

**Il controllo pubblico nella Sicurezza Alimentare:
punti di forza delle attività svolte presso i Laboratori dell'IZSLT**

Il controllo delle biotossine algali nel Lazio e nella Toscana

**Rossana Claudia Bonanni
Direzione Operativa Chimica**

Roma, 24 Ottobre 2017



INDICE

- **Biotossine algali**
- **Normativa riguardante i molluschi bivalvi e le biotossine algali**
- **Metodi di analisi**
- **Biotossine algali nella D.O.C.**
- **Prospettive future**



Biotossine algali: cosa sono?

BIOTOSSINA



sostanza prodotta o derivata da un organismo vivente, capace di indurre, anche a basse concentrazioni, manifestazioni fisiologiche dannose per alcune specie viventi

BIOTOSSINE ALGALI : *sostanze tossiche prodotte da alghe unicellulari o batteri in ambiente acquatico*

Dinoflagellati

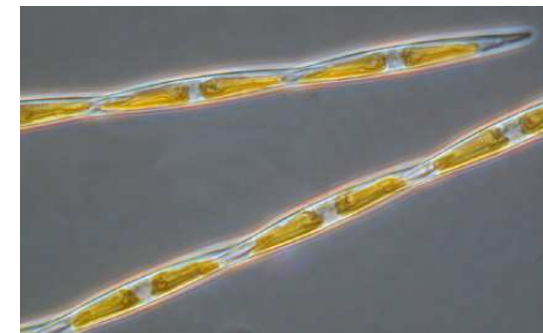


Dynophisys fortii



Alexandrium catenella

Diatomee



Pseudo-nitzschia pungens



Harmful Algal Bloom (HAB)

HARMFUL ALGAL BLOOM (fioritura algale dannosa)=
definisce i fenomeni associati alla presenza di alghe tossiche e/o dannose



Biotossine algali

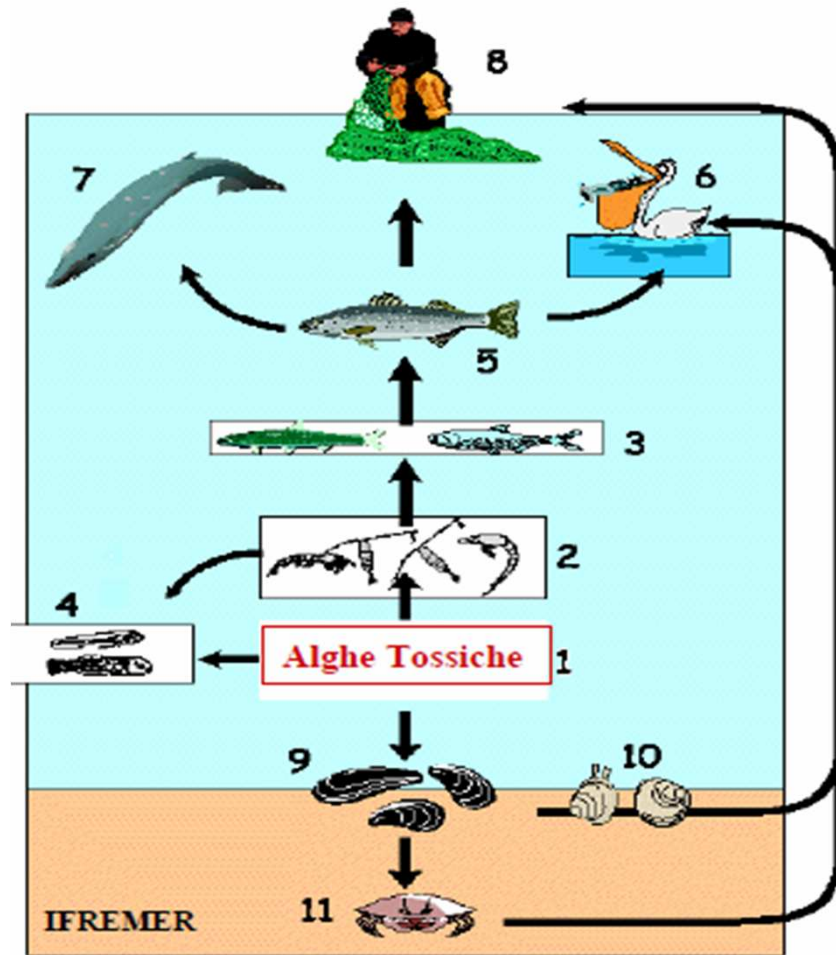
Possono essere presenti in **molluschi bivalvi**



Accumulo nei tessuti, soprattutto gonadi ed epatopancreas,
senza subire effetti tossici



Biotossine algali: bioaccumulo



L'uomo entra in contatto con le biotossine algali che, attraverso la rete trofica, si sono accumulate e concentrate in prodotti ittici di consumo umano

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



Biointossicazioni



Classificazione

SOLUBILITA' NEI SOLVENTI

IDROSOLUBILI

Paralytic Shellfish Poisoning (**PSP**)
Amnesic Shellfish Poisoning (**ASP**)
Tetrodotossine (**TTX**)

LIPOSOLUBILI

Diarrhetic Shellfish Poisoning (**DSP**)
Neurotoxic Shellfish Poisoning (**NSP**)

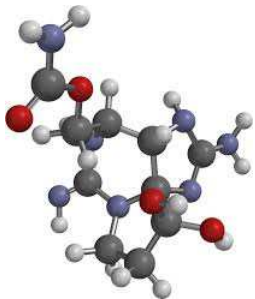
EFFETTI TOSSICI



Classificazione

Nel 2004 la **Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs** propone

CLASSIFICAZIONE IN BASE ALLE **CARATTERISTICHE CHIMICHE**



Saxitossina e STXs

Acido Domoico DA

Azaspiracido e AZAs

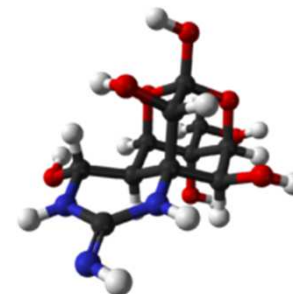
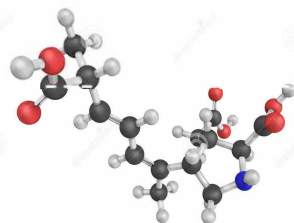
Acido Okadaico e DTXs

Pectenotossina e PTXs

Yessotossina e YTXs

Brevetossina e PbTXs

Tetrodotossine e TTXs

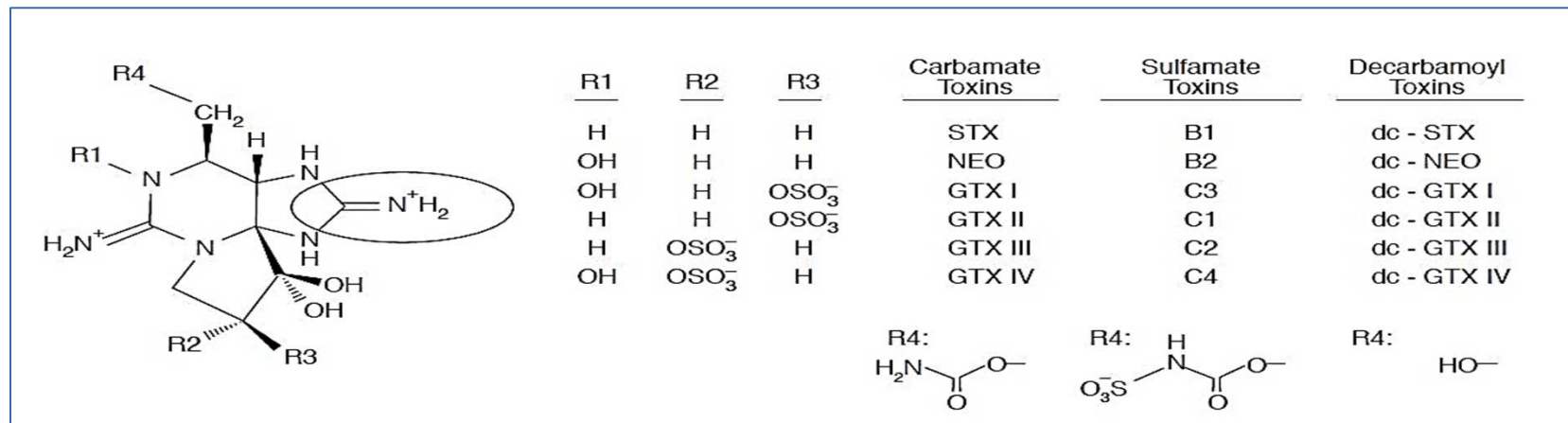


Paralytic Shellfish Poisoning (PSP)

