

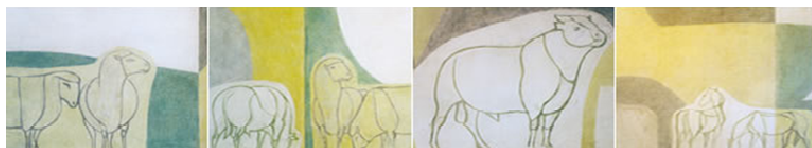
# BIOTOSSINE ALGALI

## CLASSIFICAZIONE E TOSSICITA'



*Lafrance06 – [www.lafranceart.com](http://www.lafranceart.com)*

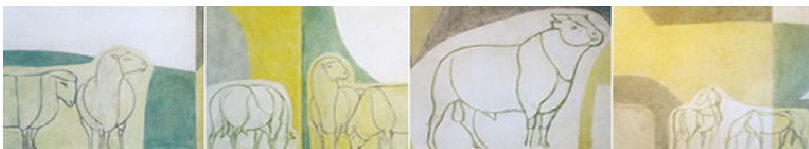
**Viaggio al centro della Direzione Operativa Chimica**



**Roma, 27/11/2012 – Ilaria Perini**

# INDICE

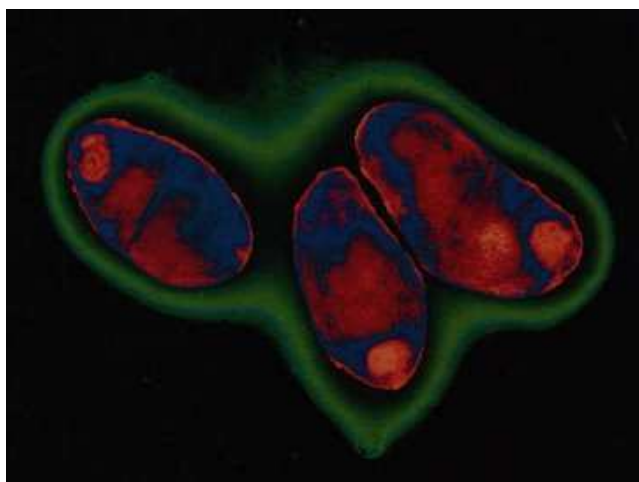
- 👉 Biotossine algali
- 👉 Normativa riguardante i molluschi bivalvi e le tossine algali
- 👉 Metodi di analisi normati
- 👉 Metodi di analisi utilizzati nella D.O.C.



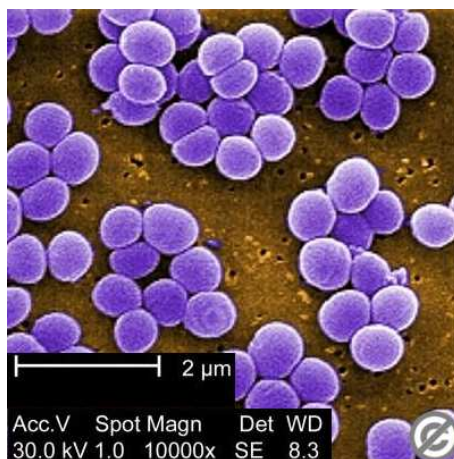
Roma, 27/11/2012 – Ilaria Perini

# Cosa sono le biotossine?

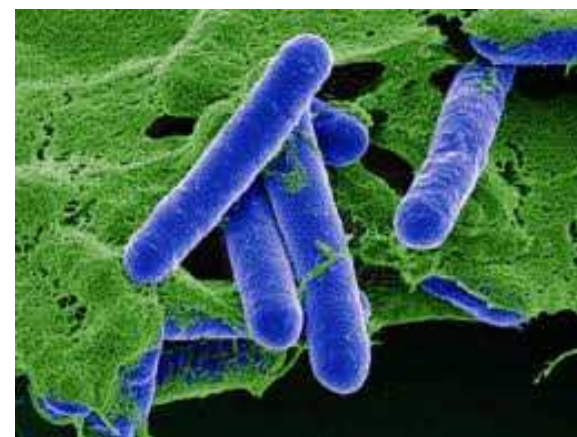
**Biotossina** ➡ sostanza prodotta da un organismo vivente capace di indurre, anche a bassa concentrazione, manifestazioni fisiologiche dannose per alcune specie viventi.



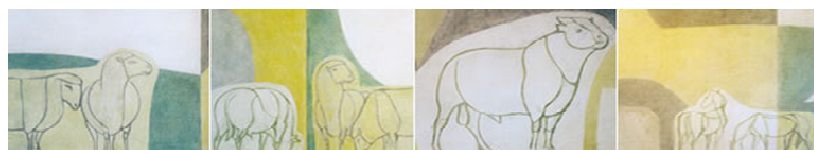
Tossina difterica



Staphylococcus aureus



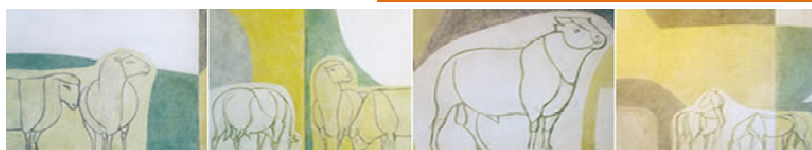
Tossina botulinica



# Le biotossine algali marine

Sono sostanze tossiche prodotte dalla fioritura di alghe unicellulari:

- **dinoflagellati** (*Alexandrium*, *Gymnodinium* e *Dinophysis*);
- **diatomee** (*Nitzschia*).





# Le biotossine algali marine

Possono essere presenti in diverse specie di molluschi bivalvi filtratori:



Ostriche



Cozze



Pettini



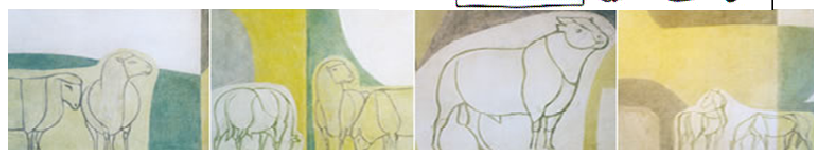
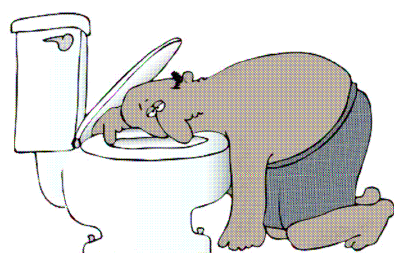
Vongole



Cannolicchi

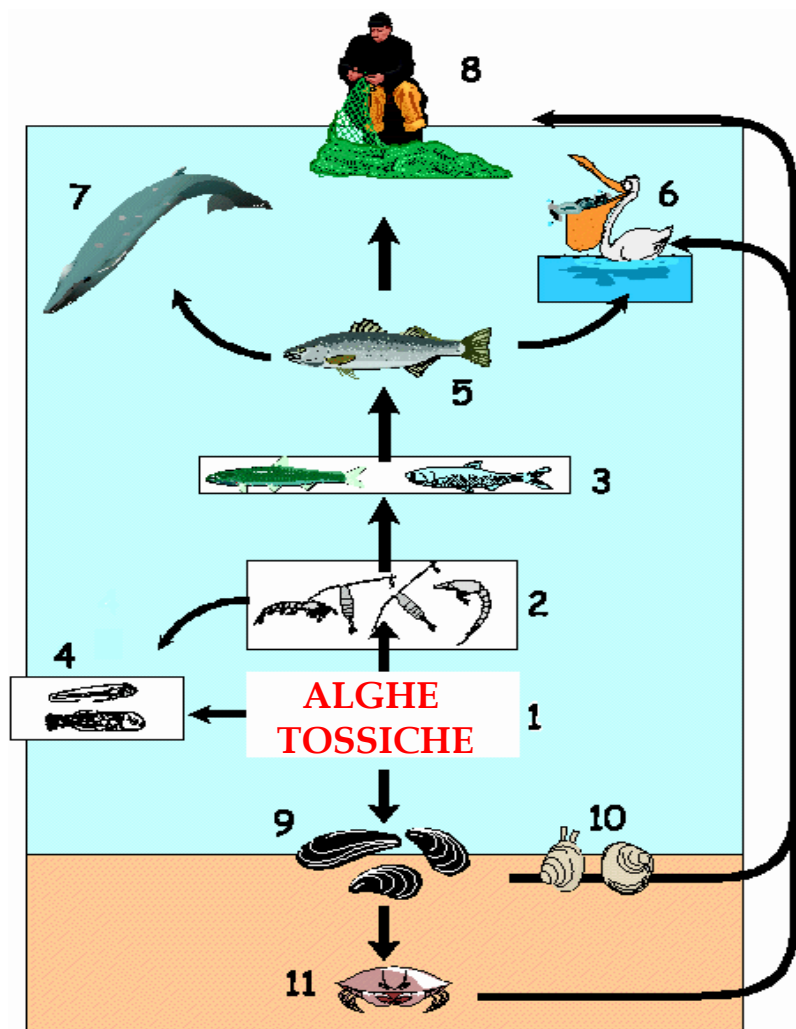
Spiccata capacità di accumulo nei tessuti e nell'epatopaneas

L'ingestione da parte dell'uomo di prodotti contaminati porta all'insorgenza di quadri patologici → **Biointossicazioni**

