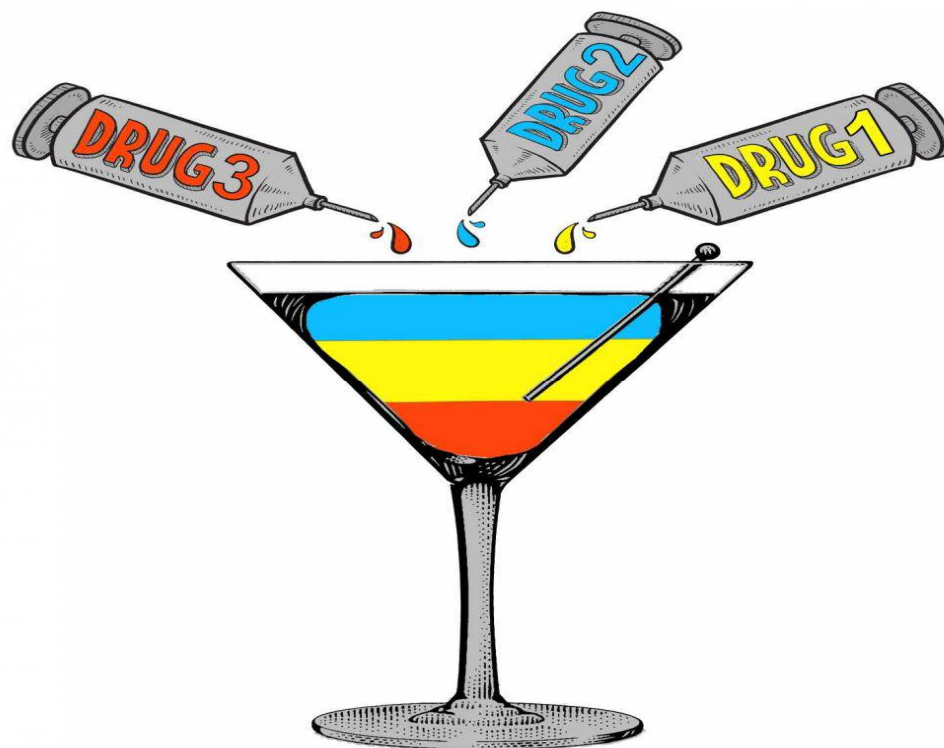


Il cocktail proibito: caratteristiche tossicologiche e determinazione analitica delle sostanze vietate



- **Normativa di riferimento**
- **Impiego illecito di sostanze ad azione anabolizzante**
- **Aspetti tossicologici**
- **Meccanismo d'azione**
- **Determinazione analitica mediante procedure di screening e di conferma**
- **Prospettive future.....**

Le figure in gioco:

Gli allevatori.....

I medici veterinari.....

~~L'opinione preposta al controllo.....~~

Gli animali.....

I laboratori di analisi.....

I laboratori clandestini.....

I Consumatori !!!!!!!!!!!!!



Un accenno alla normativa....

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 animale da produzione e durante il processo di prima trasformazione dei prodotti di origine animale.

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.

Art.3 VIETA

Direttiva 96/22/CE

- la **somministrazione** di tali sostanze, (ormoni tireostatici stilbenici...) mediante qualsiasi metodo, agli animali d'azienda e agli animali d'acquacoltura
- la **detenzione** in un'azienda, eccetto sotto controllo ufficiale, **di animali trattati**
- l'**immissione sul mercato** o la macellazione per il consumo umano
- la **trasformazione** delle carni

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 nella Tabella 2 del regolamento (UE) n. 37/2010**

Modalità di somministrazione:

Attraverso l'alimentazione :

aggiunti ai mangimi o al latte, in forma di polveri o di soluzioni acquose



Somministrazione parenterale:

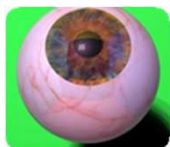
- Sottocutanea
- Intramuscolare



Il trattamento avviene per lunghi periodi (alcuni mesi); la **sospensione** del trattamento non viene effettuata che diversi giorni prima della macellazione

Matrici analizzate:

