

GIORNATA DI STUDIO

Alternative alla sperimentazione animale nello studio e rilevazione delle biotossine marine

Teramo, 9 marzo 2009

Sala Polifunzionale della Provincia



**UTILIZZO DELLA PROVA BIOLOGICA “MOUSE
TEST” COME METODO UFFICIALE PER LA
RILEVAZIONE DELLE TOSSINE LIPOSOLUBILI
NEI MOLLUSCHI EDULI LAMELLIBRANCHI**

MIRIAM BERTI

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO E DEL MOLISE “G.CAPORALE”

BIOTOSSINE ALGALI

- ❖ Molecole prodotte dalle microalghe del fitoplancton e fitobentos
- ❖ Spiccata capacità di accumulo di tali tossine da parte dei molluschi bivalvi
- ❖ L'ingestione da parte dell'uomo di prodotti contaminati porta all'insorgenza di quadri patologici " Biointossicazioni"

Biointossicazioni

- Sindromi diarroiche (Diarrhetic Shellfish Poisoning- **DSP**)
- Sindromi paralitiche (Paralytic Shellfish Poisoning - **PSP**)
- Sindromi amnesiche (Amnesic Shellfish Poisoning - **ASP**)
- Sindromi neurotossiche (Neurotoxic Shellfish Poisoning - **NSP**)

❖ *Istituto Zooprofilattico
dell'Abruzzo e del Molise
"G. Caporale"*



❖ *Centro di Riferimento
Nazionale Biotossine
Marine-Cesenatico*



Vigilanza e controllo sanitario per la tutela della salute pubblica

- I Regolamenti Comunitari del c.d. Pacchetto Igiene (Reg. CE n.178/2002, n.852/2004, n.853/2004, n.854/2004, n.2073/2005, n. 2074/2005)
- Le Linee Guida sui molluschi bivalvi e nuova regolamentazione comunitaria

IZSAM struttura competente al controllo

Effettua gli accertamenti analitici previsti dal piano di vigilanza per il controllo sanitario dei MBV destinati al consumo umano



- ❖ analisi biotossicologiche (DSP-PSP-ASP)
- ❖ analisi microbiologiche (E. coli, Salmonelle)
- ❖ analisi chimiche (metalli pesanti)
- ❖ flusso informativo dei dati ottenuti

DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoning)

❖ Polietteri ciclici ,composti liposolubili , divisi in classi strutturali:

- TOSSINE ACIDE: Acido okadaico (AO) e suoi derivati (OAs);
- TOSSINE NEUTRE :Pectenotossine (PTXs);
- Yessotossina e suoi derivati (YTXs)
- .Azaspiracido e suoi derivati (AZAs)

❖ I disturbi sono di tipo gastrointestinale:

- diarrea (92%)
- nausea (80%)
- vomito (79%)
- crampi addominali (53%)

YESSOTOSSINE

- ❖ Sono gruppo di tossine prodotte da dinoflagellati



Protoceratium reticulatum



*Lingulodinium polyedrum/
Gonyaulax polyedra*

- ❖ La tossicità riguarda organi bersaglio come cuore (miocardio), fegato e pancreas
- ❖ La YTX è stata isolata per la prima volta nella ghiandola digestiva del pettine *Patinopecten yessoensis*

YTX e YESSOTOSSINE

❖ Polietere formati da una serie di 11 anelli ciclici trans-sfusi, una catena insatura terminale di atomi di carbonio e dalla parte opposta gruppi alcolici solfatati

❖ Si conoscono più di 90 YTXs, ma sono state identificate circa una dozzina

Yessotossine (YTXs)

