



## **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?

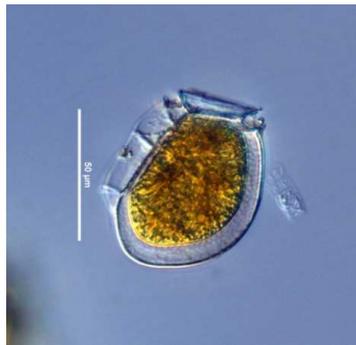
**BIOTOSSINA**



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**

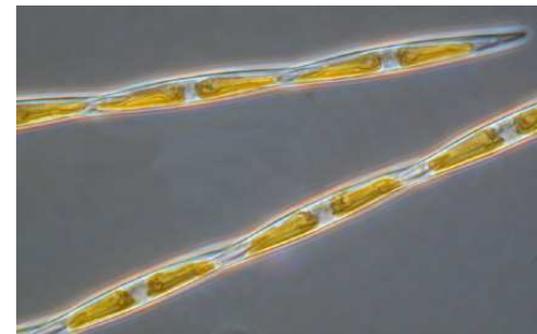


**Dynophisys fortii**



**Alexandrum catenella**

**Diatomee**



**Pseudo-nitzschia pungens**



Francesca Longo- Roma, 15 Ottobre 2019





# 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**

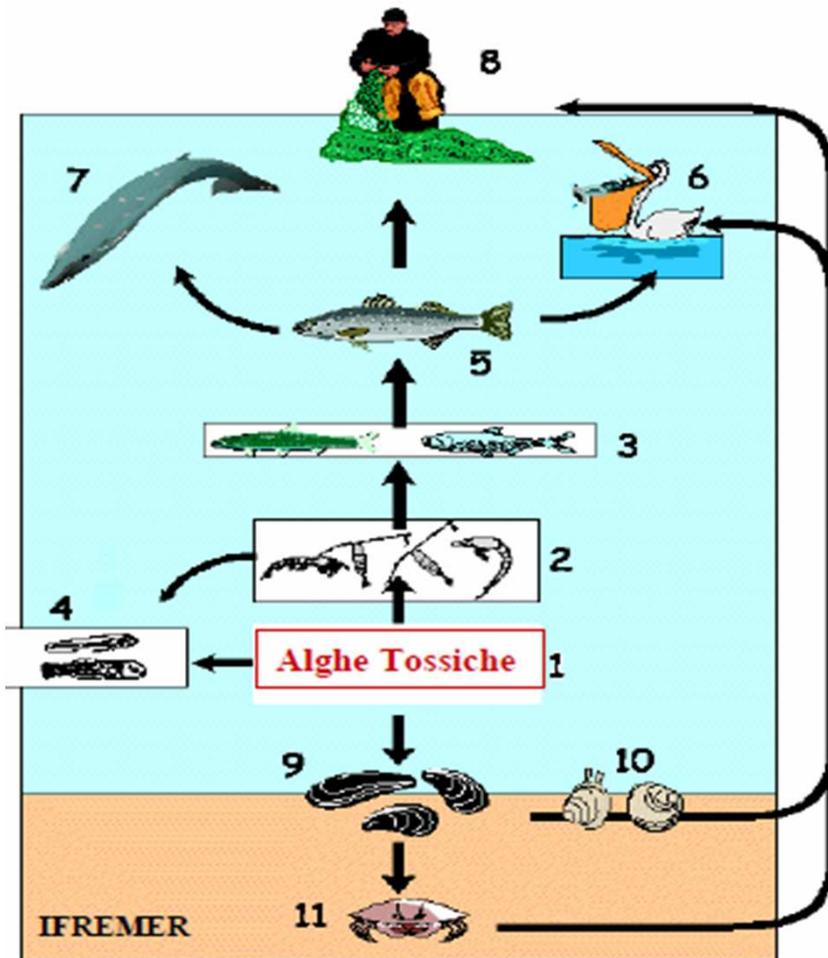


Accumulo nei tessuti, soprattutto gonadi ed epatopancreas,  
senza subire effetti tossici





# 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*

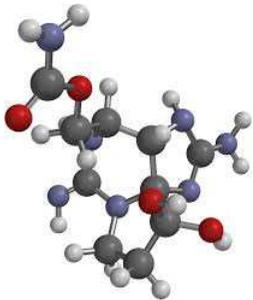




# Classificazione

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**

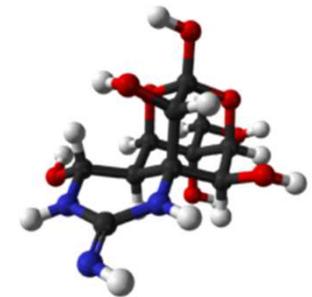
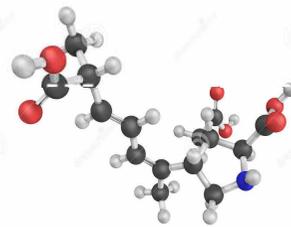
**Acido Okadaico e DTXs**

