

Intossicazioni da melamina in cani e gatti negli Stati Uniti

Introduzione.

Recentemente, l'Unione Europea ha ripreso nel suo sistema di allerta rapido, una segnalazione effettuata dalla Food and Drug Administration negli Stati Uniti riguardo alla contaminazione con melamina di materie prime ad alto tenore proteico, quali farine di glutine di mais e di frumento, farine di soia, farine di pesce. Tale allerta è originata dalle segnalazioni, fatte principalmente dai veterinari liberi professionisti, di casi di insufficienza renale e di morte in cani e gatti. Segnalazioni, che, incanalate attraverso un sistema informatico accessibile via web, hanno raggiunto il numero di circa 10.000. La causa è stata rintracciata nell'utilizzo nelle materie prime proteiche, soprattutto di origine vegetale, contaminate con melamina, in cibi per cani e per gatti. Questo sta comportando il ritiro dal commercio negli USA di svariati lotti di petfoods che abbracciano circa 5.000 linee di produzione. Contemporaneamente, la contaminazione è stata rintracciata anche in alimenti zootecnici utilizzati negli USA e nel Canada destinati all'acquacoltura, all'avicoltura e alla suinicoltura. Negli animali da produzione esposti non sono stati riscontrati fenomeni tossici e i residui presenti sono stati considerati di non rilevante pericolosità, per cui, in alcuni casi, le carni sono state esitate al consumo.

Recentissimamente, la Commissione Europea ha incaricato l'Agenzia per la Sicurezza Alimentare Europea (EFSA) di redigere una valutazione tossicologica sulla contaminazione da melamina e analoghi in mangimi e alimenti.

Questa nota, si propone di essere il più informativa possibile e può rappresentare uno stimolo per la proposizione di sistemi di sorveglianza attiva che coinvolgano la classe veterinaria nel suo insieme.

Le notizie riportate sono reperibili sui siti web della FDA, e della Associazione Medici Veterinari Americana (AVMA), aggiornate al 24 maggio 2007.

La cronistoria:

Nel settembre e dicembre 2006, sono state importate dalla Cina negli Stati Uniti e nel Canada partite di farina di glutine di frumento, utilizzate successivamente nella preparazione di pet-foods. In seguito a lamentele, insorte nel periodo Dicembre 2006 – Febbraio 2007, una delle ditte conduceva un approfondimento sulla qualità dei propri prodotti e constatava fenomeni di insufficienza renale acuta nei cani esposti. A fine Marzo 2007, la FDA identificava la presenza di melamina nei mangimi contaminati della ditta in questione. Durante lo stesso mese, altre ditte iniziavano a ritirare spontaneamente dal commercio propri prodotti.

A metà aprile 2007, in Sud Africa, in seguito al decesso di 30 cani, sono stati ritirati dal commercio alimenti zootecnici prodotti con farina di glutine importata dalla Cina. Nel frattempo, la FDA rilevava la presenza di melamina anche in partite di mangime per pets non ritirate dal commercio e riceveva circa 17.000 lettere di protesta da parte dei consumatori. A fine Aprile, si stimava che gli alimenti zootecnici contaminati avessero causato il decesso di 1950 gatti e 2200 cani.

La FDA procedeva ad un primo campionamento di materie prime. Su 750 campioni a base di glutine di mais, 330 sono risultati positivi a melamina e composti analoghi. Analogamente, su 85 campioni a base di proteine di riso, 27 sono risultati contaminati.

In accordo con le Università e le Associazioni professionali, la FDA approfondiva il nesso di causalità – effetto e ha rintracciato l'origine e la provenienza geografica della contaminazione.

L'acquisto delle proteine vegetali contaminate è risultato effettuato presso due grosse aziende cinesi, che a loro volta hanno acquistato le materie prime da altre ditte, che non sono state rintracciate completamente. Questo ha portato la FDA a concludere che il fenomeno di contaminazione possa essere più esteso di quanto fino ad ora verificato, in quanto le due ditte cinesi implicate possono avere rivestito la funzione di fornitori e non di produttori della materia prima.

Una delle ditte cinesi, inoltre, non ha dichiarato a livello nazionale che la farina di glutine era destinata all'esportazione per uso mangimistico /alimentare. Questo ha fatto sì che i controlli previsti dall'autorità cinese sui prodotti alimentari destinati all'esportazione non venissero effettuati.