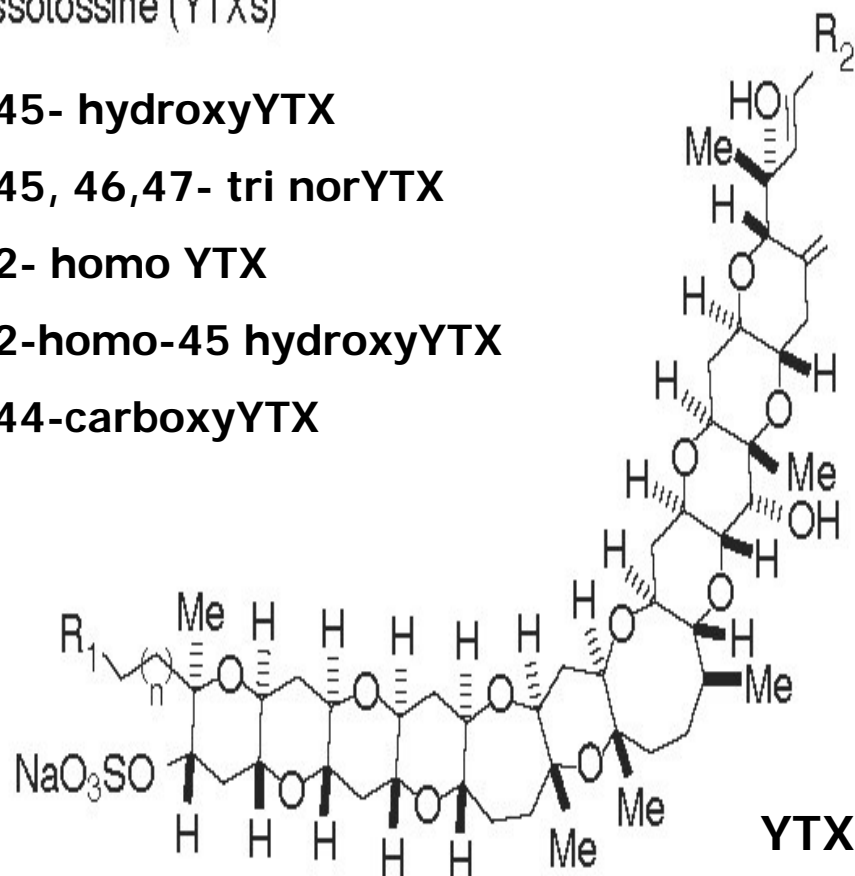
45- hydroxyYTX

45, 46,47- tri norYTX

2- homo YTX

2-homo-45 hydroxyYTX

44-carboxyYTX



***Metodi di prova riconosciuti per la
rilevazione delle tossine lipofile Reg. CE
n.2074/2005- all. III***

- ❖ **Metodi biologici MBA – RBA**
- ❖ **Metodi alternativi ai metodi di prova biologici**

Metodo di Prova

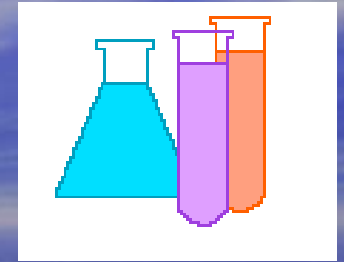
- ❖ **Determinazione delle tossine liposolubili nei molluschi eduli lamellibranchi dall'Allegato al DM 16/05/2002 (G.U.n° 165 del 16/07/2002)**
 - “ Tenori massimi e metodiche di analisi delle biotossine algali nei molluschi bivalvi vivi, echinodermi, tunicati e gasteropodi marini ”
- ❖ **Il metodo si basa sull'effetto della tossicità acuta provocata in topi adulti dopo l'inoculazione i.p. di un estratto di corpo edibile di molluschi.**

LIMITI NORMATIVI

➤ **Reg. (CE) n. 853/2004**

- yessotossine: 1 mg equivalente di yessotossine/kg;
- Acido okadaico, dinophysitossine e pectenotossine complessivamente: 160 µg di equivalente acido okadaico/kg;
- azaspiracidi: 160 µg di equivalente azaspiracido/kg.

APPLICAZIONE



- I campioni di mitili, oggetto di studio, sono stati analizzati seguendo quanto dettato dall'Allegato al Decreto del Ministero della Salute del 16 maggio del 2002
- E' prevista l'applicazione di due protocolli (Prot.1 , Prot. 2)
- Test applicato sul mollusco intero (p.e.)

❖ DSP



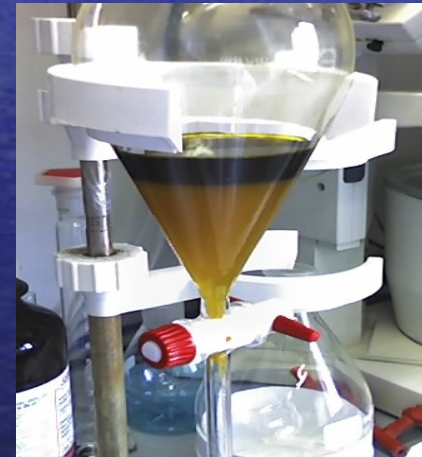
prova biologica su topo

DETERMINAZIONE DELLE DSP

- Pulizia esterna dei molluschi;
- Prelievo di circa 150 g di corpo intero;
- Omogeneizzazione;
- Prelievo di 100 g di materiale omogenato;
- **PROTOCOLLO I** (determinare le tossine liposolubili AO, DTXs, PTXs, YTXs e AZA):



- estrazione con acetone;
- estrazione con metanolo;
- evaporazione dell'estratto;
- estrazione con etere e acqua distillata
- evaporazione dell'estratto eterico;
- preparazione dell'inoculo;
- iniezione di 1 ml di inoculo in 3 topi.