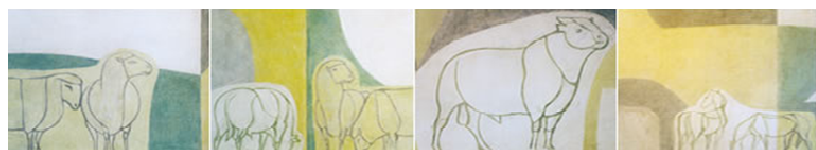


Roma, 27/11/2012 – Ilaria Perini

# Le biotossine algali marine

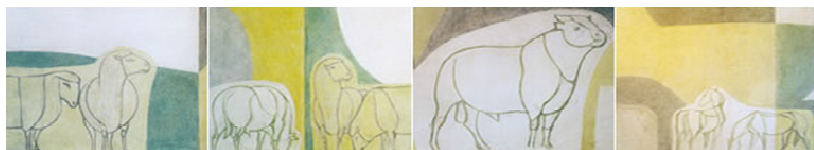
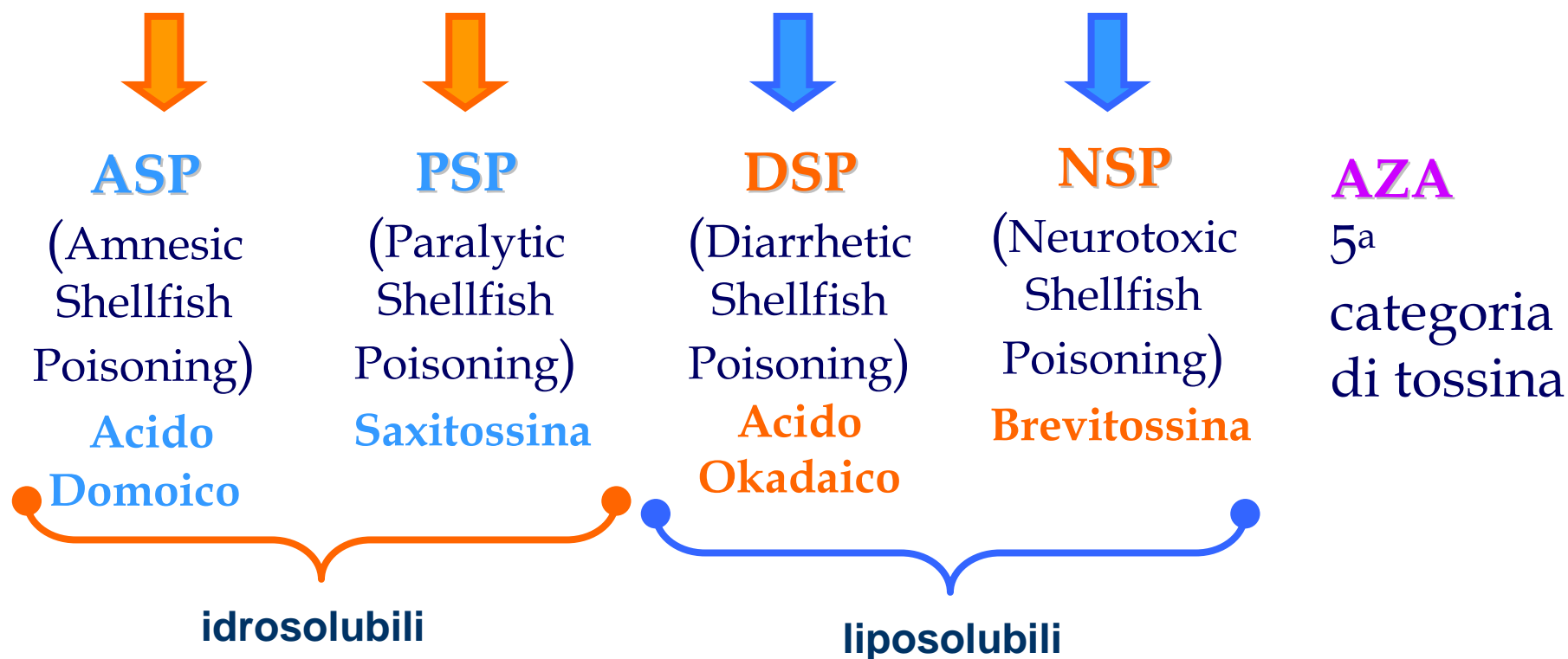


Le biotossine sintetizzate dalle microalghe possono ritrovarsi, attraverso la **rete trofica**, in organismi marini che costituiscono alimento per l'uomo e/o possono causare estese mortalità di invertebrati e pesci.



# Quanti tipi di biotossine algali?

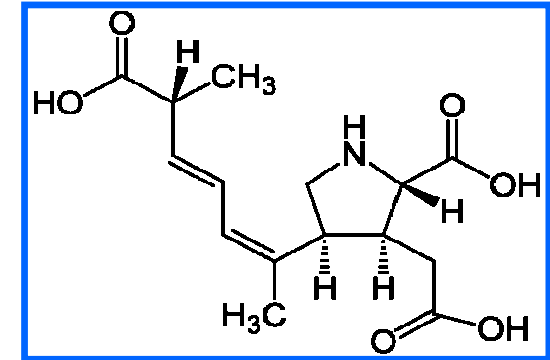
Le biotossine sono classificate in base alla tipologia dei sintomi dovuti all'intossicazione:



# ASP: Amnesic Shellfish Poisoning

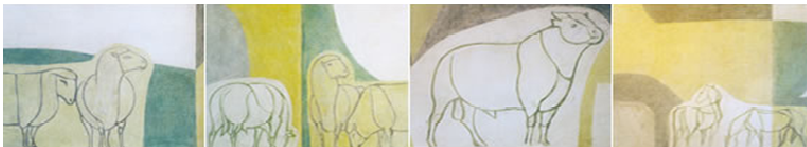
Tossina responsabile: **ACIDO DOMOICO**

Identificata per la prima volta nel 1987 in Canada



Simile al glutammato, aspartato e kainato, interviene su alcuni recettori delle sinapsi, (aumenta la penetrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  nella cellula sino a portarla alla morte).

meccanismo d'azione ➡ trasmissione sinaptica  
apparato digerente





# ASP: Amnesic Shellfish Poisoning

I sintomi si verificano entro **24-48 ore** dal consumo dei molluschi contaminati

Primi sintomi

- Disturbi gastrointestinali
- Diarrea
- Nausea
- Vomito
- Dolori addominali
- Perdita della memoria breve

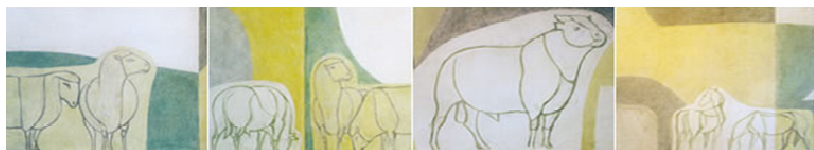
60-110  
mg di AD

270-290  
mg di AD

Sintomi  
successivi

Sintomi neurologici più gravi  
(confusione e disorientamento, convulsioni o  
coma)

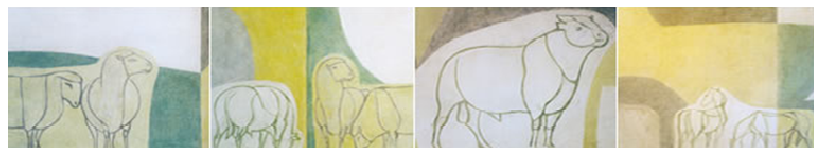
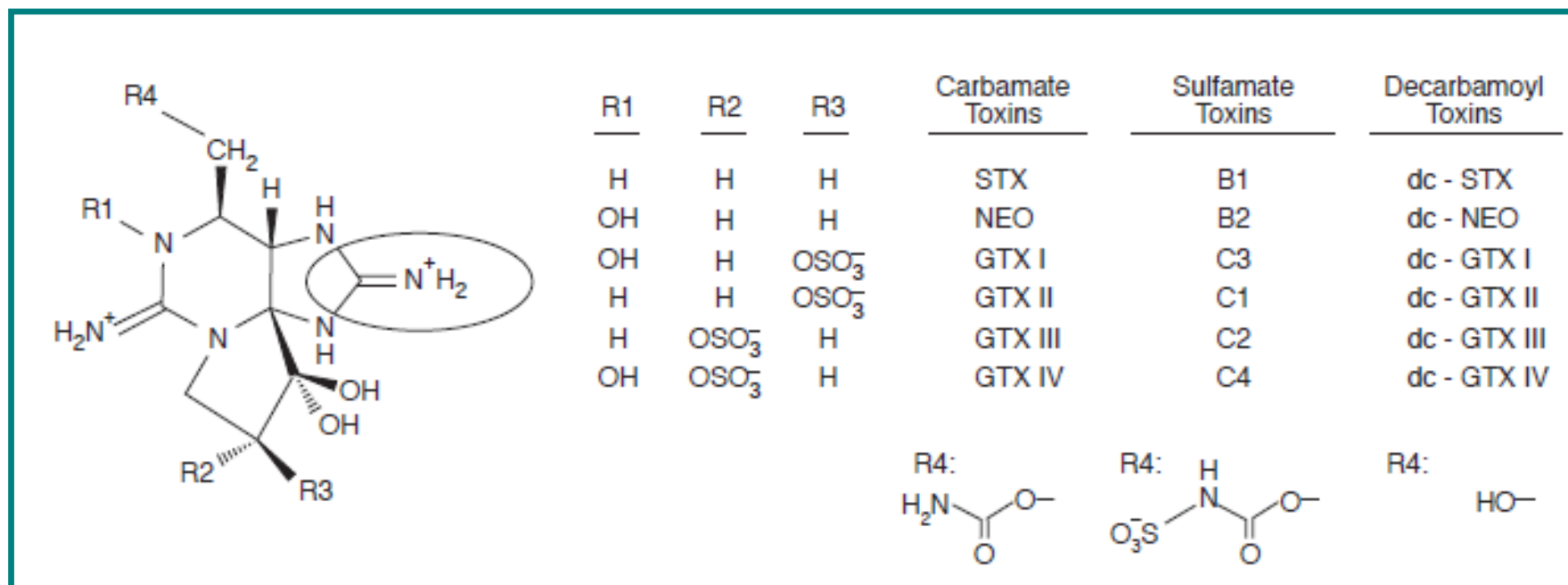
**In alcuni casi può sopraggiungere la morte**



# PSP (Paralytic Shellfish Poisoning)

La **Paralytic Shellfish Poisoning** è una delle sindromi più studiate e conosciute per le gravi conseguenze che produce nei consumatori di molluschi bivalvi.

Sono rappresentate dalla **Saxitossina** e dai suoi 21 analoghi

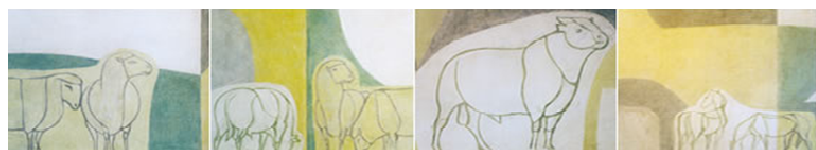
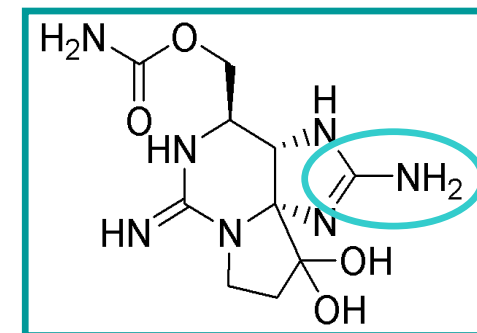


# PSP (Paralytic Shellfish Poisoning)

La struttura di base delle saxitossine è una tetroidropurina con due gruppi guanidinici; uno di questi è responsabile del blocco dei canali del  $\text{Na}^+$



blocco della trasmissione dell'impulso nervoso nei nervi periferici e nei muscoli scheletrici, con conseguente paralisi respiratoria e morte



# PSP (Paralytic Shellfish Poisoning)

Comparsa dei sintomi → entro **30 min** dall'ingestione di molluschi

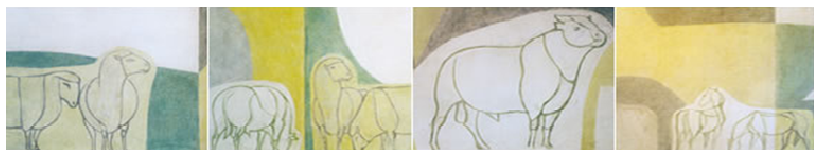
Consistono in:

- sensazione di formicolio delle labbra, lingua ed estremità delle dita;
- perdita dell'equilibrio;
- linguaggio incoerente;
- percezione alterata di braccia e gambe;
- debolezza generale.

