



CORSO BENESSERE ANIMALI DA LABORATORIO

14-18 ottobre 2019 (parte teorica – modulo base)

IZSLT – Sede di Roma

Validazione dei metodi alternativi: Sostituzione del mouse test per la rilevazione delle biotossine algali

Francesca Longo

UOC CHIMICA

IZSLT – Sede di Roma





INDICE

- Biotossine algali
- Normativa riguardante i molluschi bivalvi e le biotossine algali
- Metodi di analisi
- Biotossine algali nella U.O.C. chimica
- 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

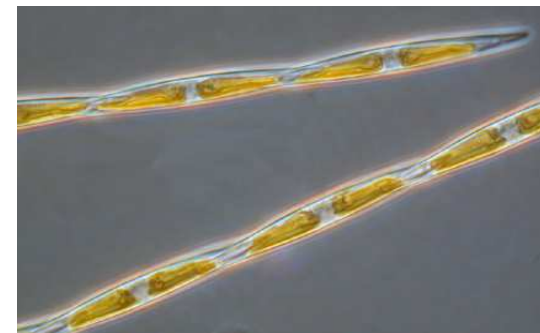


Dynophisys fortii



Alexandrium catenella

Diatomee



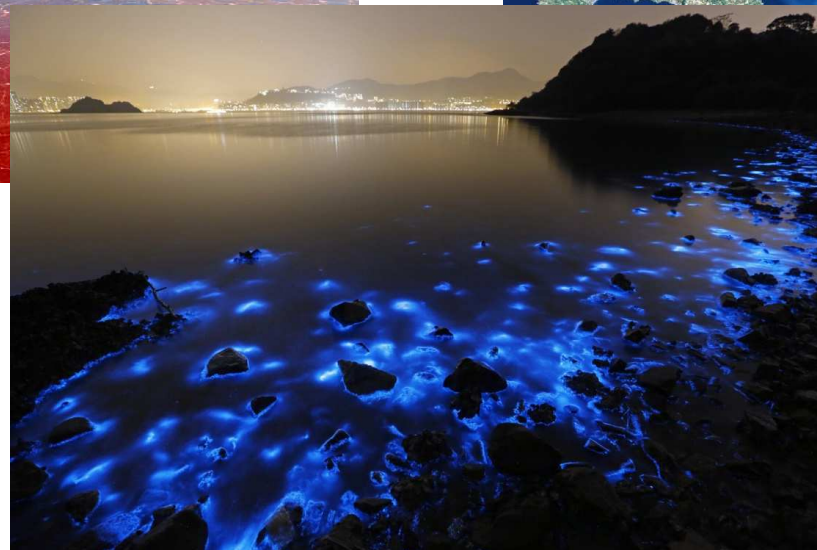
Pseudo-nitzschia pungens





Harmful Algal Bloom (HAB)

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



Francesca Longo- Roma, 15 Ottobre 2019





Biotossine algali

Possono essere presenti in **molluschi bivalvi**

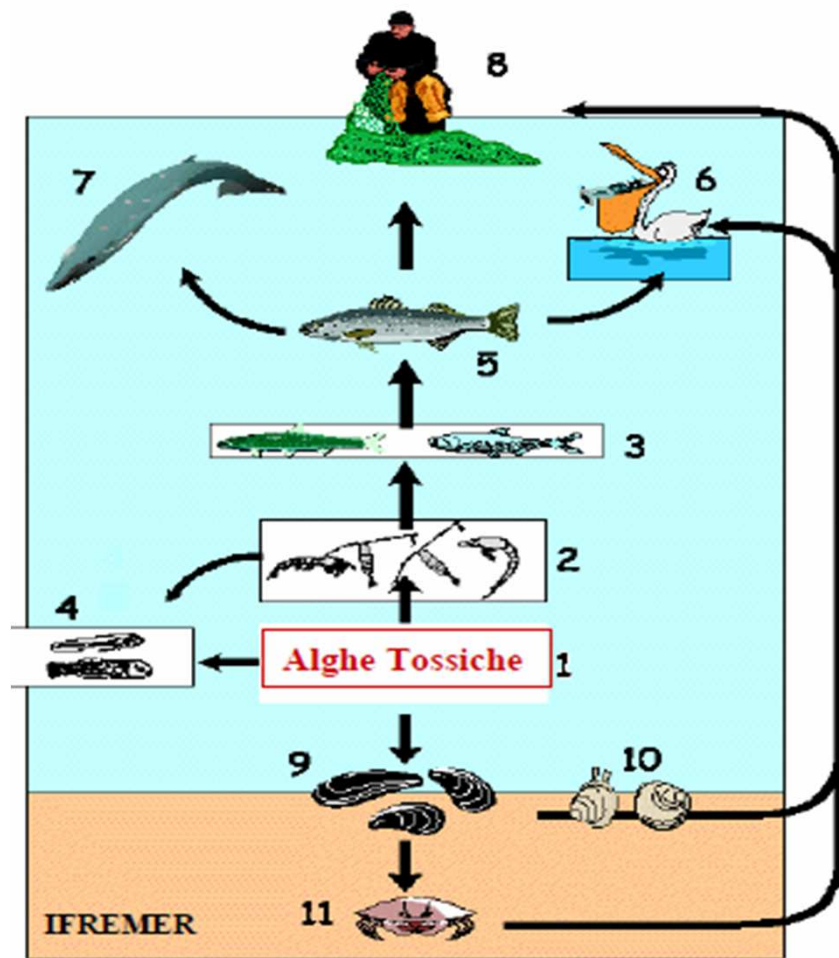


Accumulo nei tessuti, soprattutto gonadi ed epatopancreas,
senza subire effetti tossici





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

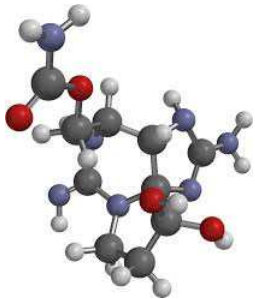




Classificazione

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

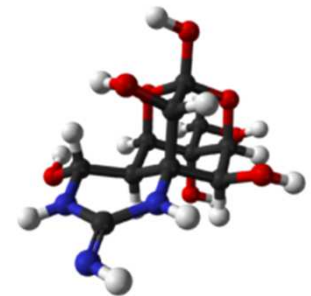
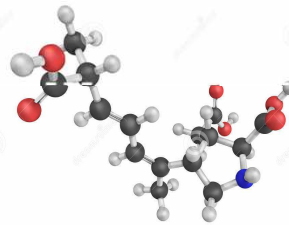
Acido Okadaico e DTXs