Urina
Siero
Mangimi
Tessuto adiposo
Muscolo
Rene
Fegato
Bulbo oculare
Pelo



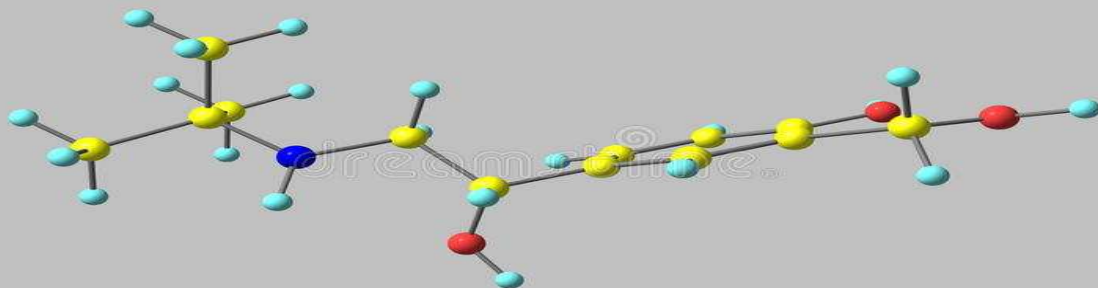
Elisa Gennuso

Direzione Operativa Chimica IZSLT

Roma 17 Ottobre 2017

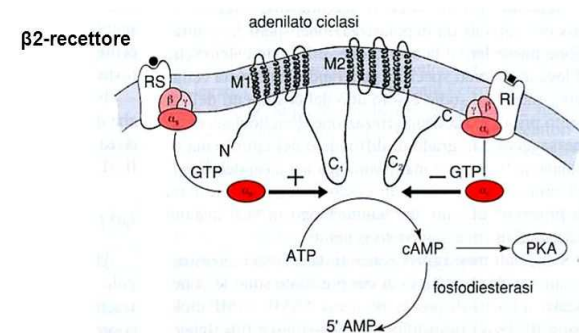
Sono sostanze progettate dall'industria farmaceutica per ottenere una **stimolazione selettiva dei recettori β 2**

- L'impiego farmacologico 'corretto' di queste sostanze ha riguardato sia in campo umano che veterinario la **terapia di forme asmatiche** e bronchiti ostruttive oppure la prevenzione di aborto e **l'intervento nei parti** distocici.



Salbutamolo

β 2-agonisti: meccanismo d'azione



- Negli anni '80 si era visto che l'impiego ad alto dosaggio negli animali da produzione (in particolare nei bovini) conferiva alle carni caratteristiche più gradite al consumatore medio
- Tutto questo portò ad un fiorire di trattamenti illeciti nei Paesi Europei
- Da alcuni anni l'impiego lecito in campo veterinario è limitato ad animali non produttori di alimenti (se si eccettua l'impiego ancora consentito delle preparazioni per via parenterale nelle vacche partorienti come tocolitici)

EFFETTI TOSSICI NELL'ANIMALE DOVUTI AD ALTO DOSAGGIO DI β 2AGONISTI

L'effetto tossico principale è una **sovrastimolazione del miocardio** (tachicardia) e, con dosaggi elevati e prolungati, una miocardiosi

- Gli effetti sul sistema cardiovascolare (vasodilatazione e iperattività cardiaca) possono determinare **collassi** degli animali
- Può comparire una **tosse stizzosa**, soprattutto nei vitelli, per irritazione bronchiale
- Con dosaggi elevati possono comparire **tremori e crampi muscolari**

RISCHI PER IL CONSUMATORE DA RESIDUI DI β_2 AGONISTI

Di tipo acuto, connessi a notevoli quantità di residuo (episodi in Spagna, Francia, Italia)

- Tremori, tachicardia, cefalea, mialgie, astenia, vertigini, vomito, febbre.
- Particolare **pericolo per i soggetti cardiopatici**, eventualmente già in terapia con altri farmaci.
- **Interferenza col parto nella donna**, in relazione all'attività tocolitica.

Tabella III Principali casi di intossicazione da clenbuterolo documentati in letteratura					
Paese	Anno	Derrata/ preparazione alimentare	Soggetti colpiti	Sintomi principali	Residui (µg/kg o µg/L)
Spagna	1990	Fegato	135	Palpitazioni, tachicardia, irrequietezza, cefalea, mialgia	160-291
Francia	1990	Fegato	22	Senso di vertigine, palpitazioni	375-500
Spagna	1992	Fegato, lingua, cannelloni	232	Tremori muscolari, tachicardia, irrequietezza, cefalea	11-486 (in urine soggetti colpiti)
Italia (Caserta)	1996	Carne ("fettine" e carne tritata)	62	Tachicardia, palpitazioni, irrequietezza, tremori, senso di vertigine, mialgia-artralgia	800-7400
Italia (Assisi)	1997	Vitello tonnato	15	Tremori, senso di vertigine, mal di testa, tachicardia, tachipnea irrequietezza, leucocitosi, iperglicemia ipokalemia	1140-1480
Messico	2002	Carni e visceri	centinaia	Non precisati	Non precisati
Portogallo	1998- 2002	Carni (anche di agnello) e fegato	50	Tachicardia, tremori, nausea, dolori colici, diarrea, senso di vertigine, ipertensione	300-1400

Matrici
previste dal
PNR

CONTROLLI PER BETA2-AGONISTI



Prelievo in allevamento: + fino a 7 gg dopo



Prelievo al macello: + fino a 42 gg

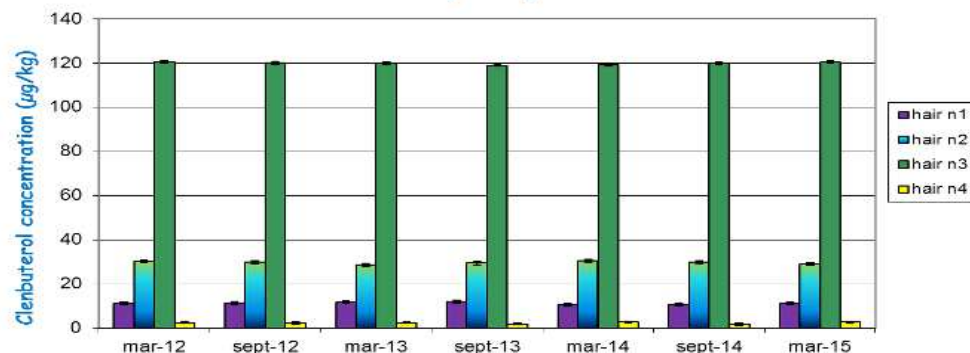


Prelievo al macello: + fino a 120 gg



Prelievo in allevamento: + fino a 5 mesi

Stability study results



Persistenza dunque
stabilità della molecola
in esame da 6-36 mesi successivi
al prelievo

