




RICERCA DI BIOTOSSINE ALGALI - MOUSE TEST

CLASSIFICAZIONE-LIMITI DI LEGGE-SVANTAGGI

P. Fatighenti – N. Corsaro
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO LAZIO E TOSCANA
PISA, 17 dicembre 2014

INTRODUZIONE

- Le **biotossine algali** sono metaboliti secondari di alcune specie di macro- e microalghe (fitoplancton potenzialmente tossico) che si possono accumulare nella catena alimentare in molluschi, crostacei, alcuni pesci ed infine nell'uomo causando vari disturbi gastrointestinali e neurologici.

- 
- Utilizzando **metodi di ricerca biologici** (mouse test) e **metodi chimici** (LC-MS/MS, HPLC) si può conoscere l'eventuale presenza di qualsiasi componente tossica presente in tali matrici alimentari.

- Gli stabilimenti adibiti all'allevamento di molluschi bivalvi filtratori (ostriche, cozze, ecc.), echinodermi, tunicati e gasteropodi marini, sono periodicamente monitorati come definito dai **REG. CE 853 e 854/2004**, dal **REG. CE 2074/2005**, dal **REG. UE 15/2011** e succ. modifiche e integrazioni.

La seguente presentazione ha lo scopo di **descrivere i metodi di ricerca** delle biotossine algali e le **quantità limite**, regolamentate dalle normative sanitarie comunitarie.

REGOLAMENTI COMUNITARI

REG (CE) 853/2004

NORME SPECIFICHE IN MATERIA DI IGIENE PER GLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE

Sezione VII Cap V: Norme sanitarie per i molluschi bivalvi vivi

Sezione VIII Cap V: Norme sanitarie per i prodotti della pesca

REG (CE) 854/2004

NORME SPECIFICHE PER L'ORGANIZZAZIONE DEI CONTROLLI UFFICIALI SUI PRODOTTI DI ORIGINE ANIMALE DESTINATI AL CONSUMO UMANO

Allegato II: Molluschi bivalvi vivi Capo II- Classificazione e monitoraggio delle zone di stabulazione e produzione

Allegato III: Prodotti della pesca Capo II – Residui e contaminanti, controlli microbiologici, parassiti...

REG (CE) 882/2004

Norme relative ai Controlli Ufficiali...in materia di mangimi e di alimenti

REG (CE) 2074/2005

Modalità di attuazione dei Reg 853 e 854/2004

Allegato III - Metodi di analisi per le biotossine marine (per le tossine lipofile in vigore fino al 31 dicembre 2014).

REG. UE 15/2011

METODI DI ANALISI UFFICIALI PER LA RILEVAZIONE DELLE BIOTOSSINE MARINE LIPOFILE NEI MOLLUSCHI BIVALVI VIVI

In vigore dal 1 luglio 2011.

REG. CE 852/2004

Articolo 1

.....

a) la responsabilità principale per la sicurezza degli alimenti incombe all'operatore del settore alimentare;

b) è necessario garantire la sicurezza degli alimenti lungo tutta la catena alimentare, a cominciare dalla produzione primaria;

Articolo 3

Obblighi generali

Gli operatori del settore alimentare garantiscono che tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione degli alimenti sottoposte al loro controllo soddisfino i pertinenti requisiti di igiene fissati nel presente regolamento.

Articolo 4

Requisiti generali e specifici in materia d'igiene

.....

3. Gli operatori del settore alimentare se necessario adottano le seguenti misure igieniche specifiche:

a) rispetto dei criteri microbiologici relativi ai prodotti alimentari;

b) le procedure necessarie a raggiungere gli obiettivi fissati per il conseguimento degli scopi del presente regolamento;

c) rispetto dei requisiti in materia di controllo delle temperature degli alimenti;

d) mantenimento della catena del freddo;

e) campionature e analisi.

ORIGINE DEI CAMPIONI

- ✓ **ASL (Aziende Sanitarie Locali):**
 - a) **classificazione**
 - b) **monitoraggio**
 - c) **vigilanza**
- ✓ **P.I.F. (Posto di Ispezione Frontaliera – Veterinario di Porto)**
- ✓ **U.V.A.C. (Uffici Veterinari per gli Adempimenti Comunitari)**
- ✓ **N.A.S. (Nucleo Antisofisticazione e Sanità dell'Arma dei Carabinieri)**

CLASSIFICAZIONE

SOLUBILITÀ

- **TOSSINE IDROSOLUBILI (AMMINOACIDI, STX, ECC.)**
- **TOSSINE LIPOSOLUBILI (POLIETERI: DSP, NSP, CIGUATOSSINE)**

STRUTTURA CHIMICA

- **AMMINOACIDI (ASP)**
- **PURINE E DERIVATI PURINICI (ES. SAXITOSSINE E PSP)**
- **IMINE**
- **POLIETERI (DSP, NSP)**

PROPRIETÀ CHIMICHE E FUNZIONALI

- **DIARROICHE (DSP: gruppo di ~ 23 polieteri)**
- **AMNESICHE (ASP: gruppo di 10 amino-acidi acidici della classe AD)**
- **NEUROTOSSICHE (NSP: gruppo di ~ 10 polieteri ciclici)**
- **AZASPIRACIDI (AZP: gruppo di ~ 5 composti policiclici)**
- **PARALITICHE (PSP: gruppo di 21 tetraidropurine)**
- **CIGUATOSSINE (CFP: gruppo di ~ 20 polieteri)**