Pectenotossina e PTXs

Yessotossina e YTXs

Brevetossina e PbTXs

Tetrodotossine e TTXs



Francesca Longo- Roma, 15 Ottobre 2019



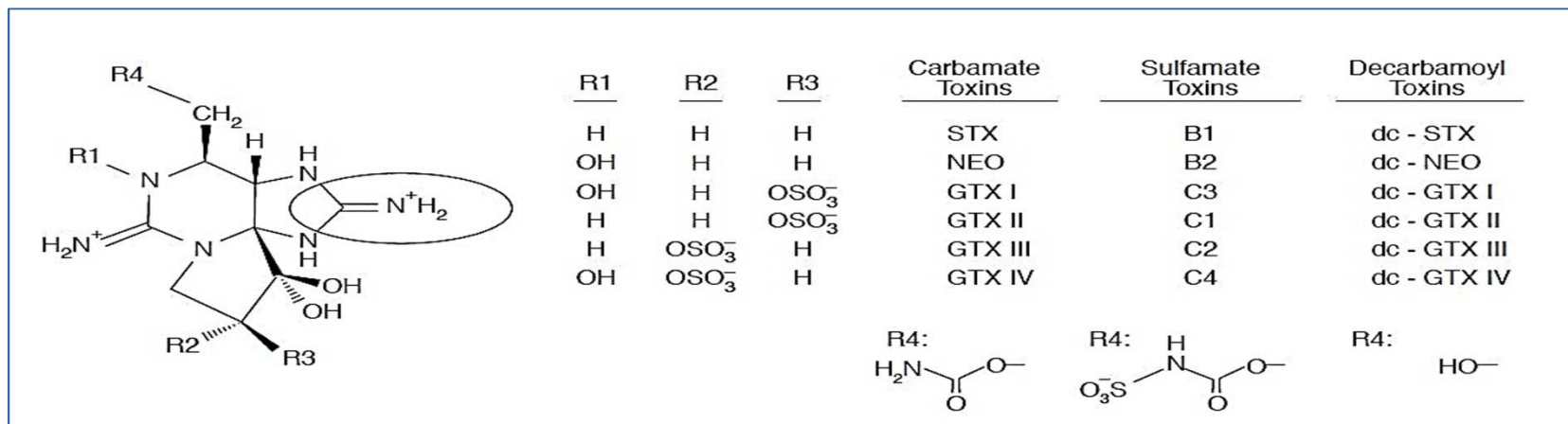


Paralytic Shellfish Poisoning (PSP)

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*

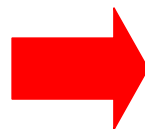




Paralytic Shellfish Poisoning (PSP)

MECCANISMO DI AZIONE

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



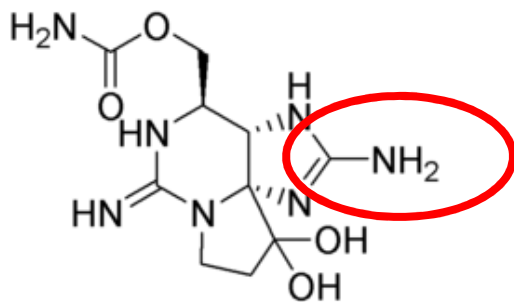
Blocco della trasmissione
degli impulsi nervosi
al sistema muscolare e scheletrico
con conseguente **paralisi respiratoria**

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)

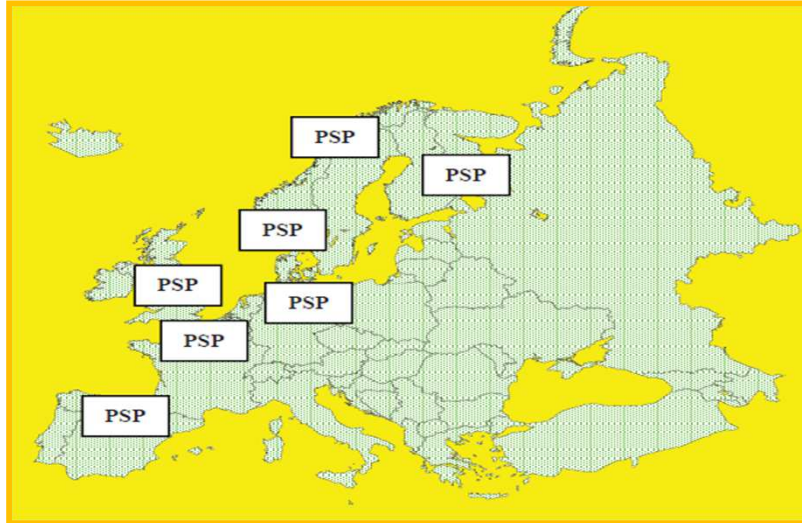
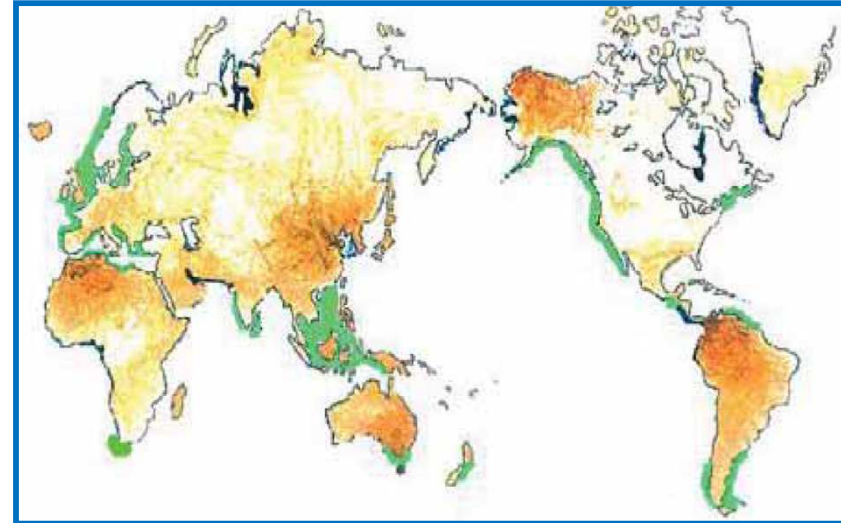




Diffusione PSP nel mondo

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)