The analytical procedure was applied to bovine hair samples, previously found to contain clenbuterol, after 6, 12, 18, 24, 30, 36 months. The concentration did not show significant decrease after storage for 3 years, suggesting that hair could be stored at room temperature without the evidence of degradations of the incorporated drugs.

In questa matrice la concentrazione di clenbuterolo è rimasta costante, quindi non subisce processi di degradazione

Journal of Chromatography B, 1036–1037 (2016) 76–83



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chromb



Analysis of beta-agonist residues in bovine hair: Development of a UPLC–MS/MS method and stability study



Luigi Giannetti^{a,*}, Giovanni Ferretti^b, Valentina Gallo^a, Francesco Necci^a, Andrea Giorgi^a, Francesca Marini^a, Elisa Gennuso^a, Bruno Neri^a

^a Istituto Zooprofilattico Sperimentale Regioni Lazio e Toscana Via Appia Nuova, 1411 - 00178 Rome, Italy
^b Agenzia Italiana del Farmaco Via del Tritone, 181 - 00187 Rome, Italy

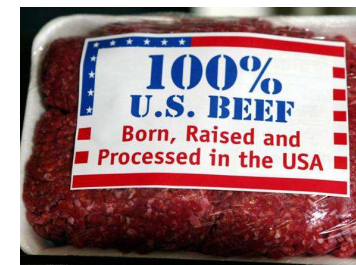
Elisa Gennuso

Direzione Operativa Chimica IZSLT

Roma 17 Ottobre 2017



Importeremo carne americana trattata con gli ormoni? E addio made in Italy?



Il Ttip aumenterà le importazioni dagli **Stati Uniti**, con un vantaggio per le grandi imprese Usa fino a 4 miliardi di euro!

Risultato: abbattere gli standard di sicurezza alimentare.

Il vero nodo è la **ractopamina**: tra il 60% e l'80% dei suini negli Usa è trattato con questo ormone della crescita vietato da noi perché **danneggia il sistema endocrino umano**

Movimento consumatori ed altre associazioni hanno manifestato contro l'approvazione del Ttip.

E' stato cancellato da Donald Trump il 23 gennaio 2017



Filmato report

<http://www.report.rai.it/dl/Report/puntata/ContentItem-d2b744b3-10f0-4bef-b830-0f7a8c29619b.html>



Elisa Gennuso

Direzione Operativa Chimica IZSLT

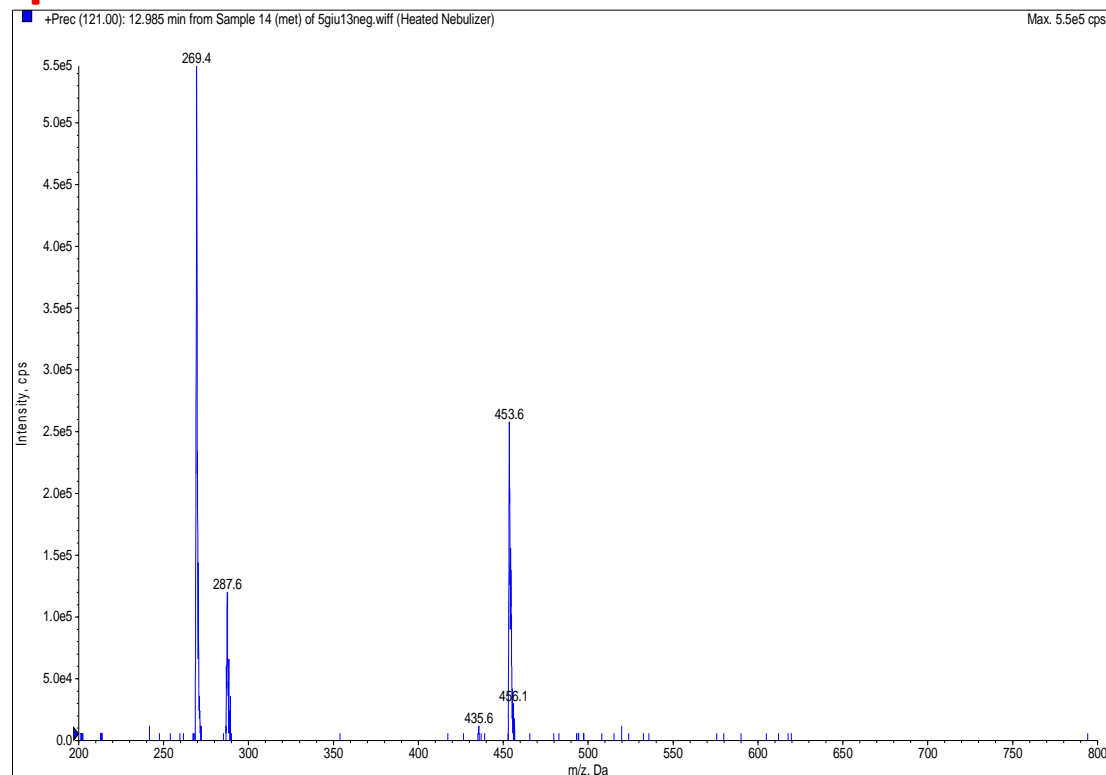
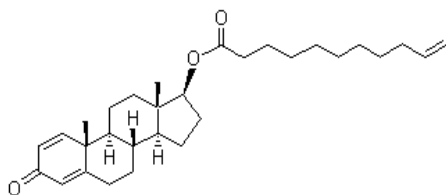
Roma 17 Ottobre 2017

