YS., Lee SG. (2016). Acaricidal activity of *Asarum heterotropoides* root-derived compounds and hydrodistillate constitutes toward *Dermanyssus gallinae* (Mesostigmata: Dermanyssidae). *Experimental and Applied Acarology*, 68:485-495.
- Kim HK., Lee SJ., Hwang BY., Yoon JU., Kim GH. (2018). Acaricidal and repellent effects of *Cnidium officinale*-derived material against *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Experimental and Applied Acarology*, 74:403-414.
- Kirkpatrick DC., Coffin DE. (1975). Trace metal content of chicken eggs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26:99-103.
- Knežević S., Pajić M., Petrović A., Vidaković S., Babić J., Živkov-Baloš M., Pušić I., Savić S., Stojanov I. (2017). *Dermanyssus gallinae* - overview: life cycle, morphology, prevalence and control measures in poultry farms. *Arhiv veterinarske medicine*, Vol. 10, No. 2, 53-62.
- Koszegi T., Poor M. (2016). Ochratoxin A: Molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level. *Toxins*, 8:111.
- Kövesi B., Cserháti M., Erdélyi M., Zándoki E., Mézes M., Balogh K. (2019). Long-Term Effects of Ochratoxin A on the Glutathione Redox System and Its Regulation in Chicken. *Antioxidants*, 8:178.
- Krogh P. (1974). Mycotoxic porcine nephropathy: A possible model for Balkan endemic nephropathy. In: Puhlev A., editor. *Endemic Nephropathy*. Sofia: Publishing House of the Bulgarian Academy of Science, 266-270.
- Leghait J., Gayraud V., Toutain PL., Picard HN., Viguié C. (2010). Is the mechanism of fipronil-induced thyroid disruption specific to the rat: re-evaluation of fipronil thyroid toxicity in sheep? *Toxicology Letters*, 194:351-357.
- Liebisch A., Liebisch G. 2003. Biologie, Schäden und Bekämpfung beim Befall durch die Rote Vogelmilbe (*Dermanyssus gallinae*). *Lohmann Information*, 4:1-7.

- Lin H., Chuan-Hua X., Jin-Jun W., Ming I., Wen-Cai I., Zhi-Mo Z. (2009). Resistance selection and biochemical mechanism of resistance to two Acaricides in *Tetranychus cinnabarinus* (Boidival). *Pesticide Biochemistry and Pyhsiology*, 93: 47-52.
- Liuzzi VC., Fanelli F., Tristezza M., Haidukowski M., Picardi E., Manzari C., Lionetti C, Grieco F., Logrieco AF., Thon MR., Pesole G., Mule G. (2016). Transcriptional analysis of acinetobacter sp. neg1 capable of degrading ochratoxin A. *Frontiers in Microbiology*, 7:2162-2170.
- Lucisano A., Severino L. (2014). Metalli pesanti. In: Nebbia C., Residui di farmaci e contaminati ambientali nelle produzioni animali. Edises, Napoli. Pag. 379-380.
- Magalhaes JZ., Sandini TM., Udo MSB., Fukushima AR., Spinosa HDS. (2018). Fipronil: uses, pharmacological and toxicological features. *Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, 11:67-83.
- Maistro EL., Terrazzas PM., Perazzo FF., Gaivão IOM., Sawaya ACHF., Rosa PCP. (2019). *Salix alba* (white willow) medicinal plant presents genotoxic effects in human cultured leukocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 82:1223-1234.
- Mally A., Keim-Heusler H., Amberg A., Kurz M., Zepnik H., Mantle P., Volkel W., Hard GC., Dekant W. (2005). Biotransformation and nephrotoxicity of ochratoxin B in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 206:43-53.
- Malir F., Ostry V., Pfohl-Leszkowicz A., Novotna E. (2013). Ochratoxin A: Developmental and reproductive toxicity—An overview. *Developmental and Reproductive Toxicology*, 98:493-502.
- Malir F., Osrty V., Pfohl-Leszkowicz A., Malir J., Toman J. (2016). Ochratoxin A: 50 years of research. *Toxins*, 8:191.
- Mantle PG., Chow AM. (2000). Ochratoxin formation in *Aspergillus ochraceus* with particular reference to spoilage of coffee. *International Journal of Food Microbiology*, 56:105-109.
- Manizan A., Oplatowska-Stachowiak M., Piro-Metayer I., Campbell K., Koffi-Nevry R., Elliott C., Akaki D., Braber C. (2018). Multi-mycotoxin determination in rice, maize and peanut products most consumed in Cote d'Ivoire by UHPLC-MS/ MS. *Food Control*, 87:22-30.
- Marangi M., Cafiero MA., Capelli G., Camarda A., Sparagano OAE., Giangaspero A. (2008). Evaluation of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae) susceptibility to some acaricides in field populations from Italy. *Experimental and Applied Acarology*, 48:11-18.
- Maresca M., Mahfoud R., Pfohl-Leszkowicz A., Fantini J. (2001). The mycotoxin ochratoxin A alters intestinal barrier and absorption functions but has no effect on chloride secretion. *Toxicology and Applied Pharmacology Journal*, 176:54-63.
- Marin-Kuan M., Nestler S., Verguet C., Bezencon C., Piguet D., Mansourian R., Holzwarth J., Grigorov M., Delatour T., Mantle P. (2006). A toxicogenomics approach to identify new plausible epigenetic mechanisms of ochratoxin a carcinogenicity in rat. *Toxicological Sciences*, 89:120-134.
- Mata AT., Ferreira JP., Oliveira BR., Batoreu MC., Barreto CMT., Pereira VJ., Bronze M. (2015). Bottled water: analysis of mycotoxins by LC-MS/MS. *Food Chemistry*, 176:455-464.