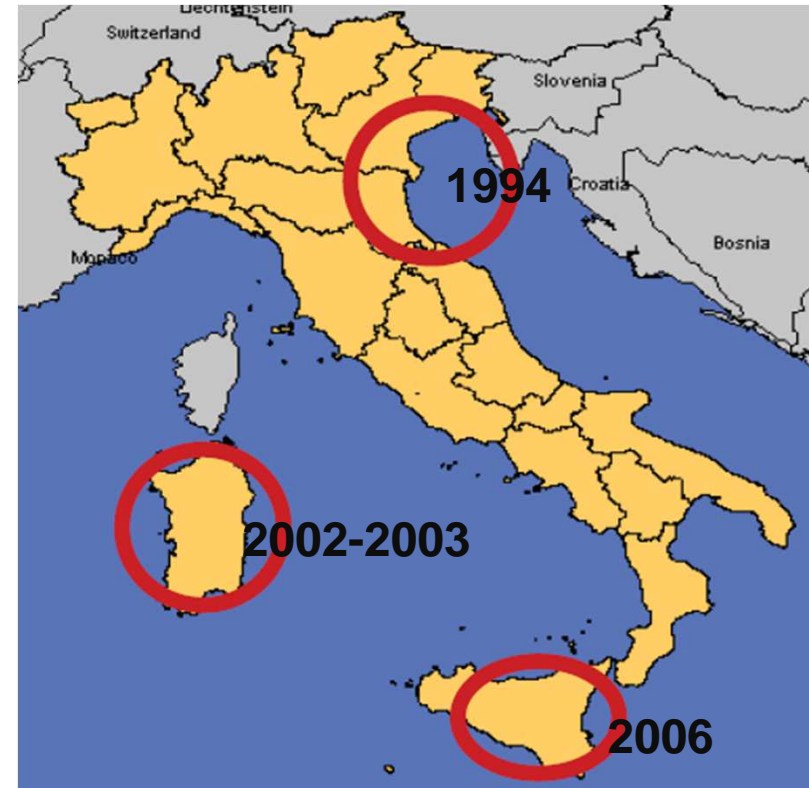
In **Germania, Bassa Sassonia, Francia, Svizzera e Italia** casi di avvelenamento a seguito di consumo di mitili esportati dalla **Spagna**





Diffusione PSP in Italia

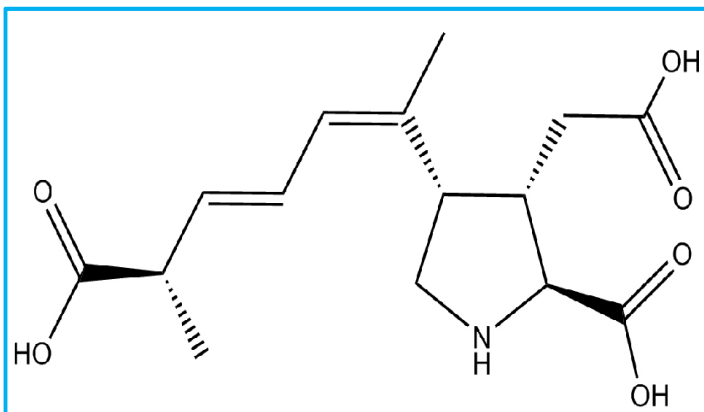
PSP MESI POTENZIALMENTE A RISCHIO	
Gennaio	●
Febbraio	●
Marzo	●
Aprile	● ● ●
Maggio	● ● ● ● ●
Giugno	● ● ● ●
Luglio	● ●
Agosto	●
Settembre	●
Ottobre	●
Novembre	●
Dicembre	●





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 agonista 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**

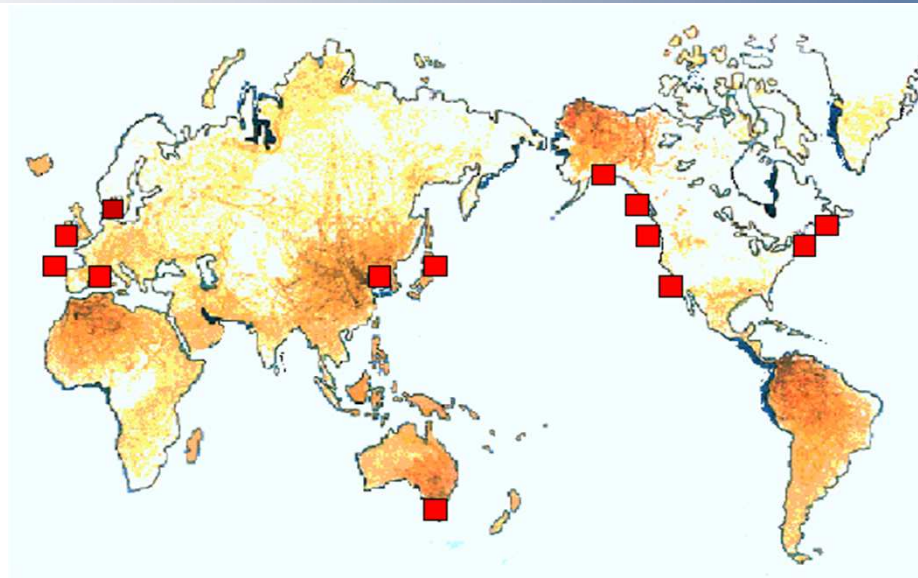
48 ore da ingestione: **Sintomi neurologici più gravi (confusione, disorientamento, perdita della memoria)**

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

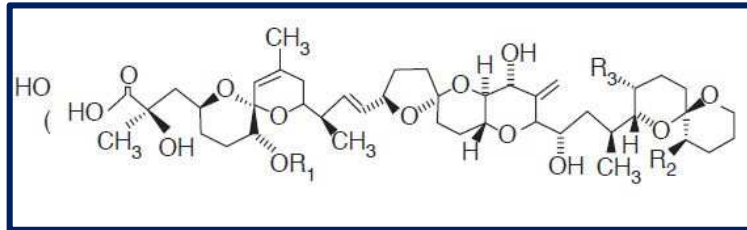
Acido okadaico e derivati (OAs)
Pectenotossine (PTXs)
Yessotossine e derivati (YTXs)
Azaspiracidi e derivati (AZAs)