**Casi più gravi:** morte per arresto respiratorio o cardiocircolatorio entro **2-12 ore** (dose 1-2mg).

La **saxitossina** è una tossina con **elevatissima tossicità** acuta per l'uomo

I suoi effetti sono analoghi a quelli della tossina botulinica



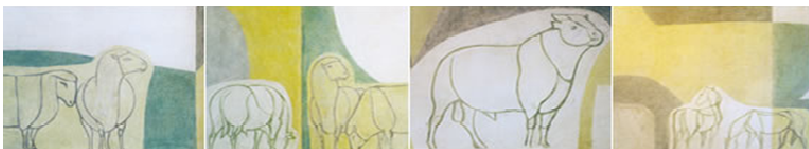


# DSP (Diarrethic Shellfish Poisoning)

Le DSP sono polieterei ciclici divisi nelle tre seguenti classi strutturali:

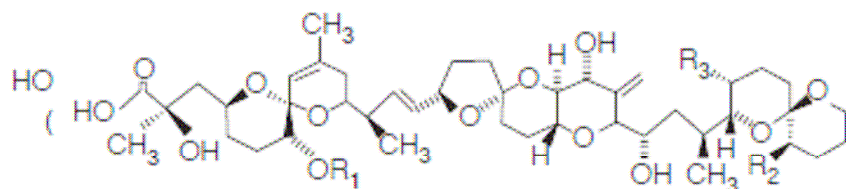
- *tossine acide: acido okadaico e suoi derivati* (OAs);
- *tossine neutre: pectenotossine* (PTXs);
- *yessotossina e suoi derivati* (YTXs).

Sono polieterei ciclici, composti liposolubili, completamente diverse per effetti tossicologici, meccanismi d'azione e alterazioni biochimiche



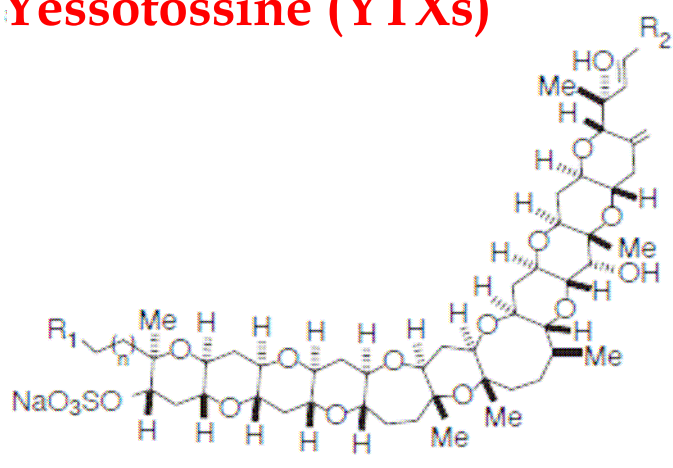
# DSP (Diarrethic Shellfish Poisoning)

## Acido okadaico e Dinofisistossine (DTXs)



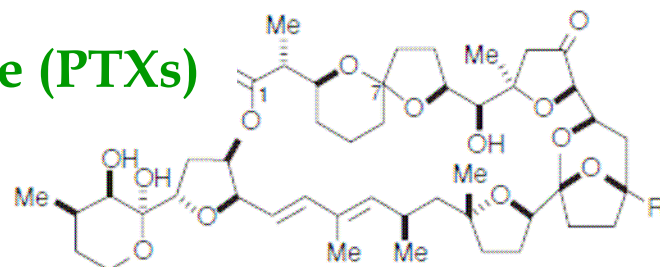
|              | R1   | R2              | R3              |
|--------------|------|-----------------|-----------------|
| AO           | H    | H               | CH <sub>3</sub> |
| DTX1         | H    | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub> |
| DTX2         | H    | H               | CH <sub>3</sub> |
| DTX3         | acyl | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub> |
| 7-O-acyloA   | acyl | CH <sub>3</sub> | H               |
| 7-O-acylDTX2 | acyl | H               | CH <sub>3</sub> |

## Yessotossine (YTXs)

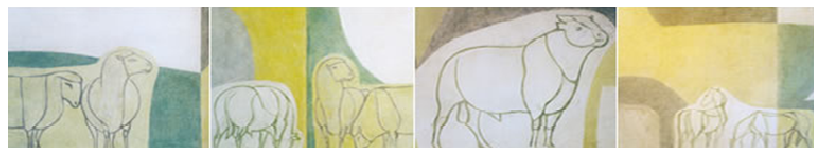


|  | R <sub>1</sub>      | R <sub>2</sub> | n |
|--|---------------------|----------------|---|
| yessotoxin (YTX)                             | OSO <sub>3</sub> Na |                | 1 |
| 45-hydroxyessotoxin (hydroxyYTX)             | OSO <sub>3</sub> Na |                | 1 |
| 45, 46, 47-trinoryessotoxin (norYTX)         | OSO <sub>3</sub> Na |                | 1 |
| 2-homoyessotoxin (homoYTX)                   | OSO <sub>3</sub> Na |                | 2 |
| 2-homo-45-hydroxyessotoxin (hydroxy-homoYTX) | OSO <sub>3</sub> Na |                | 2 |
| 44-carboxyessotoxin (carboxyYTX)             | OSO <sub>3</sub> Na |                | 1 |

## Pectenotossine (PTXs)



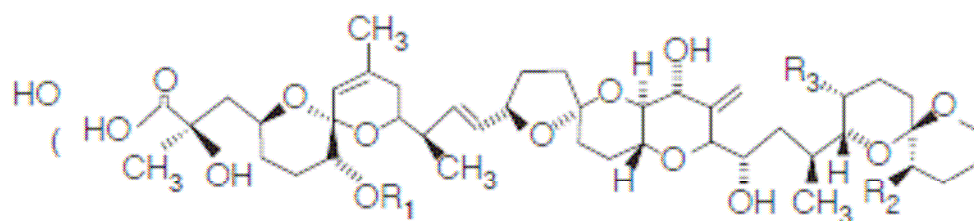
| R                        | C-7 |
|--------------------------|-----|
| PTX1: CH <sub>2</sub> OH | R   |
| PTX2(1): CH <sub>3</sub> | R   |
| PTX3: CHO                | R   |
| PTX4: CH <sub>2</sub> OH | S   |
| PTX6: COOH               | R   |
| PTX7: COOH               | S   |



Roma, 27/11/2012 – Ilaria Perini

# DSP (Diarrethic Shellfish Poisoning)

## Acido Okadaico e Dinofisistossine (DTXs)



|              | R1   | R2              | R3              |
|--------------|------|-----------------|-----------------|
| AO           | H    | H               | CH <sub>3</sub> |
| DTX1         | H    | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub> |
| DTX2         | H    | H               | CH <sub>3</sub> |
| DTX3         | acyl | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub> |
| 7-O-acylOA   | acyl | CH <sub>3</sub> | H               |
| 7-O-acylDTX2 | acyl | H               | CH <sub>3</sub> |

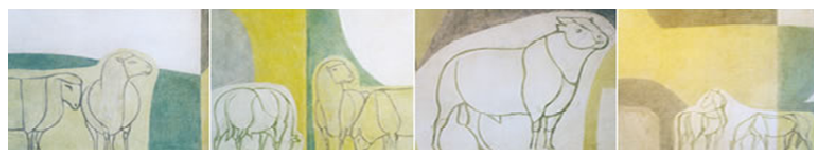
- attraversano facilmente la membrana cellulare
- inibiscono le proteine fosfatasi ➤ alterazione del meccanismo fosforilazione-defosforilazione (fondamentale per la regolazione dell'attività cellulare)

L'AO e le DTXs:

provocano diarrea (perché)

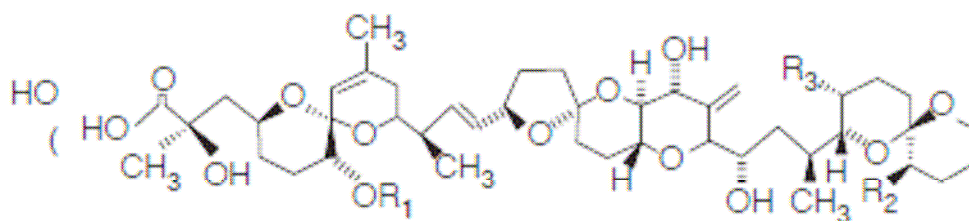
stimolano la contrazione della muscolatura liscia intestinale

- Fosforilazione delle proteine che controllano la secrezione di Na<sup>+</sup> da parte delle cellule intestinali



# DSP (Diarrethic Shellfish Poisoning)

## Acido Okadaico e Dinofisistossine (DTXs)



|              | R1   | R2              | R3              |
|--------------|------|-----------------|-----------------|
| AO           | H    | H               | CH <sub>3</sub> |
| DTX1         | H    | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub> |
| DTX2         | H    | H               | CH <sub>3</sub> |
| DTX3         | acyl | CH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub> |
| 7-O-acylOA   | acyl | CH <sub>3</sub> | H               |
| 7-O-acylDTX2 | acyl | H               | CH <sub>3</sub> |

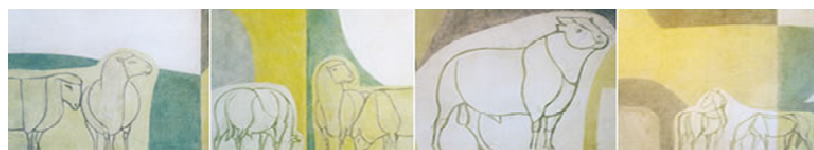
L'intossicazione è caratterizzata da disturbi gastrointestinali quali: **diarrea (92%), nausea (80%), vomito (79%) e dolori addominali (53%)**.

La dose minima per indurre diarrea negli adulti è:

- 40 mg di AO
- 36 mg di DTXs

I sintomi compaiono entro poche ore (da 2-3 a 12 ore) dall'ingestione di molluschi contaminati con durata di 2-3 giorni.

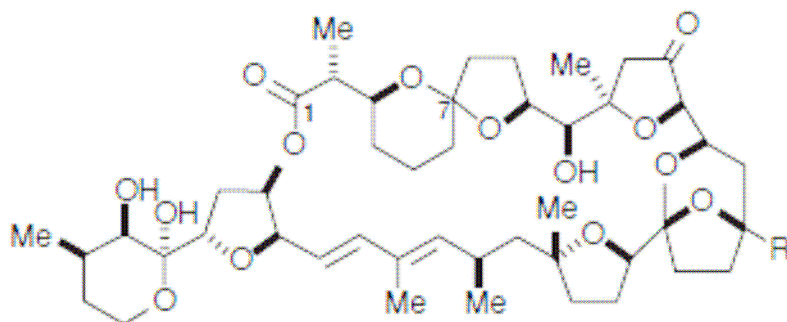
**Non è stato mai riportato alcun caso letale.**





# DSP (Diarrethic Shellfish Poisoning)

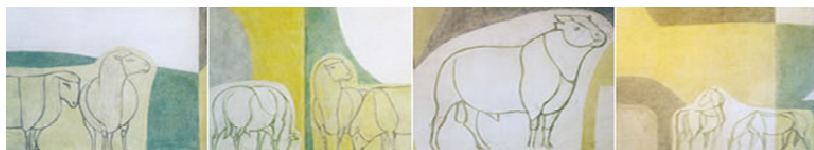
## Pectenotossine



| R                        | C-7 |
|--------------------------|-----|
| PTX1: CH <sub>2</sub> OH | R   |
| PTX2(1): CH <sub>3</sub> | R   |
| PTX3: CHO                | R   |
| PTX4: CH <sub>2</sub> OH | S   |
| PTX6: COOH               | R   |
| PTX7: COOH               | S   |

La **PTX2** è ritenuta il precursore delle altre pectenotossine (PTXs) attraverso processi di biotrasformazioni ad opera dei molluschi bivalvi.

