



**IZSAM G. CAPOREALE  
TERAMO**

**I RISULTATI DELLA RICERCA CORRENTE CONDOTTA DALL'ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE  
DELL'ABRUZZO E DEL MOLISE - ANNO 2020**

**Studio della farmacocinetica di due acaricidi nella filiera avicola,  
inseriti nei recenti piani di monitoraggio per la sicurezza alimentare:  
stato dell'arte**

**Roberta Rosato**

Teramo, 17 giugno 2021



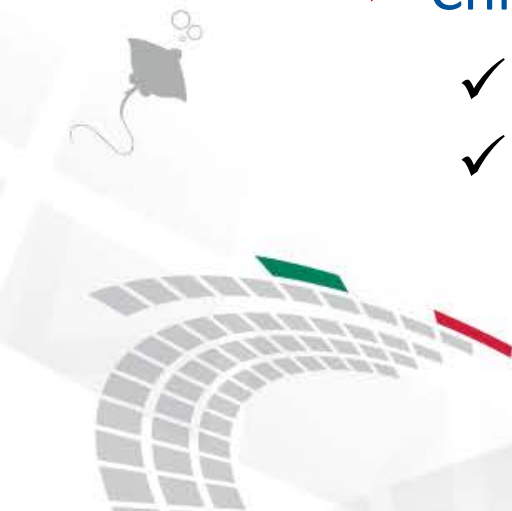


## Acaricidi nella filiera avicola

L'acaro rosso *Dermanyssus gallinae* è un parassita del pollame, ematofago in grado di infestare gabbie e mangiatoie.

Può causare ai volatili un forte prurito e, di conseguenza, **un forte stress che si ripercuote negativamente sulla produzione di carne e uova**, agendo come vettore di malattie aviarie e batteriche nell'uomo e negli animali

- ✓ Fisici: calore
- ✓ Chimici: acaricidi
  - ✓ 2017-Fipronil - uso illecito - allerta comuniraria
  - ✓ 2017- Fluralaner - *EMEA/V/MRL/004380/FULL/0001*





## Obiettivi del progetto

---

### 1. Studiare la farmacocinetica di Fipronil e Fluralaner

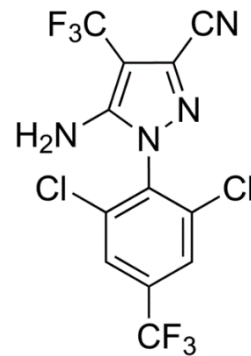
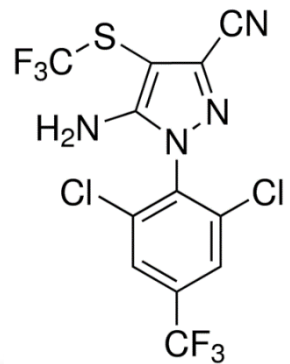
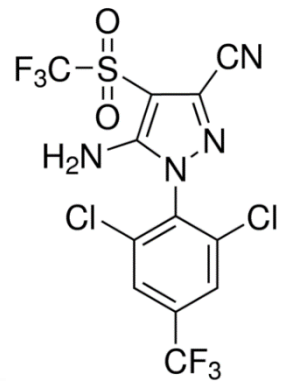
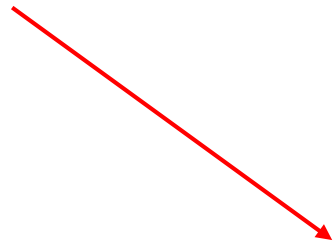
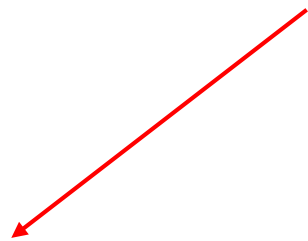
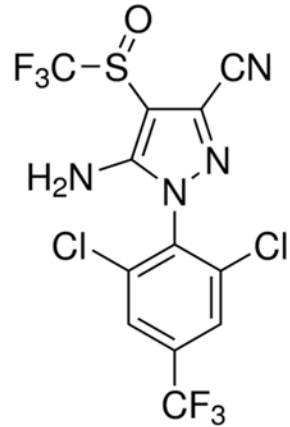
- ✓ Modalità di smaltimento nelle galline ovaiole al fine di garantirne l'assenza in carne, uova e grasso destinati al consumo alimentare
- ✓ Identificazione degli adiuvanti presenti nei formulati dei principi attivi utilizzati

### 2. Studiare protocolli di decontaminazione ambientale efficaci e inoffensivi per la salute umana e animale

- ✓ Permanenza dei residui nelle aree trattate
- ✓ Identificazione degli adiuvanti presenti nei formulati dei principi attivi utilizzati