**Pectenotossina e PTXs**

**Yessotossina e YTXs**

**Brevetossina e PbTXs**

**Tetrodotossine e TTXs**



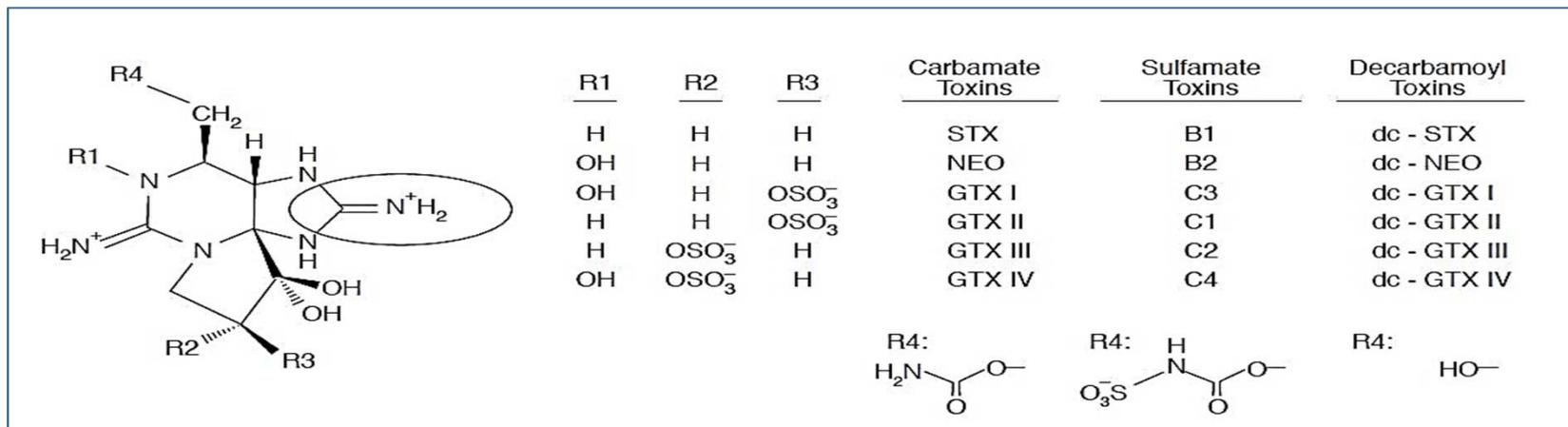


# Paralytic Shellfish Poisoning (PSP)

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*

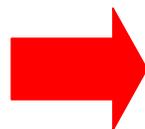




# Paralytic Shellfish Poisoning (PSP)

## MECCANISMO DI AZIONE

Blocco del trasporto di ioni sulla membrana cellulare per azione sul canale di Na<sup>+</sup>



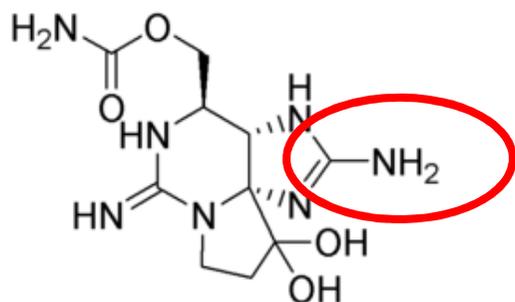
Blocco della trasmissione degli impulsi nervosi al sistema muscolare e scheletrico con conseguente **paralisi respiratoria**

## 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)

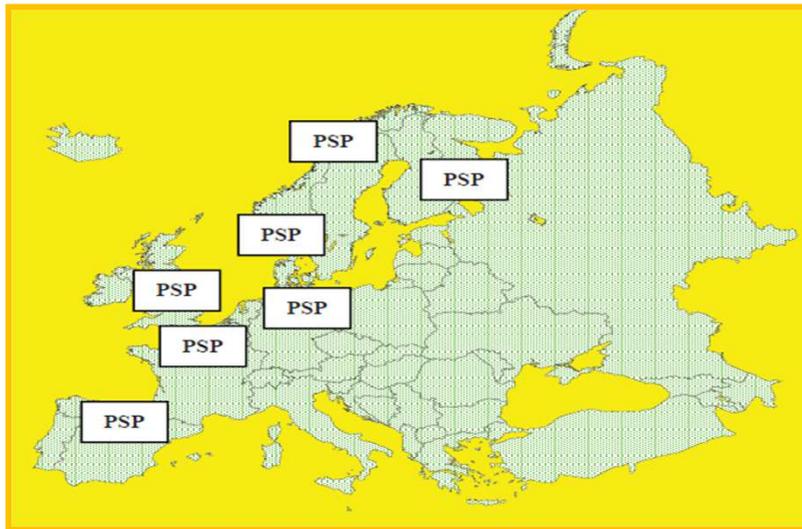
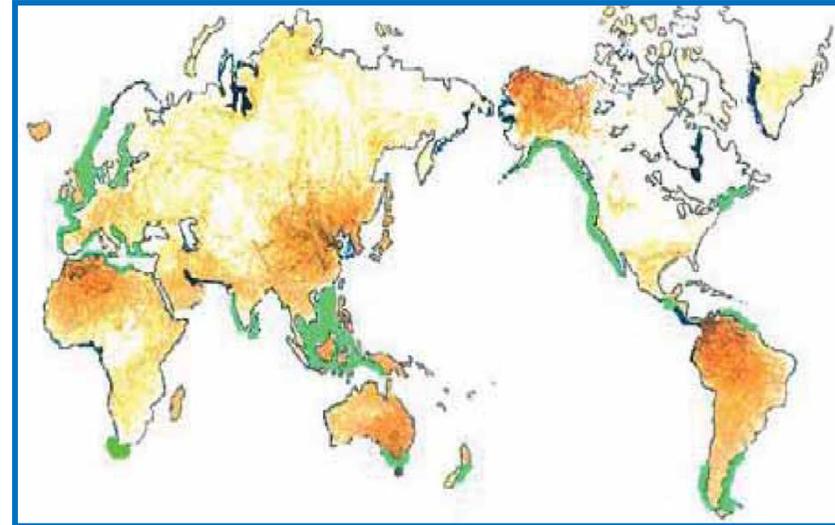