Campioni positivi al clenbuterolo

Age (months)	Sex	Concentration of Clenbuterol ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
18	F	3.62
13	F	1.98
13	F	120
13	F	2.63
12	F	30.5
17	F	2.76
11	F	3.72
8	F	1.02
8	F	12.7
8	F	2.14
9	F	2.63
9	F	6.40
5	F	13.5
5	F	3.71
4	F	2.15
4	M	1.11
4	F	6.40
4	F	10.8

Fiale sequestrate

Estere del boldenone



LC MS Precursor ion scan m/z 121 Steroidi

Elisa Gennuso

Direzione Operativa Chimica IZSLT

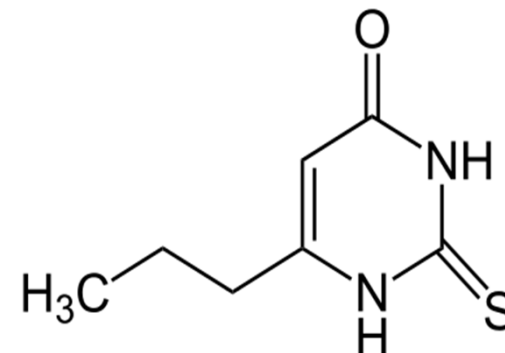
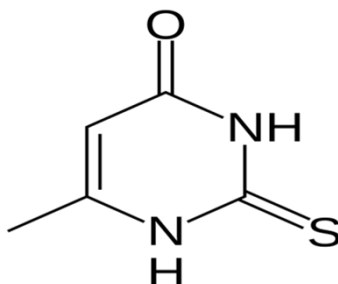
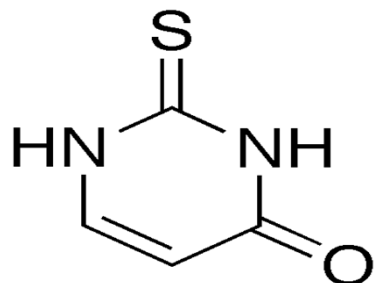
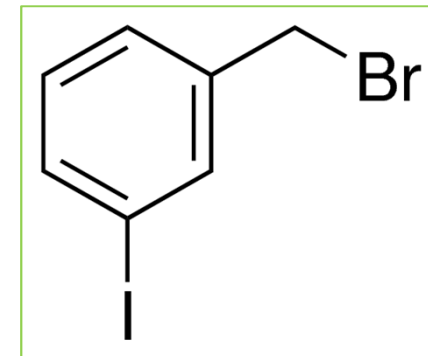
Roma 17 Ottobre 2017

Tireostatici

- I farmaci antitiroidei sono derivati del tiouracile o dell'imidazolo (più attivi)
- Alcuni utilizzati in campo umano per la terapia dell'ipertiroidismo
- Facile reperibilità, basso costo, discreta efficacia
- Somministrati illegalmente con l'alimento o nell'acqua
- Un nuovo composto, il mercaptobenzimidazolo o tapazolo è stato recentemente segnalato nell'UE

La procedura operativa standard (POS CHI 004 rev.0) permette la conferma qualitativa dei residui di tireostatici nei tessuti e fluidi biologici mediante LC-MS/MS.

I residui di tireostatici eventualmente presenti nei campioni vengono **derivatizzati** ed estratti con solvente organico in ambiente acido e successivamente analizzati in LC-MS/MS.



IMPIEGO ILLECITO DI FARMACI ANTITIROIDEI

- Somministrati con l'alimento nelle ultime 4-8 settimane prima della macellazione; rapidamente assorbiti, inibiscono la sintesi degli ormoni tiroidei
- Nei soggetti giovani determinerebbero un arresto dell'accrescimento, si utilizzano perciò nei vitelloni e nei suini magroni (dopo i 70-80 kg di peso); si calcola che nei vitelloni l'incremento di peso si aggiri intorno ai 20-30 kg

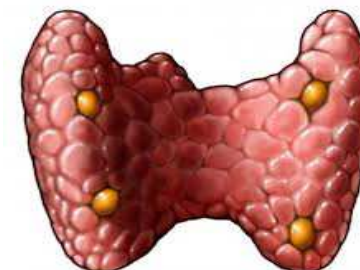
L'effetto metabolico che viene sfruttato è quello di un aumento della ritenzione idrica dei tessuti: si ottiene pertanto una carne che pesa di più ma non ha maggiore valore nutritivo (frode).

