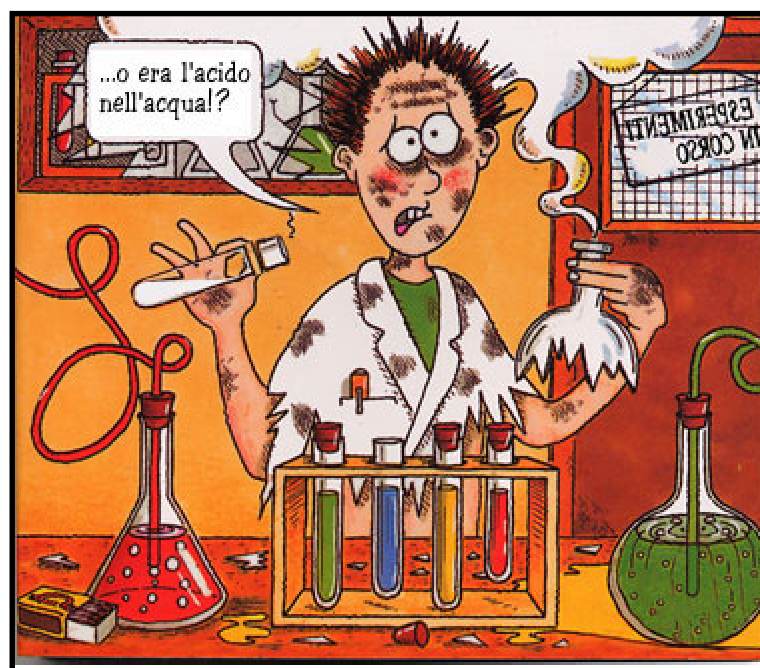


VIAGGIO AL CENTRO DELLA DIREZIONE OPERATIVA CHIMICA



**Concetti generali e classificazione dei
residui, cenni sulla normativa.**

**Trattamenti illeciti con steroidi, cortisonici e
beta-agonisti approcci analitici con metodi
di screening e di conferma.**

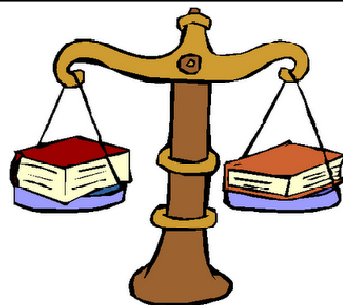
PIANI DI VIGILANZA E SORVEGLIANZA

Piani Nazionali:

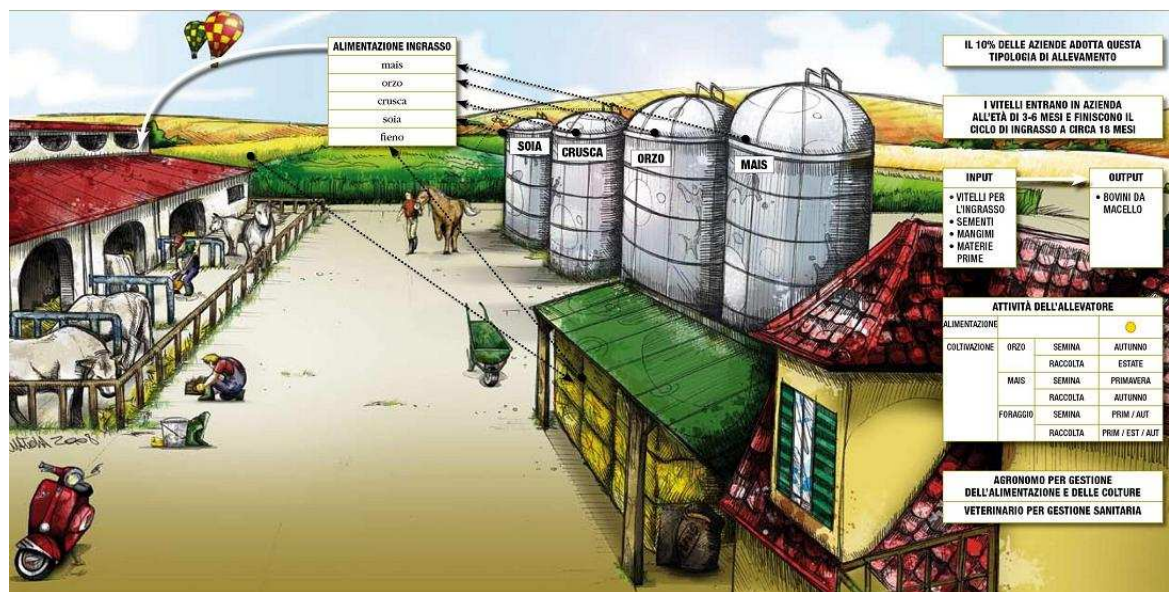
- **PNR** (Piano Nazionale Residui) extra piano
- **PNAA** (Piano Nazionale Alimentazione Animale)
- **PNI** (Piano Nazionale Integrato)

La direttiva **96/23/CE** concernente le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti impone a ciascun Stato membro di predisporre ed attuare un **piano nazionale di sorveglianza per la ricerca di residui di sostanze chimiche (di seguito denominato PNR)** durante il processo di allevamento degli animali da produzione e durante il processo di prima trasformazione dei prodotti di origine animale.

Attualmente in revisione nel **Reg 882/2004**



II PNR mira ad esaminare e porre in evidenza le ragioni dei rischi di residui nei prodotti alimentari di origine animale a livello degli allevamenti, dei mattatoi, dei centri di raccolta latte, degli impianti di acquacoltura e dei centri di raccolta e imballaggio delle uova.