Fase estrazione

- Estrazione delle tossine con acetone e con metanolo per 2' in ULTRATURRAX



Evaporazione dell'estratto acetnico e metanolico

Evaporazione in
essiccatore a vuoto
rotante



Estrazione con etere etilico del residuo risospeso in H₂O

- Ripartizione
acqua/etere etilico



Evaporazione del volume di etere

- Evaporazione in essiccatore a vuoto rotante
- Preparazione dell'inoculo: risospensione del residuo in Tween 60 all'1%



Protocollo 1

- ❖ Metodo sviluppato dal Prof Yasumoto T. nel 2001, basato sul metodo: Yasumoto T, et al. (1984) – Diarrhetic Shellfish Poisoning .
- ❖ Iniezione i.p. dell' emulsione in 3 topi
- ❖ Il test è positivo se 2 topi su 3 muoiono entro le 24 ore : presenza di tossine AOs, YTXs; PTXs, AZAs .
- ❖ I molluschi non sono idonei al consumo umano.

Determinazione tossine liposolubili – Protocollo 2



- **PROTOCOLLO II** (determinare AO, DTXs, PTXs, YTXs e AZA):

- prelievo 100 g di omogenato;
- estrazione con 300 ml di acetone;
- estrazione con 300 ml di metanolo;
- evaporazione dell'estratto;
- risospensione del residuo con diclorometano e metanolo al 60% (1:2)



DETERMINAZIONE DELLE DSP- PROTOCOLLO



STEP 1:

- evaporazione della frazione di diclorometano;
- preparazione dell'inoculo;
- iniezione di 1 ml di emulsione in 3 topi:



Sopravvivenza di 2 topi su 3 oltre le 24 ore: TEST NEGATIVO per AO, DTXs, PTXs e AZA.

Morte di 2 topi su 3 entro le 24 ore: TEST POSITIVO per AO, DTXs, PTXs e AZAs.

STEP 2:

- evaporazione della frazione di metanolo al 60%;
- preparazione dell'inoculo;
- iniezione di 1 ml di emulsione in 3 topi:



Sopravvivenza di 2 topi su 3 oltre le 5 ore: TEST NEGATIVO per YTXs.

Morte di 2 topi su 3 entro le 5 ore: TEST POSITIVO per YTXs.