Alla luce di quanto sopra, la FDA ha inteso diramare uno stato d'allerta sulle seguenti fonti proteiche: Glutine di riso, frumento, soia e mais, farina di glutine di mais, proteine di riso e concentrao di proteine di riso, sottoprodotti del mais, proteine (inclusi aminoacidi e idrolisati proteici) , proteine da fagioli.

Inoltre, ha inteso avvisare i Centres of Disease Control and Prevention (CDC), per verificare se si stia registrando una maggiore incidenza di patologie renali nella popolazione umana, quale possibile conseguenza dell'esposizione alimentare a melamina e prodotti analoghi.

La melamina e i composti analoghi

La melamina (1,3,5-Triazine-2,4,6-triamina, formula bruta $C_3H_6N_6$ si presenta come polvere bianca ed è scarsamente solubile in acqua. In virtù del numero di atomi di azoto, può trovare impiego quale fertilizzante, , ma il suo uso principale è nell'industria della plastica, per la formazione di resine melaminiche, in combinazione con la formaldeide, resine che trovano impiego anche nella produzione di materiali a contatto con gli alimenti. Ha caratteristiche di ritardante di fiamma e costituisce il componente principale anche di alcune colle e inchiostri.

Può essere il metabolita principale negli animali di un pesticida utilizzato sui vegetali, la ciromazina. In tale contesto, sono stati sviluppati dei metodi di analisi quale residuo nelle carni da parte del Food Safety Inspection Service, nell'ambito del Dipartimento dell'Agricoltura degli Stati Uniti.

Tossicità:

Poco è dato a conoscere sulla tossicità della melamina nell'uomo, d'altra parte non sono stati fino a ora riportati casi di intossicazione acuta, imputabili direttamente a tale sostanza. Non ci sono dati tossicologici per l'uomo e il gatto.

Nel ratto il più basso NOAEL riportato è di 63 mg/kg peso vivo/ giorno, per un periodo di esposizione di 13 settimane, con esposizione orale tramite il mangime. Tale dato di tossicità sub-cronica è stato preso come Punto di Partenza (POD) dalla FDA per una preliminare valutazione del rischio di

esposizione alimentare nell'uomo. Gli end points tossicologici sono: ridotto consumo di cibo e conseguente perdita di peso, calcoli in vescica, cristalluria e iperplasia dell'epitelio vescicale, ridotta percentuale di sopravvivenza.

Nel cane esiste un solo studio di tossicità cronica, (1200 mg/ kg per un anno, per via orale). A parte la presenza di cristalli urinari, non si sono notati effetti tossici.

Esposizioni continue per 2 anni a 4500 ppm o 263 mg/kg peso vivo/ giorno) so state correlate con la maggiore incidenza di calcoli e di tumori nella vescica.

Nel ratto, dove viene assorbita ed escreta senza metabolizzazione estensiva, si riporta una DL_{50} > di 3.000 g /kg, per assunzione orale. Può essere irritante sulle mucose oculari e sulla pelle. Nei conigli, la DL_{50} per esposizione cutanea risulta > di 1000 mg/ kg.

Nel topo e nel ratto, la melamina è risultata avere una DL_{50} di 6.0 g/kg , per somministrazioni gastriche mediante gavaggio, e di 4,3 g/kg se inalata. Tuttavia, in combinazione con l'acido cianidrico, utilizzato quale ritardante di fiamma nella produzione di resine melamminiche, la sua tossicità si abbassa a 4,1 mg /kg (DL_{50} gastrica) e 3,5 mg/ kg (DL_{50} per inalazione), contro le rispettive DL_{50} di 7.7 and 3.4 g/kg per l'acido cianurico.