Cosa definisce il PNR?

- **Specie**
- **Categorie**
- **Punti di Campionamento**
- **Sostanze da Ricercare**
- **Modalità di Ricerca**
- **Quadro Normativo di Riferimento**



Matrici da campionare

- Urina
- Siero / Plasma
- Grasso
- Muscolo
- Rene
- Fegato
- Bulbo oculare
- Tiroide
- Pelo
- Uova
- Miele
- Mangimi
- Acqua abbeverata
- Premiscele
- Latte ricostituito



Classificazione dei residui

Le sostanze e i loro residui da ricercare rientrano in due categorie, secondo l'allegato I della Dir.96/23CE

- Categoria **A** (**sostanze vietate**)
- Categoria **B** (**sostanze autorizzate**)

Classificazione dei residui

La categoria A comprende le **sostanze ad azione anabolizzante non autorizzate** per il trattamento degli animali da reddito. Queste sostanze vengono utilizzate fraudolentemente inducendo un incremento ponderale dell'animale trattato.

CATEGORIA A - SOSTANZE AD EFFETTO ANABOLIZZANTE E SOSTANZE NON AUTORIZZATE

- 1) Stilbeni, loro derivati e loro sali ed esteri
- 2) Agenti antitiroidei
- 3) **Steroidi**
- 4) Lattoni dell'acido resorcilico (compreso lo zeranolo)
- 5) β -agonisti
- 6) **Sostanze incluse nell'All. IV** del regolamento (CEE) n. 2377/90 del Consiglio, del 26 giugno 1990 [ora abrogato dal regolamento (CE) n. 470/2009 e regolamento (UE) n. 37/2010]

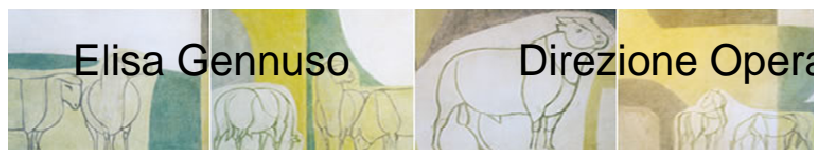
Sostanze Vietate **cat.A**

- Nitrofurani
 - Cloramfenicolo
 - Verde Malachite
 - Nitroimidazolici
 - Dapsone
- Cat.A6

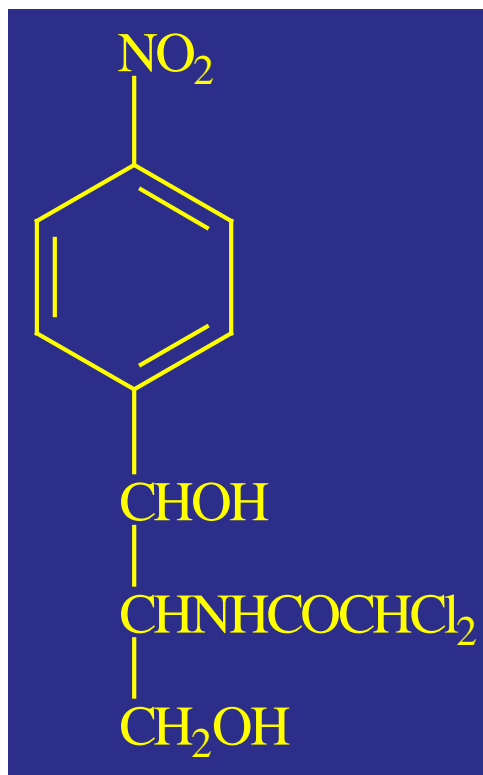
L'allegato IV contiene l'elenco delle sostanze per le quali non possono essere fissati livelli massimi in quanto i residui di tali sostanze costituiscono un rischio per la salute umana indipendentemente dal limite fissato.

Decisione della Commissione 2003/181/CE del 13 marzo 2003 che modifica la decisione 2002/657CE per quanto concerne la fissazione dei **limiti minimi di rendimento richiesti (LMRR)** per alcuni residui negli alimenti di origine animale.

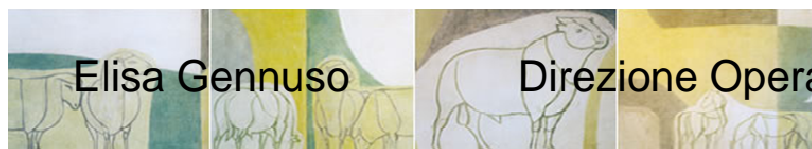
***Tabella 2 Regolamento No 37/2010 del 22 Dicembre 2009**



Cloramfenicolo (vietato)

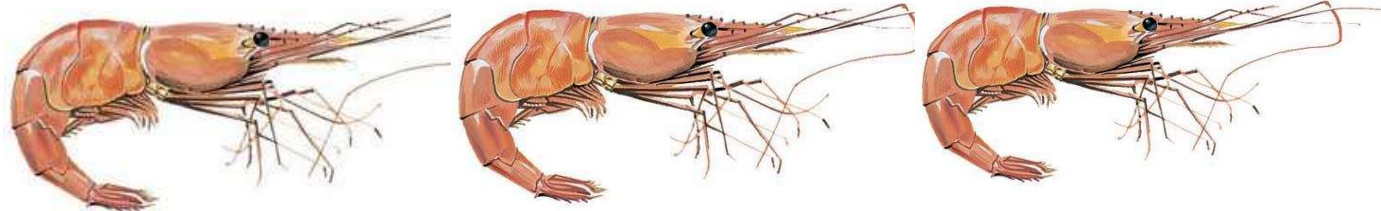


- Antibiotico ad ampio spettro d'azione
- Effetti tossici basse concentrazioni (presente nel collirio)
- È un antibiotico non autorizzato in medicina veterinaria dal 1994 dall'UE
- Usato illegalmente in zootecnia
- Determinazione in LC-MS/MS
- Gamberi, Pappa reale, Latte, Budella