Tossina responsabile è la **Saxitossina**,
isolata per la prima volta nel mollusco
Saxidomus giganteus



Sono note 30 molecole analoghe



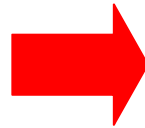
Microalghe responsabili: dinoflagellati del genere *Alexandrium* e *Gymnodinium*



Paralytic Shellfish Poisoning (PSP)

MECCANISMO DI AZIONE

Blocco del trasporto di ioni
sulla membrana cellulare
per azione sul canale di Na^+



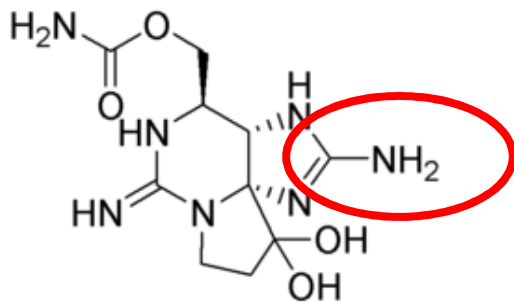
Blocco della trasmissione
degli impulsi nervosi
al sistema muscolare e scheletrico
con conseguente **paralisi respiratoria**

SINTOMI

Iniziali (30 minuti dopo ingestione)

- parestesie alla bocca e all'estremità degli arti
- impossibilità a mantenere la stazione eretta
- perdita di equilibrio
- Linguaggio incoerente

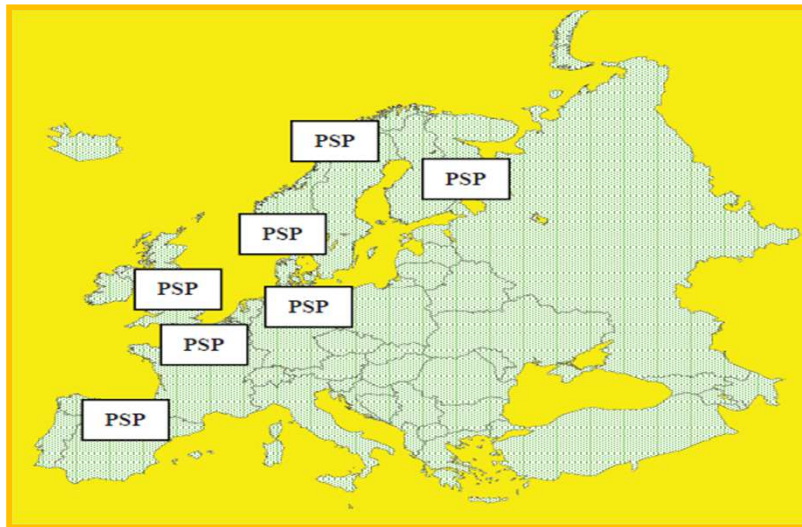
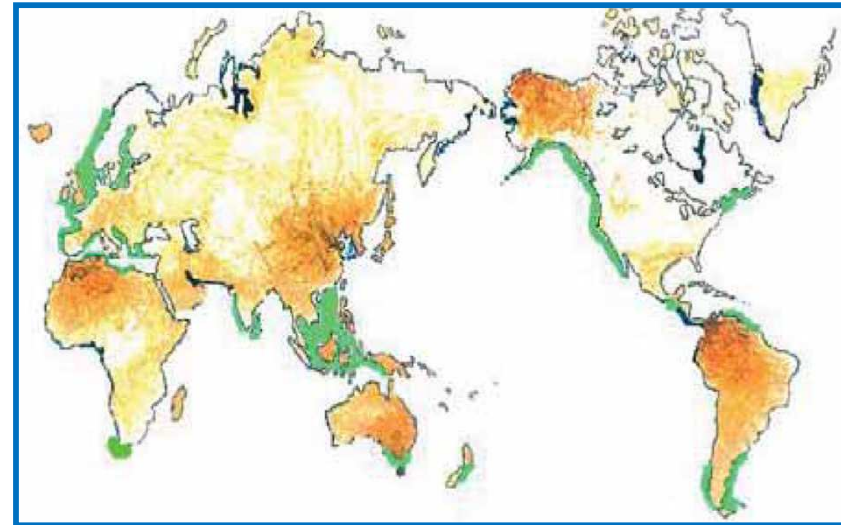
Casi più gravi: morte per arresto respiratorio o cardiocircolatorio entro 2-12h (dose 1-2 mg)



Diffusione PSP nel mondo

CASI

Asia (1991) 240 casi, 2 mortali
Venezuela (1977) 256 casi, 10 mortali
Guatemala (1987) 187 casi, 26 mortali



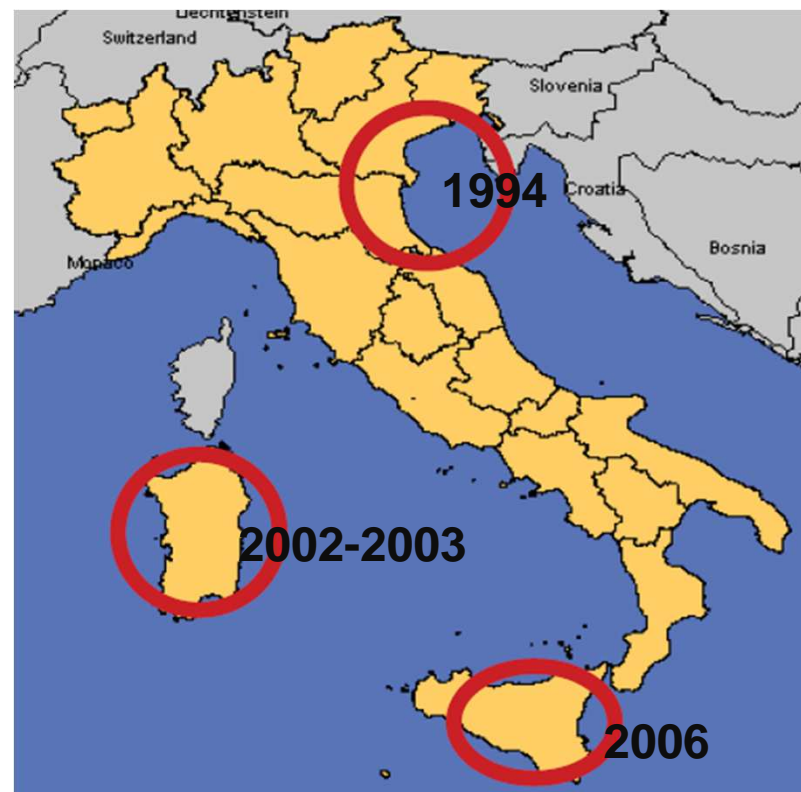
Casi noti fin dai primi del 900
(Norvegia 1901, Inghilterra 1968,
Scozia 1990, Spagna 1976)

In **Germania, Bassa Sassonia, Francia, Svizzera e Italia** casi di avvelenamento a seguito di consumo di mitili esportati dalla **Spagna**



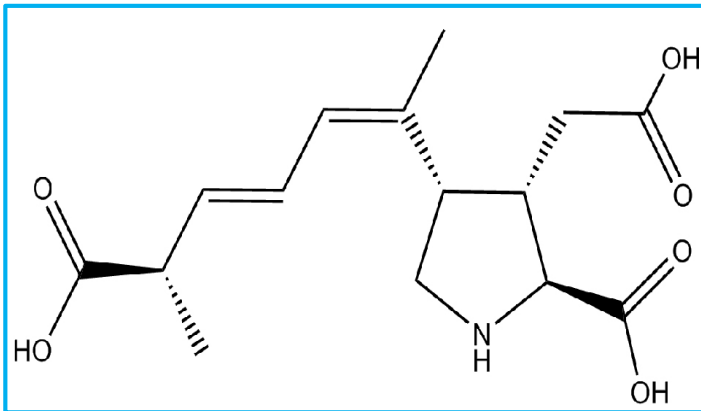
Diffusione PSP in Italia

PSP MESI POTENZIALMENTE A RISCHIO	
Gennaio	●
Febbraio	●
Marzo	●
Aprile	● ● ●
Maggio	● ● ● ● ●
Giugno	● ● ● ●
Luglio	● ●
Agosto	●
Settembre	●
Ottobre	●
Novembre	●
Dicembre	●



Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)

Tossina responsabile: **ACIDO DOMOICO**, amminoacido raro, neuroeccitatore che agisce sui siti della memoria (ippocampo)