EFFETTI SUGLI ANIMALI CONNESSI ALL'IMPIEGO DI ANTITIROIDEI

Gli effetti metabolici sono complessi trattandosi della inibizione di ormoni che regolano l'accrescimento e il funzionamento dei tessuti

E' possibile rilevare negli animali trattati:

- “ **debolezza**, diminuita tonicità muscolare, ipotermia e minore resistenza al freddo
- “ turbe nervose come sonnolenza e **difficoltà di locomozione**
- “ **edemi** diffusi, in particolare agli arti
- “ **bradicardia** e difficoltà respiratorie



L'alterazione tipica resta comunque **l'ipertrofia della tiroide** che è rilevabile dopo la macellazione dell'animale: la tiroide di un bovino pesa mediamente 25 grammi, nei suini varia tra 12 e 40 grammi. Il PNR prevede i **campionamenti su tutti gli animali con tiroidi di peso superiore a 50 grammi**

ORMONI STERIODI SESSUALI (NATURALI E DI SINTESI)

- Gli ormoni **steroidi naturali**, estradiolo*, progesterone* e testosterone*, sono sostanze normalmente presenti nell'organismo animale
- Gli ormoni **steroidi di sintesi sono molecole che mimano l'attività degli ormoni naturali** ma sono soggette a più lenta metabolizzazione (etinilestradiolo, metiltestosterone, zeranolo**, melengestrolone**, trenbolone**)
- In Italia l'utilizzo di queste sostanze è previsto solo (per le specialità omologate) su animali d'azienda non all'ingrasso al fine di trattamenti terapeutici, di sincronizzazione del ciclo estrale, di interruzione di gravidanza indesiderata, di miglioramento della fertilità e di preparazione per l'impianto di embrioni

- I **trattamenti negli USA** (e in alcuni Stati del Sud America) avvengono in genere tramite **impianti nel sottocute dell'orecchio**; in condizioni di **impiego illecito** queste sostanze sono invece utilizzabili anche **mescolate all'alimento o per iniezioni in veicoli a lento assorbimento**

** consentiti negli USA senza prescrizione di tempi di sospensione*



LIVELLI FISIOLÓGICI

- xenobiotico: la sola presenza è indice di somministrazione
- omobiotico: naturale, endogeno nessità di definire dei livelli fisiologici

PROBLEMI POSTI DAL CONTROLLO DELL'IMPIEGO ILLECITO DEGLI ORMONI STEROIDI NATURALI

Se per le altre sostanze è sufficiente rilevarne la presenza nei tessuti o nei fluidi biologici per procedere nei confronti dell'allevatore, ciò non è ovviamente possibile con gli **steroidi naturali**

- E' stato quindi necessario stabilire per queste sostanze (estradiolo, progesterone, testosterone) dei **range di livelli fisiologici**, necessariamente **differentiati per le diverse categorie di bovini** (età, sesso, interi o castrati) [DM 14/11/96]

Livelli fisiologici massimi nel plasma o nel siero di sangue dei bovini espressi in ng/ml			
Sesso-età	Estradiolo 17 beta (libero, non coniugato)	Progesterone	Testosterone
Maschi fino a sei mesi	0,040 (0,040)	1 (1)	10 (10)
Femmine sino a sei mesi	0,040 (0,040)	1 (1)	0,5 (0,5)
Maschi oltre i sei mesi	0,040 (0,040)	1,5 (1)	30 (30)
Femmine oltre i sei mesi (non gravide)	0,040 (0,040)	14 (10)	0,5 (0,5)
Maschi castrati	-	2 (2)	0,5 (0,5)
40 ppt		M 1-2 ppb	0,5-30 ppb
		F 1-14 ppb	0,5 ppb
(40 pg/mL)		(1-14 ng/mL)	(0,5-30ng/mL)