VERDE MALACHITE (vietato)

- Antibatterico (colorante)
- Utilizzato illegalmente in itticultura
- Determinazione LC-MS/MS
- Positività in Gamberi dal sud est Asiatico, in prodotti di acquacoltura



Nitrofurani e metaboliti

- Farmaci con azione batteriostatica
- Non autorizzati in Europa dal 1993
- Utilizzati illegalmente in zootecnia
- I nitrofurani possiedono una stabilità relativamente breve nei tessuti animali rispetto ai loro metaboliti che sono più persistenti, per questa ragione il monitoraggio prevede la ricerca dei residui dei loro metaboliti.
- Determinazione dei **metaboliti** dopo un processo di idrolisi con acido cloridrico per liberare i residui dalla frazione proteica per essere poi derivatizzati con nitrobenzaldeide ottenendo così i relativi nitrobenzaldeide-derivati.
- Analisi in LC-MS/MS

Metaboliti



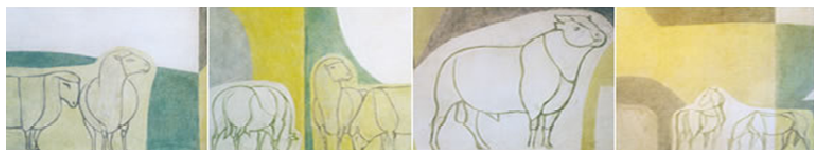
Nb-AOZ

Nb-AMOX

Nb-SEM

Nb-AMOZ

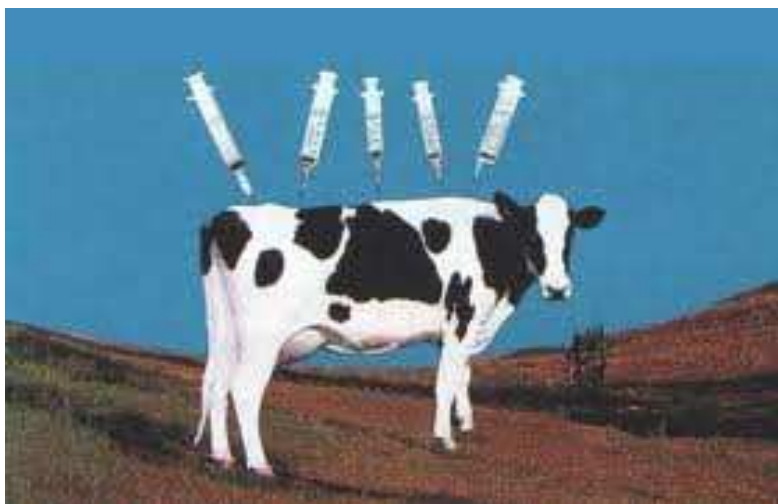
**Positività riscontrate in campioni di gamberi, budella,
muscolo di pollo e bovino**



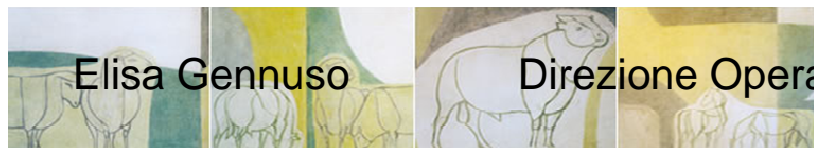
I CORTISONICI

Il **Desametasone** (9α -fluoro- 16α -metilprednisolone) è un derivato sintetico del cortisolo molto utilizzato in Medicina Veterinaria appartenente alla famiglia dei corticosteroidi, ormoni a struttura steroidea prodotti dalla corticale delle ghiandole surrenali, deputati al mantenimento dell'omeostasi dell'organismo.

I **composti di sintesi** sono caratterizzati da modificazioni della struttura del cortisolo e ciò fa sì che essi acquisiscano proprietà favorevoli ai fini del loro uso farmacologico.

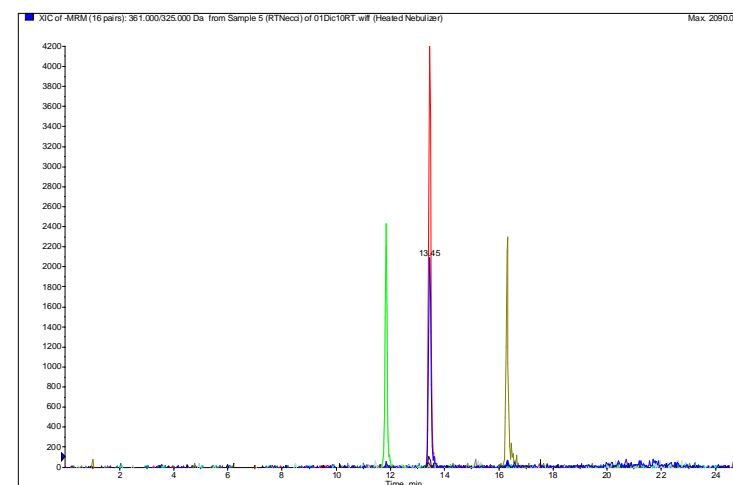
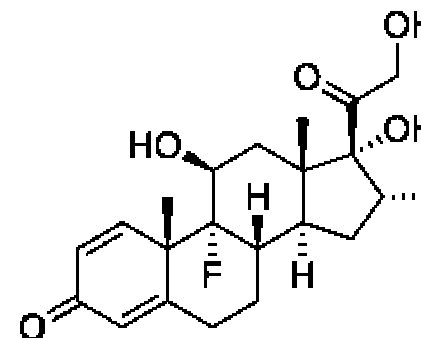


Il **desametasone** si caratterizza per una azione più duratura ed è circa trenta volte più potente rispetto al cortisolo.