# Diffusione PSP nel mondo

## 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)

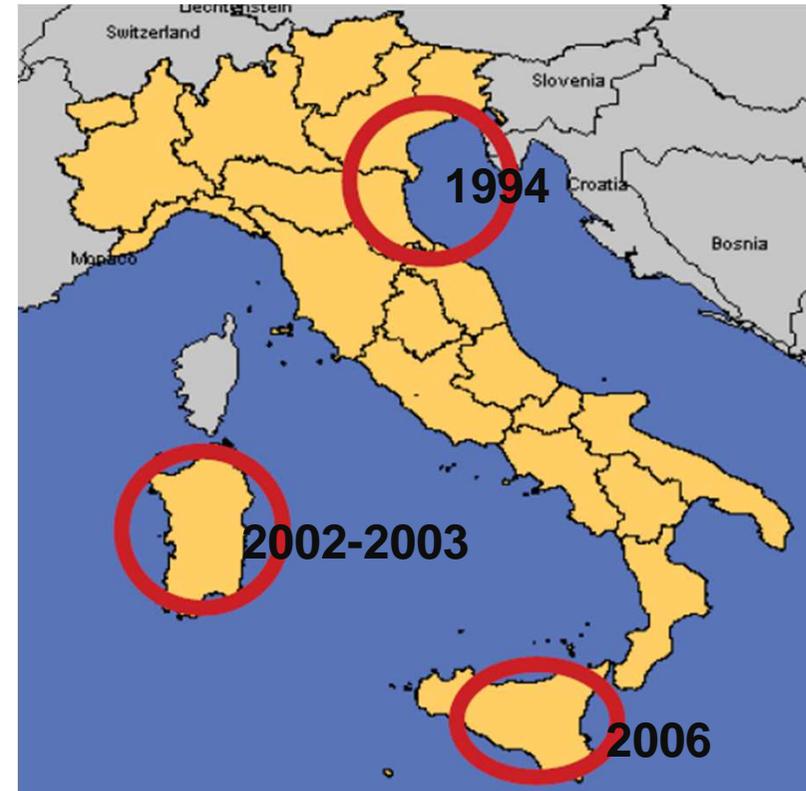
In **Germania, Bassa Sassonia, Francia, Svizzera e Italia** casi di avvelenamento a seguito di consumo di mitili esportati dalla **Spagna**





# Diffusione PSP in Italia

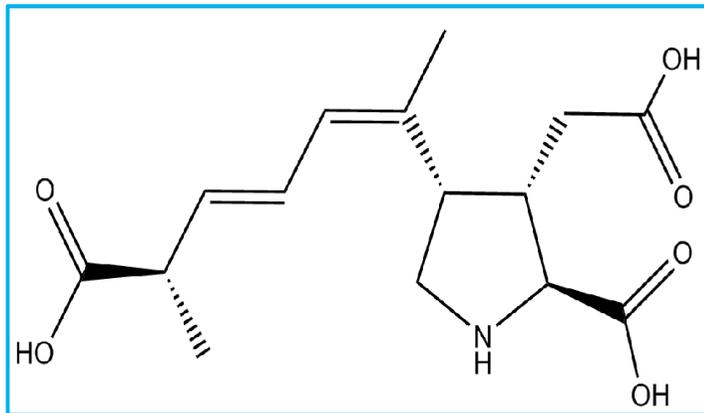
PSP MESI POTENZIALMENTE A RISCHIO	
Gennaio	●
Febbraio	●
Marzo	●
Aprile	● ● ●
Maggio	● ● ● ● ●
Giugno	● ● ● ●
Luglio	● ●
Agosto	●
Settembre	●
Ottobre	●
Novembre	●
Dicembre	●





# 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**

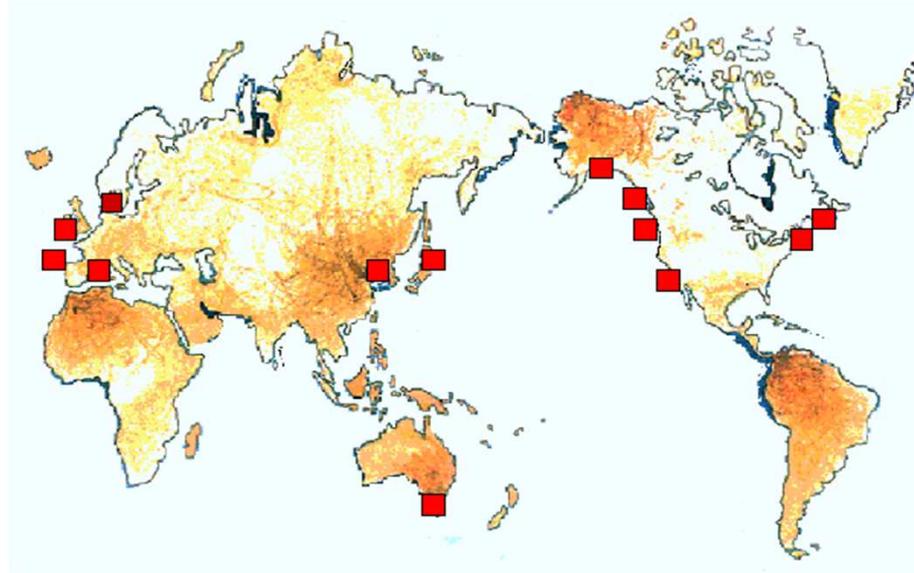
48 ore da ingestione: **Sintomi neurologici più gravi (confusione, disorientamento, perdita della memoria)**