MINISTERO DELLA SANITA



Elisa Gennuso

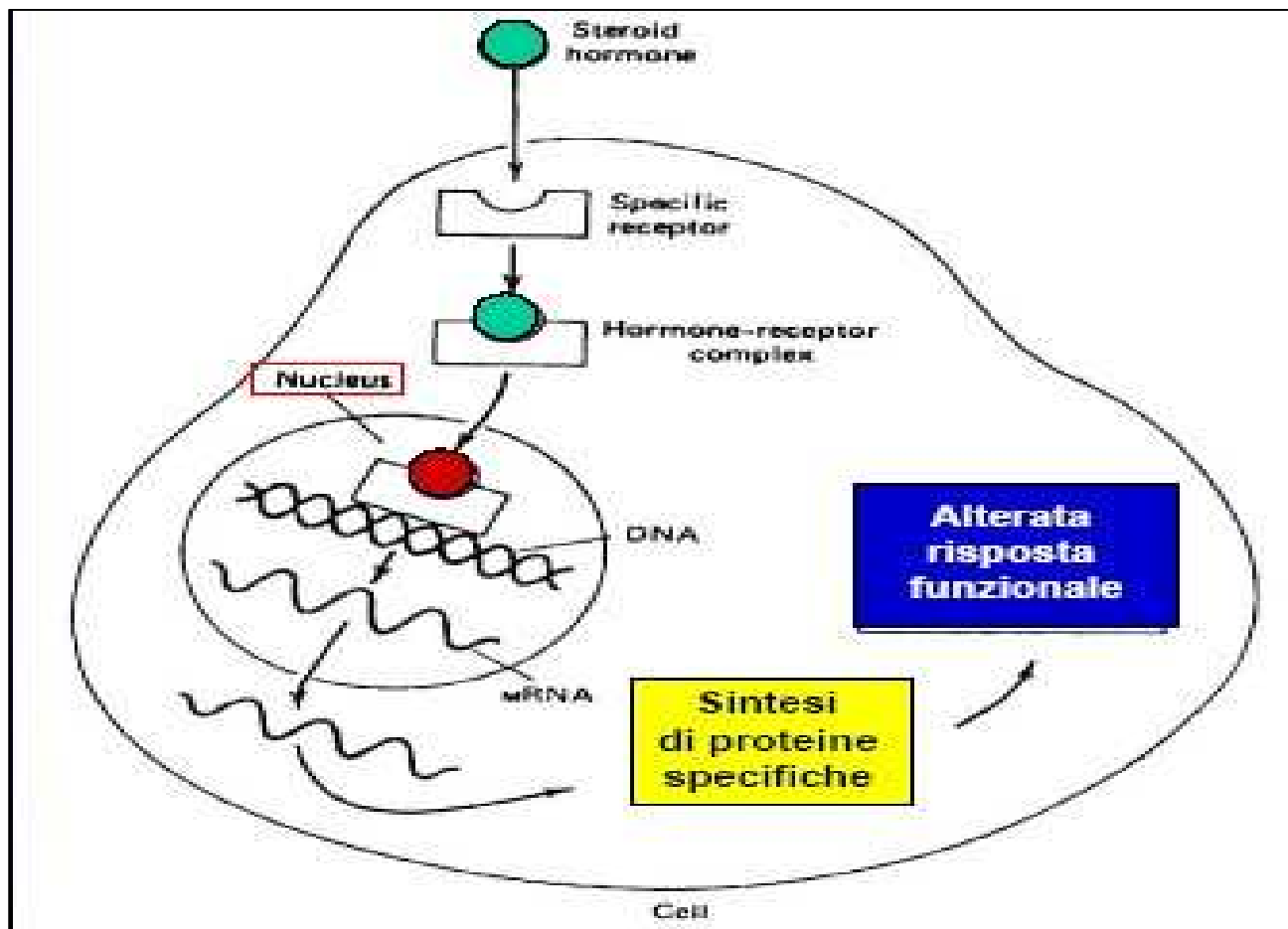


Direzione Operativa Chimica IZSLT

Roma 17 Ottobre 2017



Meccanismo d'azione ormoni steroidei



-Contaminazione mangime per suini con medrossiprogesteroneacetato

-Ricerca di MPA su tessuto adiposo suino

MPA (medrossiprogesterone acetato) allerta comunitario

giugno 2002

riciclaggio di farmaci e contaminazione di una filiera suina (B)

-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

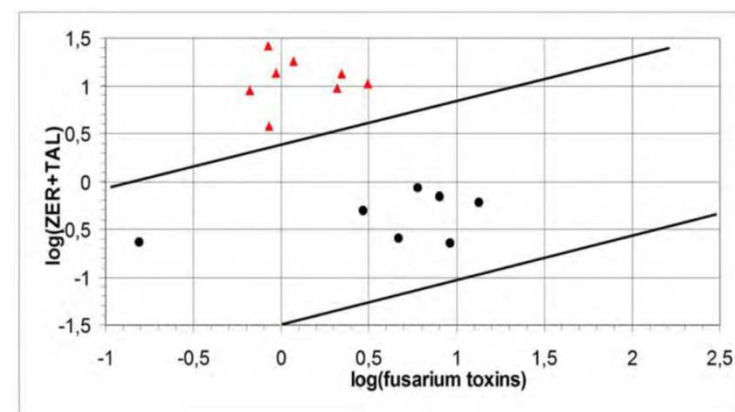
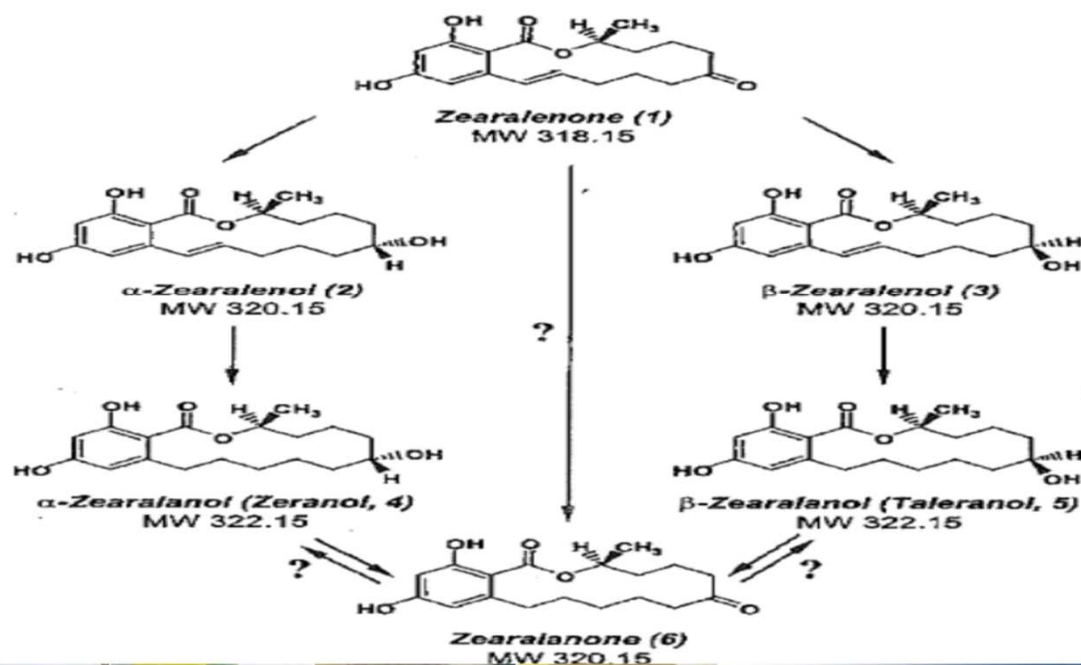
La responsabilità di tale contaminazione è stata attribuita alla distribuzione dello sciroppo di glucosio contaminato che era stato consegnato ai mangimifici