I CORTISONICI, dal 2012 *migrano dal gruppo A3 al gruppo B2f*.

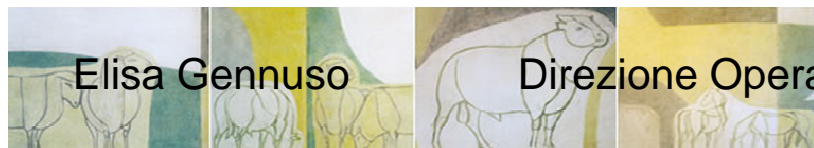
- La più importante azione farmacologica che tali molecole svolgono è senza dubbio quella **antiflogistica**.
- Il desametasone può essere impiegato in modo fraudolento sia da solo sia in combinazione con altri **promotori di crescita vietati**, come i β -agonisti, per incrementare il peso degli animali
- Le matrici dove si effettua la ricerca sono le urine, negli alimenti per l'uomo e gli animali
- Positivi per desametasone in numero significativo in campioni di urine
- L'analisi di conferma si effettua in LC-MS/MS



RESULTS ANPs 2011

B2f. Corticosteroids [1]

Compound	Species (sampling)	Member State (NC)	NC results
Dexa-methasone	Bovines (target)	DE(2) ES(5) IT(16) PL(1)	24
	Bovines (suspect)	BE(1) IT(7)	8
	Bovines (others)	DE(2) IT(8)	10
	Pigs(suspect)	BE(3)	3
Prednisolone	Bovines (target)	BE(1) IT(7)	8
	Bovines (suspect)	BE(2) IT(2)	4
	Sheep&goats (target)	BE(1)	1
Subtotal corticosteroids [1]			58

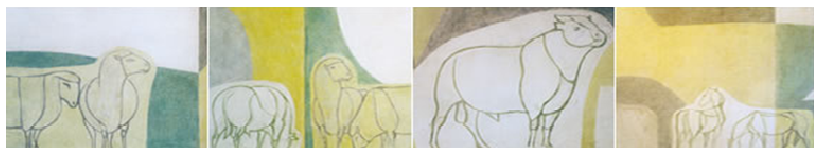


MEDROSSIPROGESTERONEACETATO(MPA) categoria A3

- Contaminazione mangime per suini con medrossiprogestosteroneacetato
- Ricerca di MPA su tessuto adiposo suino
- Riscontro di positività per il MPA
- Responsabile dell'infertilità delle scrofe
- Abbattere i maiali nutriti con mangime altamente contaminato, rimuovendoli del tutto dalla catena alimentare



La responsabilità di tale contaminazione è stata attribuita alla distribuzione dello sciroppo di glucosio contaminato che era stato consegnato ai mangimifici



La categoria B comprende :

Farmaci veterinari, **autorizzati al trattamento** chemioprolattico di animali da reddito per i quali l'Unione Europea definisce un limite massimo residuo(**LMR**)che non può essere superato nei prodotti destinati al consumo

Sostanze e agenti contaminanti per l'ambiente: pesticidi
metalli pesanti, diossine e pcb, micotossine

CATEGORIA B - MEDICINALI VETERINARI E AGENTI CONTAMINANTI

- 1) Sostanze antibatteriche, compresi sulfamidici e chinolonici
- 2) Altri prodotti medicinali veterinari
 - a) antelmintici
 - b) Coccidiostatici
 - c) carbammati e piretroidi
 - d) tranquillanti
 - e) antinfiammatori non steroidei (AINS)
 - f) altre sostanze esercitanti un'attività farmacologia
- 3) Altre sostanze e agenti contaminanti per l'ambiente
 - a) composti organoclorurati, compresi i PCB
 - b) composti organofosforati
 - c) elementi chimici
 - d) micotossine
 - e) **coloranti**(*verde malachite in A6*)
 - f) altri

Positività Ricontrate

- Tetracicline (allevamento bovino ed ovino latte e muscolo)
- Sulfamidici (sulfadimetossina e sulfametazina nel muscolo suino e sulfatiazolo nel miele).
- Chinolonici (enrofloxacin allevamento avicolo, muscolo)
- Macrolidi (Tilosina nel miele, Spiramicina nel latte)
- Beta lattamici (amoxicillina nel latte)
- Coccidiostici (nicarbazina nelle uova)