**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**

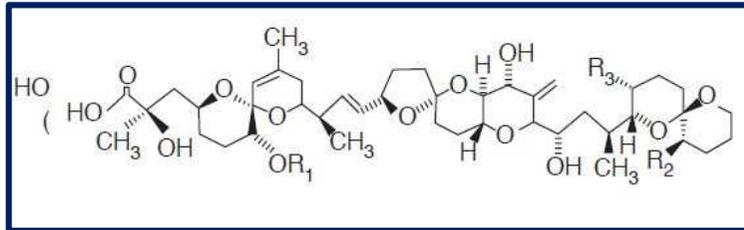
Acido okadaico e derivati (OAs)  
Pectenotossine (PTXs)  
Yessotossine e derivati (YTXs)  
Azaspiracidi e derivati (AZAs)

**Microalghe responsabili: dinoflagellati gen. Dinophysis e Prorocentrum**





# Acido Okadaico e derivati



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

## 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**

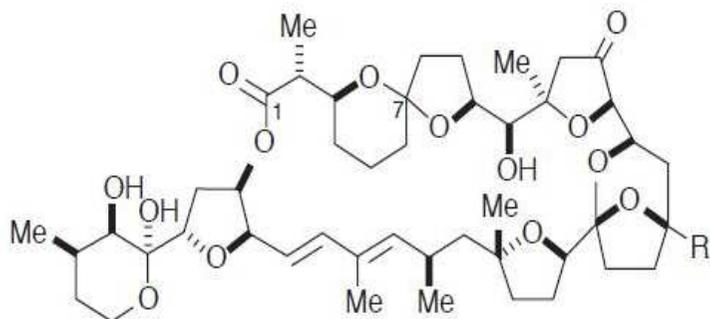
Studi in vivo

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

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

## MECCANISMO DI AZIONE IGNOTO

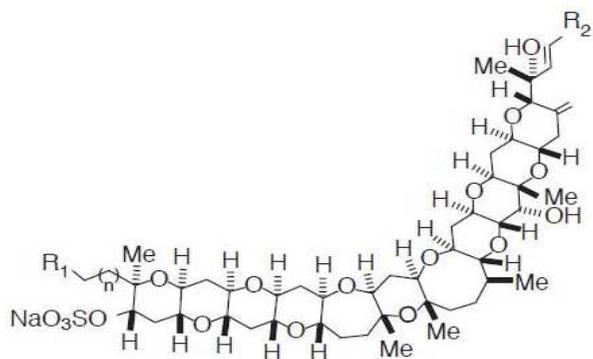
Da studi in vivo:  
lesioni a **fegato, stomaco e intestino** e  
cambiamenti istologici a **polmoni e reni**

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





# Yessotossine (YTXs)



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

## MECCANISMO DI AZIONE IGNOTO

Nessun potere diarroico → nessuna inibizione delle  
Proteine Fosfatasi

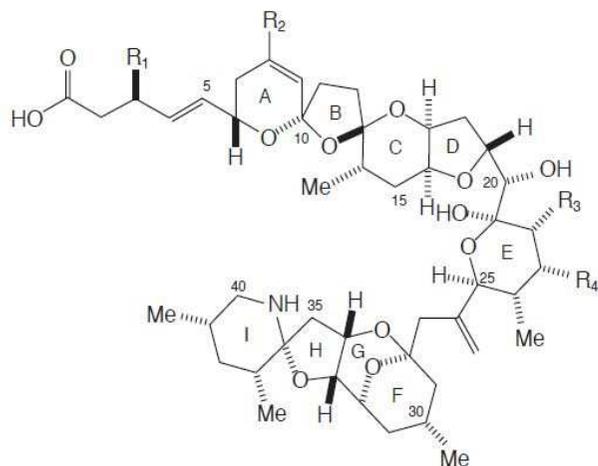
Organo bersaglio: **MIOCARDIO** (Studi in vivo)