- Maurer V., Baumgärtner J. 1992. Temperature influence on life table statistics of the chicken mite *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Experimental and Applied Acarology*, 15:27-40.
- Meluzzi A., Borboni A., Cerolini S, Dal Bosco A., Manfreda G., Cecilia M., Sirri F., Zaniboni L. (2016). Uova e salute umana. In: Mele M., Pulina G., Alimenti di origine animale e salute. Ed. Franco Angeli s.r.l., Milano, Italia, pag. 359.
- Mullens AB., Murillo AC., Zoller H., Heckerth RA., Jirjis F., Flochlay-Sigognault A. (2017). *Parasites & Vectors*, 10:358.
- Munoz K., Blaszkewicz M., Campos V., Vega M., Degen GH. (2014). Exposure of infants to ochratoxin A with breast milk. *Archives of Toxicology*, 88:837-846.
- Naharashi T., Zhao X., Ikeda T., Nagata K., Yeh JZ. (2007). Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity, *Human & Experimental Toxicology*, 26:361-366.
- Naghizadeh M., Larsen FT., Watrang E., Norup LR., Dalgaard TS. (2019). Rapid whole blood assay using flow cytometry for measuring phagocytic activity of chicken leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 207:53-61.
- Nisianakis P., Giannenas I., Gavriil A., Kontopidis G., Kyriazakis I. (2009). Variation in Trace Element Contents Among Chicken, Turkey, Duck, Goose, and Pigeon Eggs Analyzed by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS). *Biological Trace Element Research*; 128:62-71.
- Nunn F., Baganz J., Bartley K., Hall S., Burgess S., Nisbet AJ. (2020). An improved method for in vitro feeding of adult female *Dermanyssus gallinae* (poultry red mite) using Baudruche membrane (goldbeater's skin). *Parasites Vectors*, 13:585.
- O'Brien E., Dietrich D. (2004). Mycotoxins affecting the kidney. In *Toxicology of Kidney*; Hook, J., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, pp. 895-936.
- O'Brien E., Dietrich DR. (2005). Ochratoxin A: The continuing enigma. *Critical Reviews in Toxicology*, 35:33-60.
- Ohi M., Dalsenter PR., Andrade AJ., Nascimento AJ. (2004). Reproductive adverse effects of fipronil in Wistar rats. *Toxicology Letters*, 146:121-127.
- Omar RF., Gelboin HV., Rahimtula AD. (1996). Effect of cytochrome P450 induction on the metabolism and toxicity of ochratoxin A. *Biochemical Pharmacology*, 51:207-216.
- Paoloni A., Solfrizzo M., Bibi R., Pecorelli I. (2018). Development and validation of LC-MS/MS method for the determination of Ochratoxin A and its metabolite Ochratoxin alpha in poultry tissues and eggs. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 53:327-333.
- Parvin D., Keyvan P., Hossein R., Mostafa C., Mojtaba A. (2014). Prevalence of ochratoxin A in human milk in the Khorrambid Town, Fars province, South of Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2:99-102.
- Peckham J., Doupnik BJ., Jones OJ. (1971). Acute toxicity of ochratoxins A and B in chicks. *Applied Microbiology*, 21:492-494.
- Pfohl-Leszkowicz A., Manderville RA. (2007). Ochratoxin A: an overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51:61-99.