NON CONFORMITA' PNR 2011
Suddivisione per Gruppi

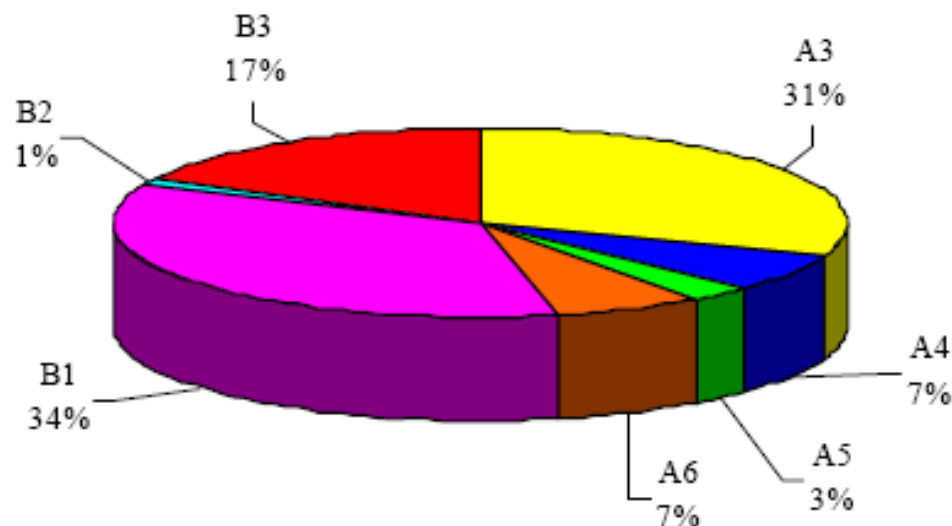


Figura 2 – Distribuzione percentuale delle non conformità nei singoli gruppi in attuazione del PNR 2011

Il gruppo B1 (*sostanze antibatteriche, comprese sulfamidici e chinolonici*) rappresenta la principale causa di non conformità (**34%**). A seguire, gli *steroidi* (A3) con il **31%** e le *altre sostanze e agenti contaminanti per l'ambiente* (B3) con il **17%**.

Obiettivi PNR

- Svelare i casi di somministrazione illecita di sostanze vietate
- Svelare la somministrazione abusiva di sostanze autorizzate
- Verificare la conformità dei residui di farmaci veterinari con i limiti massimi residui
- Dopo aver elaborato tutti i dati/esiti analitici a disposizione, vengono predisposte azioni tese a migliorare il processo di sorveglianza.

PNAA

**Il Piano Nazionale di Sorveglianza e di
Vigilanza Sanitaria sull'Alimentazione degli
Animali assume valenza triennale, in uso per
gli anni 2012-2013-2014**

Il Piano Nazionale Alimentazione Animale

Ha la finalità di contribuire, attraverso la vigilanza
e il controllo
sui mangimi, ad assicurare la salubrità dei
prodotti di origine
animale destinati al consumo umano.

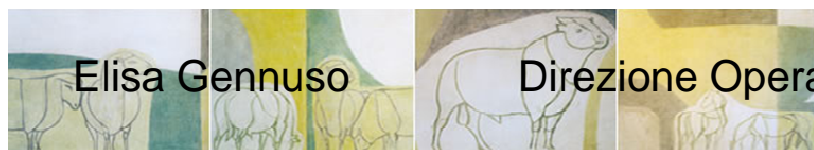
Matrici campionate:

Materie prime per mangimi di origine animale, vegetale, minerale.

Tutte le tipologie di mangimi (completi e complementari).

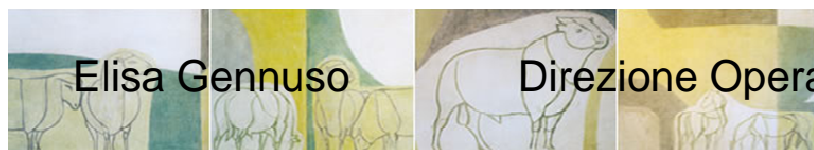
Gli alimenti medicamentosi per animali (additivi e premiscele medicate)

L'acqua di abbeverata



Positività Ricontrate

Sulfamidici in azienda allevamento conigli
Tetracicline in allevamento bovino
Cross contamination

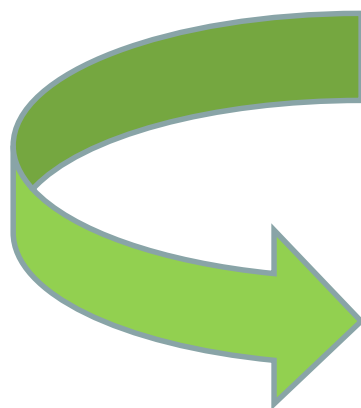


Elisa Gennuso

Direzione Operativa Chimica IZSLT

Roma 20 Novembre

Flussi Informativi

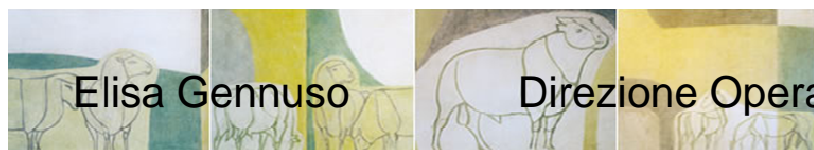
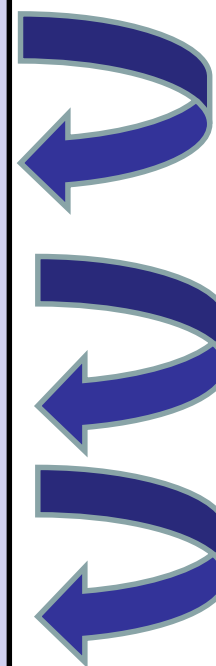


I campioni raccolti vengono analizzati dagli IZSS

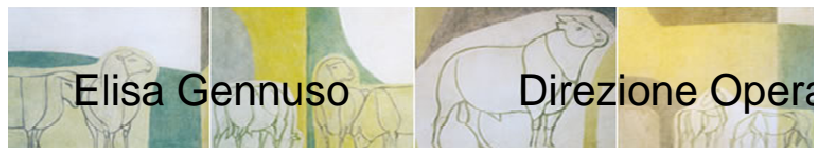
la cui attività è coordinata dall'ISS che effettua le analisi di revisione.