I sintomi dovuti all'ingestione di molluschi contaminati sono: nausea e vomito, non inducono diarrea.



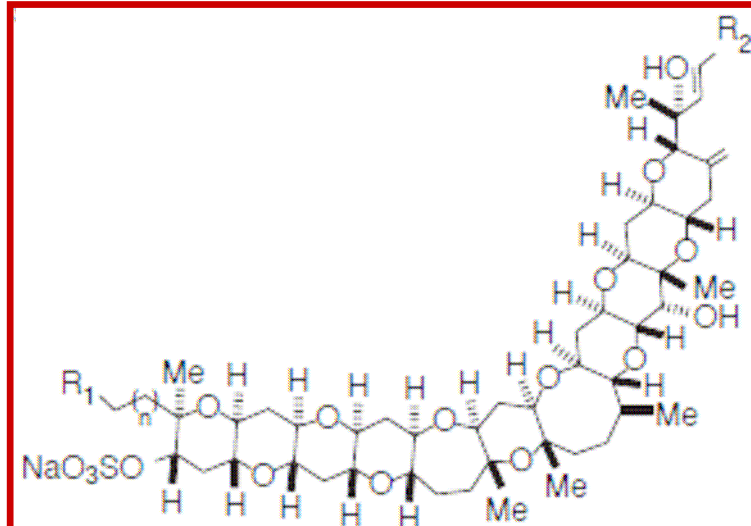
# DSP (Diarrethic Shellfish Poisoning)

## Yessotossine

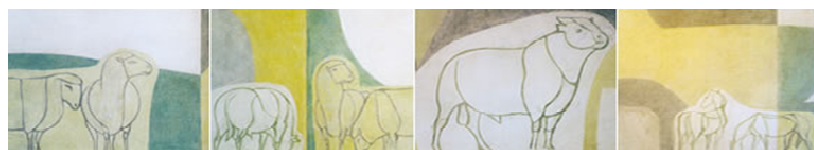
La yessotossina è un etere policiclico a forma di scala ("laddershaped").  
Ha una minore tossicità rispetto alle altre DSP e non induce diarrea.

Non si hanno ancora dati disponibili:

- Assorbimento
- Distribuzione
- Metabolismo
- Escrezione
- Meccanismo/i d'azione tossica



|  | R <sub>1</sub>      | R <sub>2</sub> | n |
|--|---------------------|----------------|---|
| yessotoxin (YTX)                             | OSO <sub>3</sub> Na |                | 1 |
| 45-hydroxyessotoxin (hydroxyYTX)             | OSO <sub>3</sub> Na |                | 1 |
| 45, 46, 47-trinoryessotoxin (norYTX)         | OSO <sub>3</sub> Na |                | 1 |
| 2-homoyessotoxin (homoYTX)                   | OSO <sub>3</sub> Na |                | 2 |
| 2-homo-45-hydroxyessotoxin (hydroxy-homoYTX) | OSO <sub>3</sub> Na |                | 2 |
| 44-carboxyessotoxin (carboxyYTX)             | OSO <sub>3</sub> Na |                | 1 |

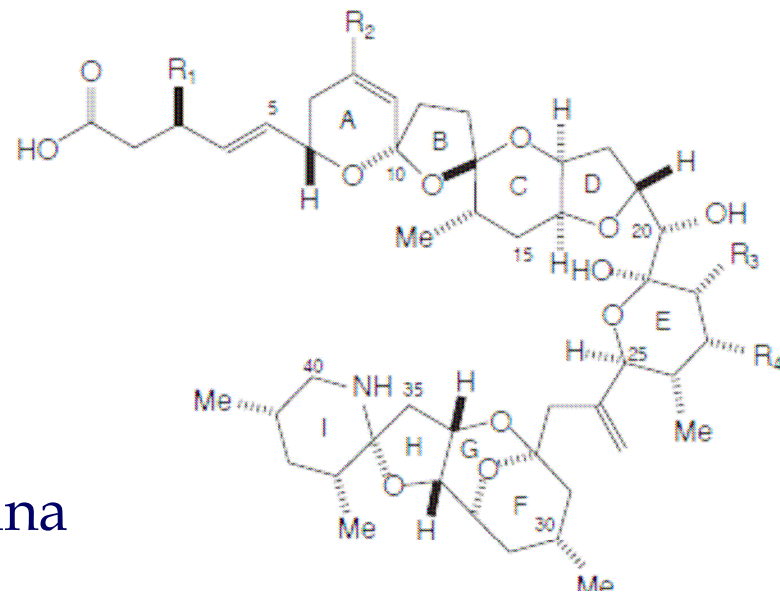


# AZA (Azaspiracid Poisoning)

## Azaspiracido

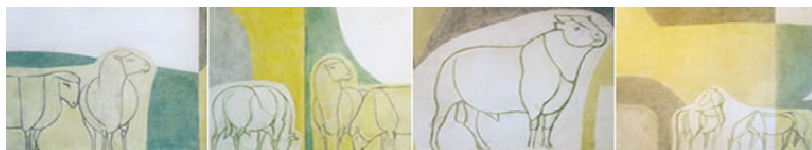
Nuova tossina liposolubile marina isolata per la prima volta nel 1995 nei mitili provenienti dall'Irlanda

Tossine polietere contenenti un gruppo azaspiro, la cui famiglia conta almeno una ventina di analoghi ma solo di alcuni si conosce la tossicità.



| Tossina               | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub> |
|-----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Azaspiracido (AZA)    | H              | H              | Me             | H              |
| Azaspiracido-2 (AZA2) | H              | Me             | Me             | H              |
| Azaspiracido-3 (AZA3) | H              | H              | H              | H              |
| Azaspiracido-4 (AZA4) | OH             | H              | H              | H              |
| Azaspiracido-5 (AZA5) | H              | H              | H              | OH             |

Tossicologia  
nota



Roma, 27/11/2012 – Ilaria Perini

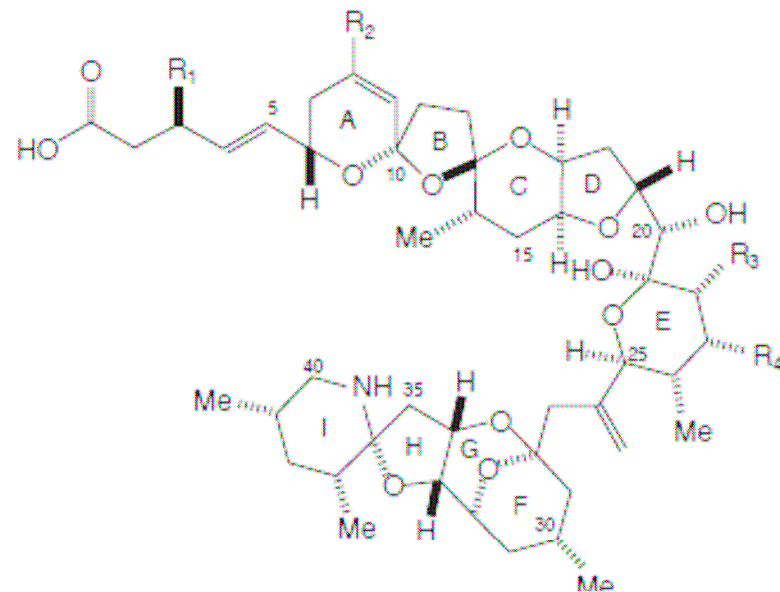
# AZA (Azaspiracid Poisoning)

## Azaspiracido

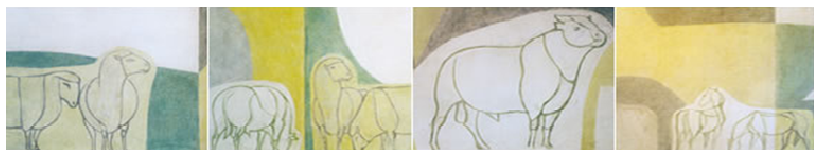
I sintomi per ingestione di molluschi bivalvi contaminati sono simili a quelli dovuti alle DSP:  
nausea, vomito, diarrea e crampi allo stomaco

Sono ancora in corso studi *in vivo* e *in vitro* per valutare:

- la tossicità,
- i meccanismi d'azione,
- la biotrasformazione,
- l'assorbimento,
- la distribuzione
- l'escrezione delle AZP nell'uomo.



| Tossina               | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub> |
|-----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Azaspiracido (AZA)    | H              | H              | Me             | H              |
| Azaspiracido-2 (AZA2) | H              | Me             | Me             | H              |
| Azaspiracido-3 (AZA3) | H              | H              | H              | H              |
| Azaspiracido-4 (AZA4) | OH             | H              | H              | H              |
| Azaspiracido-5 (AZA5) | H              | H              | H              | OH             |