Sono noti 8 isomeri

Identificata per la prima volta in Canada nel **1987**: 250 persone intossicate e 4 morte dopo consumo di mitili con sintomi di **confusione** e **disorientamento**, **mutismo** e **coma**

Microalghe responsabili: diatomee *Nitzschia* e *Pseudonitzschia*



Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)

MECCANISMO DI AZIONE

simile a aspartato, glutammato e kainato, esplica un'azione antagonista sui recettori cerebrali di amminoacidi eccitatori, con stimolazione delle cellule nervose con possibilità di lesioni

SINTOMI

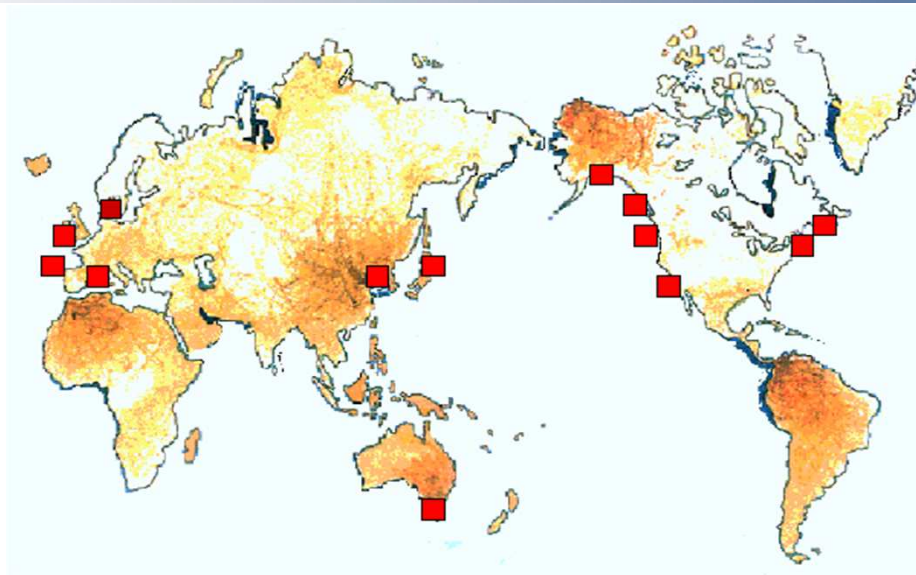
24 ore da ingestione: **disturbi gastrointestinali, nausea, dolori addominali e perdita di memoria a breve termine**

48 ore da ingestione: **Sintomi neurologici più gravi (confusione, disorientamento, perdita della memoria)**

Casi più gravi: lesioni neuronali a ippocampo e coma



Diffusione ASP



Nel **mondo**: CANADA, CALIFORNIA, AUSTRALIA, NUOVA ZELANDA

In **Europa**: **NO CASI DI INTOSSICAZIONE**, ma mitili contaminati in SPAGNA, OLANDA, DANIMARCA,

In **Italia**: negli anni '90 comparsa nell'Adriatico di Pseudonitzschia,

ASSENZA o **SCARSA PRESENZA** di acido domoico nelle produzioni nazionali, ma esiste **il rischio sanitario** derivante da **prodotti di importazione contaminati**.



Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP)

SINTOMATOLOGIA

da 30 min a 7 ore da ingestione

diarrea, nausea, vomito, dolori addominali, cefalea

Durata fino a tre giorni



SINDROME NON LETALE

EZIOLOGIA

Biotossine liposolubili

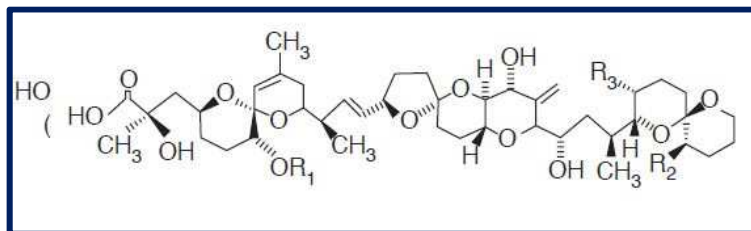
4 classi strutturali diverse per effetti
tossicologici, meccanismi di
azione e lesioni biochimiche

Acido okadaico e derivati (OAs)
Pectenotossine (PTXs)
Yessotossine e derivati (YTXs)
Azaspiracidi e derivati (AZAs)

Microalghe responsabili: dinoflagellati gen. Dinophysis e Prorocentrum



Acido Okadaico e derivati



	R1	R2	R3
AO	H	H	CH ₃
DTX1	H	CH ₃	CH ₃
DTX2	H	H	CH ₃
DTX3	acyl	CH ₃	CH ₃
7-O-acylOA	acyl	CH ₃	H
7-O-acylDTX2	acyl	H	CH ₃

Meccanismi di azione e effetti tossici

OA, DTX1 e DTX2 inibiscono selettivamente **le proteine fosfatasi** (PP2A), alterando i processi di fosforilazione-defosforilazione.

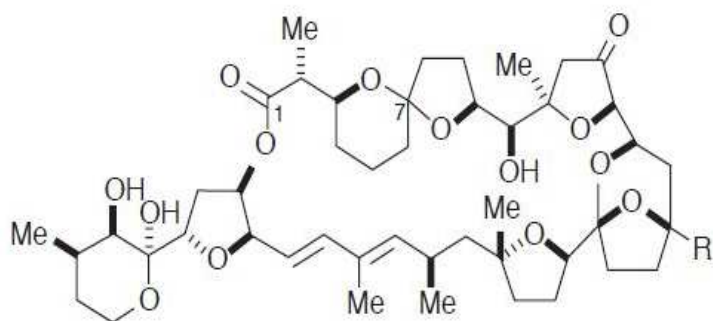
OA provoca diarrea stimolando la **fosforilazione che controlla la secrezione di Na** da parte delle **cellule intestinali** e stimolando la **contrazione della muscolatura liscia intestinale**

Studi in vivo

OA, DTX3 e DTX1 distruggono epitelio intestinale;
OA e DTX1 promotori di tumori della pelle e dello stomaco;
OA mostra **attività genotossica**



Pectenotossine (PTXs)



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

**20 composti che
derivano da PTX2
attraverso
biotrasformazione da
parte dei molluschi**

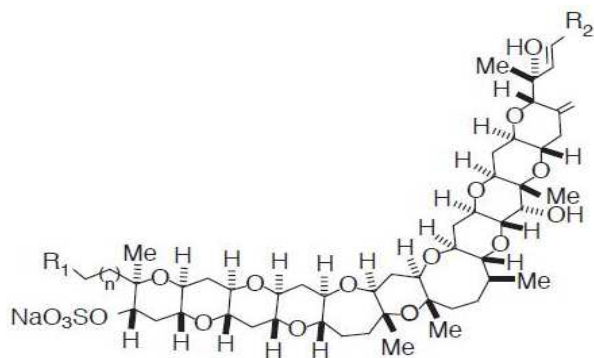
MECCANISMO DI AZIONE IGNOTO

Da studi in vivo:
lesioni a **fegato**, **stomaco** e **intestino** e
cambiamenti istologici a **polmoni** e **reni**

**Richiesta da parte dei Laboratori
di Riferimento Nazionali la
DEREGOLAMENTAZIONE DELLE
PTXs**



Yessotossine (YTXs)



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

MECCANISMO DI AZIONE IGNOTO

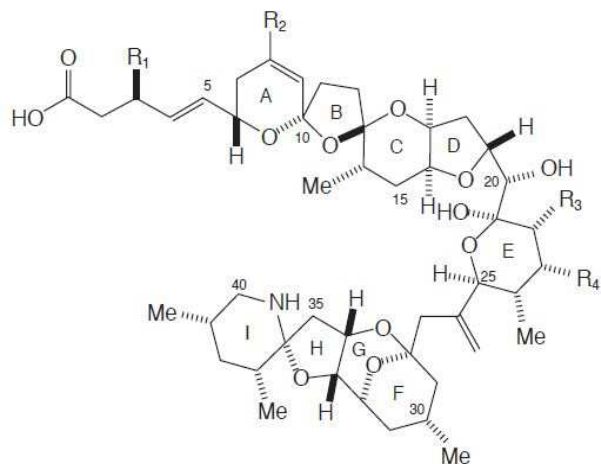
Nessun potere diarroico → nessuna inibizione
delle Proteine Fosfatasi

Organo bersaglio: **MIOCARDIO** (Studi in vivo)

**NON SONO NOTI CASI DI
INTOSSICAZIONE UMANA**



Azaspiracidi (AZAs)



Tossina	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
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