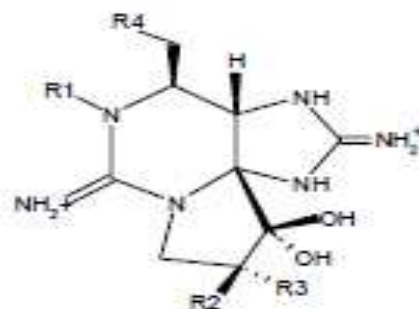
CLASSIFICAZIONE F.A.O.

MARINE BIOTOXINS – FAO 2004

- 1) **PARALYTIC SHELLFISH POISONS (PSP)**
21 tetraidropurine (es. saxitossina, STX) idrosolubili prodotte da dinoflagellati (**Alexandrium spp.**)
- 2) **DIARRHOEIC SHELLFISH POISONS (DSP)**
~ 23 polieteri stabili al calore e composti lipofili associati a dinoflagellati (**Dinophysis spp.** e **Prorocentrum spp.**)
- 3) **AMNESIC SHELLFISH POISONS (ASP)**
~ 10 aminoacidi acidi idrosolubili (es. AD) prodotti da macro-alghe come le alghe rosse (**Chondria spp.** e **Alsidium spp.**) e micro-alghe come **Pseudonitzschia spp.**
- 4) **NEUROLOGIC SHELLFISH POISONS (NSP)**
~ 10 polieteri ciclici prodotti da dinoflagellati (**Gymnodinium spp.**) + 4 metaboliti di brevetossine
- 5) **AZASPIRACID SHELLFISH POISONS (AZP)**
~ 5 composti policiclici complessi associati a **Protopteridinium spp.**
- 6) **CIGUATERA FISH POISONS (CFP)**
~ 20 polieteri liposolubili stabili al calore associati a dinoflagellati (**Gambierdiscus toxicus**, **Prorocentrum spp.**, **Gymnodinium spp.** e **Gonyaulax spp.**)

STRUTTURA CHIMICA DELLE TOSSINE PSP

Figure 2.1 Chemical structures of PSP toxins



R_1	R_2	R_3	$R_4 =$	$R_4 =$	$R_4 =$ OH	$R_4 =$ H
H	H	H	carbamate toxins	N-sulfo-carbamoyl toxins	decarbamoyl toxins	deoxy-decarbamoyl toxins
H	H	OSO ₃ ⁻	STX	GNTX5(B1)	dcSTX	doSTX
H	OSO ₃ ⁻	H	GNTX2	C1	dcGNTX2	
OH	H	H	GNTX3	C2	dcGNTX3	
OH	H	OSO ₃ ⁻	neoSTX	GNTX6(B2)	dcneoSTX	doneoSTX
OH	OSO ₃ ⁻	H	GNTX1	C3	dcGNTX1	doGNTX1
			GNTX4	C4	dcGNTX4	

Source: Mons *et al.*, 1998; Quilliam *et al.*, 2001

TOSSICITÀ DELLE TOSSINE PSP

Table 2.2 Acute toxicity of STX in mice (Mons et al., 1998)

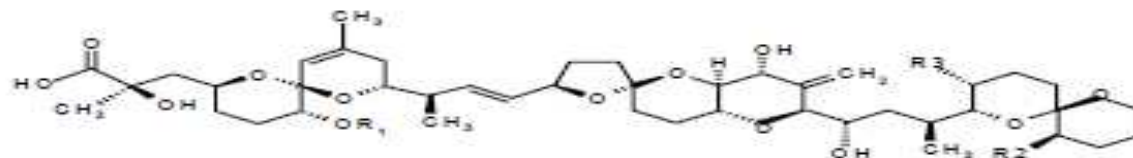
Route	LD ₅₀ in µg/kg bw
oral	260-263
intravenous	2.4-3.4
intraperitoneal	9.0-11.6

Table 2.3 Oral LD50 values of STX in various species (Mons et al., 1998)

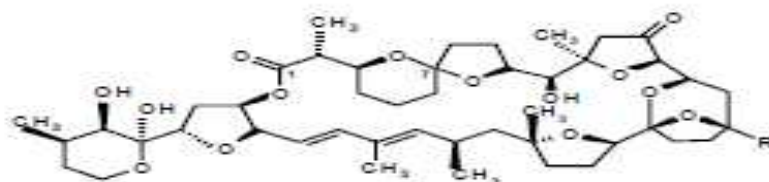
Oral route	LD ₅₀ in µg/kg bw
rat	192-212
monkey	277-800
cat	254-280
rabbit	181-200
dog	180-200
guinea pig	128-135
pigeon	91-100