Biosaggio sul topo

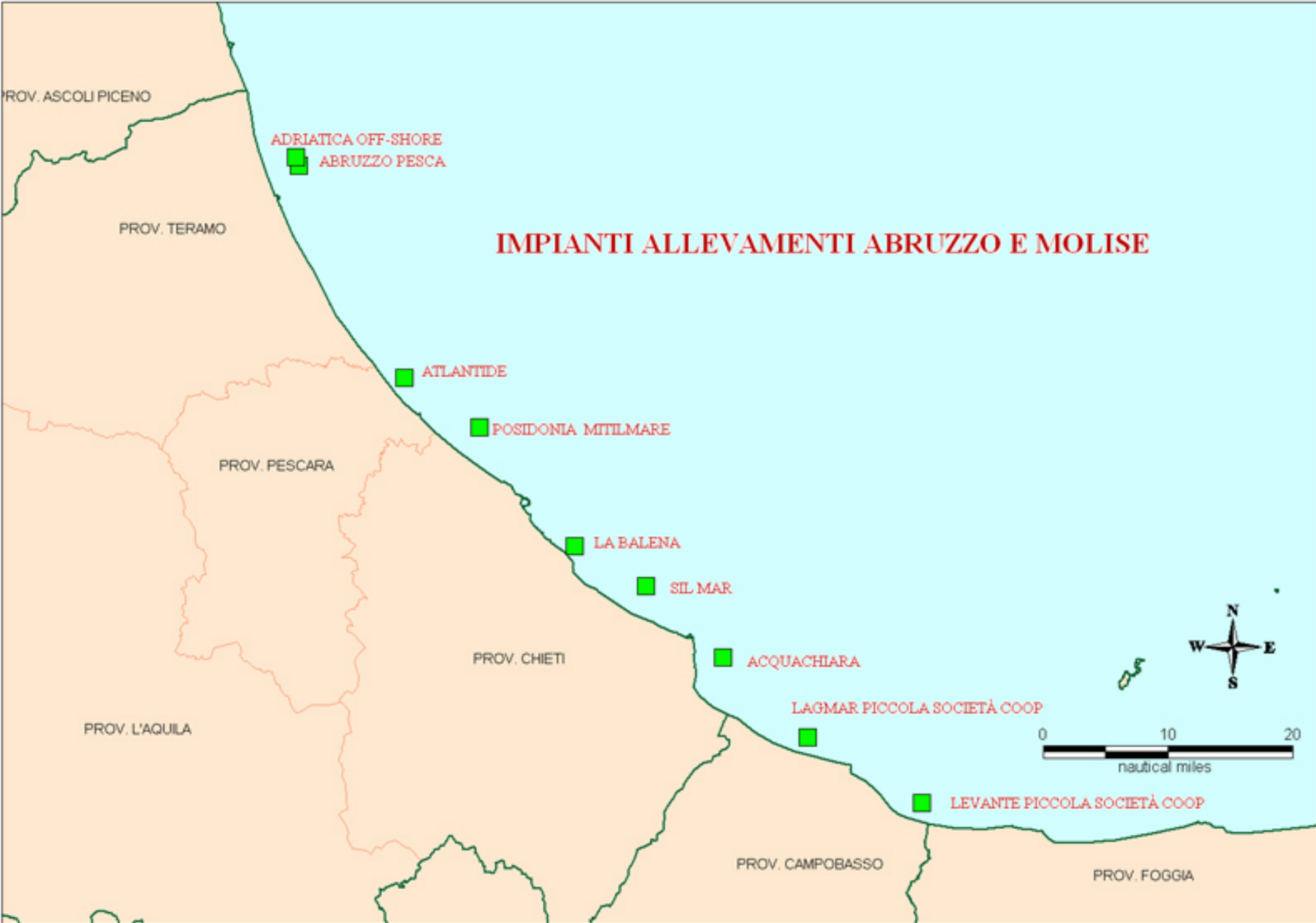
Aspecificità :
interferenze da parte di
altre sostanze presenti
nel materiale analizzato



Scarsa sensibilità

Problemi etici sull'utilizzo di
mammiferi per le bioanalisi

IMPIANTI ALLEVAMENTI ABRUZZO E MOLISE



Trattamento dei campioni di mitili da impiegare nel dosaggio funzionale delle YTXs

- ❖ Procedura Operativa Standard (27 Giugno 2007) : Procedura di dosaggio funzionale delle Yessotossine

Dipartimento di Scienze Biomediche , Università di Modena e Reggio Emilia – Prof. Gian Paolo Rossini

- ❖ - parte del 5 b. Campioni da impiegare nel dosaggio-

Preparazione dei campioni di mitili da impiegare nel dosaggio YTXs

- prelievo di omogenato;
- estrazione con di acetone;
- estrazione con metanolo;
- evaporazione dell'estratto metanolico e acetone;
- ripartizione del residuo con diclorometano e metanolo al 60%
- evaporazione sotto flusso di azoto della frazione (40ml) dell'estratto metanolico
- risospensione del residuo in etanolo assoluto/DMSO(1:1)
- Sonicazione
- Conservazione del campione a -20°C e al riparo dalla luce



- **CAMPIONE VERRA' UTILIZZATO PER IL DOSAGGIO FUNZIONALE DELLE YTXs IN VITRO**

Campioni utilizzati per il dosaggio funzionale YTXs

- Mitili provenienti dalle zone di produzione dell'Abruzzo e del Molise
- Mitili provenienti dalle zone di produzione dell'Emilia Romagna

REPORT ANALISI ESEGUITE ANNO 2008

- DSP → n .93 analisi eseguite (nessuna positività)
- PSP → n. 93 analisi eseguite (nessuna positività)
- ASP → n. 93 analisi eseguite (nessuna positività)



***GRAZIE PER
L'ATTENZIONE!!!***