**NON SONO NOTI CASI DI  
INTOSSICAZIONE UMANA**





# Azaspiracidi (AZAs)



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

**32 composti  
AZAs**

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

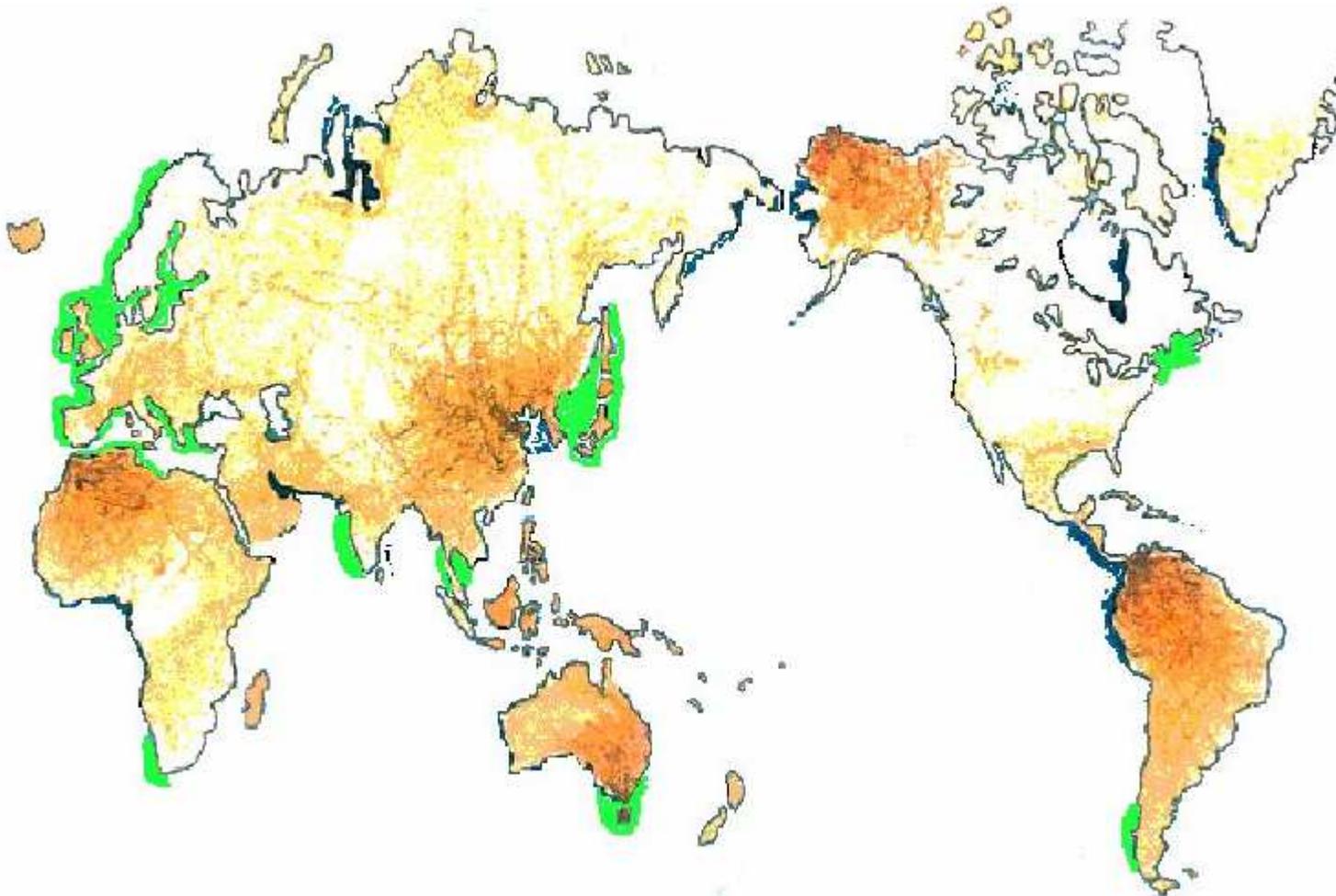
**Tossicità nell'uomo:** effetto acuto con **disturbi gastrointestinali**

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





# Diffusione DSP nel mondo

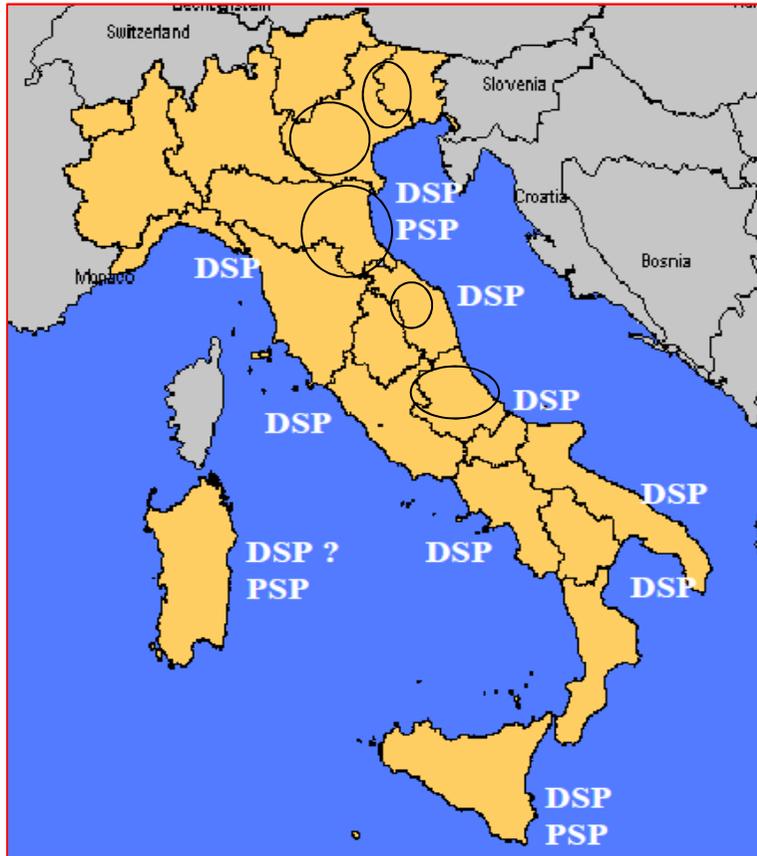


Francesca Longo- Roma, 15 Ottobre 2019





# Diffusione DSP in Italia



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

## STAGIONALITA'

	DSP
<b>Gennaio</b>	●
<b>Febbraio</b>	●
<b>Marzo</b>	●
<b>Aprile</b>	●
<b>Maggio</b>	●
<b>Giugno</b>	● ● ●
<b>Luglio</b>	● ● ● ●
<b>Agosto</b>	● ● ● ●
<b>Settembre</b>	● ● ● ●
<b>Ottobre</b>	● ● ● ●
<b>Novembre</b>	● ●
<b>Dicembre</b>	●





# 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  $\mu\text{g}$  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	$\mu\text{g}$ OA equivalenti/kg
	DTX1	1	
	DTX2	0,6	
Gruppo PTX	PTX2	1	$\mu\text{g}$ OA equivalenti/kg
	PTX1	1	
Gruppo AZA	AZA1	1	$\mu\text{g}$ 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.