STRUTTURA CHIMICA DELLE TOSSINE DSP

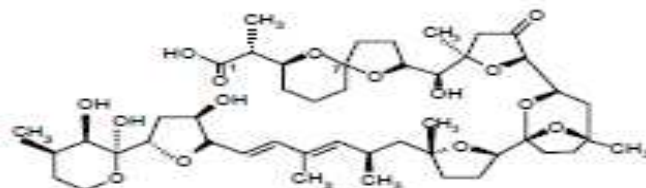
Figure 3.1 Chemical structures of okadaic acid, dinophysistoxins and pectenotoxins



	R1	R2	R3
okadaic acid (OA)	H	H	CH ₃
dinophysistoxin-1 (DTX1)	H	CH ₃	CH ₃
dinophysistoxin-2 (DTX2)	H	CH ₃	H
dinophysistoxin-3 (DTX3)	acyl	CH ₃	CH ₃



	R	C-7
pectenotoxin-1 (PTX1)	CH ₂ OH	R
pectenotoxin-2 (PTX2)	CH ₃	R
pectenotoxin-3 (PTX3)	CHO	R
pectenotoxin-4 (PTX4)	CH ₂ OH	S
pectenotoxin-5 (PTX5)	COOH	R
pectenotoxin-7 (PTX7)	COOH	S



	C-7
pectenotoxin-2 seco acid (PTX2SA)	R
7-epi-PTX2SA	S

Source: Yasumoto *et al.*, 2001

TOSSICITÀ DELLE TOSSINE DSP

Table 3.1 Acute toxicity (lethal dose) of DSP toxins after i.p. injection in mice

Toxin	toxicity ($\mu\text{g/kg}$ bw)	pathological effects
Okadaic acid (OA)	200	diarrhoea
Dinophysistoxin-1 (DTX1)	160-200**	diarrhoea
Dinophysistoxin-3 (DTX3)	500	diarrhoea
Pectenotoxin-1 (PTX1)	250	hepatotoxic
Pectenotoxin-2 (PTX2)	230-260**	hepatotoxic*
Pectenotoxin-3 (PTX3)	350	hepatotoxic*
Pectenotoxin-4 (PTX4)	770	hepatotoxic*
Pectenotoxin-6 (PTX6)	500	hepatotoxic*
Yessotoxin (YTX)	100** 100-214*** 286 *** (LD ₅₀)	cardiotoxic [#]
45-OH yessotoxin (OH-YTX)	100	hepatotoxic [@]

Source: Van Egmond *et al.*, 1993 and Ritchie, 1993 (except as indicated)

* presumed from the toxicity of PTX1

** fasted suckling male mice: at 80 $\mu\text{g/kg}$ bw 1/3 mice died, at 100 $\mu\text{g/kg}$ bw all 3 mice died (Ogino *et al.*, 1997)