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**

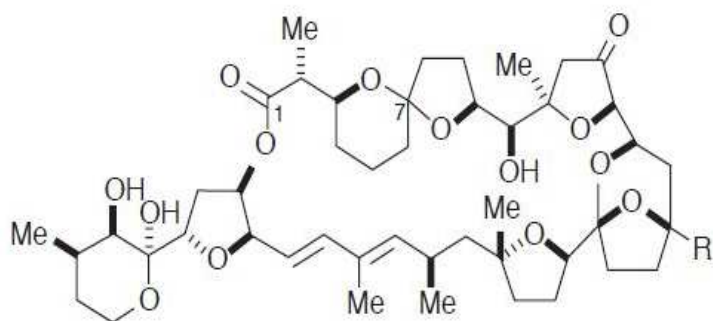
Studi in vivo

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	<i>R</i>
PTX2(1): CH ₃	<i>R</i>
PTX3: CHO	<i>R</i>
PTX4: CH ₂ OH	<i>S</i>
PTX6: COOH	<i>R</i>
PTX7: COOH	<i>S</i>

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

MECCANISMO DI AZIONE IGNOTO

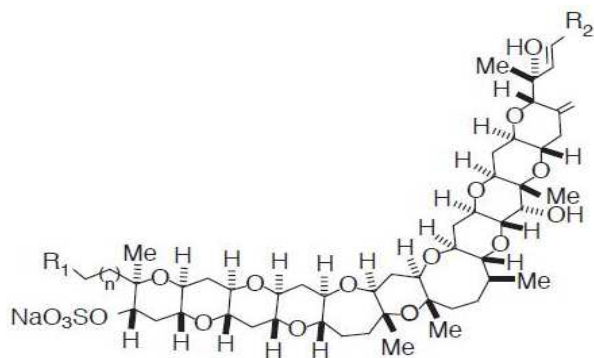
Da studi in vivo:
lesioni a **fegato**, **stomaco** e **intestino** e
cambiamenti istologici a **polmoni** e **reni**

**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

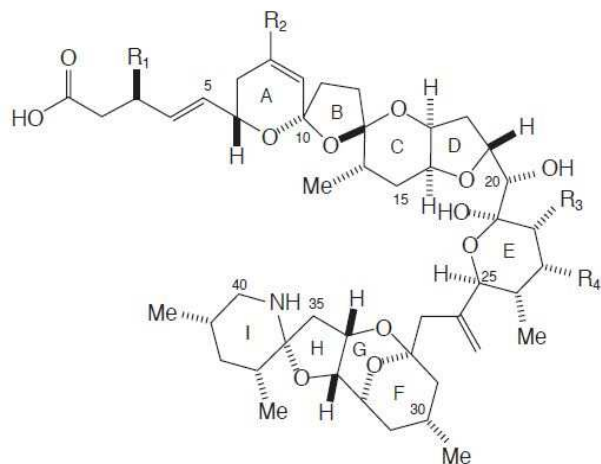
Organo bersaglio: **MIOCARDIO** (Studi in vivo)

**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

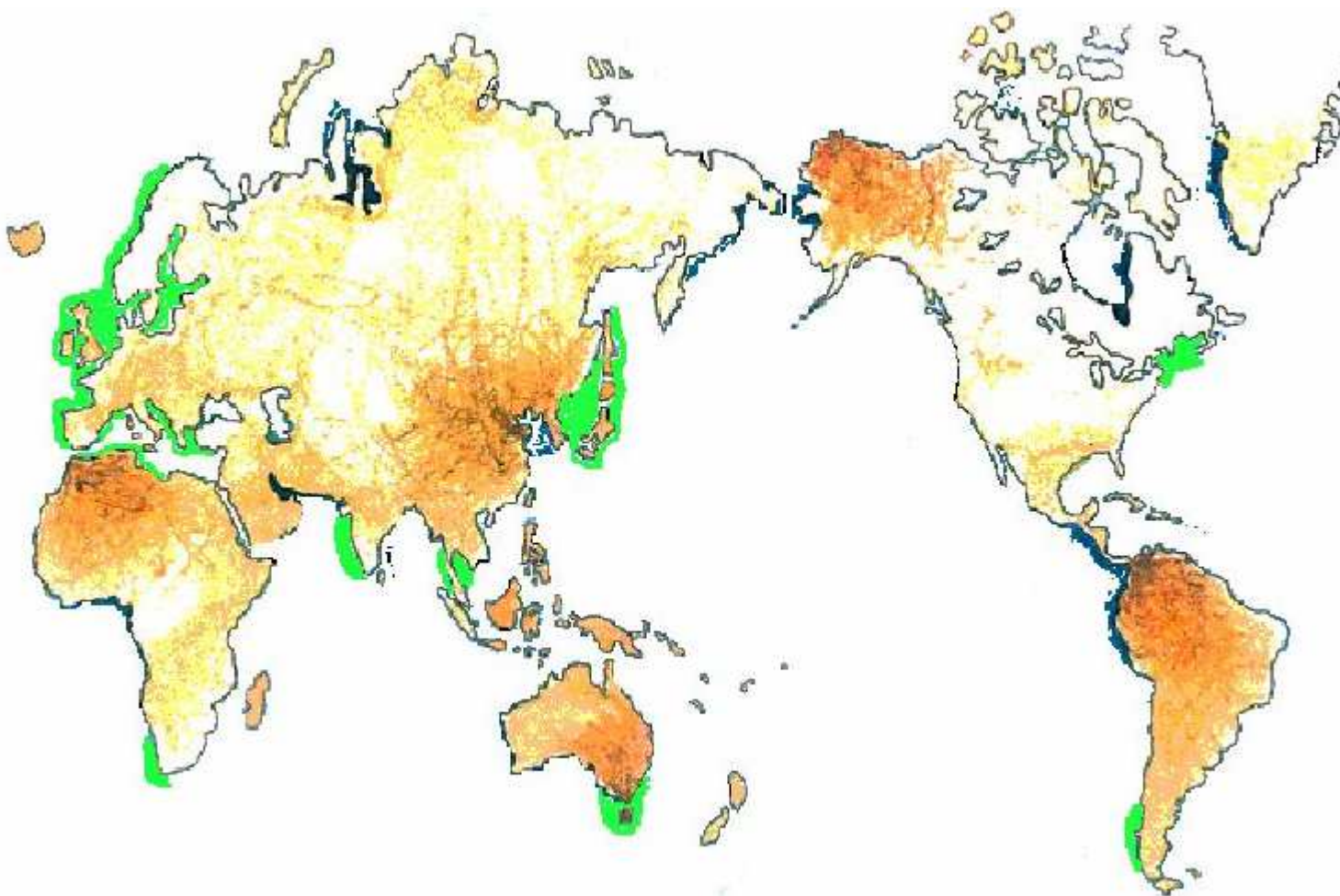
Tossicità nell'uomo: effetto acuto con **disturbi gastrointestinali**