Pisa LW., Amaral-Rogers V., Belzunces LP., Bonmatin JM., Downs CA., Goulson D., Wiemers M. (2014). Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environmental Science and Pollution Research*, 22:68-102.

Piskorska-Pliszczynska J., Juskiewicz TJ. (1991). Tissue deposition and passage into eggs of ochratoxin A in Japanese quail. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology*, 10:8-10.

Pozniak B., Switala M., Bobrek K., Graczyk S., Dzimira S. (2012). Adverse effects associated with high-dose acetylsalicylic acid and sodium salicylate treatment in broilers. *British Poultry Science*, 53:777-783.

Pozzo L., Salamano G., Mellia E., Gennero MS., Doglione L., Cavallarin L., Tarantola M., Forneris G., Schiavone A. (2012). Feeding a diet contaminated with ochratoxin A for chickens at the maximum level recommended by the EU for poultry feeds (0.1 mg/kg). Effects on growth and slaughter performance, haematological and serum traits. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97:13-22.

Priest ND. (2004). The biological behaviour and bioavailability of aluminium in man, with special reference to studies employing aluminum-26 as a tracer: Review and study update. *Journal of Environmental Monitor*, 6:375-403.

Prior MG., Sisodia CS., Neil JB. (1976). Acute oral ochratoxicosis in day-old white leghorns, turkeys and Japanese quail. *Poultry Science*, 55:786-790.

Regolamento (CE) n. 315/1993 del Consiglio, 8 febbraio 1993. Stabilisce procedure comunitarie relative ai contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta ufficiale delle Comunità Europee* del 13 febbraio 1993, n. L 37:1-5.

Regolamento (UE) 2019/1792 DELLA COMMISSIONE del 17 ottobre 2019 che modifica gli allegati II, III e V del regolamento (CE) n. 396/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda i livelli massimi di residui di amitrolo, fipronil, flupirsulfuron metile, imazosulfuron, isoproturon, orthosulfamuron e triasulfuron in o su determinati prodotti.

Regolamento di esecuzione (UE) N. 781/2013 DELLA COMMISSIONE del 14 agosto 2013 che modifica il regolamento di esecuzione (UE) n. 540/2011 per quanto riguarda le condizioni di approvazione della sostanza attiva fipronil e che vieta l'uso e la vendita di sementi trattate con prodotti fitosanitari contenenti tale sostanza attiva.

Regolamento (CE) N. 1107/2009 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 21 ottobre 2009 relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari e che abroga le direttive del Consiglio 79/117/CEE e 91/414/CEE.

Regolamento (CE) N. 396/2005 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 23 febbraio 2005 concernente i livelli massimi di residui di antiparassitari nei o sui prodotti alimentari e mangimi di origine vegetale e animale e che modifica la direttiva 91/414/CEE del Consiglio.

Regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio, 28 gennaio 2002. Stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare. *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* del 01 febbraio 2002, n. L 31:1-24.

Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006. Definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 20 dicembre 2006, n. L 364:5-24.

Reinfelder J.R., Fisher N.S., Luoma S.N., Nichols J.W., Wang W.X. (1998). Trace element trophic transfer in aquatic organisms: A critique of the kinetic model approach, *Science of The Total Environment*, Volume 219:117-135.

Ringot D., Chango A., Schneider Y.J., Larondelle Y. (2006). Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions*, 5:18-46.

Romero A., Ramos E., Ares I., Castellano V., Martínez M., Martínez-Larrañaga M.R., Anadón A., Martínez M.A. (2016). Fipronil sulfone induced higher cytotoxicity than fipronil in SH-SY5Y cells: Protection by antioxidants. *Toxicology Letters*, 252:42-49.

Roncada P., Altafini A., Fedrizzi G., Guerrini A., Polonini G.L., Caprai E. (2020). Ochratoxin A contamination of the casing and the edible portion of artisan salamis produced in two Italian regions. *World Mycotoxin Journal*, 13:553-562.