I dati relativi all'attività svolta vengono comunicati dalle Asl agli assessorati alla sanità, che li trasmettono al Ministero della Salute, che li

trasmette entro sei mesi dalla fine dell'anno alla Commissione Europea.

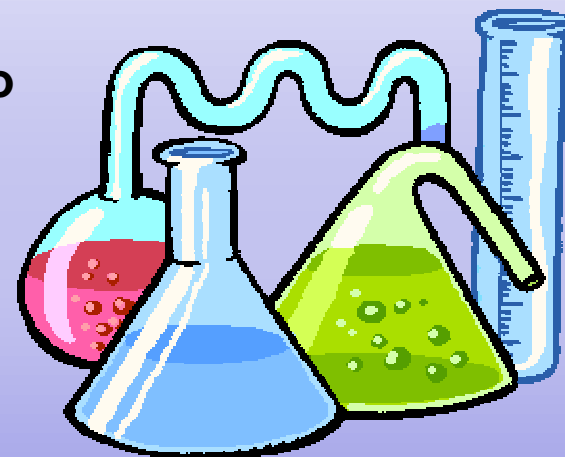


E adesso una pausa

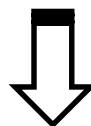


La Direzione Operativa Chimica esegue la ricerca dei residui di categoria A e di categoria B avvalendosi di metodi analitici che sono stati sviluppati in tre fasi:

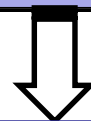
- 1- Sviluppo e ottimizzazione del metodo analitico**
- 2- Validazione del metodo analitico**
- 3-Accreditamento del metodo analitico**



I METODI ANALITICI (POS procedure operative standard)
vengono validati seguendo le indicazioni riportate dalla
Decisione 2002/657/CE.



In accordo alla ISO/IEC 17025/2005
in relazione all'accreditamento dei
metodi



Assicurazione della qualità e la comparabilità dei
risultati analitici prodotti dai laboratori per il
controllo ufficiale dei residui riconosciuti
dall'autorità competente.

Criteri di rendimento di un metodo

La validazione ha lo scopo di verificare le caratteristiche e le prestazioni di un metodo con l'obiettivo di dimostrare che è affidabile nelle condizioni in cui è applicato.

- Accuratezza
- Specificità
- Esattezza
- Precisione
- Ripetibilità
- Riproducibilità
- Recupero
- Robustezza
- LOD
- LOQ
- C α
- C β



È possibile stabilire che il metodo analitico è adeguato e che genera risultati affidabili!!!