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





Diffusione DSP nel mondo

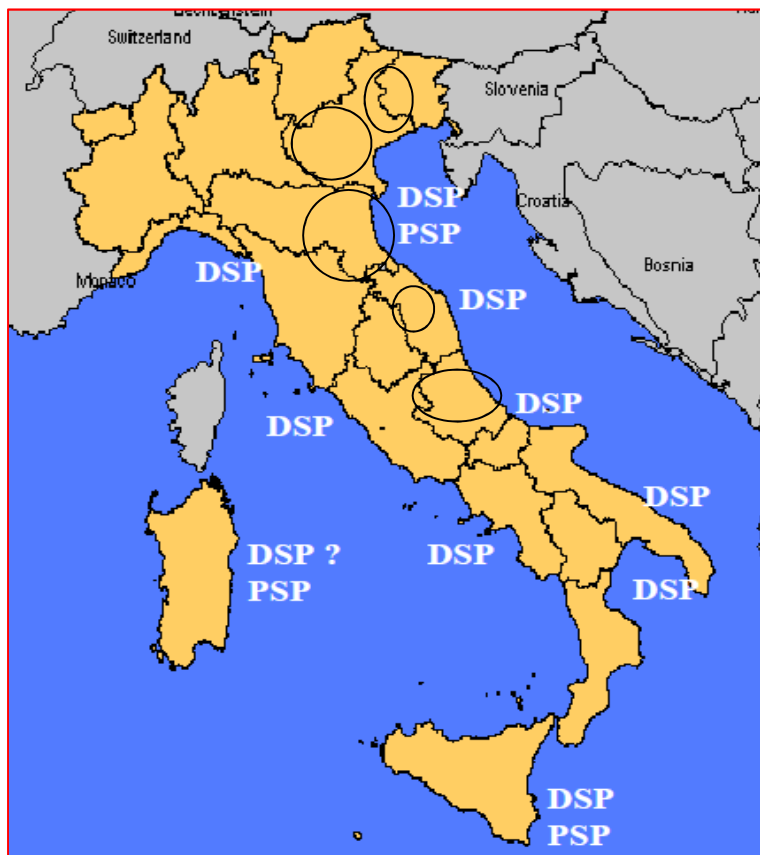


Francesca Longo- Roma, 15 Ottobre 2019





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 e s.m.i. 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

**1,00 mg di equivalente Yessotossina/kg parte edibile modificato
in 3, 75 mg di equivalente Yessotossina/kg parte edibile dal
Regolamento (UE) N.786/2013**

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	





Normativa

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 (Aesan EURLMB Domoic acid vers 1 2008)

DSP Metodi biologici o LC-MS/MS (*modifica nel Reg. CE 11/2015*) (***AECOSAN –EURLMB marine Biotoxins vers. 5 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





REGOLAMENTO (UE) 2017/1980 DELLA COMMISSIONE del 31 ottobre 2017 che modifica l'allegato III del regolamento (CE) n. 2074/2005 per quanto riguarda il metodo di determinazione delle tossine PSP

Articolo 1

L'allegato III, capitolo I, del regolamento (CE) n. 2074/2005 è sostituito dal testo seguente:

«CAPITOLO I: METODO DI DETERMINAZIONE DELLE TOSSINE PSP

1. Il tenore di tossine PSP (paralytic shellfish poison) delle parti commestibili dei molluschi (corpo intero od ogni parte commestibile separatamente) deve essere determinato con il metodo dell'analisi biologica o con altro metodo internazionalmente riconosciuto.

2. In caso di contestazione dei risultati, il metodo di riferimento è il cosiddetto metodo Lawrence, nella forma pubblicata nell'AOAC Official Method 2005.06 (Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish).»

Articolo 2

Il presente regolamento entra in vigore il terzo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*.

Esso si applica a decorrere dal 1° gennaio 2019.



Francesca Longo- Roma, 15 Ottobre 2019





Metodi utilizzati nella D.O.C.

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

**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



Francesca Longo- Roma, 15 Ottobre 2019





Metodi utilizzati nella D.O.C.

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 um

AECOSAN –EURLMB Marine
biotoxins vers. 5 2015



Francesca Longo- Roma, 15 Ottobre 2019





Metodi utilizzati nella D.O.C.

La spettrometria di massa serve a misurare la massa delle molecole ,
quindi fornisce la massa molecolare e anche la formula molecolare .

Non è possibile misurare la massa di una molecola direttamente. Se però
la molecola è ionizzata, allora il rapporto *massa/carica* dello ione risultante può
essere misurato. La spettrometria di massa è una tecnica altamente sensibile.





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



ANCHE PER CAMPIONI IDROLIZZATI

CONDIZIONI LC

Gradiente

A) Soluzione acquosa ammoniacale

B) CH_3CN

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





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





Esempio di campione reale

Gruppo Tossine	Analoghi	TEF	Espressione risultato
Gruppo AZA	AZA1	1	$\mu\text{g AZA equivalenti/kg}$
	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.

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

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

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

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

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

Campione NON CONFORME





Le biotossine algali nella D.O.C.

CAMPIONI ANALIZZATI NEGLI ULTIMI ANNI

	2016	2017	2018	Gen-Set 2019
ASP	188	197	222	222
DSP	190	200	230	284



Francesca Longo- Roma, 15 Ottobre 2019



Branca	N° Campioni analizzati ASP 2018	N° Campioni analizzati Biotossine liposolubili 2018	N° Campioni analizzati ASP 2019	N° Campioni analizzati Biotossine liposolubili 2019
Piano Per il Controllo Sanitario della Filiera dei Molluschi Bivalvi (fase primaria)	154	155	128	148
Controllo ufficiale alimenti per l'uomo PRIC (Produzione post -primaria	57	58	46	43
Controllo ufficiale Alimenti per l'uomo (PIF, UVAC)	8	12	20	23
Autocontrollo	3	5	28	70

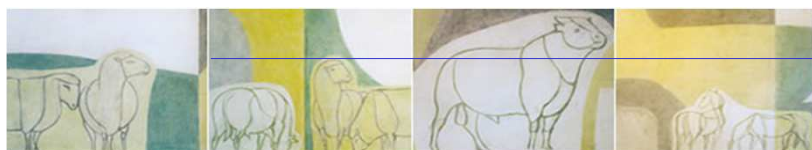




Le biotossine algali nella D.O.C.