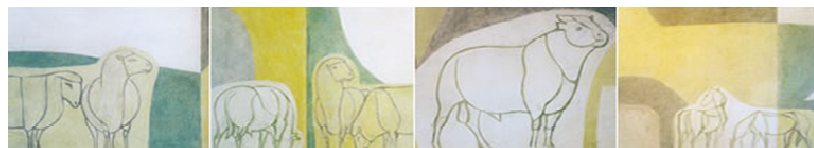




# Distribuzione biotossine in Europa

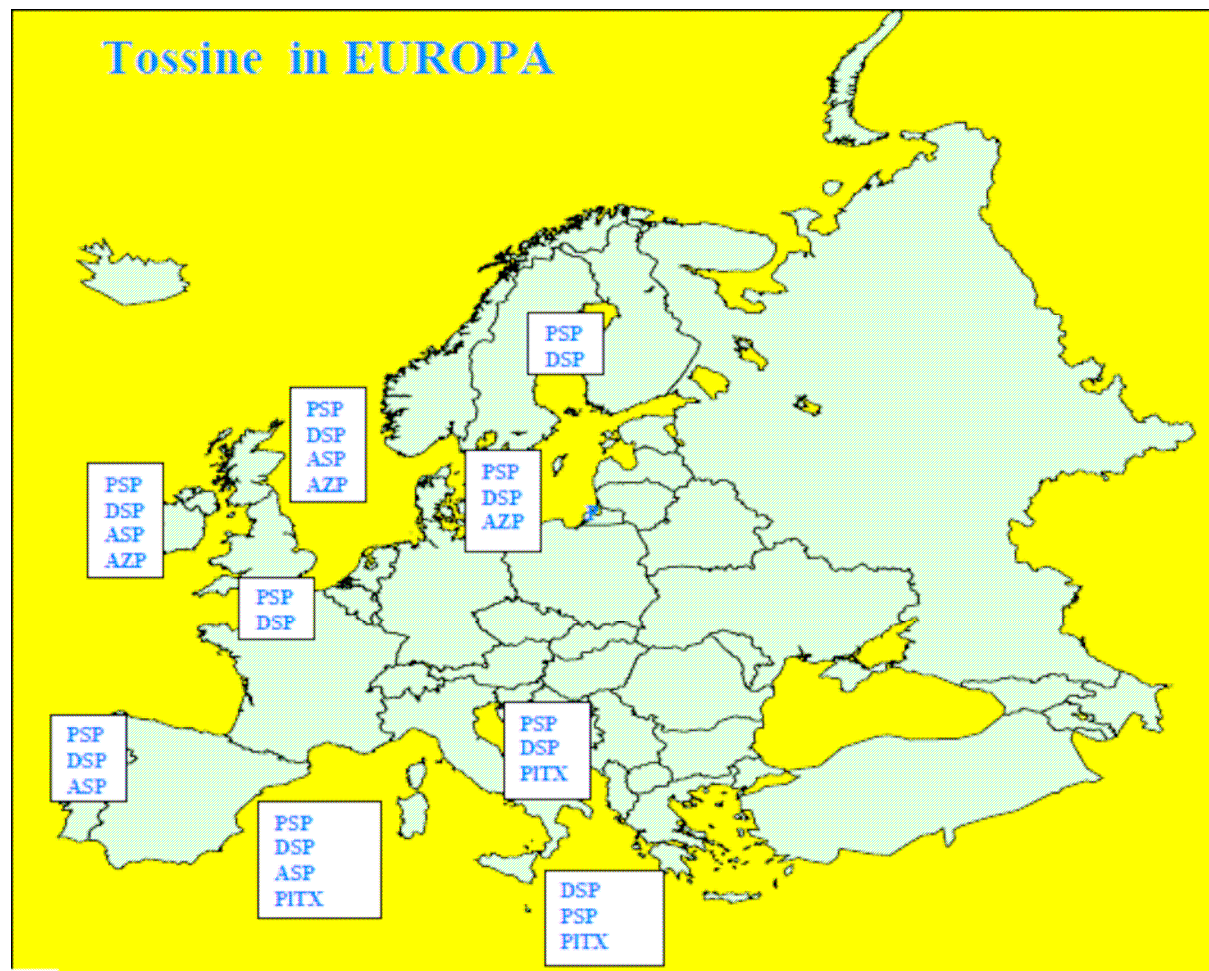
| Anno         | Tossina    | Luogo  |
|--------------|------------|--|
| Anni '60     | PSP        | Casi in Portogallo, Spagna, Inghilterra, Norvegia Isole Faroer                                 |
| Anni '70     | PSP        | Epidemia in Europa occidentale   |
| Anni '70-'80 | PSP        | Intossicazione Venezuela e Guatemala   |
| 1976-1982    | DSP        | Intossicazioni in Giappone   |
| Anni '80     | ASP        | Baia di Cardigan<br>Canada   |
| 1989         | DSP        | Adriatico  |
| Anni '90     | PSP        | Intossicazioni in Marocco  |
| 1995-1997    | DSP<br>AZP | Adriatico<br>Vari casi sulle coste Irlandesi   |
| 2000-2008    | PSP<br>AZP | Coste orientali ed occidentali del Nord America<br>Intossicazioni in Francia, Irlanda e Belgio |

Tabella



Roma, 27/11/2012 – Ilaria Perini

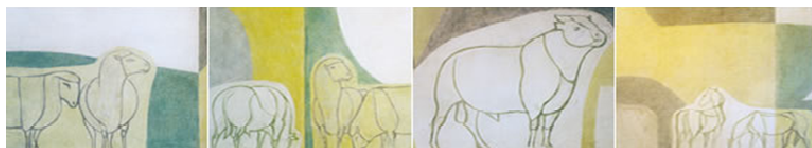
# Distribuzione biotossine in Europa



**Dati 2009**

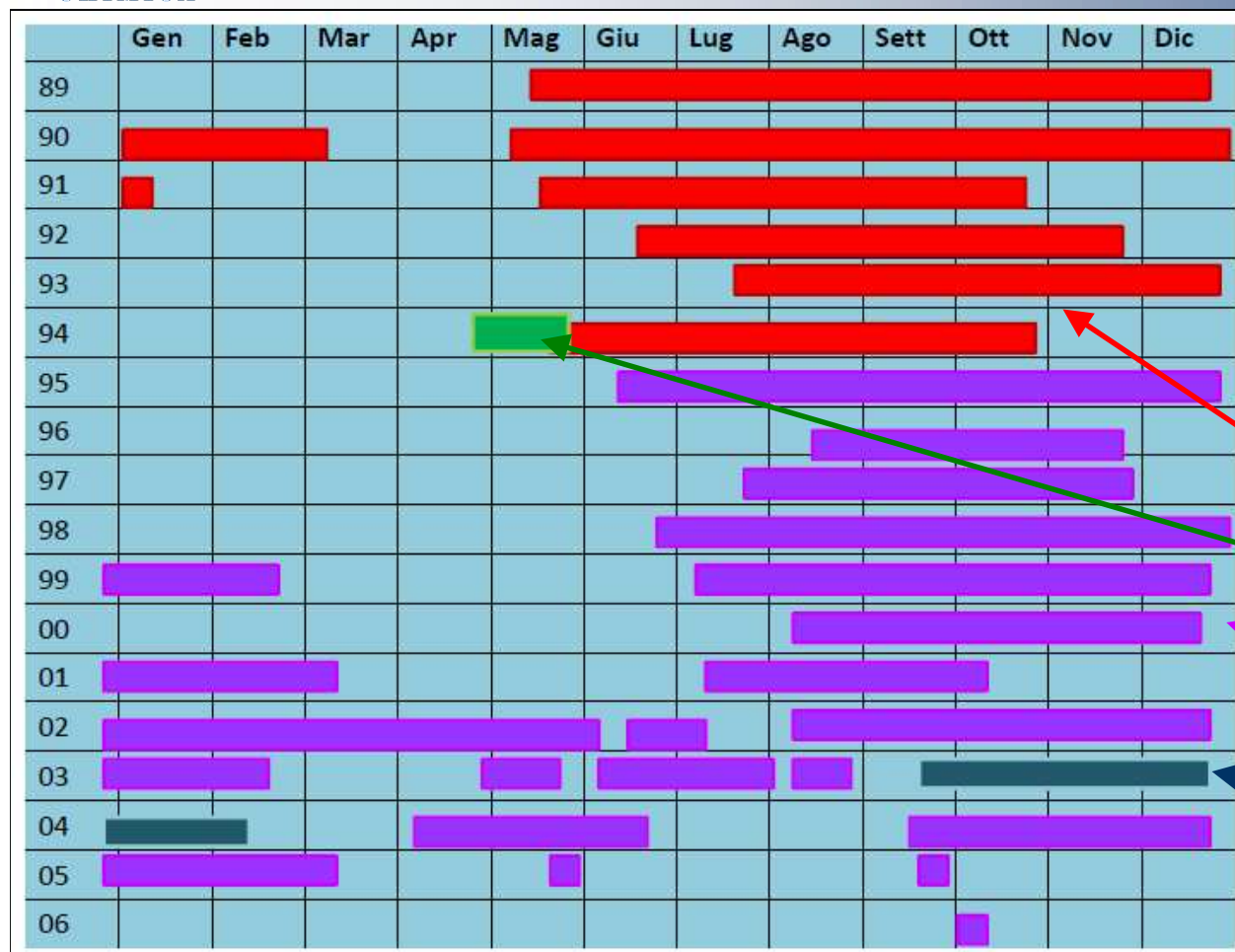
Negli ultimi due decenni, gli episodi sono aumentati in tutto il mondo, nelle zone temperate e in quelle tropicali.

*Si tratta di un aumento reale? Il risultato del miglioramento dei metodi di sorveglianza e di monitoraggio? Non è chiaro!*



Roma, 27/11/2012 – Ilaria Perini

# Distribuzione biotossine in Italia



Periodi di sospensione temporanea della raccolta di *Mytilus Galloprovincialis* per DSP e PSP in Emilia Romagna

AO, DTX, PTX

PSP

YTX

Spirolidi

La tossicità dei mitili dell'Adriatico settentrionale si manifesta con una certa continuità: periodo **estivo-autunnale**.