# 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<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>OH (50:50)**

**Omogeneizzatore  
a immersione 3 min 10000 rpm**

**Filtrazione con filtrino 0.45 mm**

**DETERMINAZIONE HPLC-DAD**





# Metodi utilizzati nella D.O.C.

## DETERMINAZIONE DELLE DSP in LC-MS/MS

Pulitura e omogeneizzazione  
del campione

Estrazione con CH<sub>3</sub>OH (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





# 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 ammoniacca**

**B) CH<sub>3</sub>CN**

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) CH<sub>3</sub>CN

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
<b>ASP</b>	188	197	222	222
<b>DSP</b>	190	200	230	284



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

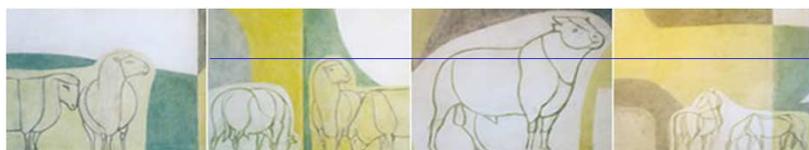




# Le biotossine algali nella D.O.C.

## CAMPIONI CON PRESENZA DI DSP > LOQ

Analita	Conc ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	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

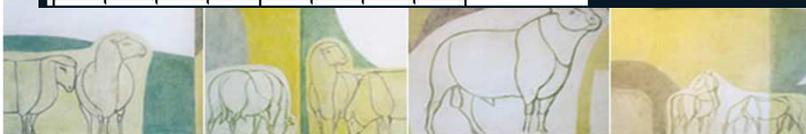
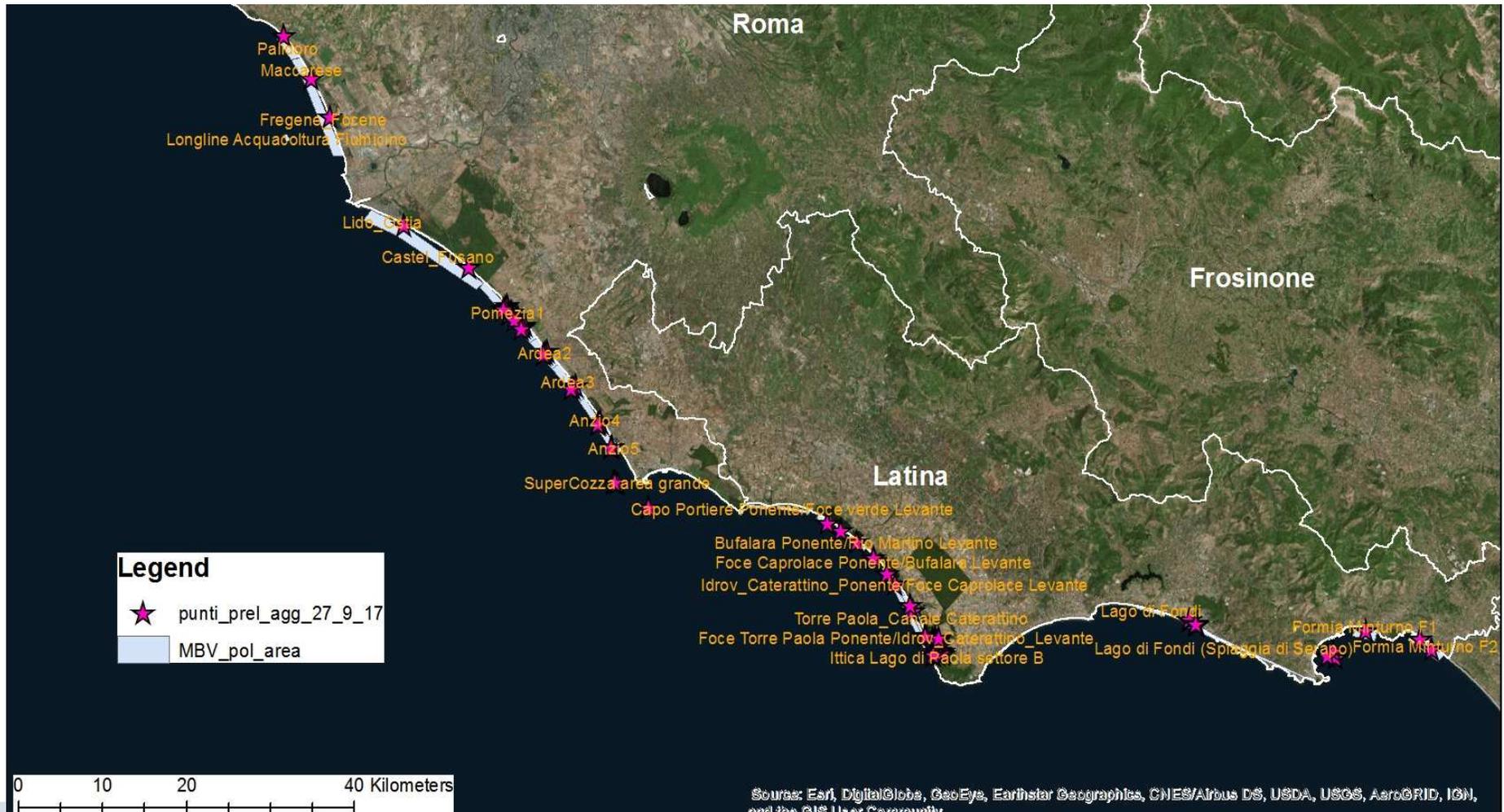
10 campioni con presenza DSP in autocontrollo