In pecore di razza merino, alimentate con melamina in ragione di 100 g /capo/ in singola somministrazione, si sono osservati livelli ematici di urea aumentati per 11 giorni, calo completo dell'appetito e anuria al 10°giorno. L'esame anatomo-patologico ha rilevato la completa ostruzione dei tubuli con cristalli bianchi. Dosi giornaliere di 25 g e 50 g /capo, hanno determinato la morte di soggetti dopo 9 e 7 giorni di esposizione, con lesioni renali e abomasali, cistite emorragica e infiammazione dell'intestino cieco. A dosi di 10 g, due pecore su tre sono morte entro 31 giorni, con cristalli renali ed edema polmonare. I cristalli, esaminati spettroscopicamente, in ambiente acido, hanno rilevato un massimo di assorbanza a 235 nm, corrispondente a quello della melamina.. Non sono stati osservati danni epatici o ridotta motilità dei prestomaci.

Per la tossicità cronica, è stato dimostrato che esposizioni prolungate a melamina possono causare disturbi alla sfera riproduttiva, calcoli renali, e patologie alla vescica, che possono esitare in tumori. Cani alimentati con diete contenenti il 3% di melamina, per un anno, hanno manifestato poliuria, con un ridotto peso specifico delle urine e presenza di cristalli di melamina, proteinuria e sangue occulto.

Per quanto riguarda la valutazione di esposizione nell'uomo, la FDA ritiene che sia improbabile che l'uomo possa venire in contatto con livelli di contaminazione quali quelli rilevati nei mangimi.

Lo scenario più conservativo ipotizzato assume la presenza di residui di melamina e acido cianurico a livello di 100 ppb in tutti gli alimenti solidi consumati da una persona di 60 kg nell'arco di un giorno (circa 1500 g). pari a 2,5 µg/ kg peso vivo / giorno. Considerando il POD di 63 mg/kg/ peso vivo nel ratto e scegliendo un fattore di sicurezza di 100, che tiene conto delle possibili variabili interspecifiche, la dose tollerabile quotidiana (TDI) risulterebbe essere 630 µg/ kg peso vivo / giorno, circa 250 volte inferiore al TDI

Tuttavia, rimane aperto il problema della tossicità determinata dalle possibili interazioni *in vivo* tra melamina, composti analoghi ed eventuali contaminanti di processo e acido cianurico (effetti additivi e sinergici).

Tale punto costituisce la più importante criticità nella valutazione tossicologica , in quanto esiste l'evidenza che la melamina presente nei mangimi contaminati in realtà sia stata ottenuta per recupero dalle acque di processo. Infatti, dal processo di produzione della melamina si origina un'acqua di scarico ad alto potere inquinante, per cui si procede ad una concentrazione dei residui

solidi, che sono costituiti da circa 70% melamina, 23% da composti analoghi (le ossitriazine ammelina, ammelide e acido cianurico). La composizione di tali residui solidi può variare in base alla tecnologia utilizzata nel processo di produzione.

Esiste inoltre l'aspetto derivante dalla possibile interazione della melamina con altri costituenti della razione alimentare. Sono documentate le interazioni tra melamina e acido cianurico e formaldeide; questi ultimi negli USA possono essere ancora utilizzati in alcuni casi come additivi zootecnici. Tale interazione comporterebbe una minore solubilità della melamina e favorirebbe la precipitazione di cristalli.

Motivi per la presenza di melamina in alimenti zootecnici

La melamina è stata proposta quale fonte di azoto non proteico nei ruminanti fin dal 1958. Tuttavia, sia per il costo, sia per la disponibilità di altre fonti di azoto non proteico, quali biuretto ed urea con un migliore tasso di idrolisi, il suo uso è stato soppiantato.

Nell'attuale congiuntura, l'utilizzo di melamina, quale prodotto di recupero dalle acque di processo, si configura quale frode in commercio, per aumentare il tenore di azoto nella farina proteica e quindi simulare un più elevato contenuto di proteine. Vale la pena notare che il prezzo di tali materie proteiche viene stabilito in base al tenore proteico e che tale specifica di solito viene inserita tra gli obblighi contrattuali da rispettare. Il fatto che la molecola sia costituita per il suo 66% da atomi di azoto, e che i metodi di analisi non fossero implementati, ha favorito le condizioni per il suo utilizzo nella frode.

Riscontri clinici e anatomo-patologiche in animali di affezione esposti a mangimi contaminati

I principali segni di intossicazione descritti sono riconducibili a insufficienza renale: perdita di appetito, depressione, letargia, vomito e diarrea, disuria e cambi improvvisi nell'assunzione di acqua. L'esame strumentale ecografico rileva una ecogenicità a livello di corticale, con liquidi perirenali e dilatazione del bacinetto.