*** fasted male mice (Aune *et al.*, 2002)

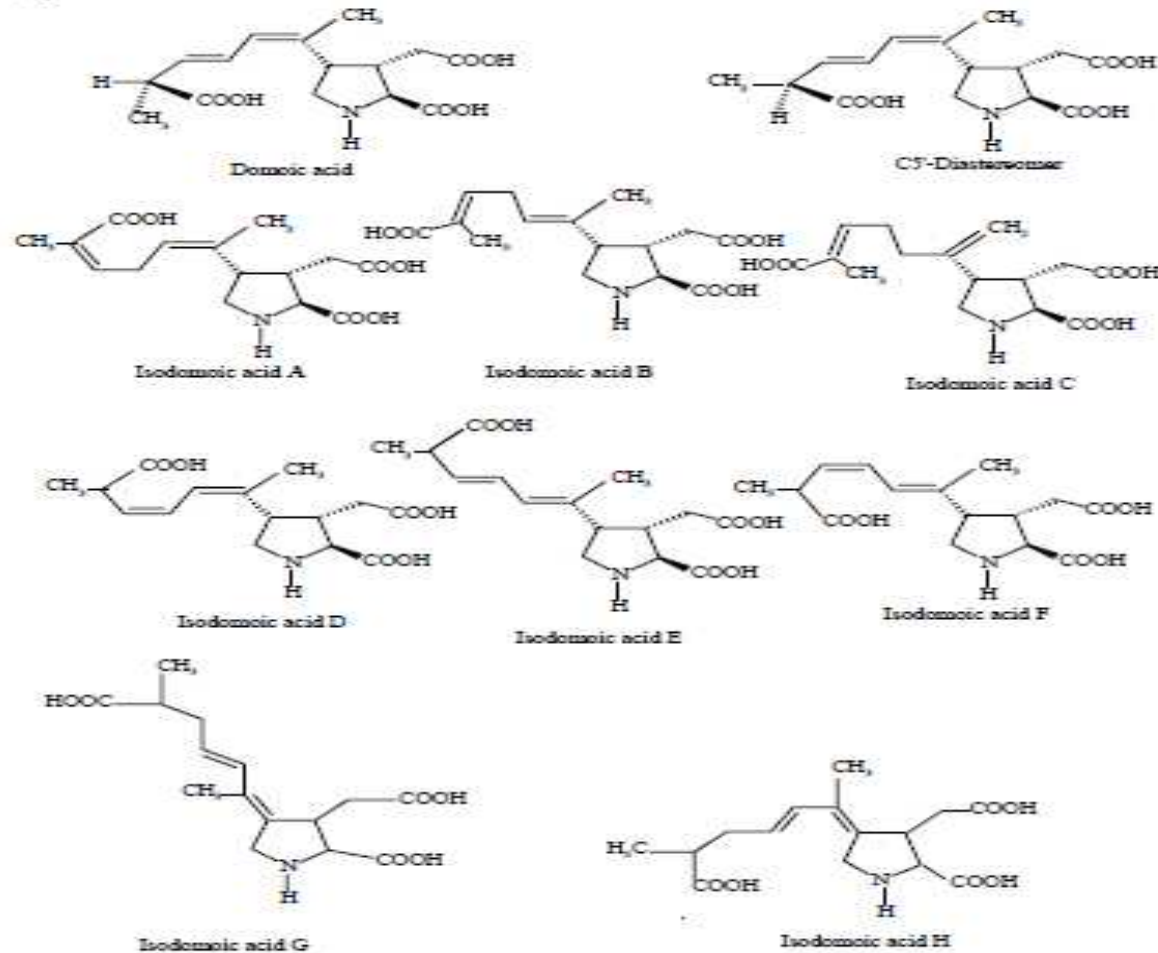
* data indicate damage to the heart

** Ogino *et al.* (1997)

@ data indicate damage to the liver

STRUTTURA CHIMICA DELLE TOSSINE ASP

Figure 4.1 Chemical structures of domoic acid and its isomers



TOSSICITÀ DELLE TOSSINE ASP

La **LD₅₀** per **via intra-peritoneale** nel topo è di 3,6 mg di AD/Kg pe

Nell'**UOMO** l'**ACIDO DOMOICO (AD)** è tossico sia per il sistema nervoso centrale che periferico, producendo una sindrome di neuropatia, amnesia, vomito, crisi epilettiche, coma e morte.

A causa dei suoi effetti sulla memoria le intossicazioni da AD sono denominate Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)

STRUTTURA CHIMICA DELLE TOSSINE NSP

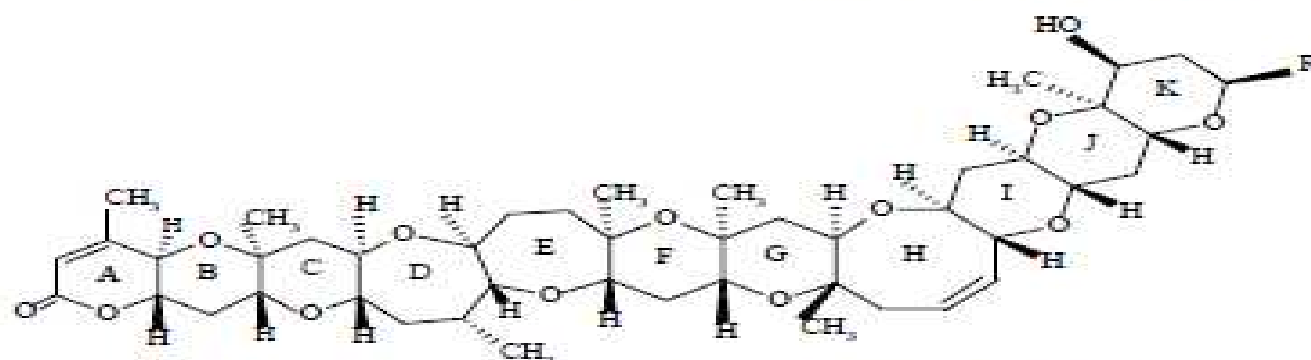
Figure 5.1 Chemical structures of type A and B brevetoxins (Hua et al., 1996)



Type 1 (A) brevetoxins:

PbTx-1,
PbTx-7,
PbTx-10,

$R = \text{CH}_2\text{C}(=\text{CH}_2)\text{CHO}$
 $R = \text{CH}_2\text{C}(=\text{CH}_2)\text{CH}_2\text{OH}$
 $R = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$



Type 2 (B) brevetoxins:

PbTx-2
oxidized PbTx-2
PbTx-3
PbTx-8
PbTx-9
PbTx-5
PbTx-6

$R = \text{CH}_2\text{C}(=\text{CH}_2)\text{CHO}$
 $R = \text{CH}_2\text{C}(=\text{CH}_2)\text{COOH}$
 $R = \text{CH}_2\text{C}(=\text{CH}_2)\text{CH}_2\text{OH}$
 $R = \text{CH}_2\text{COCH}_2\text{Cl}$
 $R = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$
the K-ring acetate of PbTx-2
the H-ring epoxide of PbTx-2

TOSSICITÀ DELLE TOSSINE NSP

Table 5.1 Acute toxicity of brevetoxins in Swiss mice

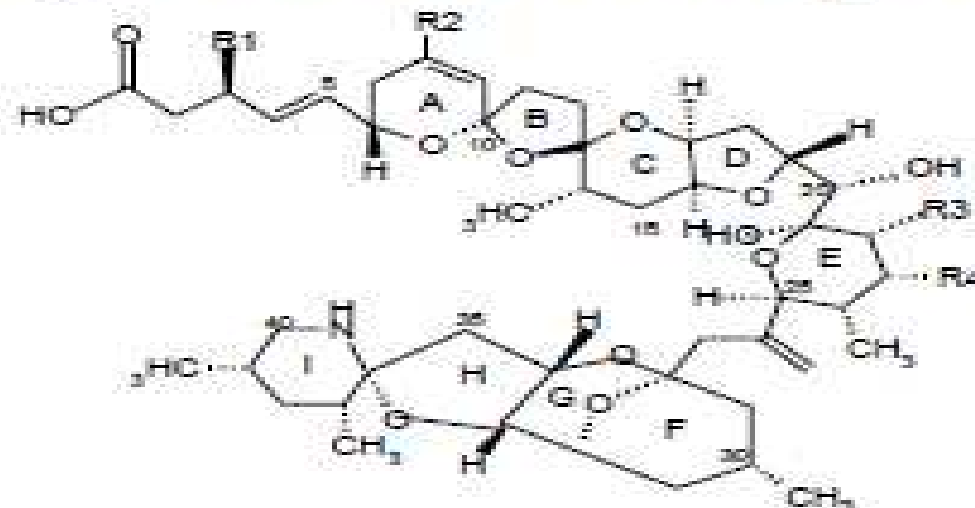
brevetoxins	route	observation time (hours)	LD ₅₀ value µg/kg bw	vehicle	reference
PbTx-1	intraperitoneal	24	> 100	0.9% saline + 0.1% Tween 60	Dechraoui <i>et al.</i> , 1999
PbTx-3	oral (females)	24	520	0.9% saline	Baden and Mende, 1982
PbTx-3	intraperitoneal (females)	24	170	0.9% saline	Baden and Mende, 1982
PbTx-3	intravenous (females)	24	94	0.9% saline	Baden and Mende, 1982
PbTx-	oral (females)	24	6 600	0.9% saline	Baden and Mende, 1982
PbTx-2	intraperitoneal (females)	24	200	0.9% saline	Baden and Mende, 1982
PbTx-2	intravenous (females)	24	200	0.9% saline	Baden and Mende, 1982

Table 5.2 Acute intraperitoneal toxicity of brevetoxin analogues in mice

brevetoxin analogues	route	survival time	minimum lethal dose µg/kg bw	vehicle	reference
BTX-B1	intraperitoneal	< 2 hours	50	methanol	Ishida <i>et al.</i> , 1995; 1996
BTX-B2	intraperitoneal	< 1 hour	306	water	Morohashi <i>et al.</i> , 1999; Murata <i>et al.</i> , 1998
BTX-B3	intraperitoneal	no deaths within 24 hours	>300	unknown	Morohashi <i>et al.</i> , 1995
BTX-B4	intraperitoneal	6-24 hours	100	1% Tween 60	Morohashi <i>et al.</i> , 1999

STRUTTURA CHIMICA DELLE TOSSINE AZP

Figure 6.1 Chemical structures of azaspiracids



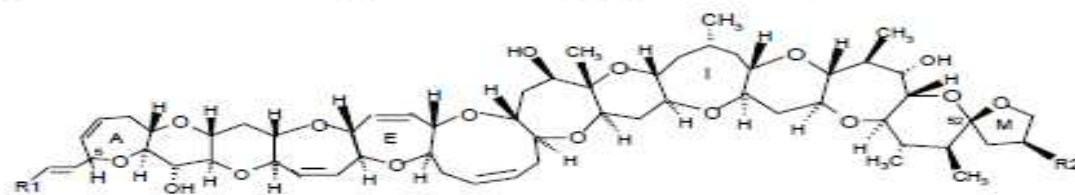
	R_1	R_2	R_3	R_4
azaspiracid (AZA)	H	H	CH ₃	H
azaspiracid-2 (AZA2)	H	CH ₃	CH ₃	H
azaspiracid-3 (AZA3)	H	H	H	H
azaspiracid-4 (AZA4)	OH	H	H	H
azaspiracid-5 (AZA5)	H	H	H	OH