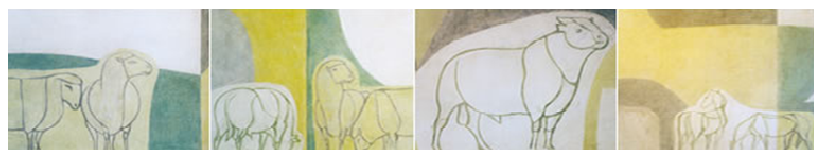
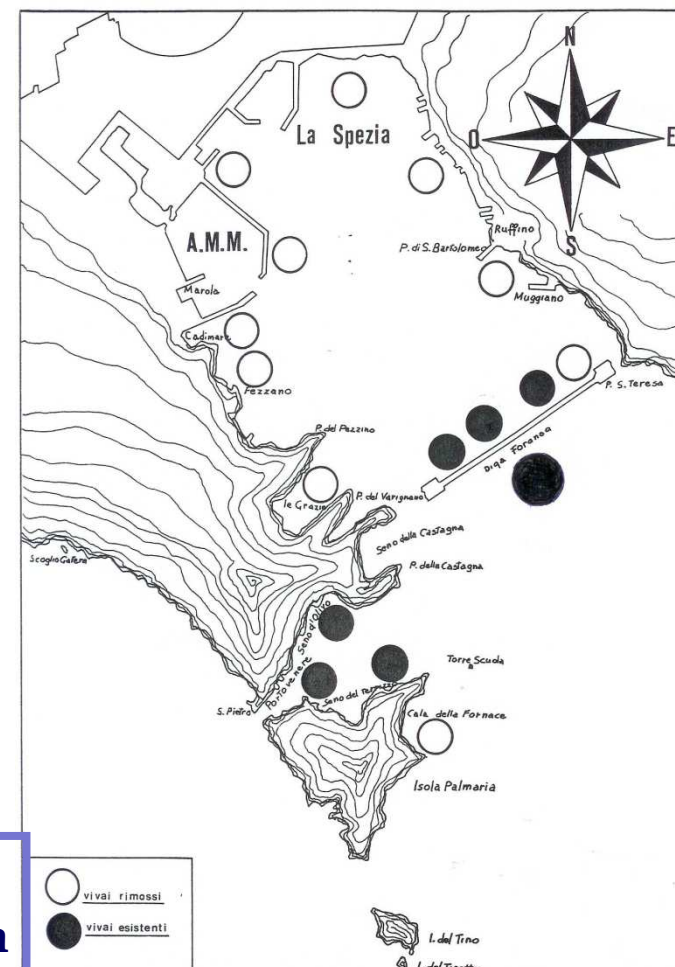
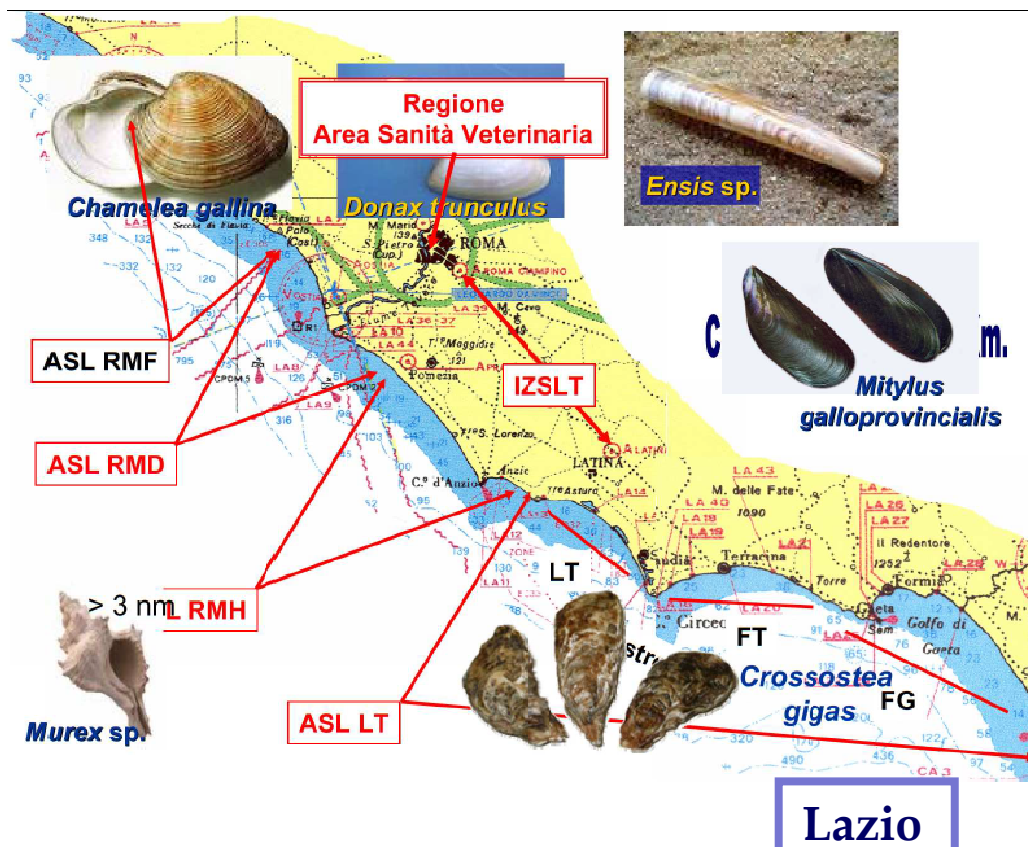


Roma, 27/11/2012 – Ilaria Perini



# Distribuzione biotossine in Italia

## Piano regionale per il controllo sanitario della filiera dei molluschi bivalvi



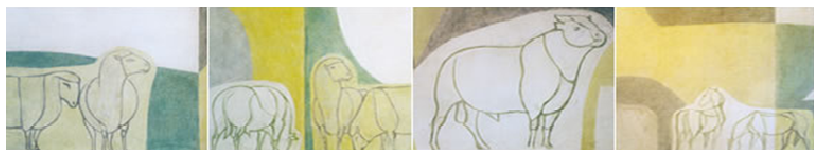
Roma, 27/11/2012 – Ilaria Perini

# Monitoraggio zone di produzione

Il monitoraggio di routine prevede durante l'anno:

- controllo mensile parametri chimico-fisici delle acque (pH, T, O<sub>2</sub> disciolto, salinità), parametri microbiologici e biotossicologici dei mitili.
- controllo semestrale dei parametri chimici nei mitili
- controllo annuale sulla presenza di radionuclidi

Nel periodo di massima raccolta (Aprile/Ottobre) e quindi di maggior consumo, i controlli sulle zone di produzione vengono significativamente intensificati.



Roma, 27/11/2012 – Ilaria Perini



# Normativa

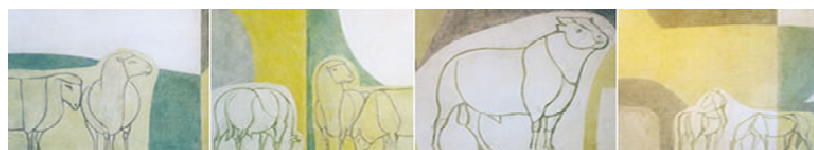
Il **Regolamento CE 854/2004** stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano.

**Requisiti delle zone di produzione** (*All.II, Capo II del Reg.CE 854/2004*):

**Zona A:** raccolta e vendita diretta previo confezionamento (rispettando i requisiti sanitari stabiliti dal Regolamento (CE) N. 853/04)

**Zona B:** depurazione in stabilimenti riconosciuti e in zone classificate ai fini della stabulazione

**Zona C:** depurazione e/o stabulazione di lunga durata ( $\geq 2$  mesi)

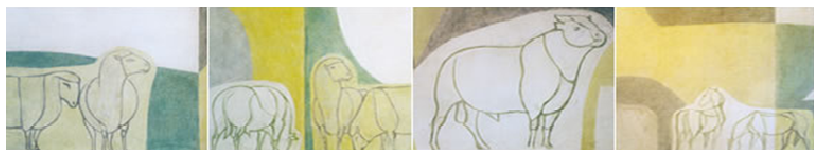


# Normativa

Il **Regolamento CE 853/2004** definisce i seguenti tenori massimi di alcune biotossine marine in molluschi bivalvi ed in altri organismi:

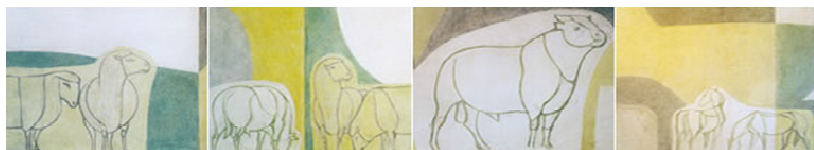
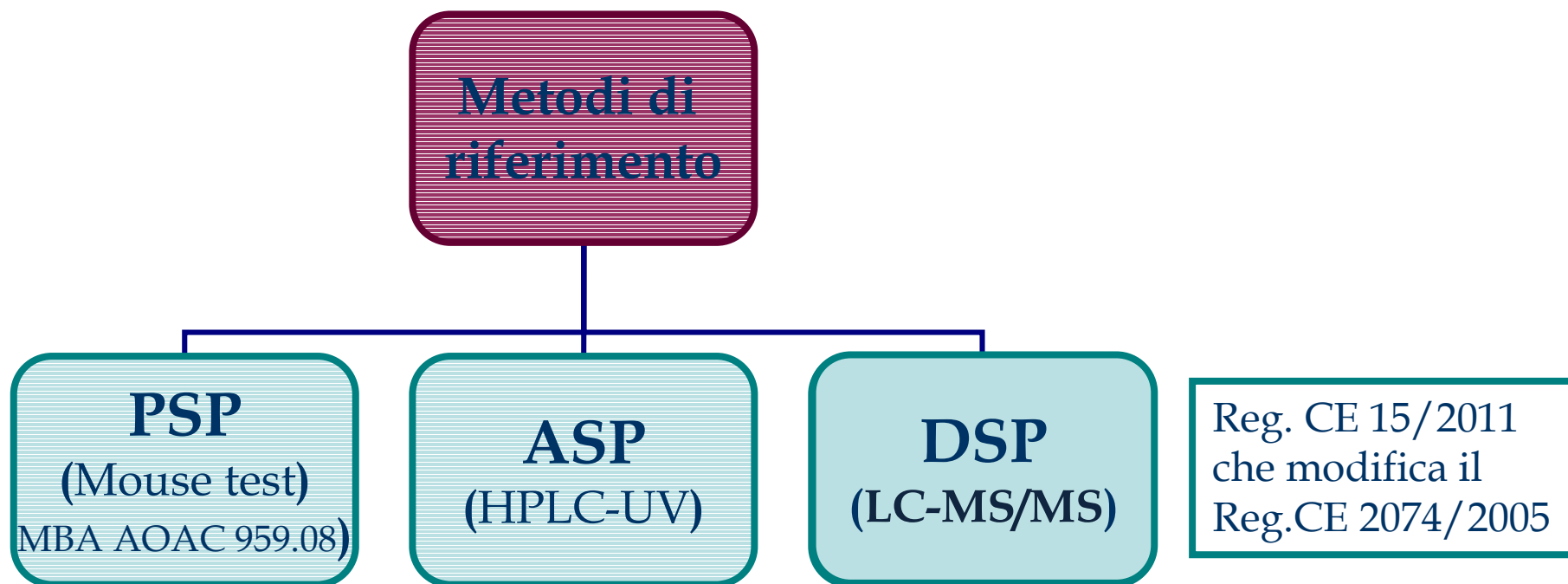
“Essi non devono contenere biotossine marine in quantità totali (misurate nel corpo intero o nelle parti consumabili separatamente) superiori ai seguenti limiti:

- a) **ASP**: 20 mg/kg di AD;
- b) **PSP**: 800 µg/kg;
- c) **OA**, **DTX** e **PTX** complessivamente: 160 µg di equivalente AO/kg;
- d) **YTX**: 1 mg di equivalente YTX/kg;
- e) **AZA**: 160 µg di equivalente AZA/kg.”