L'Associazione Americana di Diagnostica Veterinaria di Laboratorio sta censendo l'entità del fenomeno negli USA e nel Canada, anche con l'utilizzo della rete web, stimolando la segnalazione dal campo mediante una scheda disponibile al sito www.aavld.org. I principali criteri per la raccolta dati sono: 1) esposizione accertata ad uno dei mangimi ritirati dal commercio; 2) Lesioni istologiche renali compatibili con nefrosi indotta dalla presenza di cristalli di melamina a livello di tubuli 3) presenza di cristalli nelle urine; 4) conferma analitica della presenza di melamina e analoghi in mangimi, urine e tessuti

I riscontri fatti sulla presenza di cristalli bianchi a livello di tubuli renali, hanno rivelato che la composizione è al 30% melamina e al 70% composti analoghi (ammelina, ammelide, acido cianurico), con l'ipotesi che l'acido cianurico potesse essere il frutto del metabolismo batterico. Il tipo di lesione, non solo meccanica, ma anche accompagnato da necrosi, ha portato ad ipotizzare un meccanismo di tossicità potenziato, dato dalla contemporanea presenza di tali composti.

Ampia documentazione iconografica è disponibile sul sito:
<http://www.avma.org/aa/petfoodrecall/default.asp#veterinarians>

Ove possibile, si consiglia di prelevare siero e urine ante-mortem. Sulle urine è opportuno eseguire anche l'esame del sedimento. I cristalli di melamina appaiono bi-rifrangenti sotto luce polarizzata. In caso di sospetto, i campioni di alimento devono essere registrati e conservati presso il proprietario, in attesa delle analisi. L'esame necroscopico deve essere effettuato dall'anatomopatologo competente, con attenzione rivolta all'apparato urinario, acquisendo ove possibile la documentazione fotografica delle lesioni riscontrate.

Si consiglia di prelevare e fissare i reperti autoptici provenienti da polmone, cuore, fegato, milza, rene, vescica, surrenali, pancreas, tiroide e paratiroidi, ileo e cervello. Le sezioni non devono superare lo spessore di 4 mm e il rapporto fissativo/ tessuto deve essere 10: 1. Campioni di rene, fegato, grasso e urine devono essere prelevati e congelati a disposizione di saggi tossicologici in fase di sviluppo. Per evitare il dissolversi dei calcoli renali durante il fissaggio in formalina, sezioni di rene possono essere conservate in etanolo puro.

L'inclusione in paraffina deve avvenire entro 2 giorni dal fissaggio, per evitare il dissolversi dei cristalli. La colorazione ematossilina/eosina risulta adeguata per l'identificazione dei focolai di necrosi e dei calcoli, che possono essere meglio evidenziati mediante la colorazione argentea di Gomori o mediante esame a luce polarizzata. I cristalli sono evidenti anche su sezioni fissate o congelate, con o senza colorazione.

Va tenuta presente la diagnosi differenziale con altre cause, quali enterite da parvovirus, malattia cronica tubulo-interstiziale, linfosarcoma e avvelenamento da glicole etilenico.

Metodi di analisi.

La FDA ha recentemente implementato un metodo per l'analisi di melamina e analoghi in mangimi, mediante spettrometria di massa abbinata alla gas cromatografia. Tale metodo prevede un limite di identificazione di 10 ppm, corrispondente ad una contaminazione nel mangime nell'ordine del 0,01%.

Fonti bibliografiche

<http://www.avma.org/>

<http://www.efsa.europa.eu/it.html>

<http://www.fda.gov/default.htm>

<http://www.usda.gov/wps/portal/usdahome?contentidonly=true&contentid=2007/05/0129.xml>

Clark, R. 1966. Melamine crystalluria in sheep. *Journal South African Veterinary Medical Assoc.*, 1966, Vol. 37, pp. 349-351.

Lahalih SM, Absi-Halabi M, (1989). Recovery of solids from melamine waste effluents and their conversion to useful products", *Industrial & Engineering Chemistry Research*, vol.28, 500-504

Newton G.L. and Utey P.R. 1978 Melamine as a dietary nitrogen source for ruminants", *Journal of Animal Science*, vol.47, p1338-44,

Mast RW *et al.* (1983). Metabolism, disposition and excretion of [¹⁴C]melamine in male Fischer 344 rats". *Food and Chemical Toxicology* 21 (6): 807-810.