TOSSICITÀ DELLE TOSSINE AZP

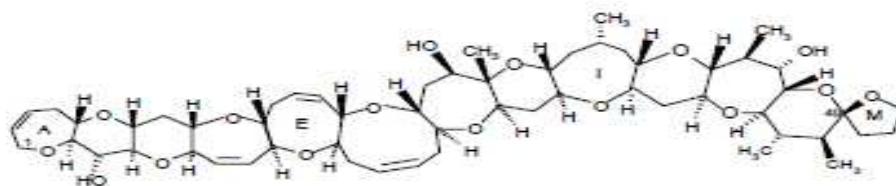
- Gli studi di **tossicità acuta** nel topo hanno dimostrato una **LD₅₀** per **via intra-peritoneale** di 150 µg/kg pe di KILLARY TOXIN 3 (KT 3 o AZA) (Satake et al. 1998)

STRUTTURA CHIMICA DELLE CIGUATOSSINE

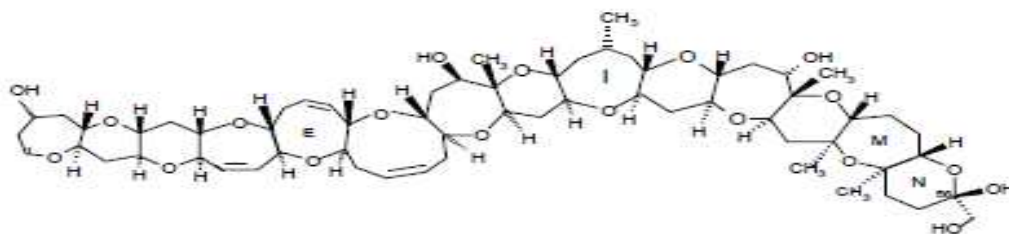
Figure 7.1 Structure of Pacific (P) and Caribbean (C) ciguatoxins (CTXs)



	<u>R1</u>	<u>R2</u>
P-CTX-1:	$^1\text{CH}_2\text{OHCHOH}$	OH
P-CTX-3 (P-CTX-2):	$^1\text{CH}_2\text{OHCHOH}$	H
P-CTX-4B (P-CTX-4A):	$^1\text{CH}_2\text{OH}$	H



P-CTX-3C



C-CTX-1 (C-CTX-2)

The energetically less favoured epimers, P-CTX-2 (52-epi P-CTX-3), P-CTX-4A (52-epi P-CTX-4B) and C-CTX-2 (56-epi C-CTX-1) are indicated in parenthesis. 2,3-Dihydroxy P-CTX-3C and 51-hydroxy P-CTX-3C have also been isolated from Pacific fish (Lewis, 2001).

TOSSICITÀ DELLE TOSSINE CFP

Table 7.2 ⁽¹⁾ Effects of ciguatoxins (CTXs), gambiertoxins (GTXs) and maitotoxins (MTXs) administered intraperitoneally (i.p.) to (18-)20 g mice

Toxin	ip. LD ₅₀ (µg/kg bw)	MU ⁽²⁾ (ng)	Signs of intoxication	Min. / max. time to death ⁽³⁾
P-CTX-1	0.25	5	hypothermia below 33°C, piloerection, diarrhoea, lachrymation, hypersalivation, dyspnoea, wobbly upright gait, gasping, terminal convulsions with tail arching, death from respiratory failure	37 min./≈ 24 h
CTX-1B	0.33			mean survival time 10-20 h ⁶
P-CTX-2	2.3	9	as for P-CTX-1, plus progressive hind limb paralysis	53 min./≈ 100 h
CTX-2A2	1.9			mean survival time 10-20 h ⁶
CTX-2A1	3.5			mean survival time 3.5-4.5 h ⁶
P-CTX-3	0.9	18	as for P-CTX-1, plus progressive hind limb paralysis	60 min./≈ 26 h
CTX-3C	2.5			mean survival time 10-20 h ⁶
GTX-3C	1.3	26		
CTX-4B	10			mean survival time 3.5-4.5 h ⁶
GTX-4B	4.0	80	as for P-CTX-1, plus hind limb paralysis	
MTX-1 ⁽⁴⁾	0.05	1	hypothermia, piloerection, dyspnoea, progressive paralysis from hind extending to fore limbs, mild gasping, mild convulsions preceding death > 30 seconds	72 min./≈ 72 h
MTX-2 ⁽⁴⁾	0.08	1.6	as for MTX-1	41 min./≈ 72 h
MTX-3 ⁽⁴⁾	≈ 0.1	≈ 2	as for MTX-1	72 min./≈ 72 h
C-CTX-1 ⁽⁵⁾	3.6			
C-CTX-2 ⁽⁷⁾	1			

⁽¹⁾ Hallegraef *et al.* (1995).

⁽²⁾ Mouse unit is 1/50 x LD₅₀ (~1 MU is the LD₅₀ dose for a 20 g mouse) (Lewis and Sellin, 1992)

⁽³⁾ Minimum time to death estimated; maximum time to death estimated from effects of doses near the LD₅₀ dose (De Fouw *et al.*, 2001).