2002/657/CE Limite Decisione cca

Articolo 6

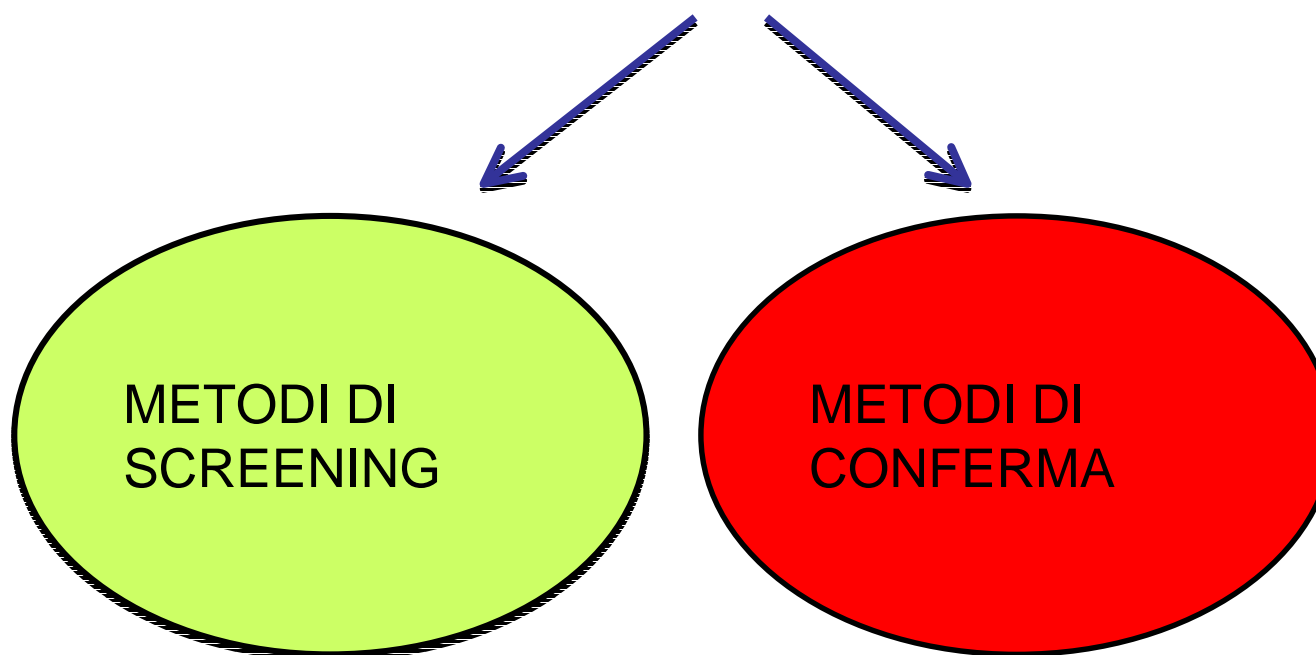
Interpretazione dei risultati

1. Il risultato di un'analisi sarà considerato non conforme se viene superato il limite di decisione del metodo di conferma per l'analita.
2. Se per una sostanza è stato stabilito un limite consentito, il limite di decisione è la concentrazione oltre la quale è possibile stabilire con una certezza statistica di $1 - \alpha$ che il limite consentito è stato effettivamente superato.
3. Se per una sostanza non è stato stabilito un limite consentito, il limite di decisione è il livello di concentrazione più basso al quale un metodo è in grado di stabilire con una certezza statistica di $1 - \alpha$ che quel particolare analita è effettivamente presente.
4. Per le sostanze elencate nel gruppo A dell'allegato I alla direttiva 96/23/CE, l'errore α è pari o inferiore all'1 %. Per tutte le altre sostanze l'errore α è pari o inferiore al 5 %.

NON CONFORME > Limite Decisione cca

LMR+1.64 S (es $cca=100 + 1.64 * 6.5= 111$)

METODI DI ANALISI



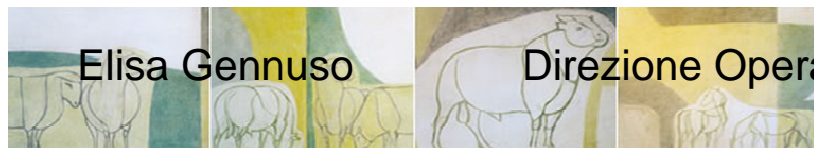
Metodo di **screening**: metodo impiegato per rivelare la possibile presenza di una sostanza o una classe al livello di interesse

Metodo di **conferma**: metodo che fornisce informazioni complete o complementari per l'identificazione inequivocabile di una sostanza e, se necessario, per la sua quantificazione

METODI DI ANALISI

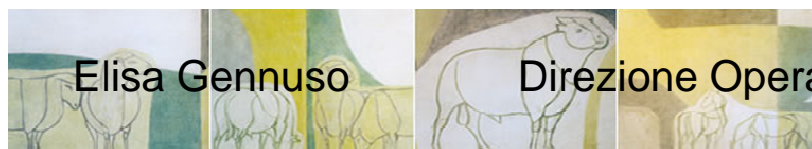
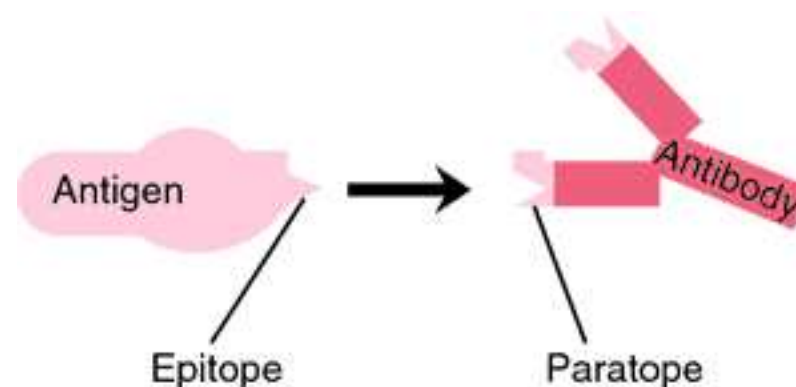
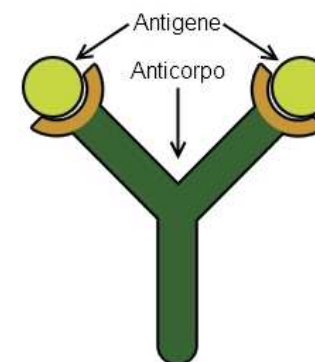
- **SCREENING:**

utilizzati per rivelare la possibile presenza di un analita o classe di analiti a o sopra un livello di interesse. Questi metodi permettono di processare un elevato numero di campioni e di evidenziare i **sospetti**.



Tecniche di screening E.L.I.S.A

- Specificità del legame Ag/Ab
- Analisi di un numero elevato di campioni
- Facile e rapida esecuzione



La qualità del dato cromatografico dipende prevalentemente dal sistema di rivelazione impiegato e dalla conseguente capacità di rispettare specifici criteri identificativi

LC o GC con rilevazione attraverso spettrometria di massa



Gruppo A e B

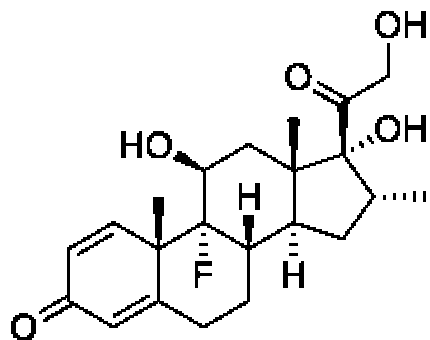


In seguito a separazione cromatografica



Full scan o 3 Id.Points (B) o 4 Id.P. (A)

Nel caso di risultato di
*sospetta **non conformità***
l'esito deve essere
verificato con
un metodo di **conferma**