**32 composti
AZAs**

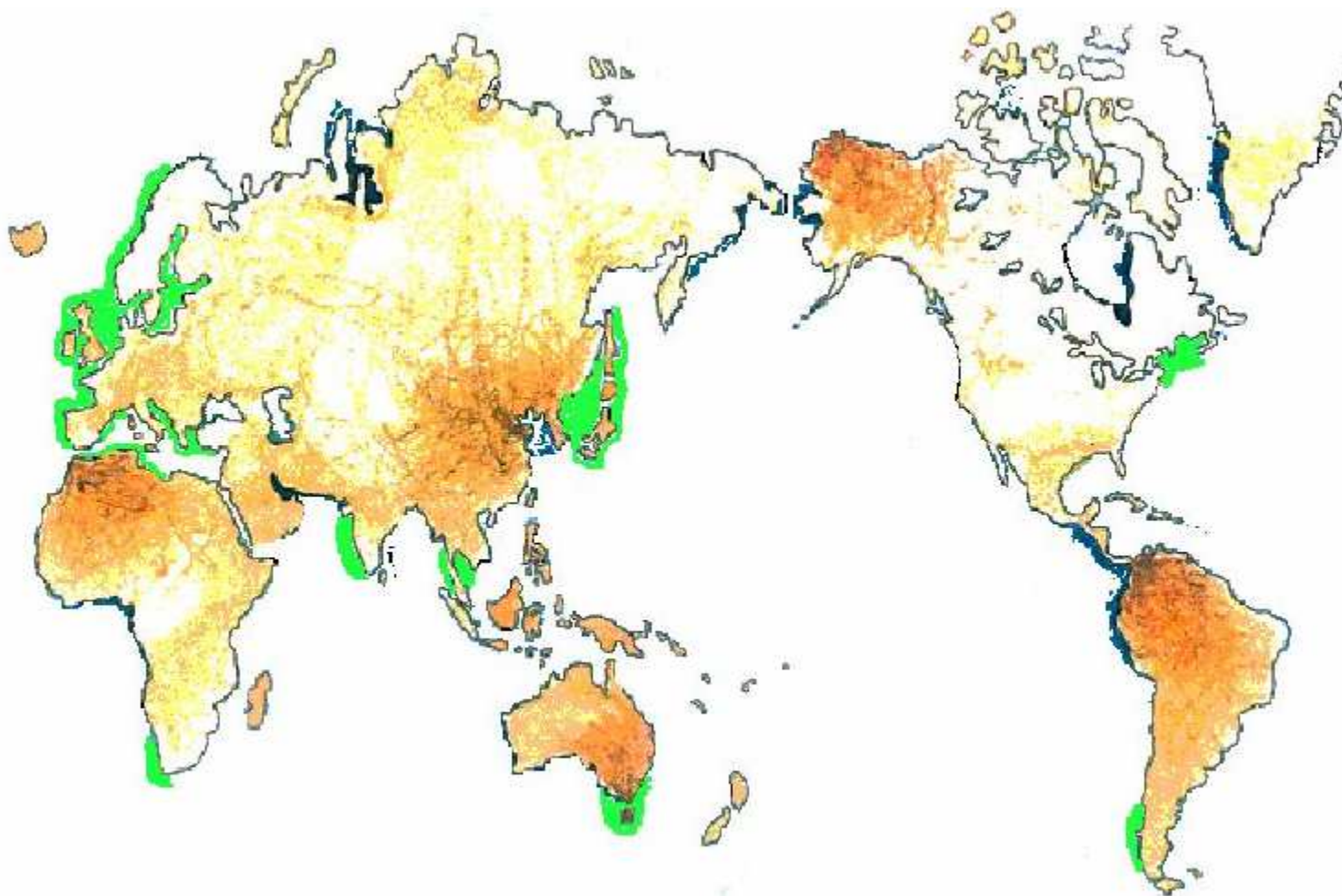
Prima apparizione (Irlanda, 1995) forti disturbi gastrointestinali nei consumatori dei Paesi Bassi che avevano mangiato mitili importati dall'Irlanda

Tossicità nell'uomo: effetto acuto con **disturbi gastrointestinali**

Tossicità animale: AZA1 provoca danni gravi a fegato, polmone, pancreas, timo, milza e tratto digestivo

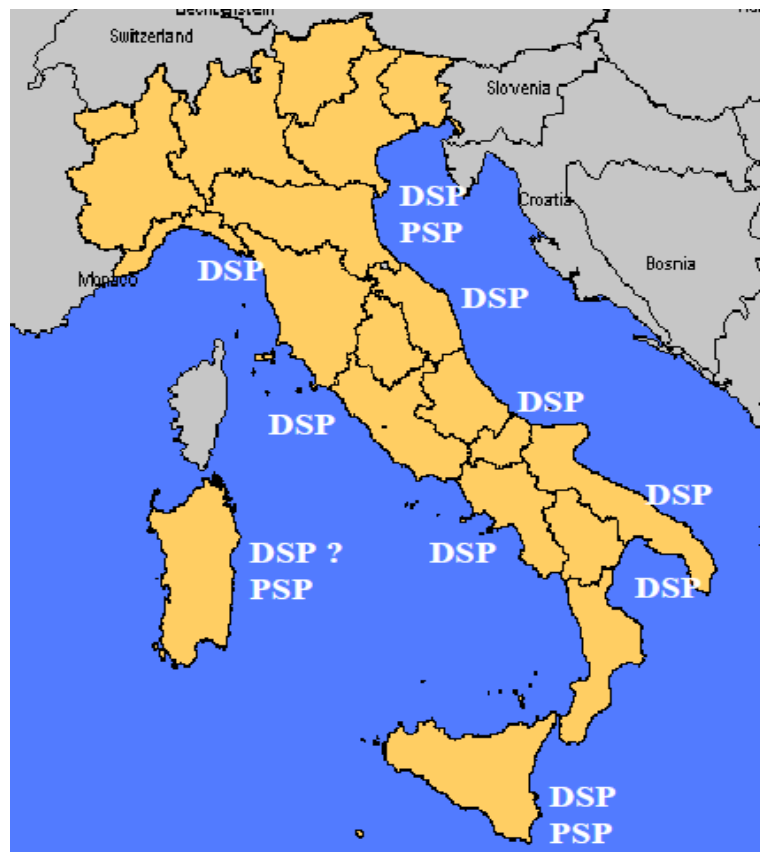


Diffusione DSP nel mondo



Rossana Claudia Bonanni - Roma, 24 Ottobre 2017

Diffusione DSP in Italia



**PRIMO EPISODIO DI INTOSSICAZIONE
IN EMILIA ROMAGNA NEL 1989**

STAGIONALITA'

	DSP
Gennaio	●
Febbraio	●
Marzo	●
Aprile	●
Maggio	●
Giugno	● ● ●
Luglio	● ● ● ●
Agosto	● ● ● ●
Settembre	● ● ● ●
Ottobre	● ● ● ●
Novembre	● ●
Dicembre	●



Normativa

Il Reg. (CE) 853/2004 definisce i seguenti tenori massimi di alcune biotossine marine in molluschi bivalvi e altri organismi

800 µg di equivalente Saxitossina/kg parte edibile

20 mg di Acido Domoico + Ac. Epidomoico/kg parte edibile

160 µg di equivalente Acido Okadaico/kg parte edibile

3,75 mg di equivalente Yessotossina/kg parte edibile

160 µg di equivalente Azaspiracido/kg parte edibile



Tossicità equivalente

Tossicità equivalente (TEQ, toxicity equivalency)

grandezza tossicologica che esprime la concentrazione di una sostanza nociva in termini di **quantità equivalente a un composto standard**.

Esprime il quantitativo di un tossico come concentrazione della sostanza di riferimento in grado di generare i medesimi effetti tossici.

La TEQ è in relazione con l'effettiva concentrazione di una data sostanza tramite il **fattore di equivalenza tossica** (**TEF**, toxic equivalency factor), parametro adimensionale che moltiplicato per la concentrazione effettiva fornisce la TEQ.



Fattore di tossicità equivalente

L'espressione dei risultati in accordo con la legislazione europea è di μg equivalenti/kg o mg equivalenti/kg ed è richiesto l'utilizzo dei **fattori di tossicità equivalente (TEFs)**, adottati dall'EFSA

Gruppo tossine	Analoghi	TEF	Espressione dei risultati
Gruppo OA	OA	1	μg OA equivalenti/kg
	DTX1	1	
	DTX2	0,6	
Gruppo PTX	PTX2	1	μg PTX equivalenti/kg
	PTX1	1	
Gruppo AZA	AZA1	1	μg AZA equivalenti/kg
	AZA2	1,8	
	AZA3	1,4	
Gruppo YTX	YTX	1	mg YTX equivalenti/kg
	Homo-YTX	1	
	45 OH YTX	1	
	45 oh homo YTX	0,5	



Il Reg. (CE) 2074/2005 All.III definisce i metodi di analisi riconosciuti per la rivelazione di biotossine marine

- PSP** Mouse test (MBA **AOAC 959.08**)
- ASP** HPLC-UV
- DSP** LC-MS/MS (*modifica nel Reg. CE 11/2015*)



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



Metodi utilizzati nella D.O.C.