Ruan D., Wang W.C., Lin C.X., Fouad A.M., Chen W., Xia W.G., Wang S.Q., Luo X., Zhang W.H., Yan S.J., Zheng C.T., Yang L. (2019). Effects of curcumin on performance, antioxidation, intestinal barrier and mitochondrial function in ducks fed corn contaminated with ochratoxin A. *Animal*, 13:42-52.

Salis S., Testa C., Roncada P., Armorini S., Rubattu N., Ferrari A., Miniero R., Brambilla G. (2017). Occurrence of imidacloprid, carbendazim, and other biocides in Italian house dust: Potential relevance for intakes in children and pets. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 52:699-709.

Santos L., Marin S., Sanchis V., Ramos A.J. (2010). Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in *Capsicum* powder samples available on the Spanish market. *Food Chemistry*, 122:826-830.

Saracila M., Panaite T.D., Vlaicu P.A., Tabuc C., Palade M.L., Gavris T., Criste R.D. (2018). Dietary willow bark extract for broilers reared under heat stress. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies*, 75:92-98.

Saracila M., Panaite T.D., Soica C., Tabuc C., Olteanu M., Predescu C., Rotar C.M., Criste R.D. (2019). Use of a hydroalcoholic extract of *Salix alba* L. bark powder in diets of broilers exposed to high heat stress. *South African Journal of Science*, 49:942-954.

Schaaf G.J., Nijmeijer S.M., Maas R.F., Roestenberg P., de Groene E.M., Fink-Gremmels J. (2002). The role of oxidative stress in the ochratoxin A-mediated toxicity in proximal tubular cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1588:149-158.

Schiavone A., Cavallero C., Girotto L., Pozzo L., Antoniazzi S., Cavallin L. (2008). A survey on the occurrence of ochratoxin A in feeds and sera collected in conventional and organic poultry farms in Northern Italy. *Italian Journal of Animal Science*, 7:495-503.

Seliger C., Schaerer B., Kohn M., Pendl H., Weigend S., Kaspers B., Härtle S. (2012). A Rapid High-Precision Flow Cytometry Based Technique for Total White Blood Cell Counting in Chickens, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 145:86-99.

- Shaheen N., Ahmed M.K., Islam M.S., Habibullah-Al-Mamun M., Tukun A.B., Islam S. (2016). Health risk assessment of trace elements via dietary intake of 'non- piscine protein source' food stuffs (meat, milk and egg) in Bangladesh. *Environmental Science and Pollution Research*; 23:7794-7806.
- Shara M., Stohs SJ. (2015). Efficacy and safety of white willow bark (*Salix alba*) extracts. *Phytotherapy Research*, 29:1112-1116.
- Shahzad AK., Emerson JV., Ono AM., Fernandes EV., Hirooka YE., Shimizu FC., Oba A., Flaiban KMCK., Itano EN. (2019). Effects of Subcutaneous Ochratoxin-A Exposure on Immune System of Broiler Chicks. *Toxins*, 11:264.
- Shim W., Ha K., Kim M., Kim J., Chung D. (2014). Evaluation of the transferrate of ochratoxin a to decoctions of herbal medicines. *Food Science and Biotechnology*, 23:2103-2108.
- Simon-Delso N., Amaral-Rogers V., Belzunces LP., Bonmatin JM., Chagnon M., Downs C., Furlan L., Gibbons DW., Giorio C., Girolami V., Goulson D., Kreutzweiser DP., Krupke CH., Liess M., Long E., McField M., Mineau P., Mitchell EAD., Morrissey CA., Noome DA., Pisa L., Settele J., Stark JD., Tapparo A., Van Dyck H., Van Praagh J., Van der Sluijs JP., Whitehorn PR., Wiemers M. (2015). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, 22:5-34.
- Smith ME., Lewis CW., Anderson JG., Solomons GL. (1994). Mycotoxins in Human Nutrition and Health. Agro-industrial division, E2, of the European Commission Directorate-General XII for scientific research and development. 1-48.
- Solcan C., Timofte D., Floristean VC., Carter SD., Solcan G. (2013). Ultrastructural lesions and immunochemical analysis of Bcl-2 protein expression in the kidney of chickens with experimental ochratoxicosis. *Acta Veterinaria Hungarica*, 61:344-353.
- Solcan C., Pavel G., Floristean V., Chiriac I., LencuB., Solcan G. (2015). Effect of ochratoxin A on the intestinal mucosa and mucosa-associated lymphoid tissues in broiler chickens. *Acta Veterinaria Hungarica*, 63:30-48.
- Solfrizzo M., Piemontese L., Gambacorta L., Zivoli R., Longobardi F. (2015). Food coloring agents and plant food supplements derived from *Vitis vinifera*: a new source of human exposure to ochratoxin A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63:3609-3614.
- Stafford EG., Tell LA., Lin Z., Davis LJ., Vickroy WT., Riviere EJ., Baynes ER. (2018). Consequences of fipronil exposure in egg-laying hens. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 253:57-60.
- Steinbruck D., Rasch C., Kumke MU. (2008). Photophysics of ochratoxin A in aqueous solution. *Zeitschrift fur Naturforschung*, 63:1321-1326.
- Sparagano O., Pavličević A., Murano T., Camarda A., Sahibi H., Kilpinen O. (2009). Prevalence and key figures for the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* infections in poultry farm systems. *Experimental and Applied Acarology*, 48:3-10.
- Stoev SD., Paskalev M., MacDonald S., Mantle PG. (2002). Experimental 1 year ochratoxin A toxicosis in pigs. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 53:481-487.