⁽⁴⁾ From *Gambierdiscus toxicus* but are unlikely to accumulate in flesh of fish to levels toxic for humans via the oral route. MTXs can induce slight watery anal secretion, but do not cause diarrhoea.

⁽⁵⁾ Fouw *et al.* (2001).

⁽⁶⁾ Dechraoui *et al.* (1999).

⁽⁷⁾ Lehane and Lewis (2000).

METODI DI ANALISI

- **METODI BIOLOGICI :**

SAGGI IN VIVO

SAGGI IN VITRO

- **METODI BIOCHIMICI:**

IMMUNODOSAGGI

SAGGI ENZIMATICI

- **METODI CHIMICI:**

CROMATOGRAFICI

SPETTROMETRICI

METODI UFFICIALI DI ANALISI

REG (CE) 2074/2005 E REG. UE 15/2011

- **METODO DI DETERMINAZIONE DELLE TOSSINE PSP:**
 - MOUSE TEST
- **METODO DI DETERMINAZIONE DELLE TOSSINE ASP:**
 - CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE (HPLC)
- **METODI DI DETERMINAZIONE DELLE TOSSINE LIPOFILE:**
 - MOUSE TEST fino al 31 dicembre 2014
 - METODO LC-MS/MS DEL LABORATORIO UE DI RIFERIMENTO dal 1 gennaio 2015

LIMITI DEI METODI

- **METODI DI DETERMINAZIONE CHIMICA STRUMENTALE:**

VANTAGGI:

NON PRESENTANO PROBLEMATICHE DI ETICA

SVANTAGGI:

**COMPLESSITÀ DI ESECUZIONE PER LA GRANDE VARIETÀ DELLE COMPONENTI
(31 tipi di tossine idrofile e almeno 58 tipi di tossine lipofile);**

COSTOSITÀ;

RICHIEDONO LA DISPONIBILITÀ DI STANDARDS

- **MOUSE TEST:**

VANTAGGI:

**PERMETTE DI CONOSCERE LA PRESENZA DI QUALSIASI TIPO DI COMPONENTE
TOSSICA IDROFILA E LIPOFILA PRESENTE NEL CAMPIONE IN ESAME**

MENO COSTOSO

SVANTAGGI:

**PRESENZA DI FALSI POSITIVI
PROBLEMATICHE DI ETICA**

QUANTITÀ LIMITE

REGOLAMENTATE DALLE NORME SANITARIE

REG. CE 853/2004

I molluschi bivalvi vivi non devono contenere biotossine marine in quantità totali superiori ai seguenti limiti:

- 1) PSP: 800 µg/Kg pe;**
- 2) ASP: 20 mg di ac. domoico /Kg pe;**
- 3) Ac. Okadaico, dinophysitossine e pectenotossine complessivamente: 160 µg di equivalente ac. Okadaico/Kg pe;**
- 4) Yessotossine: 3,75 mg di equivalente yessotossine/Kg pe (Reg. UE 786/2013);**
- 5) Azaspiracidi: 160 µg di equivalente azaspiracido/kg pe.**

METODO UFFICIALE ACCREDITATO POS MIC 034 NOR BIOTOSSINE LIPOSOLUBILI

- PROCEDURA APPLICABILE A MOLLUSCHI BIVALVI, ECHINODERMI, TUNICATI E GASTEROPODI MARINI VIVI, CONGELATI E COTTI
- IL METODO È IN GRADO DI RILEVARE:
 - AOs, DTXs, PTXs a livelli uguali o superiori a 160 µg di OA eq/kg;
 - YTXs anche a livelli inferiori a quelli regolamentati;
 - AZAs;
 - brevitossine, gymnodimine, spirolidi, pinnatossina;
 - ciguatossina;
 - palitossina.

La procedura è basata sul metodo di Yasumoto et al.
American Chemical Society, 1984

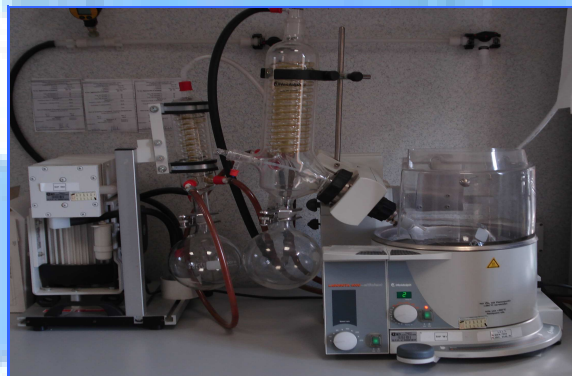
BIOTOSSINE LIPOSOLUBILI

POS MIC 034 NOR

- 1) **PREPARAZIONE DEL CAMPIONE**
(100g di omogenato + 50g di scorta per CRM)



- 2) **ESTRAZIONE DEI COMPOSTI LIPOFILICI**
il metodo si basa sull'estrazione in 500 ml di acetone seguita da partizione tra dietil-etero o diclorometano e acqua;
la fase organica viene distillata e raccolto il residuo con 4ml di tween 60 1% p/v.