Zeranol: quale origine ?

Aggiornamento delle ricerche preesistenti

• *zeranolo e metaboliti*: il metodo di conferma analitico impiegato per la ricerca delle sostanze appartenenti al gruppo A4 – *Lattoni dell'acido resorcilico (compreso lo zeranolo)* – in matrice urina, deve essere in grado di rilevare le seguenti molecole: α -zearalanolo (zeranolo), β -zearalanolo (taleranolo), zearalanone, α -zearalenolo, β -zearalenolo e zearalenone. Gli IZZ.SS. in possesso di metodo validato e accreditato sono l'IZS della Lombardia e dell'Emilia Romagna e l'IZS delle Regioni Lazio e Toscana. Maggiori istruzioni circa l'interpretazione dei risultati conseguiti saranno fornite nel corso di attuazione del PNR, appena ricevute indicazioni da parte del Laboratorio Europeo di Riferimento;



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**



Elisa Gennuso



Direzione Operativa Chimica IZSLT

Roma 17 Ottobre 2017

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

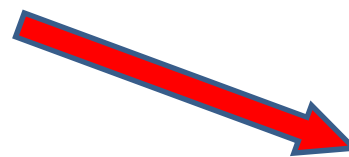
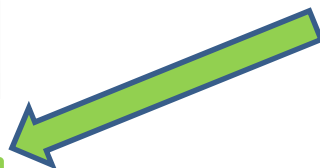


Assicurazione della qualità e la comparabilità dei risultati analitici prodotti dai laboratori per il controllo ufficiale dei residui riconosciuti dall'autorità competente.

METODI ANALITICI



Screening



Conferma



Cognome.....
 Nome.....
 nato il.....
 (atto n..... P..... S.....)
 a.....
 Cittadinanza.....
 Residenza.....
 Via.....
 Stato civile.....
 Professione.....
 CONNOTATI E CONTRASSEGNI SALIENTI
 Statura.....
 Capelli.....
 Occhi.....
 Segni particolari.....

Nc1cc(Cl)c(C(O)CN(C)C)c(Cl)c1
 FOTOGRAFIA
 Firma del titolare.....
 IL SINDACO
 Impronta del dito indice sinistro



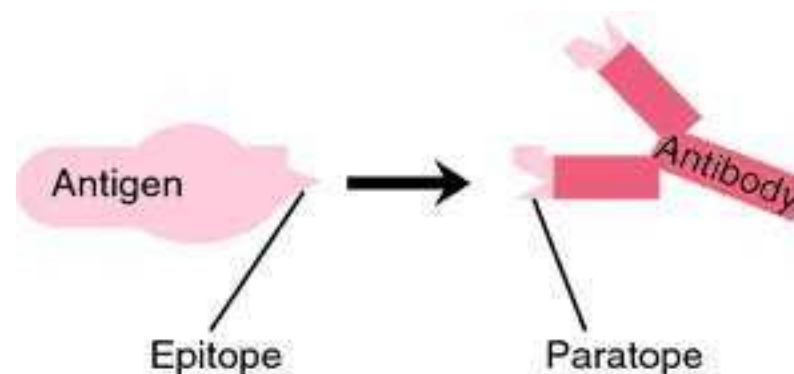
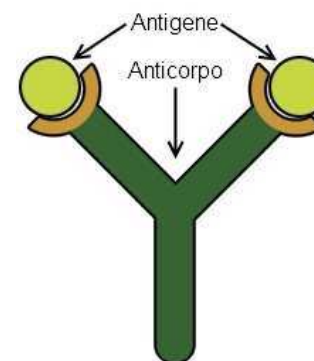
Metodo di screening: metodo impiegato per rivelare la possibile presenza di una sostanza o una classe al livello di interesse.

I metodi di screening permettono di processare un elevato numero di campioni e di evidenziare i **sospetti**.