- Stoev SD. (2010). Studies on Carcinogenic and Toxic Effects of Ochratoxin A in Chicks. *Toxins*, 2:649-664.
- Størmer F., Hansen C., Pedersen J., Hvistendahl G., Aasen A. (1981). Formation of (4R)- and (4S)-4-hydroxyochratoxin A from ochratoxin A by liver microsomes from various species. *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 42:1051-1056.
- Størmer F., Støren O., Hansen C., Pedersen J., Aasen A. (1983). Formation of (4R)- and (4S)-4-hydroxyochratoxin A and 10-hydroxyochratoxin A from Ochratoxin A by rabbit liver microsomes. *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 45:1183-1187.
- Suzuky S., Satoh T., Yamakazi M. (1977). The pharmacokinetics of ochratoxin A in rats. *Japan Journal of Pharmacology*, 27:735-744.
- Tabatabaei SN. (2016). Effect of olibanum (*Boswellia thurifera*) as a feed additive on performance, some blood biochemical and intestinal morphology in broiler chicks. *Research Opinions in Animal and Veterinary Sciences*, 6:130-134.
- Taillebois E., Alamiddine Z., Brazier C., Graton J., Laurent DA., Thany HS., Le Questel JY. (2015). Molecular features and toxicological properties of four common pesticides, acetamiprid, deltamethrin, chlorpyrifos and fipronil. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23:1540-1550.
- Teerlink J., Hernandez J., Budd R. (2017). Fipronil washoff to municipal wastewater from dogs treated with spot-on products. *Science of the Total Environment*, 599-600:960-966.
- Tingle CCD., Rother JA., Dewhurst CF., Lauer S., King WJ. (2003). Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 176:1-66.
- Trovato GM. (2012). Behavior, nutrition and lifestyle in a comprehensive health and disease paradigm: skills and knowledge for a predictive, preventive and personalized medicine. *The EPMA Journal*, 3:1-15.
- Trampel D., Imerman P., Carson T., Kinker J., Ensley S. (2003). Lead Contamination of Chicken Eggs and Tissues from a Small Farm Flock. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Inc.*, 15:418-22.
- Turner NW., Subrahmanyam S., Piletsky SA. (2009). Analytical for determination of mycotoxins. A review. *Analytica Chimica Acta*, 632:168-180.
- Uchiyama R., Moritomo T., Kai O., Uwatoko K., Inoue Y., Nakanishi T. (2005). Counting absolute number of lymphocytes in quail whole blood by flow cytometry. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67:441-444.
- Umar S., Umar K., Sarwar AH., Khan A., Ahmad N., Ahmad S., Katiyar CK., Husain SA., Khan HA. (2014). *Boswellia serrata* extract attenuates inflammatory mediators and oxidative stress in collagen induced arthritis. *Phytomedicine*, 21:847-856.
- Van der Merwe KJ., Steyn PS, Fourie L., Scott DB., Theron JJ. (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, 205:1112-1113.
- Van Overmeire I., Pussemier L., Hanot V., De Temmerman L., Hoenig M., Goeyens L. (2006). Chemical contamination of free-range eggs from Belgium. *Food Additives and Contaminants*, 23:1109-1122.