POS CHI 018 NOR

DETERMINAZIONE DELL' **ACIDO DOMOICO IN **HPLC-DAD****

CAMPO DI APPLICAZIONE **2-80 mg/kg**

**Norma di riferimento:
AESAN EURLMB Domoic
acid vers 1 2008**



**Pulitura e omogeneizzazione
del campione**

**Aggiunta soluzione
estraente $H_2O:CH_3OH$ (50:50)**

**Omogeneizzatore
a immersione 3 min 10000 rpm**

Filtrazione con filtrino 0.45 mm

DETERMINAZIONE HPLC-DAD



Metodi utilizzati nella D.O.C.

POS CHI 021 NOR

DETERMINAZIONE DELLE DSP in LC-MS/MS

Pulitura e omogeneizzazione
del campione

Estrazione con CH₃OH (2x9ml)

Estratto a volume 20 ml

Filtro 0,22 mm

Determinazione in LC-MS di OA free
PTXs, AZAs, YTXs



Determinazione in LC-MS di OA tot

Idrolisi basica
1ml estratto (76°C 40 min)

Neutralizzazione

Filtro 0,22 µm

AECOSAN –EURLMB Marine
biotoxins vers. 5 2015



POS CHI 021 NOR

Determinazione LC-MS biotossine liposolubili del gruppo dell'OA e delle YTX



ANCHE PER CAMPIONI IDROLIZZATI

CONDIZIONI LC

Gradiente

A) Soluzione acquosa ammoniacale

B) CH₃CN

Tempo	%A	%B
0	90	10
8	10	90
13	10	90
15	90	10
20	90	10

CONDIZIONI MS/MS

Sorgente ESI

Analizzatore Triplo quadrupolo

Mod di ionizzazione NEGATIVA

Acquisizione in MRM

(Multi Reaction Monitoring)

Composto	ESI	Q1	Q3	DP (v)	CE (v)
OA	NEG	803.5	255.0	-120	-62
OA	NEG	803.5	113.0	-120	-60
DTX2	NEG	803.5	255.0	-120	-62
DTX2	NEG	803.5	113.0	-120	-60
DTX1	NEG	817.5	255	-120	-62
DTX1	NEG	817.5	113.0	-120	-60
YTX	NEG	1141.5	1061.7	-60	-46
YTX	NEG	1141.5	855.5	-60	-108
45 OH-YTX	NEG	1157.5	1077.7	-60	-46
45 OH-YTX	NEG	1157.5	871.5	-60	-108
Homo-YTX	NEG	1155.5	1075.5	-60	-46
Homo-YTX	NEG	1155.5	869.5	-60	-108
45 OH-HomoYTX	NEG	1171.5	1091.5	-60	-46
45 OH-HomoYTX	NEG	1171.5	869.5	-60	-108



POS CHI 021 NOR

Determinazione LC-MS biotossine liposolubili del gruppo delle AZA e delle PTX

CONDIZIONI LC

Gradiente

A) Soluzione acquosa di acido formico 50mM/ammonio formiato 2 mM

B) CH₃CN

Tempo	%A	%B
0	80	20
8	10	90
11	10	90
11,5	80	20
17	80	20

CONDIZIONI MS/MS

Sorgente ESI

Analizzatore Triplo quadrupolo

Mod di ionizzazione POSITIVA

Acquisizione in MRM

(Multi Reaction Monitoring)

Composto	ESI	Q1	Q3	DP (v)	CE (v)
AZA-1	POS	842,5	824,5	81	55
AZA-1	POS	842,5	806,5	81	55
AZA-2	POS	856,5	838,5	81	55
AZA-2	POS	856,5	820,5	81	55
AZA-3	POS	828,5	810,5	81	55
AZA-3	POS	828,5	792,5	81	55
PTX-1	POS	892,5	821,5	66	39
PTX-1	POS	892,5	213,2	66	51
PTX-2	POS	876,5	823,4	66	39
PTX-2	POS	876,5	213,2	66	51



POS CHI 021 NOR

CALCOLO DEI RISULTATI

La **quantificazione** delle tossine è determinata con il **metodo di calibrazione dello standard esterno**.

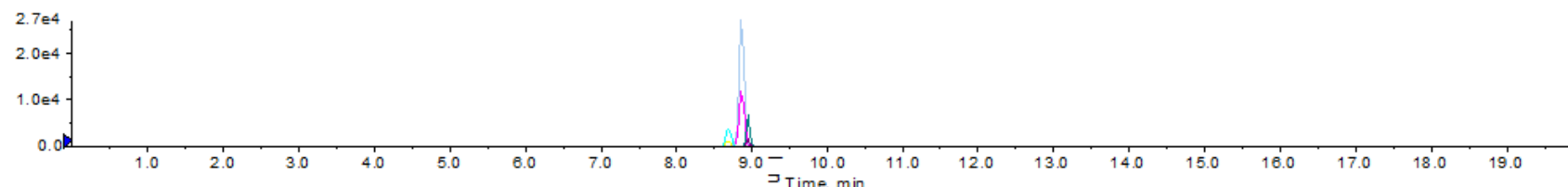
In accordo con l'approccio seguito durante la validazione interlaboratorio del metodo ed assumendo una risposta equimolare:

- la curva di calibrazione dell'**OA** è usata anche per **DTX1** e **DTX2**;
- la curva di calibrazione della **YTX** è usata anche per **homoYTX**, **45OH-YTX** e **45 OH homo YTX**;
- la curva di calibrazione della **PTX2** è usata per **PTX1**;
- la curva di calibrazione per l'**AZA1** è usata per **AZA2** e **AZA3**.

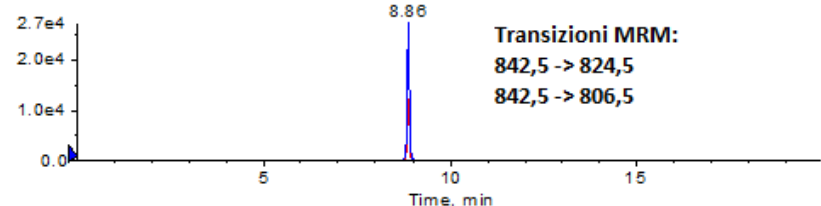


Esempio di campione reale

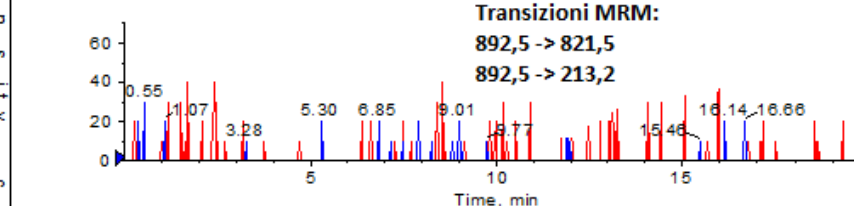
XIC of +MRM (13 pairs): 892.500/821.500 Da from Sample 38 (13L03A1-1) of R Tsett13+.wiff (Turbo Spray) Max. 30.0 cps



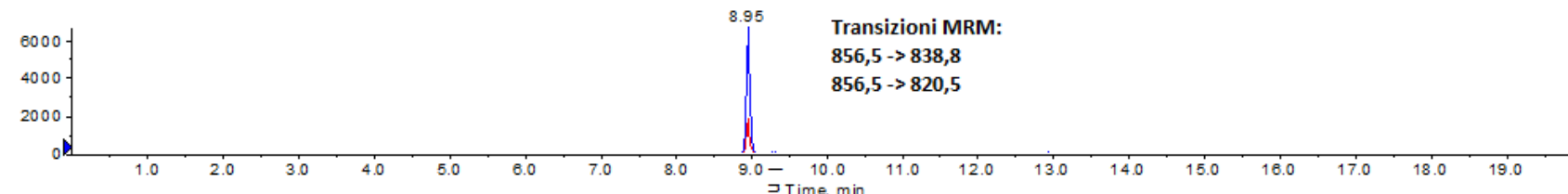
XIC of +MRM (13 pairs): 842.500/824.500 Da from Sam... Max. 2.7e4 cps