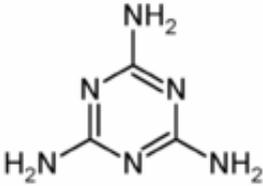
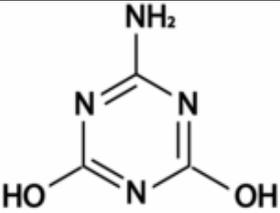
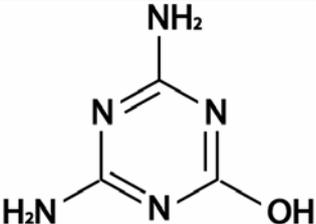
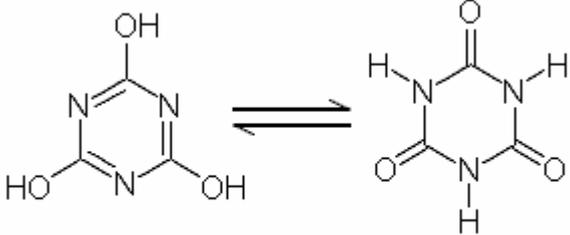
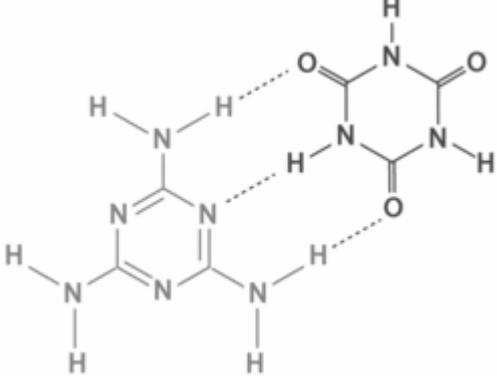
Lipschitz W.L., Stokey E. (1945) The mode of action of three new diuretics: melamine, adenine and formoguanamine, *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, Vol. 83, 235-249,

Babayan A.A., Aleksandryan A.V.,(1985) Toxicological characteristics of melamine cyanurate, melamine and cyanuric acid", Zhurnal Eksperimental'noi i Klinicheskoi Meditsiny, Vol.25, 345-9 abstract disponibile in inglese

Heck HD and Tyl RW (1985) The induction of bladder stones by terephthalic acid, dimethyl terephthalate, and melamine (2,4,6-triamino-s-triazine) and its relevance to risk assessment.". Regul Toxicol Pharmacol. 5 (3): 294-313.

Ishiwata H., Inoue T. , Yamazaki T., Yoshihira, K. (1987) Liquid chromatographic determination of melamine in beverages", J. Assoc. Off. Anal. Chem. Vol.70, 457-60 ^ J.V. Sancho, M. Ibanez, S. Grimalt, O. Pozo J., Hernandez F.,(2005) Residue determination of cyromazine and its metabolite melamine in chard samples by ion-pair liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry", Analytica Chimica Acta.530, p237-243

Formule di struttura di melamina e composti analoghi

	<p>Melamina</p> <p>1,3,5-Triazine-2,4,6-triamine CAS 108-78-1 Formula bruta C₃H₆N₆ Peso Molecolare 126.12</p>
	<p>Ammelide</p> <p>6-Amino-2,4-Dihydroxy-1,3,5-Triazine CAS 645-93-2 Formula bruta C₃H₄N₄O₂ Peso molecolare 128.09</p>
	<p>Ammelina</p> <p>4,6-Diamino-2-Hydroxy-1,3,5-Triazine CAS 645-92-1 Formula bruta C₃H₅N₅O Peso molecolare 127.11</p>
 <p>s-triazine-2,4,6-triol s-triazine-2,4,6-trione</p>	<p>Acido Cianurico (forme in equilibrio)</p> <p>s-triazine -2,4,6- triol s-triazine-2,4,6-trione CAS 108-80-5 Peso molecolare 129.09</p>
	<p>Interazioni ioniche (rappresentate dalle linee tratteggiate) tra melamina e acido cianurico, per la possibile formazione di cristalli</p>