- Van Overmeire I., Pussemier L., Waegeneers N., Hanot V., Windal I., Boxus L., Covaci A., Eppe G., Scippo M.L., Sioen I., Bilau M., Gellynck X., De Steur H., Tangni E.K., Goeyens L. (2009). Assessment of the chemical contamination in home-produced eggs in Belgium: general overview of the CONTEGG study. *Science of the Total Environment*, 407:4403-4410.
- Vasylieva N., Barnych B., Wan D., El-Sayed A., El-Sheikh EA., Nguyen MH., Wulff H., McMahan R., Strynar M., Gee JS, Hammock DB. (2017). Hydroxy-fipronil is a new urinary biomarker of exposure to fipronil. *Environment International*, 103:91-98.
- Verma RS., Mehta A., Srivastava N. (2007). In vivo chlorpyrifos induced oxidative stress: Attenuation by antioxidant vitamins. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88:191-196.
- Visconti A., Bottalico A. (1983). High levels of ochratoxins A and B in moldy bread responsible for mycotoxicosis in farm animals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31:1122-1123.
- Wang, W., S. Zhai, Y. Xia, H. Wang, D. Ruan, T. Zhou, Y. Zhu, H. Zhang, M. Zhang, H. Ye, W. Ren, and L. Yang. (2019). Ochratoxin A induces liver inflammation: involvement of intestinal microbiota. *Microbiome* 7:151.
- Watkins B.A. (1995). The Nutritive Value of the Egg; Stadelman W.J., Cotterill O.J. Eds., Food Products Press: Binghamton, NY, USA, pag. 177-194.
- Wu Q., Dohnal V., Huang L., Kuča K., Wang X., Chen G., Yuan Z. (2011). Metabolic pathways of ochratoxin A. *Current Drug Metabolism*, 12:1-10.
- Xiao H., Madhyastha S., Marquardt RR., Li S., Vodela JK., Frohlich AA., Kemppainen BW. (1996). Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: Structure-activity relationships. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 137:182-192.
- Yang S., Zhang H., de Saeger S., de Boevre M., Sun F., Zhang S., Cao X., Wang Z. (2015). In vitro and in vivo metabolism of ochratoxin A: A comparative study using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole/time-of-flight hybrid mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407:3579-3589.
- Yang S., Li L., Yu L., Sun L., Li K., Tong C., Xu WX., Cui GY., Long M., Li P. (2020). Selenium-enriched yeast reduces caecal pathological injuries and intervenes changes of the diversity of caecal microbiota caused by Ochratoxin-A in broilers. *Food and Chemical Toxicology*, 137:111139.
- Yiannikouris A., Jouany JP. (2002). Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research*, 51:81-99.
- Yair R., Uni Z. (2011). Content and uptake of minerals in the yolk of broiler embryos during incubation and effect of nutrient enrichment. *Poultry Science*, 90:1523-1531.
- Zabihi NA., Mahmoudabady M., Soukhtanloo M., Hayatdavoudi P., Beheshti F., Niazmand S. (2018). *Salix alba* attenuated oxidative stress in the heart and kidney of hypercholesterolemic rabbits. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 8:63-72.
- Zdybel J., Jacek K., Cencek T. (2011). In vitro effectiveness of selected acaricides against red poultry mites (*Dermanyssus gallinae*, De Geer, 1778) isolated from laying hen battery cage farms localised in different regions of Poland. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 55, 411-416.

Zhao X., Salgado V., Yeh J., Narahashi T. (2003). Differential action of Fipronil and Dieldrin insecticides on GABA gated chloride channels in Cocroach neurons, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 306:914-924.

Zinedine A., Fernández-Franzón M., Mañes J., Manyes L. (2017). Multi-mycotoxin contamination of couscous semolina commercialized in Morocco. *Food Chemistry*, 214:440-446.

Zuzana S., Janka B., Štefan C., Kovaříková V., Burkuš J., Špírková A., Koppel J., Dušan F. (2018). Fipronil causes toxicity in mouse preimplantation embryos. *Toxicology*, 410:214-221.