BIOTOSSINE LIPOSOLUBILI

POS MIC 034 NOR

3) INOCULAZIONE INTRAPERITONEALE DEGLI ANIMALI

vengono selezionati 3 topi
di peso corporeo tra 17-21g
e viene inoculato 1 ml
di materiale estratto
a ciascun topo



4) OSSERVAZIONE NELLE 24h:

- il test è positivo se si osserva la morte di 2 topi su 3 entro le 24h e indica la presenza di una o più tossine lipofile a livelli superiori del
REG. CE 853/2004;

- il test è negativo se sopravvivono 2 topi su 3 entro le 24h

NOTA: se il test è positivo il saggio non è concluso ed il campione è sottoposto a metodo di conferma ai sensi del REG. CE 2074/2005 e

**L'ALIQUOTA DI SCORTA VIENE INVIATA PER CONFERMA E QUANTIFICAZIONE AL CRM C/O
LABORATORIO ACCREDITATO CON METODO LC-MS/MS**

IL METODO BIOLOGICO PUÒ ESSERE UTILIZZATO FINO AL 31 DICEMBRE 2014



METODO UFFICIALE ACCREDITATO POS MIC 034 NOR PARALYTIC SHELLFISH POISON (PSP)

- PROCEDURA APPLICABILE A MOLLUSCHI BIVALVI, ECHINODERMI, TUNICATI E GASTEROPODI MARINI VIVI, CONGELATI E COTTI
- IL METODO RILEVA BIOTOSSINE ALGALI TIPO PARALYTIC SHELLFISH POISON (PSP) SECONDO I REG. CE 853/2004 E 2074/2005
- È ESCLUSO DAL CAMPO DI APPLICAZIONE IL CALCOLO DELLA TOSSICITÀ ESPRESSO IN $\mu\text{g/Kg}$ EQUIVALENTE
- SI BASA SULL'EFFETTO DELLA TOSSICITÀ ACUTA IN TOPI ADULTI DOPO INOCULAZIONE INTRAPERITONEALE DI UN ESTRATTO ACIDO DEL CAMPIONE

PARALYTIC SHELLFISH POISON (PSP)

POS MIC 034 NOR

- 1) **PREPARAZIONE DEL CAMPIONE**
(100g di materiale omogenato + 50g di scorta per CRM)



- 2) **ESTRAZIONE ACIDA**
(a 100g di campione sono aggiunti 100ml di HCl 0,1M; la soluzione ottenuta si aggiusta a $2 < \text{pH} < 4$ e si porta ad ebollizione per 5 minuti; si raffredda a temperatura ambiente e si verifica nuovamente il pH nel range $2 < \text{pH} < 4$; si porta la miscela ottenuta a 200ml con acqua distillata, si omogenizza di nuovo e si lascia decantare la parte solida)



PARALYTIC SHELLFISH POISON (PSP)

POS MIC 034 NOR

3) INOCULAZIONE DEGLI ANIMALI

(vengono selezionati 2 topi del peso di 19-21g e viene inoculato per via intra-peritoneale 1 ml del campione estratto ad ognuno dei topi)



4) OSSERVAZIONE PER 60 MINUTI

(gli animali sono attentamente osservati per i primi 10 minuti; quindi le osservazioni si effettuano ad intervalli di 15 minuti fino allo scadere della prima ora)

5) ESPRESSIONE DEI RISULTATI

PSP non determinabili/PSP determinabili

PARALYTIC SHELLFISH POISON (PSP)

POS MIC 034 NOR

ESPRESSIONE DEI RISULTATI

- **Se entrambi i topi inoculati sopravvivono** oltre 60 minuti la concentrazione delle tossine è **inferiore al limite di rilevabilità**.

Pertanto è riportato sul rapporto di prova:

Paralytic Shellfish Poison: NON DETERMINABILI

- **In caso di morte entro 60 minuti** dall'inoculazione la concentrazione delle tossine può essere determinata.

Pertanto sul rapporto di prova è riportato:

Paralytic Shellfish Poison: DETERMINABILI

NOTA: **se il test è positivo** il campione è sottoposto a **metodo chimico** per la rilevazione della saxitossina e dei suoi analoghi ai sensi del REG. CE 2074/2005.

Quindi:

**L'ALiquota di scorta viene inviata per la quantificazione al CRM C/O
LABORATORIO NAZIONALE DI RIFERIMENTO PER LE BIOTOSSINE MARINE**

I risultati sono espressi in **µg di STX dihydrochloride equivalenti/kg di pe**

- **In caso di contestazione dei risultati il metodo di riferimento è il metodo biologico.**



GRAZIE

PER L'ATTENZIONE