CAMPIONI CON PRESENZA DI DSP > LOQ

Analita	Conc (µg/kg)	Area classificata	Periodo
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
Gruppo YTX (H-YTX)	160	Golfo di Gaeta	Ott 2018
Gruppo YTX (H-YTX) (45-OH-homo-YTX)	210 170 40	Golfo di Gaeta	Ott 2018





Le biotossine algali nella D.O.C.

CAMPIONI con presenza di biotossine algali > LOQ Gennaio –Agosto 2019

24 campioni totali ➔ 19 campioni presenza di biotossine gruppo okadaico

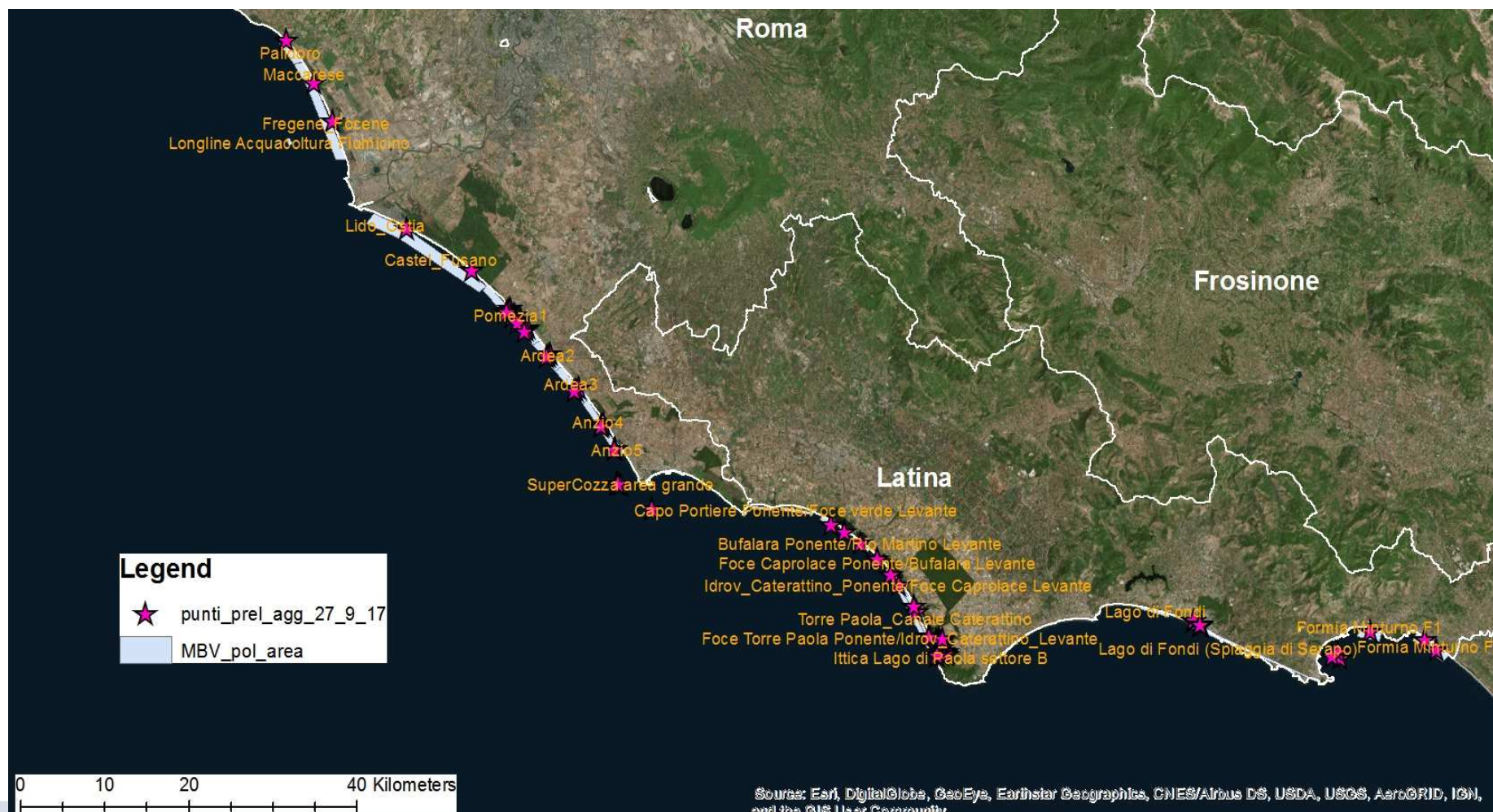
10 campioni con presenza DSP in autocontrollo