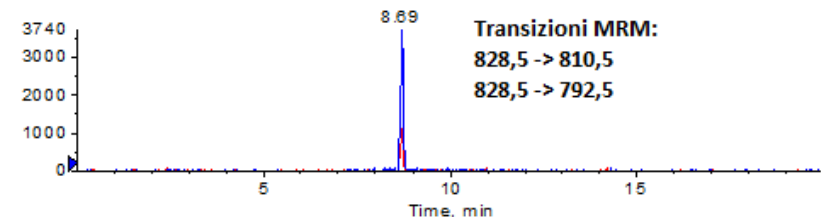
XIC of +MRM (13 pairs): 892.500/821.500 Da from Samp... Max. 30.0 cps



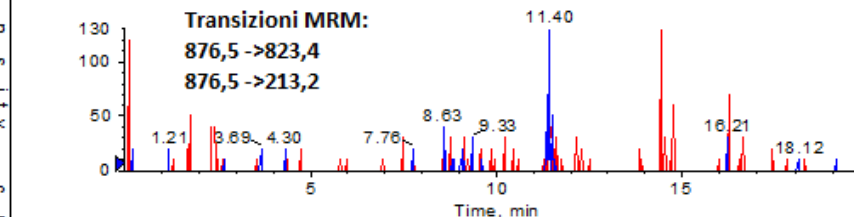
XIC of +MRM (13 pairs): 856.500/838.500 Da from Sample 38 (13L03A1-1) of R Tsett13+.wiff (Turbo Spray) Max. 6760.0 cps



XIC of +MRM (13 pairs): 828.500/810.500 Da from Sa... Max. 3740.0 cps



XIC of +MRM (13 pairs): 876.500/823.400 Da from Sam... Max. 130.0 cps



Esempio di campione reale

Modalità di ionizzazione: POSITIVA

Analita	Transizioni	Concentrazione
AZA3	828,5 -> 810,5 828,5 -> 792,5	68 µg/kg
AZA1	842,5 -> 824,5 842,5 -> 806,5	576 µg/kg
AZA2	856,5 -> 838,5 865,5 -> 820,5	152 µg/kg
PTX2	876,5 -> 823,4 876,5 -> 213,2	<LOQ
PTX1	892,5 -> 821,5 892,5 -> 213,2	<LOQ



Esempio di campione reale

Gruppo Tossine	Analoghi	TEF	Espressione risultato
Gruppo AZA	AZA1	1	µg AZA equivalenti/kg
	AZA2	1,8	
	AZA3	1,4	

Il contenuto individuale di tossina e di suo analogo deve essere moltiplicato prima per il TEF corrispondente, sommando poi gli equivalenti totali del rispettivo gruppo.

$$\text{Conc AZA1} \times \text{TEF AZA1} + \text{Conc AZA2} \times \text{TEF AZA2} + \text{Conc AZA3} \times \text{TEF AZA3} =$$

$$576 \times 1 + 152 \times 1,8 + 68 \times 1,4 = 945 \text{ µg AZA equivalenti/kg}$$

Tenendo conto dell'incertezza di misura estesa $U(\text{Horwitz})=304 \text{ ug/kg}$

$$(945 - 304) < x < (945 + 304) \text{ µg AZA equivalenti/kg} \rightarrow$$

$$641 < x < 1249 \text{ µg AZA equivalenti/kg}$$

Campione NON CONFORME



STEP DI PURIFICAZIONE SPE del campione

PROBLEMA DI SOPPRESSIONE IONICA

- BASSA RIPRODUCIBILITA'
- INQUINAMENTO DELLA SORGENTE



Colonnine STRATA X

Condizionamento: 1 ml CH_3OH e
1 ml $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (30/70 v/v)

1,2 ml campione diluito con 2,8 ml H_2O

Lavaggio 1 ml $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (20/80 v/v)

Eluizione con 2 ml CH_3OH

A secco in corrente di N_2

riprendere con 1,2 ml CH_3OH basificato



Le biotossine algali nella D.O.C.

CAMPIONI ANALIZZATI NEGLI ULTIMI ANNI

	2014	2015	2016	Agosto 2017
ASP	295	230	188	125
DSP	5	235	192	130



**TUTTI CAMPIONI
CONFORMI**



Le biotossine algali nella D.O.C.

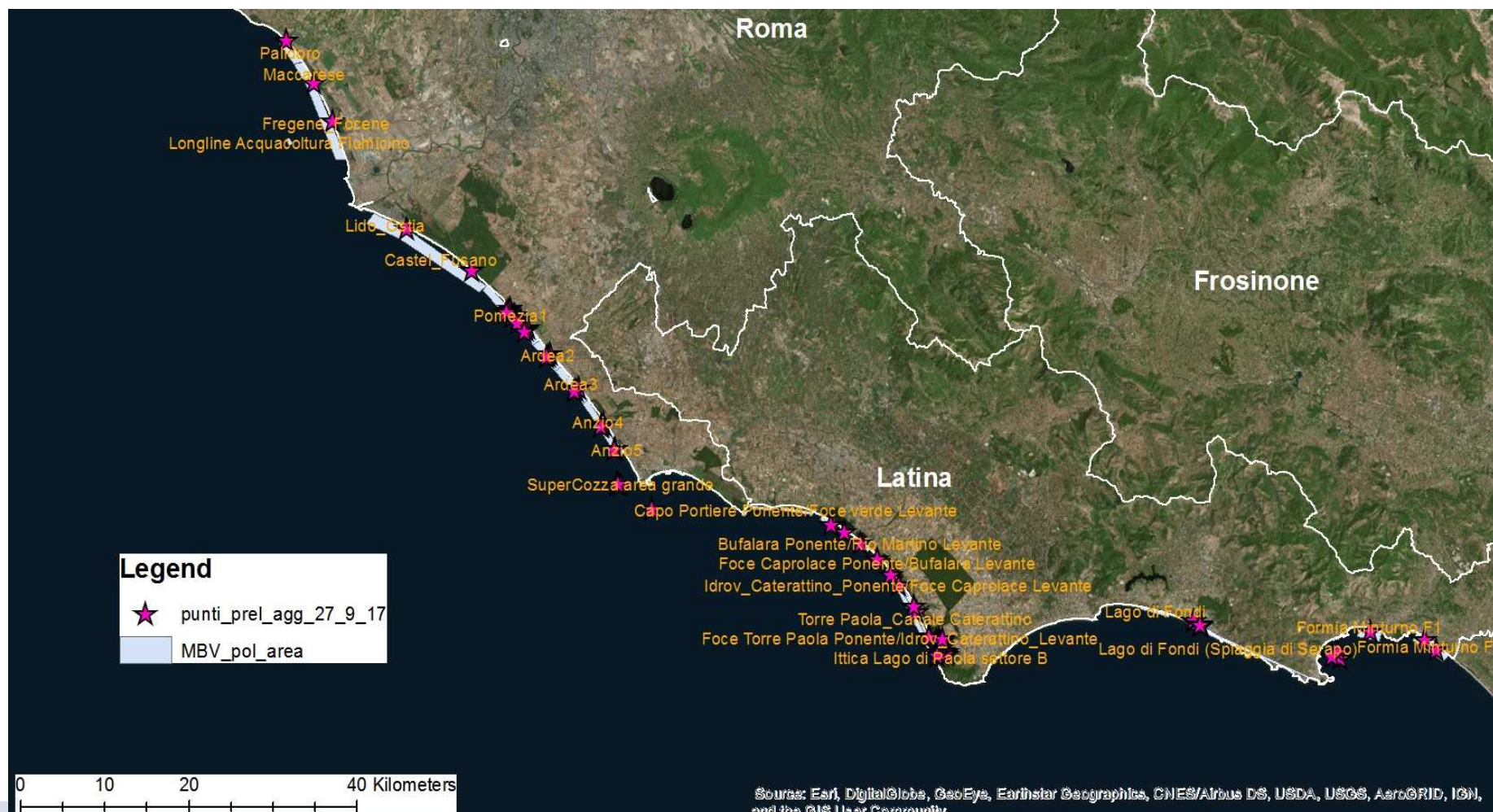
CAMPIONI CON PRESENZA DI DSP > LOQ

Analita	Conc (µg/kg)	Area classificata	Periodo
OA tot	224±90	Latina	Gen 2015
OA tot	115	Latina	Gen 2015
DTX-1	150	Latina	Gen 2015
YTX tot	1550	Latina	Feb 2015
OA tot	103	Anzio	Mag 2016
AZA tot	105	Irlanda	Set 2016
OA tot	108	Lago di Paola (Sabaudia)	Gen 2017
OA tot	81,3	Lago di Paola (Sabaudia)	Gen 2017