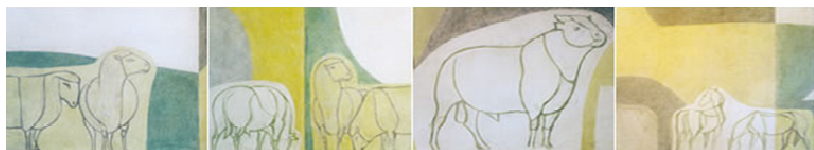
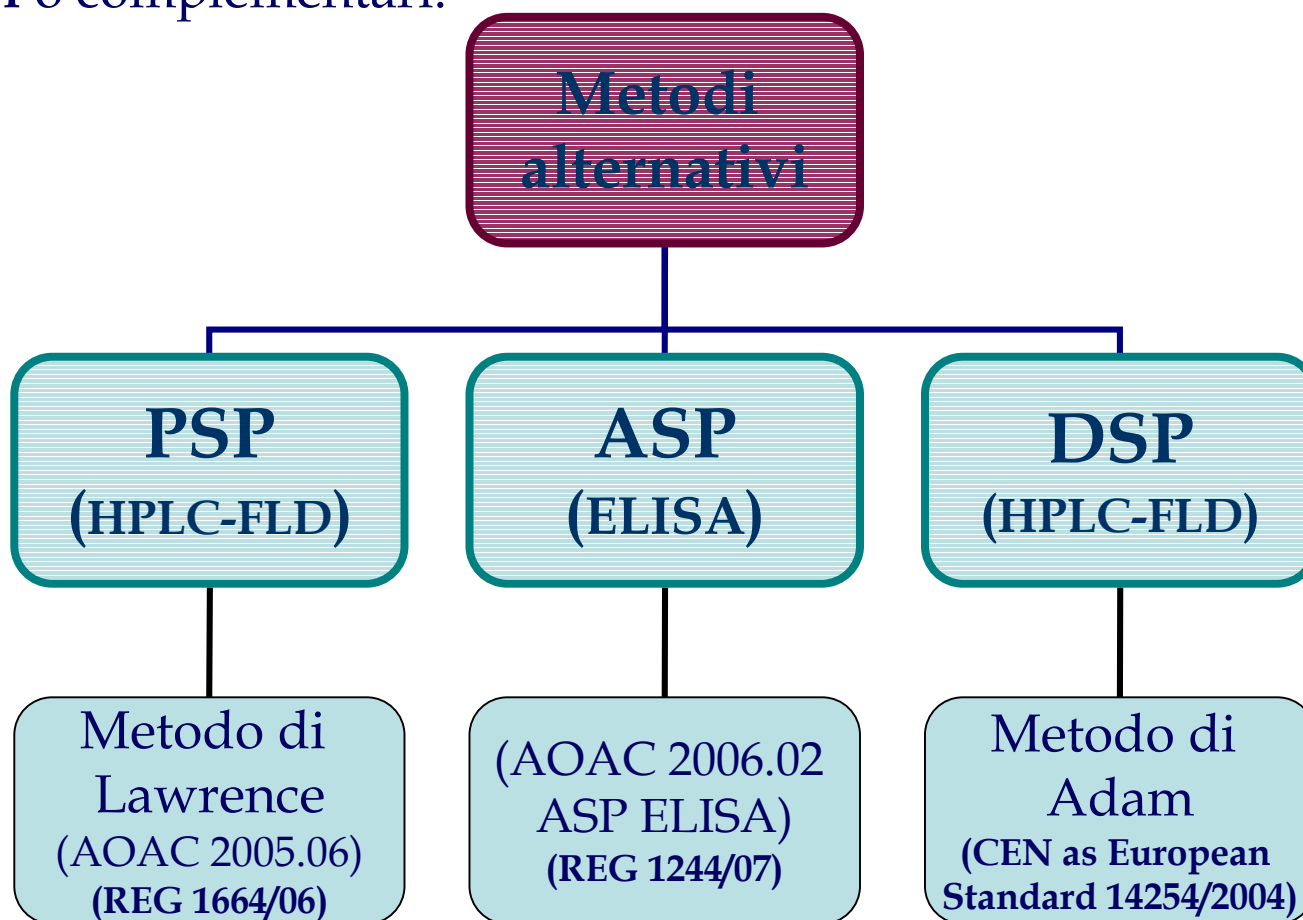
# Normativa

Il **Regolamento CE 2074/2005** (*Allegato III*) → stabilisce i metodi di analisi



# Normativa

Inoltre stabilisce che metodi come HPLC-FD, LC-MS, immunosaggi e test funzionali (es. test inibizione fosfatasi) possono essere considerati **metodi alternativi** o complementari.

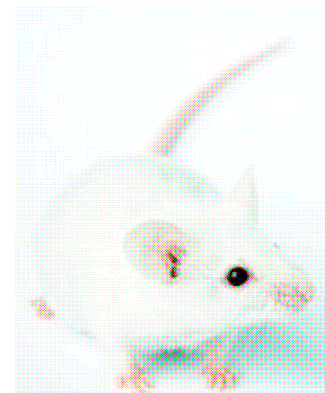


# Confronto tra metodi

## Metodo biologico (**Mouse Bioassay**)

### Vantaggi:

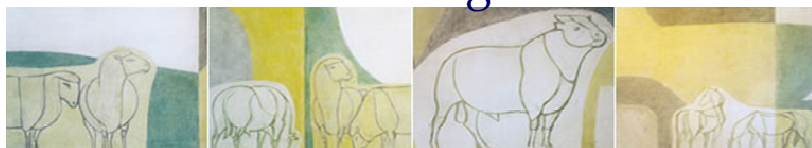
- facile da eseguire
- meno costoso rispetto ad un metodo chimico



### Svantaggi:

- bassa precisione ( $\pm 20-30\%$ );
- bassa accuratezza (specialmente nell'intorno dei limiti di legge);
- soggetto a falsi positivi;
- soggetto a falsi negativi (inadeguatezza per alcune tossine);
- problemi etici sull'utilizzo dei topi

“Funciones y actividades del Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas” – Ana Gago Martínez – EU-RL-MB



Roma, 27/11/2012 – Ilaria Perini



# Confronto tra metodi

## Metodo biologico (Mouse Bioassay)

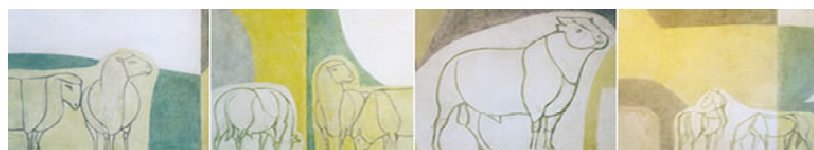
### B. Metodi biologici

- (1) Per consentire agli Stati membri di adeguare i propri metodi al metodo LC-MS/MS definito nella parte A, punto 1), del presente capitolo, una serie di procedure di biotest sui topi, che differiscono nella parte test (epatopancreas o corpo intero) e nei solventi utilizzati per le fasi di estrazione e purificazione, può ancora essere utilizzata fino al **31 dicembre 2014** per la rilevazione delle tossine marine di cui all'allegato III, sezione VII, capitolo V, punto 2, lettere c), d) ed e), del regolamento (CE) n. 853/2004.
- (2) Sensibilità e selettività dipendono dalla scelta dei solventi utilizzati per le fasi di estrazione e purificazione e di ciò occorre tenere conto in sede di decisione del metodo da utilizzare al fine di coprire l'intera gamma di tossine.

Reg.CE  
15/2011



**Metodo valido fino al 31 dicembre 2014**



Roma, 27/11/2012 – Ilaria Perini

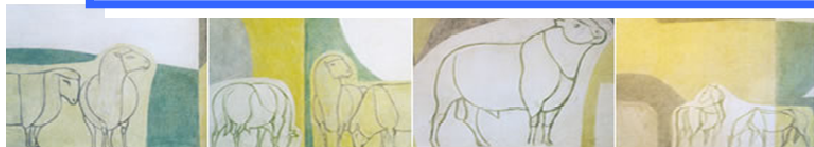
# Confronto tra metodi

## Metodo chimico (LC-MS/MS)

Il metodo LC-MS/MS è stato validato dal Laboratorio di Riferimento Europeo (EU-LR-MB) ed è stato dichiarato un approccio che mantiene e garantisce una totale protezione per il consumatore senza disagi dei test biologici

Un metodo di cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC-MS/MS) è stato convalidato con il coordinamento del laboratorio di riferimento dell'Unione europea per le biotossine marine (laboratorio UE di riferimento) in uno studio di validazione interlaboratorio effettuato dagli Stati membri. Tale metodo è disponibile per la consultazione pubblica nella pagina web del laboratorio UE di riferimento (<http://www.aesan.msps.es/en/CRLMB/web/home.shtml>). Questa tecnica convalidata di cromatografia liquida (LC)-spettrometria di massa (MS) va applicata come metodo di riferimento per la rilevazione delle tossine lipofile e sistematicamente utilizzata sia per controlli ufficiali in ogni fase della catena alimentare, sia per autocontrolli di operatori del settore alimentare.

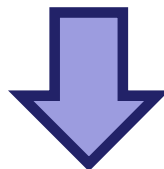
Reg. CE 15/2011



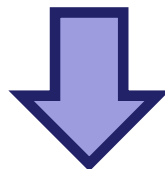
Roma, 27/11/2012 – Ilaria Perini

# Metodi utilizzati nella D.O.C.

Metodo per l'identificazione e la determinazione dell'Acido Domoico

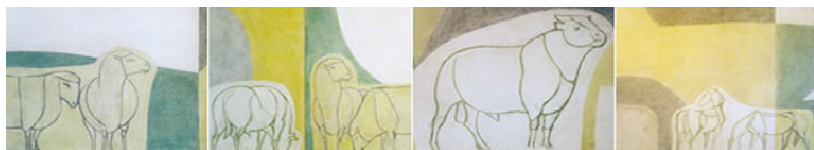


**POS CHI 018 NOR**



Norma di riferimento:

**CEN/TC 275 WG 5 Domoic method 2008.06.06**



Roma, 27/11/2012 – Ilaria Perini



# Metodi utilizzati nella D.O.C.

Pulitura ed omogeneizzazione  
dei molluschi



Estrazione: 4 g di campione +  
16 ml di MeOH/H<sub>2</sub>O (1/1)



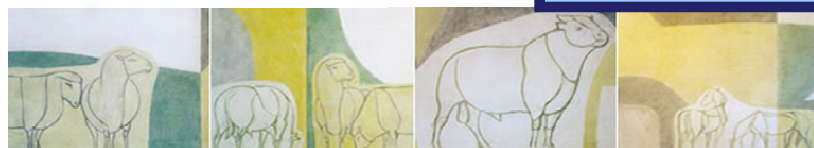
Omogeneizzazione mediante  
Ultraturrax e centrifugazione



Filtrazione



Analisi: HPLC UV



Roma, 27/11/2012 – Ilaria Perini

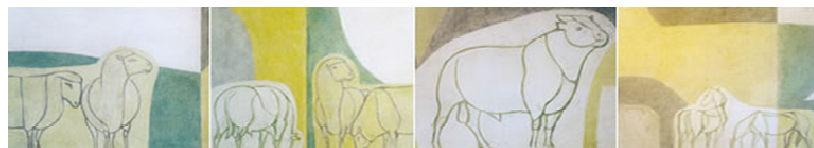
# Metodi utilizzati nella D.O.C.