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



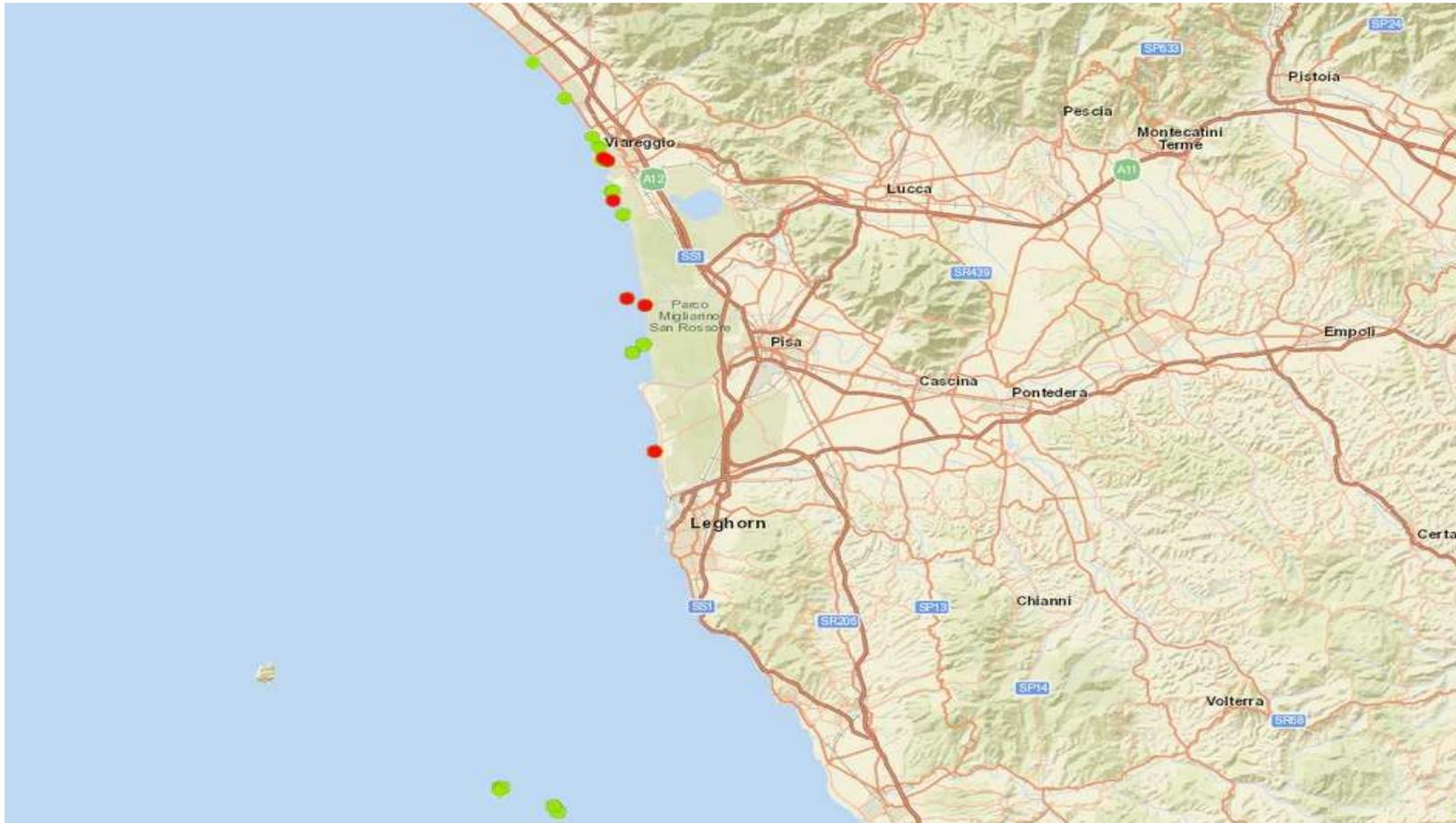
# Punti di prelievo nel Lazio

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 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



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 1<sup>st</sup> January 2018.