Punti di prelievo nel Lazio

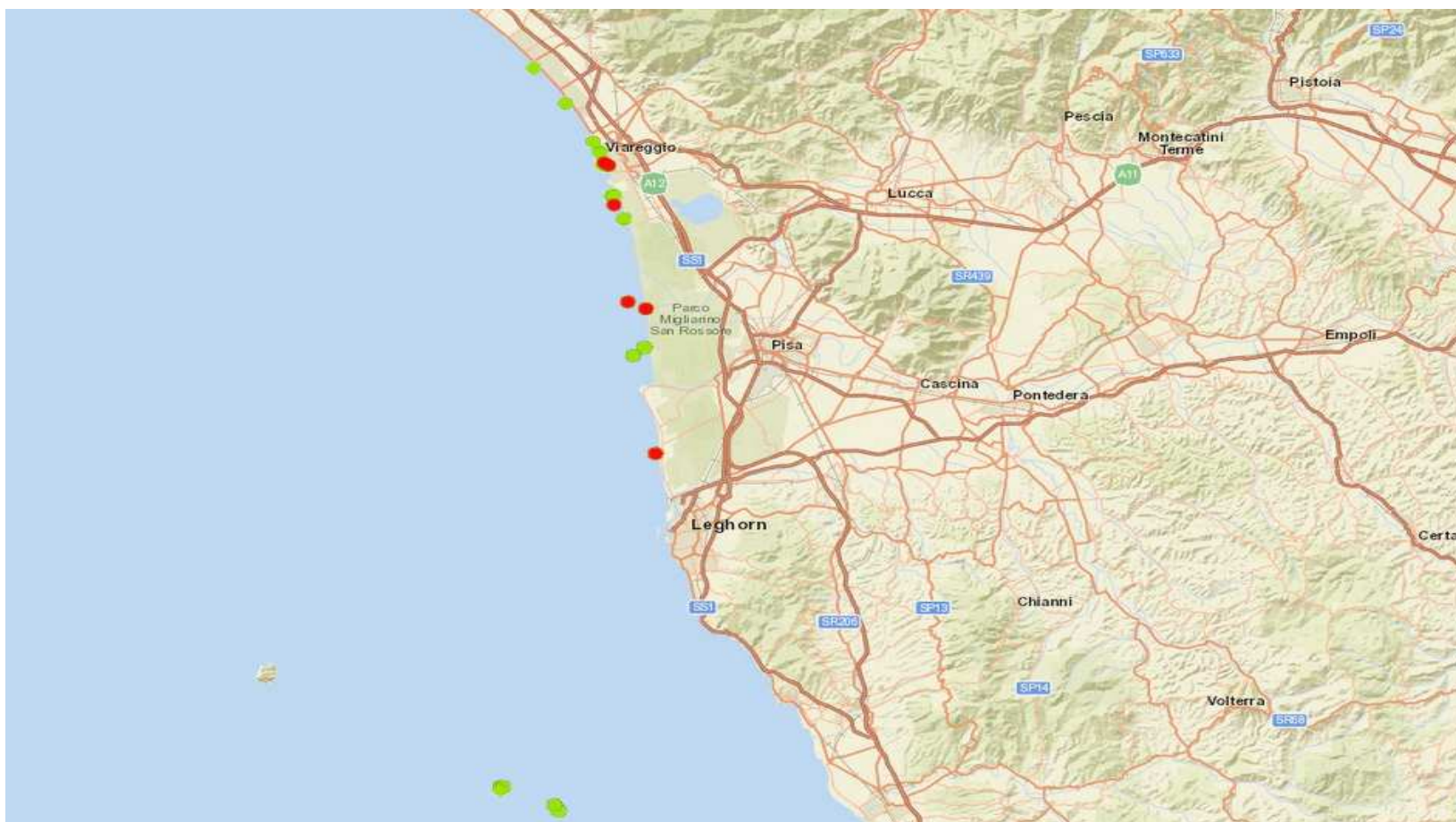
Piano regionale per il controllo sanitario della filiera dei molluschi bivalvi



Rossana Claudia Bonanni - Roma, 24 Ottobre 2017

Punti di prelievo in Toscana

Piano regionale per il controllo sanitario della filiera dei molluschi bivalvi



Rossana Claudia Bonanni - Roma, 24 Ottobre 2017

Laboratorio Nazionale di Riferimento

Centro Ricerche Marine di Cesenatico (CRM) indicato dalla UE quale **Laboratorio Nazionale di Referenza per il Controllo delle Biotossine Marine**

Principali mansioni del LNR (reg CE 882/2004 Art.33)

- Fornisce supporto tecnico e scientifico alle Autorità competenti
- Coordina le attività dei Laboratori Ufficiali responsabili per le analisi sui campioni
- Organizza **Proficiency Tests** tra i laboratori ufficiali nazionali e assicura follow up e assistenza in caso di qualsiasi problematica
- Assicura la trasmissione delle informazioni fornite dal Laboratorio di riferimento Europeo sia alle Autorità competenti sia ai laboratori ufficiali
- Collabora con il Laboratorio di Riferimento Europeo nella propria area di competenza



Prospettive future



Rossana Claudia Bonanni - Roma, 24 Ottobre 2017

Nuovo metodo per determinazione PSP

COMMISSION REGULATION (EU) /

of **XXX**

Regulation (EC) No 2074/2005 is amended as follows:

Chapter I of Annex III is replaced by the following:

amending Annex III to Commission Regulation (EC) No 2074/2005 as regards paralytic shellfish poison (PSP) detection method.

CHAPTER I

PARALYTIC SHELLFISH POISON (PSP) DETECTION METHOD

1. The paralytic shellfish poison (PSP) content of edible parts of molluscs (the whole body or any part edible separately) must be detected in accordance with the biological testing method or any other internationally recognised method.

2. If the results are challenged, the reference method shall be the so-called Lawrence method as published in AOAC Official Method 2005.06 (Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish).



Article 2

This Regulation shall enter into force on the third day following that of its publication in the *Official Journal of the European Union*.

It shall apply from 1st January 2018.

Il metodo di Lawrence sostituirà il MBA come metodo di riferimento



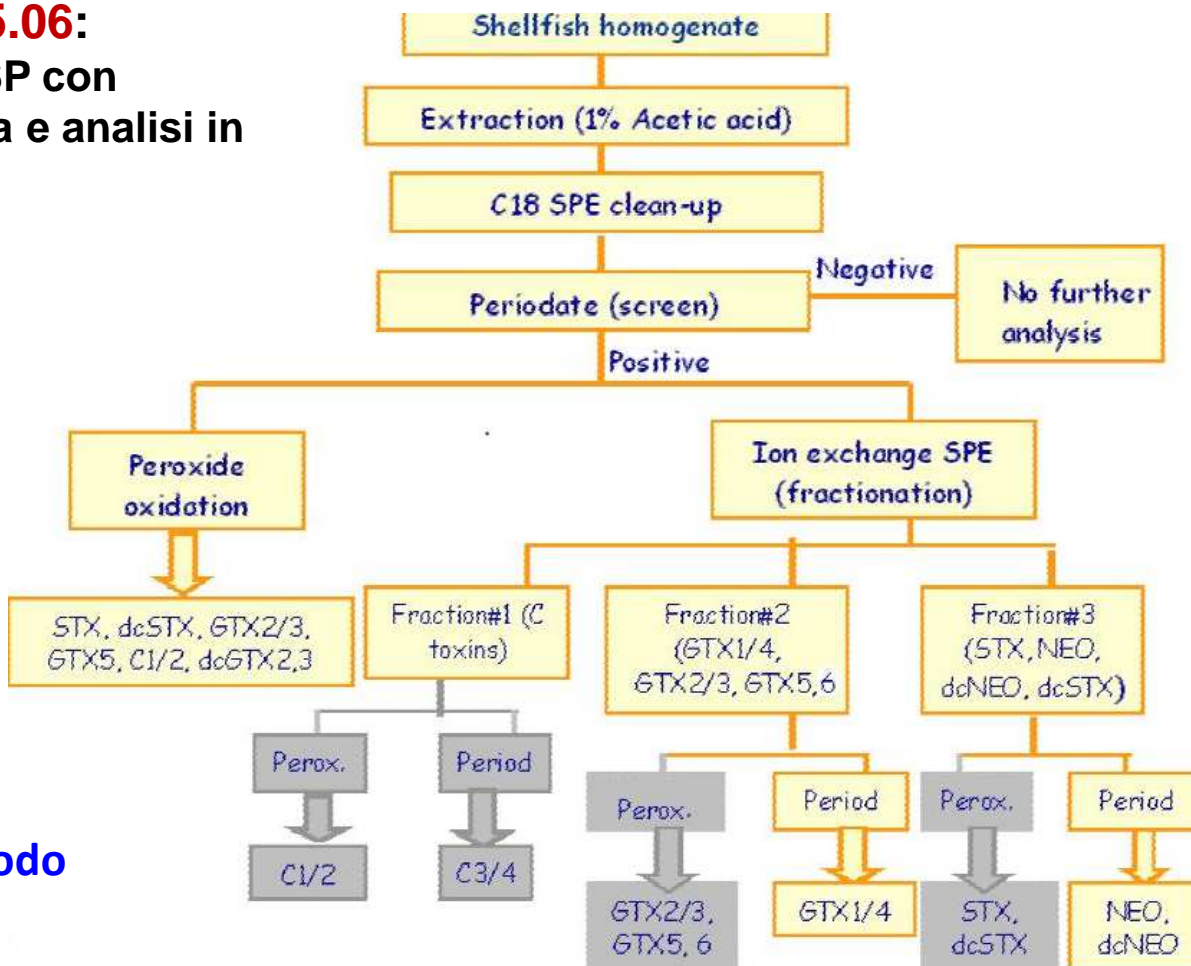
Rossana Claudia Bonanni - Roma, 24 Ottobre 2017