Validazione ed accreditamento di un metodo per la determinazione di Acido Okadaico in LC-MS/MS



**EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic Marine Biotoxins in molluscs by LC-MS/MS** (European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins (EU-RL-MB) – Vigo, Spain)

Dal 31 dicembre 2014 diventerà il METODO UFFICIALE  
(Reg. CE 15/2011)



Roma, 27/11/2012 – Ilaria Perini



# Metodi utilizzati nella D.O.C.

Pulitura ed omogeneizzazione  
dei molluschi

Estrazione: 2 g di campione +  
9 ml di MeOH

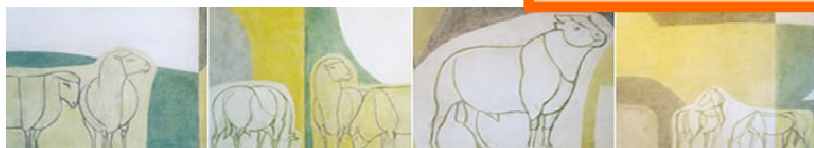
Agitare su Vortex + centrifuga

Filtrazione con filtri 0.22  $\mu\text{m}$

Analisi: LC-MS/MS



Si ripete 2 volte



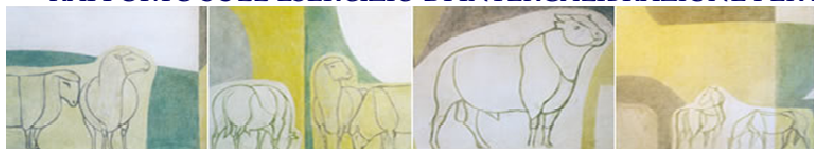
# Proficiency test 2012

Organizzato dal Centro Ricerche Marine di Cesenatico (CRM) indicato dalla Unione Europea quale Laboratorio Nazionale di Riferenza per il Controllo delle Biotossine Marine

## 3.1 Scopo dell'esercizio

Lo scopo dell'esercizio di intercalibrazione è stato quello di armonizzare l'approccio alle metodiche analitiche riconosciute come metodiche di riferimento per il controllo delle tossine liposolubili, in ottemperanza ai Regolamenti (EC) No.853/2004 e No.854/2004, stabilite nel Regolamento (EC) No.2074/2005 revisionato dal Regolamento (EC) No.15/2011 e di confrontare e verificare la qualità dei risultati ottenuti dai differenti laboratori di prova coinvolti.

Ad ogni laboratorio sono stati distribuiti **7 campioni** per il circuito **tossine liposolubili (DSP)** (4 materiali per il metodo chimico e 3 per il metodo biologico).



# Proficiency test 2012

| Codice Lab | Metodo               | z-score  |   |  |   |
|------------|----------------------|--|---|--|---|
|            |                      | CRM/12/L/02  |   | CRM/12/L/04  |   |
|            |                      | free OA<br>$x = 210 \mu\text{g/kg}$<br>$s = 52 \mu\text{g/kg}$ | YTX<br>$x = 0,22 \text{ mg/kg}$<br>$s = 0,06 \text{ mg/kg}$ | free OA<br>$x = 203 \mu\text{g/kg}$<br>$s = 51 \mu\text{g/kg}$ | YTX<br>$x = 0,24 \text{ mg/kg}$<br>$s = 0,06 \text{ mg/kg}$ |
| 1204       | EU SOP<br>LC-MS/MS   | -0,16  | 0,68  | 0,22   | 0,29  |
| 1206       | EU SOP<br>LC-MS/MS   | -1,02  | 7,01  | 0,03   | 1,60  |
| 1212       | EU SOP<br>LC-MS/MS   | 0,06   | —   | -0,82  | -1,05   |
| 1214       | EU SOP<br>LC-MS/MS   | 0,77   | -0,69   | 0,70   | -1,18   |
| 1215       | Interno<br>LC-MS TOF | 1,11   | -1,01   | -0,37  | 0,34  |
| 1218       | EU SOP<br>LC-MS/MS   | -0,76  | 1,01  | 0,24   | 0,29  |

CRM/12/L/02 e CRM/12/L/04 costituito da *Mytilus galloprovincialis* raccolti dalle aree di molluschicoltura del Friuli Venezia Giulia, naturalmente contaminati da Acido Okadaico, esteri dell'acido okadaico e Yessotossine.

RAPPORTO SULL'ESERCIZIO DI INTERCALIBRAZIONE PER LA DETERMINAZIONE DELLE TOSSINE LIPOSOLUBILI-2012



Roma, 27/11/2012 – Ilaria Perini

# Proficiency test 2012

| Codice Lab | Metodo               | z-score                                |  |
|------------|----------------------|--|--|
|            |                      | CRM/12/L/05                            |  |
|            |                      | AZA1<br>x = 440 µg/kg<br>s = 110 µg/kg | AZA totali<br>x = 624 µg/kg<br>s = 156 mg/kg |
| 1204       | EU SOP<br>LC-MS/MS   | -0,64                                  | 0,32   |
| 1206       | EU SOP<br>LC-MS/MS   | 2,07                                   | 0,29   |
| 1212       | EU SOP<br>LC-MS/MS   | -1,62                                  | -0,79  |
| 1214       | EU SOP<br>LC-MS/MS   | -0,64                                  | 0,04   |
| 1215       | Interno<br>LC-MS TOF | 1,04                                   | -0,44  |
| 1218       | EU SOP<br>LC-MS/MS   | -0,22                                  | 0,58   |

CRM/12/L/05 materiale omogenato di *Mytilus edulis* fornito dal Marine Institute (NRL Irlanda) naturalmente contaminato da azaspiracidi, miscelato con un omogenato di mitili non contaminati provenienti dalla costa emiliano romagnola..

RAPPORTO SULL'ESERCIZIO DI INTERCALIBRAZIONE PER LA DETERMINAZIONE DELLE TOSSINE LIPOSOLUBILI-2012



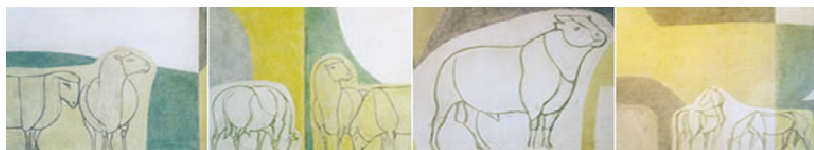
Roma, 27/11/2012 – Ilaria Perini

# Metodi utilizzati nella D.O.C.

Sviluppo di un metodo per la determinazione di tossine PSP  
in HPLC-FLD



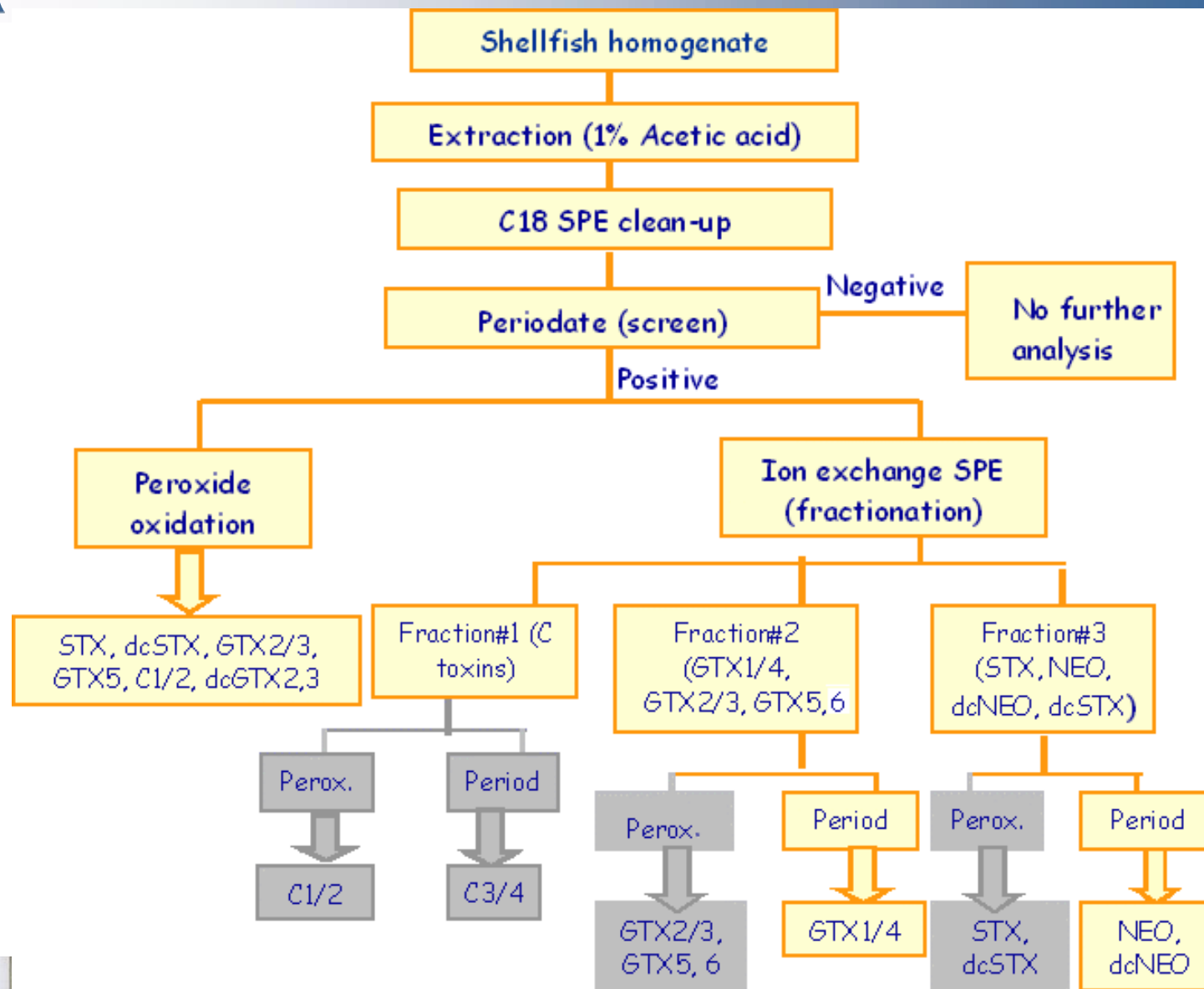
Metodo di Lawrence (*AOAC 2005.06 Method*)



Roma, 27/11/2012 – Ilaria Perini

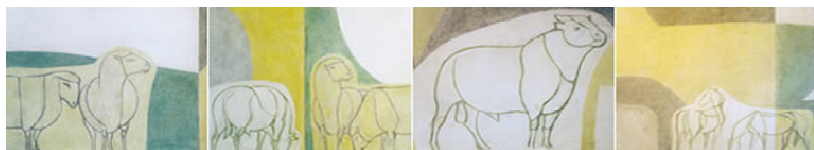


# Metodi utilizzati nella D.O.C.

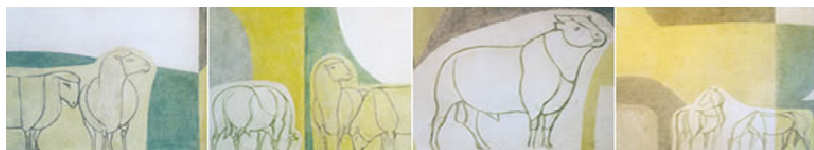


# Conclusioni

- ✱ I sistemi di monitoraggio e sorveglianza di acque e molluschi sono ormai di routine e in costante aumento → l'evoluzione delle biotossine è continua.
- ✱ Nel nostro dipartimento sono già validati ed accreditati i metodi per la ricerca di Acido Domoico e Acido Okadaico.
- ✱ È previsto:
  - lo sviluppo e la validazione del metodo per la determinazione delle tossine PSP in HPLC
  - l'accreditamento delle altre tossine DSP in LC-MS/MS



# GRAZIE PER L'ATTENZIONE



Roma, 27/11/2012 – Ilaria Perini