Campione NON conforme Gruppo Okadaico > 400 ug/kg
proveniente dalla Francia



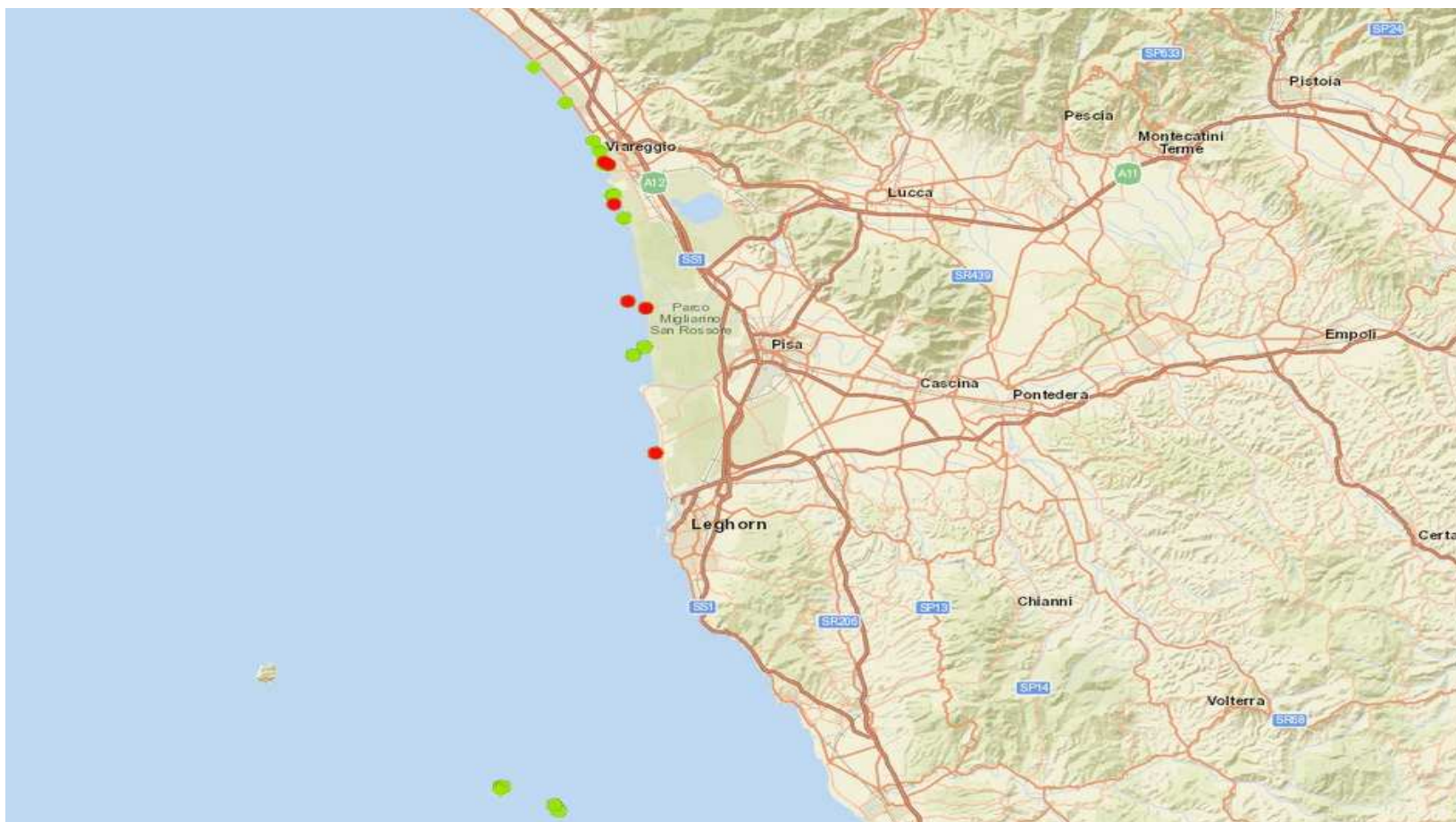
Punti di prelievo nel Lazio

Piano regionale per il controllo sanitario della filiera dei molluschi bivalvi



Punti di prelievo in Toscana

Piano regionale per il controllo sanitario della filiera dei molluschi bivalvi



Francesca Longo- Roma, 15 Ottobre 2019



laboratorio Nazionale di Riferimento

Centro Ricerche Marine di Cesenatico (CRM) indicato dalla UE quale **Laboratorio Nazionale di Riferenza 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



Francesca Longo- Roma, 15 Ottobre 2019





Prospettive future



Francesca Longo- Roma, 15 Ottobre 2019





Metodo ufficiale chimico PSP

Regulation (EC) No 2074/2005 is amended as follows:
Chapter I of Annex III is replaced by the following:

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).

COMMISSION REGULATION (EU) 2017/1980 of 31 October 2017 amending Annex III to Regulation (EC) No 2074/2005 as regards paralytic shellfish poison (PSP) detection method



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 è il metodo di riferimento in caso di contenzioso