Nuovo metodo per determinazione PSP

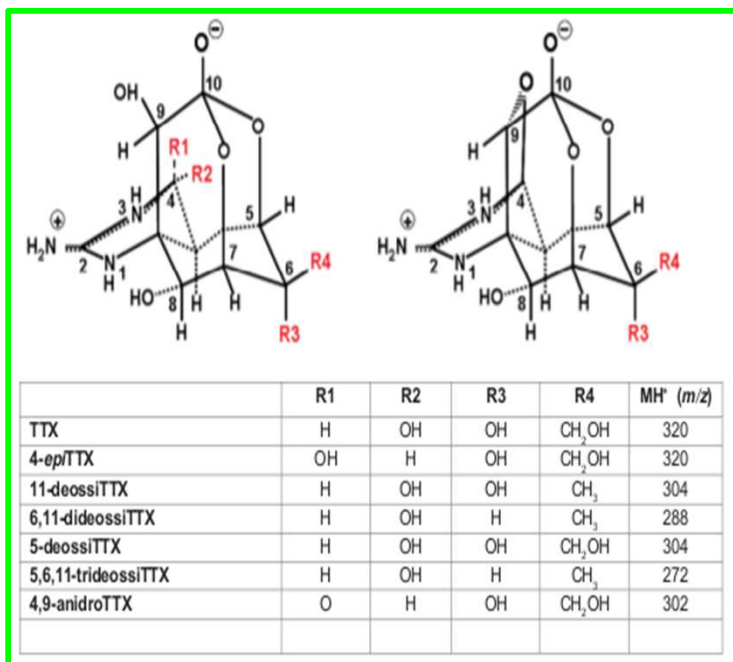
Metodo ufficiale AOAC 2005.06:
determinazione quantitativa PSP con
ossidazione pre-cromatografica e analisi in
HPLC-FLD
(Metodo di Lawrence)

Metodo lungo ed elaborato,
Derivatizzazione complessa
Problemi nella determinazione
quantitativa e nell'interpretazione

In attesa dal Laboratorio di
riferimento Europeo di un metodo
LC-MS/MS come alternativa



Biotossine emergenti: tetrodotossina



Solubile in acido acetico ed altri acidi,
scarsamente solubile in acqua e etanolo,
insolubile in solventi organici

Tetrodotossina (TTX) di origine batterica
(*Vibrio*, *Pseudomonas*, *Alteromonas*,
Plesiomonas)

TTX isolata nel 1909 nel
Takifugu rubripes appartenente alla
famiglia delle **Tetraodontidae**



Tossicità TTX

Azione neurotossica sull'attività della pompa Na^+/K^+ nelle cellule di fibre nervose e muscolari, impedendo il passaggio dell'impulso nervoso da una cellula all'altra

Stadio di gravità	Sintomatologia	Tempo di insorgenza dei sintomi
1° Stadio (sintomatologia leggera)	Lieve torpore delle labbra e della lingua, talvolta accompagnato da sintomi gastrointestinali (principalmente nausea*).	5-45 minuti
2° Stadio (sintomatologia moderata)	Torpore del viso e di altre aree, parestesia avanzata, paralisi motoria delle estremità, incoordinazione, cattiva articolazione della parola. I riflessi sono comunque normali.	10-60 minuti
3° Stadio (sintomatologia grave)	Incoordinazione del sistema muscolare, afonia, disfagia, dispnea, cianosi, diminuzione della pressione sanguigna, pupille fisse e dilatate, dolore precordiale. La vittima è ancora cosciente.	da 15 minuti ad alcune ore
4° Stadio (sintomatologia gravissima)	Grave insufficienza respiratoria e ipossia, grave ipotensione, bradicardia, aritmia cardiaca, il cuore continua a pulsare per un breve periodo.	15 minuti -24 ore

Dose minima letale
2 mg TTX,
disturbi seri con
10 μg TTX eq./kg p.c.

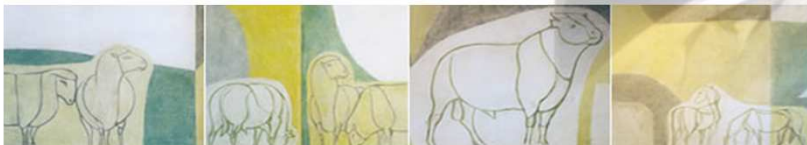


Casi di avvelenamento prevalentemente nei **paesi Indo-pacifici**, dell'Oceano Atlantico e del Golfo del Messico, a seguito di consumo soprattutto di pesce palla



Il Giappone e il culto del Fugu

Il **Fugu** (= pesce palla) è un piatto tipico della cucina giapponese



Il Giappone e il culto del Fugu

Nell'animale, la TTx si accumula principalmente nelle **viscere** (**fegato, gonadi**) ed in maniera minore nella **pelle, muscoli** e **testa**.

Il consumo del fugu è consentito solo in **ristoranti ufficialmente autorizzati**, con **cuochi altamente specializzati**.



TTX nel Mediterraneo

Toxins **2015**, *7*, 1779-1807; doi:10.3390/toxins7051779

OPEN ACCESS

**PRIMO CASO DOCUMENTATO DI RITROVAMENTO IN
EUROPA DI MOLLUSCHI BIVALVI CONTAMINATI DA TTXS**

toxins

ISSN 2072-6651

www.mdpi.com/journal/toxins

Article

First Detection of Tetrodotoxin in Greek Shellfish by UPLC-MS/MS Potentially Linked to the Presence of the Dinoflagellate *Prorocentrum minimum*

Aristidis Vlamis ^{1,2}, Panagiota Katikou ^{2,*}, Ines Rodriguez ¹, Verónica Rey ¹, Amparo Alfonso ¹,
Angelos Papazachariou ², Thetis Zacharaki ², Ana M. Botana ¹ and Luis M. Botana ¹

La presenza di TTX in molluschi filtratori del Mediterraneo,
anche se a concentrazioni inferiori ai livelli che inducono la
sintomatologia (conc. max rilevata 222,9 µg/kg TTX),
indica dunque un **nuovo rischio emergente**.
(Regulatory limit in food in Japan is 2.000 µg/kg TTX eq)



Rossana Claudia Bonanni - Roma, 24 Ottobre 2017

Biotossine emergenti: tetrodotossina

XVIII Workshop of EU-RL/NRLs for Marine Biotoxins
Cesenatico (Italy) 22-23 October 2015
CONCLUSIONS



5. The Group recognised the need to raise the issue of Tetrodotoxins presence in shellfish and need for further action to the EU Commission.

- Attesa di metodi di riferimento per determinazione per TTX dal Laboratorio di Riferimento Europeo
- Necessità di reperire materiali contaminati naturalmente, poiché disponibile solo la TTX come materiale di riferimento certificato



Conclusioni

- I sistemi di monitoraggio e sorveglianza di acque e molluschi sono ormai di routine e in costante aumento poiché l'evoluzione delle biotossine è continua.
- Nel nostro dipartimento sono accreditati i metodi per la ricerca di ASP e DSP
- È previsto:
 - il passaggio delle PSP al metodo chimico, con sviluppo e la validazione di un metodo LC-MS/MS
 - lo sviluppo e la validazione del metodo per la determinazione delle tossine TTX



A chi è ancora sveglio...
Grazie per l'attenzione!