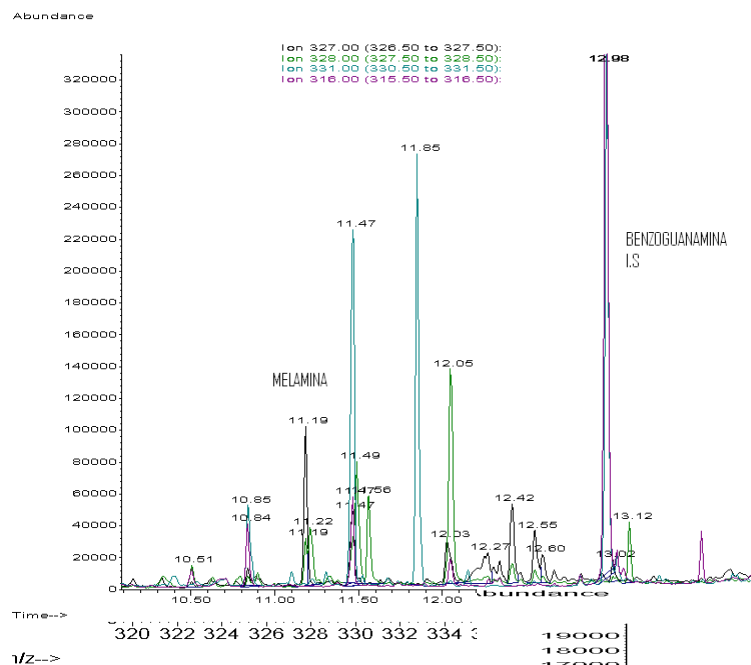


Effettuare il riconoscimento inequivocabile della
Sostanza servono informazioni sulla
struttura chimica.

Impiego della spettrometria di massa



MELAMINA sistema di allerta internazionale

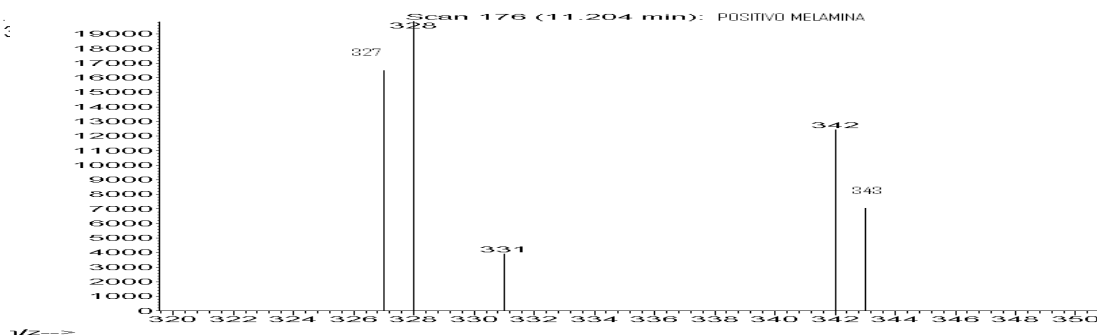


-è un composto chimico(2,4,6 triamina-s- triazina) utilizzato nella produzione di plastica, colle e resine sintetiche.

-viene aggiunta negli alimenti e mangimi, in modo fraudolento, per aumentare i valori proteici

-si determina mediante analisi in GC/MS

- Positività riscontrate in mangime per cani,risce crackers,latte in polvere



Metodi Lab Residui

	<i>POS</i>	<i>Tecnica</i>
POS CHI 003 INT	Verdemalachite, leucomalachite	LC-MS/MS
POS CHI 004 INT	Tireostatici: Urna tessuti	LC-MS/MS
POS CHI 017 INT	Beta agonisti:	LC-MS/MS
POS CHI 018 INT	Ormoni Urina	LC-MS/MS
POS CHI 020 INT	Tilosina	LC-MS/MS
POS CHI 021 INT	Sulfamidici: Miele	LC-MS/MS
POS CHI 022 INT	Nitrofurani: AOZ, AMOZ, AHD, SEM	LC-MS/MS
POS CHI 023 INT	Dapsone	LC-MS/MS
POS CHI 024 INT	Cloramfenicolo Alimenti Mangimi	LC-MS/MS
POS CHI 025 INT	Cortisonici: Urine Fegato Mangime	LC-MS/MS
POS CHI 026 INT	Zeranol e taleranol Urine	GC-MS
POS CHI 030 INT	Penicilline: Alimenti Mangimi	LC-MS/MS
POS CHI 031 INT	Streptomina (ELISA)	ELISA
POS CHI 032 INT	Avermectine Alimenti Mangimi	LC-FL
POS CHI 033 INT	Sulfamidici Alimenti Mangimi	LC-MS/MS
POS CHI 034 INT	Antibiotici: Alimenti mangimi	LC-MS/MS
POS CHI 035 INT	Melamina	GC-MS
POS CHI 039 INT	Beta agonisti screening	ELISA
POS CHI 042 INT	Promazine: Urina	ELISA
POS CHI 043 INT	Benzimidazolici Alimenti	LC-MS/MS
POS CHI 044 INT	Ormoni steroidei: Urina Tessuti	LC-MS/MS
POS CHI 045 INT	Nitroimidazoli:	LC-MS/MS
POS CHI 046 INT	Coccidiostatici Alimenti Mangimi	LC-MS/MS
POS CHI 048 INT	Residui di farmaci nei Mangimi	LC-MS/MS
POS CHI 061 INT	Antinfiammatori non steroidei	LC-MS/MS



Conclusioni:

Assicurare la conformità degli alimenti alle normative nazionale e comunitarie in materia di residui di sostanze chimiche negli animali vivi e nei prodotti da loro derivati.

Risolvere alcune criticità riscontrate al fine di permettere il miglioramento del programma di monitoraggio futuro garantendo la sicurezza degli alimenti che tutti i giorni finiscono nel nostro piatto.





Grazie a tutti per
l'attenzione!!!!!!!