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

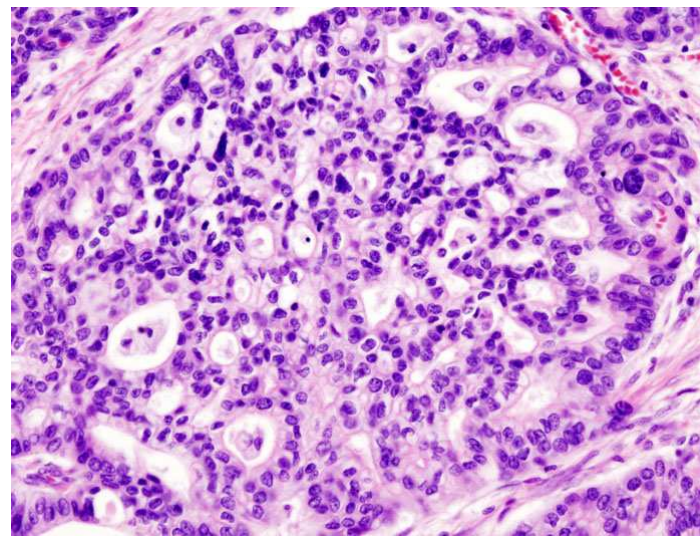
Tecniche di screening E.L.I.S.A

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

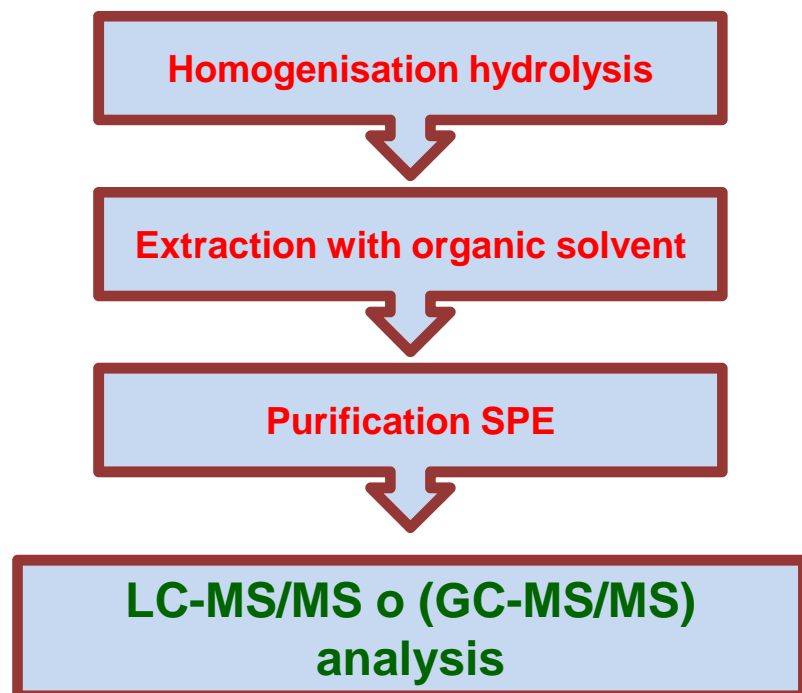


Test istologico

- **β -agonisti**: esame ispettivo delle trachee, delle ghiandole sessuali, distribuzione del grasso, esame istologico del fegato con evidenziazione del glicogeno mediante colorazione PAS +, misurazione del pH della carne a 45 minuti
- **tireostatici**: esame ispettivo della tiroide (peso)
- **anabolizzanti e ormoni**: esame ispettivo dell'ovaio e dell'utero in animali impuberi ed esame istologico delle ghiandole sessuali secondarie.



Metodi di Conferma



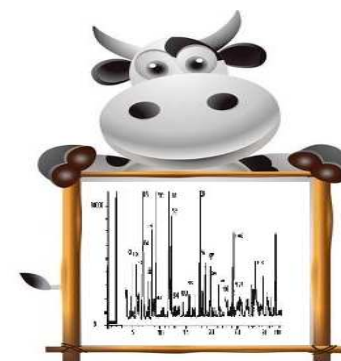
Nel caso di risultato di sospetta **non conformità**
l'esito deve essere verificato con un metodo di
conferma



Per effettuare il riconoscimento inequivocabile della
sostanza servono informazioni sulla **struttura chimica**.



Impiego della spettrometria di massa

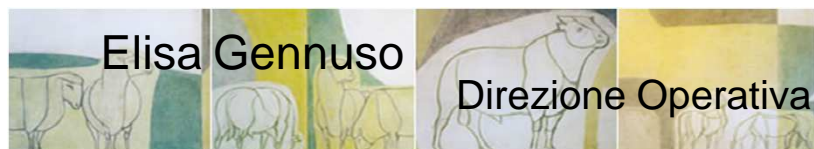


Metodi Lab Residui

Necessità di monitorare nuovi analiti e una nuove matrici

	POS	Tecnica
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	Streptomicina (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

POS CHI 044 REV.4 (accreditamento flessibile)



Elisa Gennuso

Direzione Operativa Chimica IZSLT

Roma 17 Ottobre 2017

GRAZIE PER L'ATTENZIONE



Elisa Gennuso

Roma 17 Ottobre 2017