**Il metodo di Lawrence è il metodo di riferimento in caso di contenzioso**



Francesca Longo- Roma, 15 Ottobre 2019



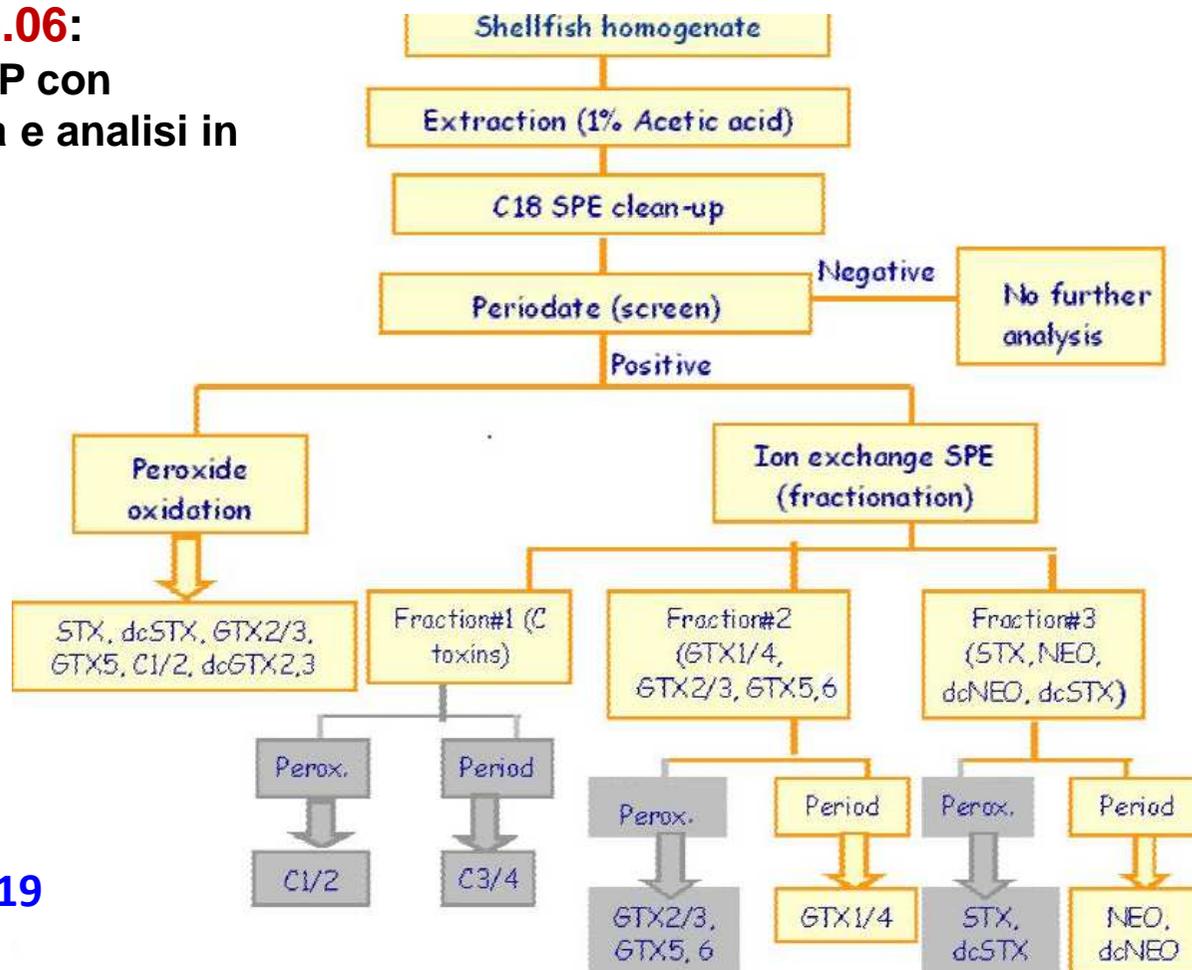


# Determinazione PSP

**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) CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 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





# 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

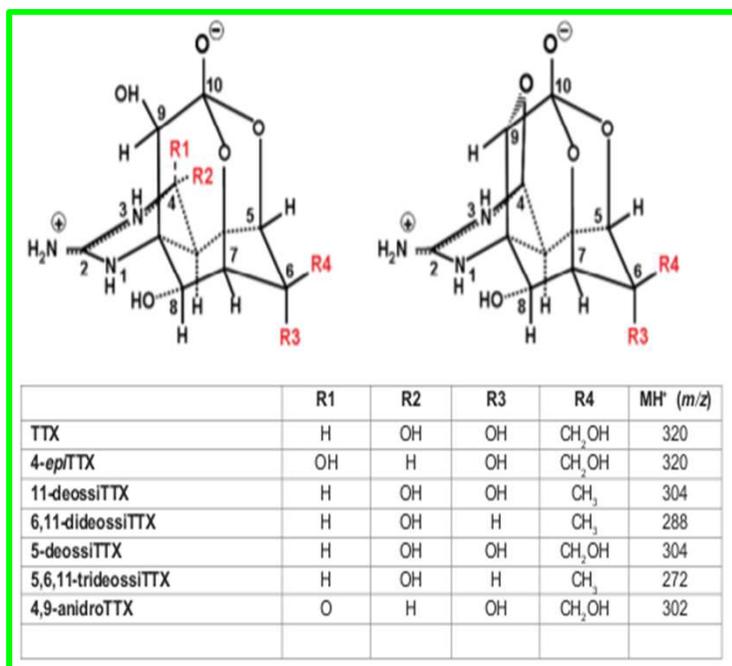
### Effetto matrice

- 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 dell'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  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  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  $\mu\text{g}$  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**.

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





# 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 <sup>1,2</sup>, Panagiota Katikou <sup>2,\*</sup>, Ines Rodriguez <sup>1</sup>, Verónica Rey <sup>1</sup>, Amparo Alfonso <sup>1</sup>, Angelos Papazachariou <sup>2</sup>, Thetis Zacharaki <sup>2</sup>, Ana M. Botana <sup>1</sup> and Luis M. Botana <sup>1</sup>

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!**