Francesca Longo- Roma, 15 Ottobre 2019



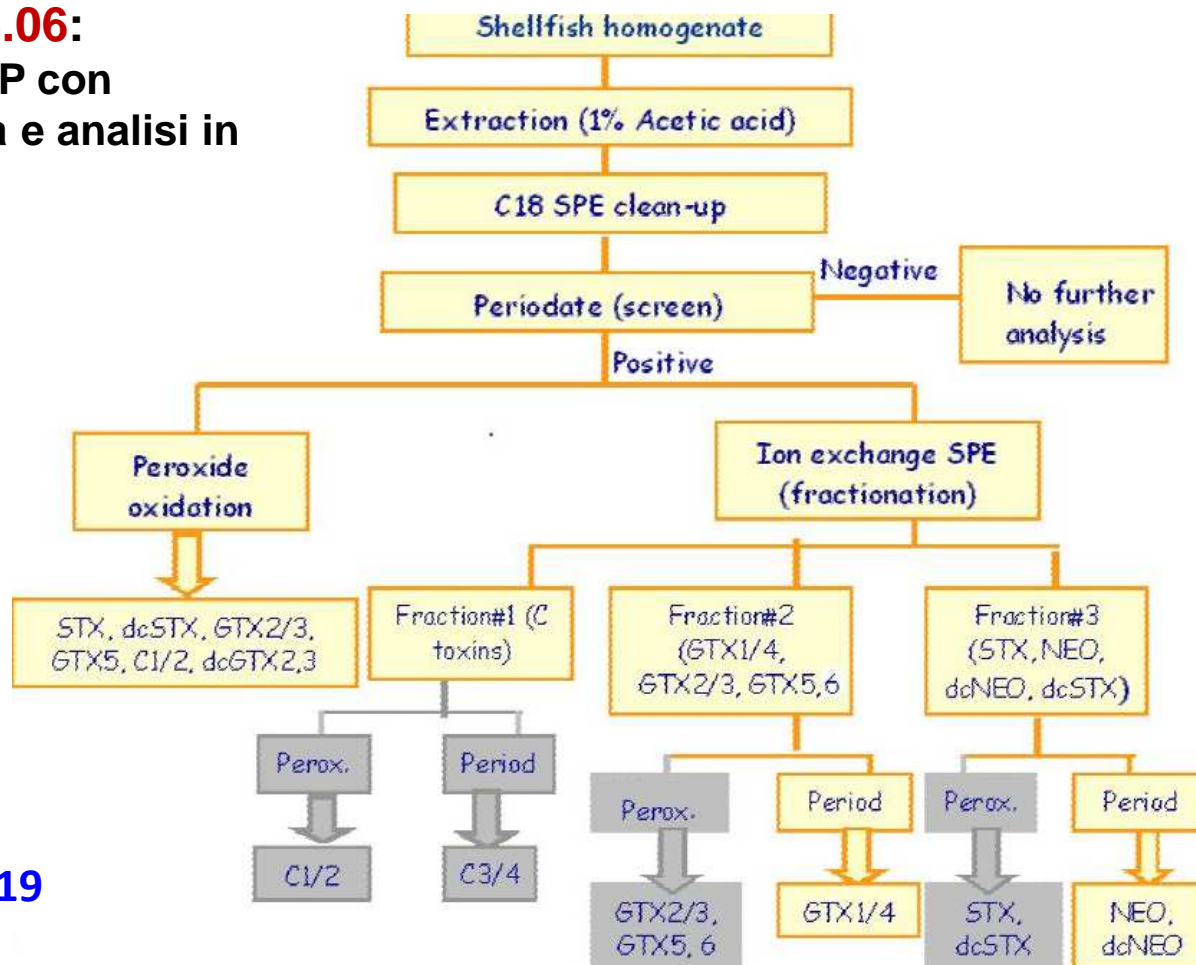


Determinazione PSP

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

**Il Laboratorio di riferimento
Nazionale comincerà a fare dei
training a partire da ottobre 2019**





**ANCHE IL Laboratorio di riferimento Europeo sta lavorando
alla validazione di un metodo LC-MS/MS come alternativa
al metodo di Lawrence**

CONDIZIONI LC

Gradiente

A) Soluzione acquosa con Acido

Formico 2.6 mM e ammonio formiato

B) CH₃CN:H₂O 95/5 (v/v) con Acido

Formico 2.6 mM e ammonio formiato

Tempo	%A	%B
0	20	80
5	30	70
7	60	40
9	60	40
10	20	80
14	20	80



Francesca Longo- Roma, 15 Ottobre 2019





Determinazione PSP

CONDIZIONI MS/MS

Sorgente ESI

Analizzatore Triplo quadrupolo

Acquisizione in MRM

(Multi Reaction Monitoring)

Composto	ESI	Q1	Q3	DP(v)	CE(v)-
STX	POS	300,2	203,9	130	7
STX	POS	300,2	282,2	130	7
dcSTX	POS	257,2	239,2	130	7
dcSTX	POS	257,2	221,8	130	7
NEO	POS	316,1	297,8	110	8
NEO	POS	316,1	195,1	110	8
dcNEO	POS	273,2	254,9	80	2
dcNEO	POS	273,2	125,8	80	14
GTX5	POS	380,2	300	36	7
GTX5	POS	380,2	282	36	7
GTX1e4	POS	412,2	394,1	30	8
GTX1e4-	POS	412,2	332	30	8
GTX2e3	POS	396	316	40	8
GTX2e3	POS	396	378	40	8
dcGTX2e3-	POS	353	335	40	8
dcGTX2e3-	POS	353	273,3	40	8
C1-C2	NEG	475	395	-55	-8
C1-C2	NEG	475	122	-55	-8





Determinazione PSP

Problematiche affrontate durante le prove di sviluppo metodo PSP in LC-MS/MS

Ottimizzazione della parte strumentale



Riduzione del segnale per effetto matrice

Analisi quantitativa in MS

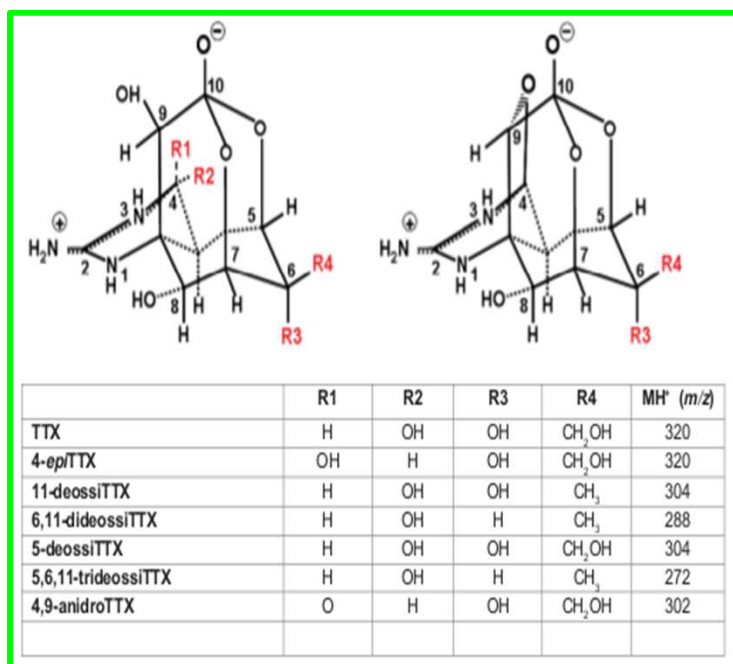
Effetto matrice

- Anche quando si è certi che il metodo messo a punto sia sufficientemente selettivo, cioè che il segnale misurato sia dovuto solo all'analita, non si può escludere che la contemporanea presenza di specie diverse dall'analita modifichi l'intensità del segnale, inficiando l'analisi quantitativa.
- Questo fenomeno, detto "effetto matrice", può essere dovuto ad interazioni chimiche dell'analita con altre specie presenti nel campione, sia prima dell'introduzione nello spettrometro di massa, che durante la fase di ionizzazione (effetto della matrice sull'abbondanza dello ione dell'analita e/o dei suoi frammenti).





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.



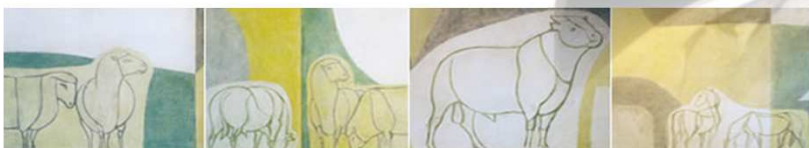
Casi di avvelenamento prevalentemente nei **paesi Indo-pacifici**, dell'Oceano Atlantico e del Golfo del Messico, a seguito di consumo soprattutto di pesce palla





Il Giappone e il culto del Fugu

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



Francesca Longo- Roma, 15 Ottobre 2019





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**.

È **vietata** la commercializzazione ed il consumo del **fegato** di pesce palla





TTX nel Mediterraneo

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

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

OPEN ACCESS

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)



Francesca Longo- Roma, 15 Ottobre 2019





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 in corso:
 - il passaggio delle PSP al metodo chimico, con sviluppo e la validazione di un metodo LC-MS/MS
- E' previsto:
 - lo sviluppo e la validazione del metodo per la determinazione delle tossine TTX





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