# Fipronil



Fipronil Sulfone

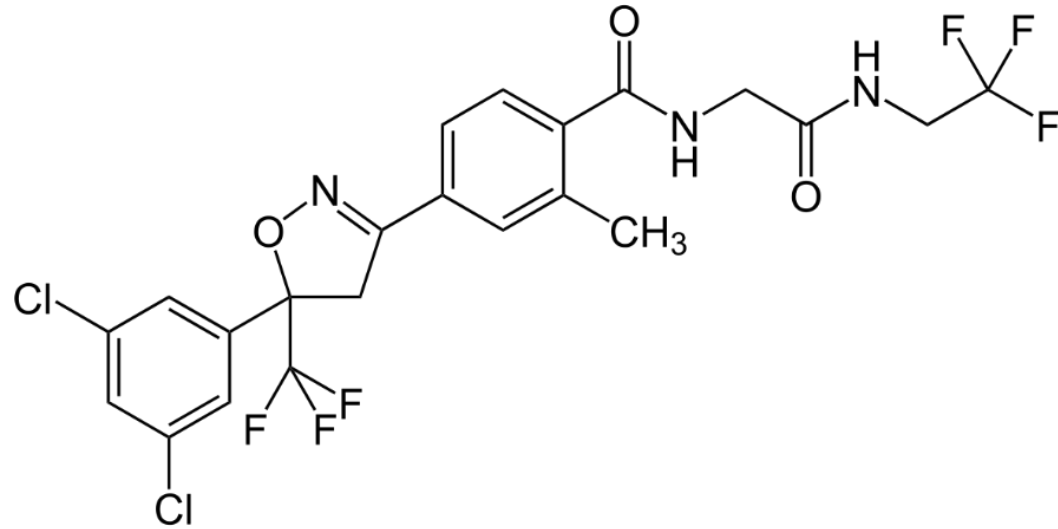
Fipronil Sulfide

Fipronil Desulfinyl

- ❖ Elevate concentrazioni nel grasso e nel fegato
- ❖ Eliminato attraverso le feci e le urine
- ❖ Principale metabolita: Fipronil Sulfone



# Fluralaner



- ❖ Elevato assorbimento – proteine plasmatiche
- ❖ Elevate concentrazioni nel grasso e nel fegato
- ❖ 90% eliminato attraverso le feci
- ❖ Principale metabolita: Fluralaner carboxylic acid



# Fasi del progetto

2 Unità operative coinvolte:

- ❖ UO1: Unità di Bromatologia e Residui
- ❖ UO2: Unità di Allevamenti e Sperimentazione Animale con il supporto del reparto di Diagnostica Specialistica

	UO		Mesi/anno																							
	1	2	1-4				5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
			feb/19 - mar/20				ott-20	nov-20	dic-20	gen-21	feb-21	mar-21	apr-21	mag-21	giu-21	lug-21	ago-21	set-21	ott-21	nov-21	dic-21	gen-22	feb-22	mar-22	apr-22	
WP1	x	x				D1																				
WP2	x	x					M1																			
WP3	x	x						M2																		
WP4	x	x												M3												
WP5	x	x																		M4						
WP6	x	x														M5					M6					
WP7	x	x																							M7	
WP8	x	x																								M8

WP1: Studio e ricerca bibliografica

WP2: Pianificazione di test in vivo sugli animali

WP3: Sviluppo e validazione del metodo strumentale e analitico

WP4: Campionamento e analisi

WP5: Analisi dei dati

WP6: Pianificazione del protocollo di decontaminazione

WP7: Analisi dei dati ambientali

WP8: Impatto scientifico: diffusione e utilizzo dei risultati del progetto



# Protocollo sperimentale

- ❑ Allevamento di 252 galline ovaiole con la tecnica "tutto pieno/tutto vuoto" e suddivisione degli animali in 3 gruppi sperimentali:

## GRUPPO R

- **Controllo**
- 52 galline: nessun trattamento

## GRUPPO B

- **Trattamento con Fipronil**
- 100 galline: aspersione con una soluzione di Fipronil (Frontline®)

## GRUPPO G

- **Trattamento con Fluralaner**
- 100 galline: somministrazione di acqua contenente 3,18 mg/L di Fluralaner (Exzolt®)

- ❑ Arrivo animali: 19/09/2020
- ❑ Tempo di acclimatamento: 1 mese
- ❑ Inizio sperimentazione: 26/10/2020
- ❑ Fine sperimentazione: 03/03/2021



# Sviluppo e validazione del metodo analitico e strumentale: molecole target

- ❖ Analiti ricercati: Fipronil, Fipronil Sulfone, Fipronil Desulfinyl, Fipronil Sulfide, Fluralaner
- ❖ Per i campioni di uova, muscolo e grasso i metodi analitici e strumentali erano già disponibili e accreditati dal nostro laboratorio
- ❖ Per i campioni biologici (sangue, siero, feci e pollina) e per i tamponi ambientali sono stati messi a punto 3 metodi:

## Metodi analitici



## Metodo strumentale

### Sistema UHPLC-HRMS

Dionex™ Ultimate 3000 interfacciato con Q Exactive™

### Parametri UHPLC

- Colonna: Waters™ Acquity UPLC HSS T3™ (100 mm x 2.1 mm x 1.8 μm)
- Fasi mobili:
  - A: 5 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub> + 0.1% HCOOH in H<sub>2</sub>O
  - B: 5 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub> + 0.1% HCOOH in MeOH
- Flusso: 0.3 mL/min
- Volume di iniezione: 10 μL

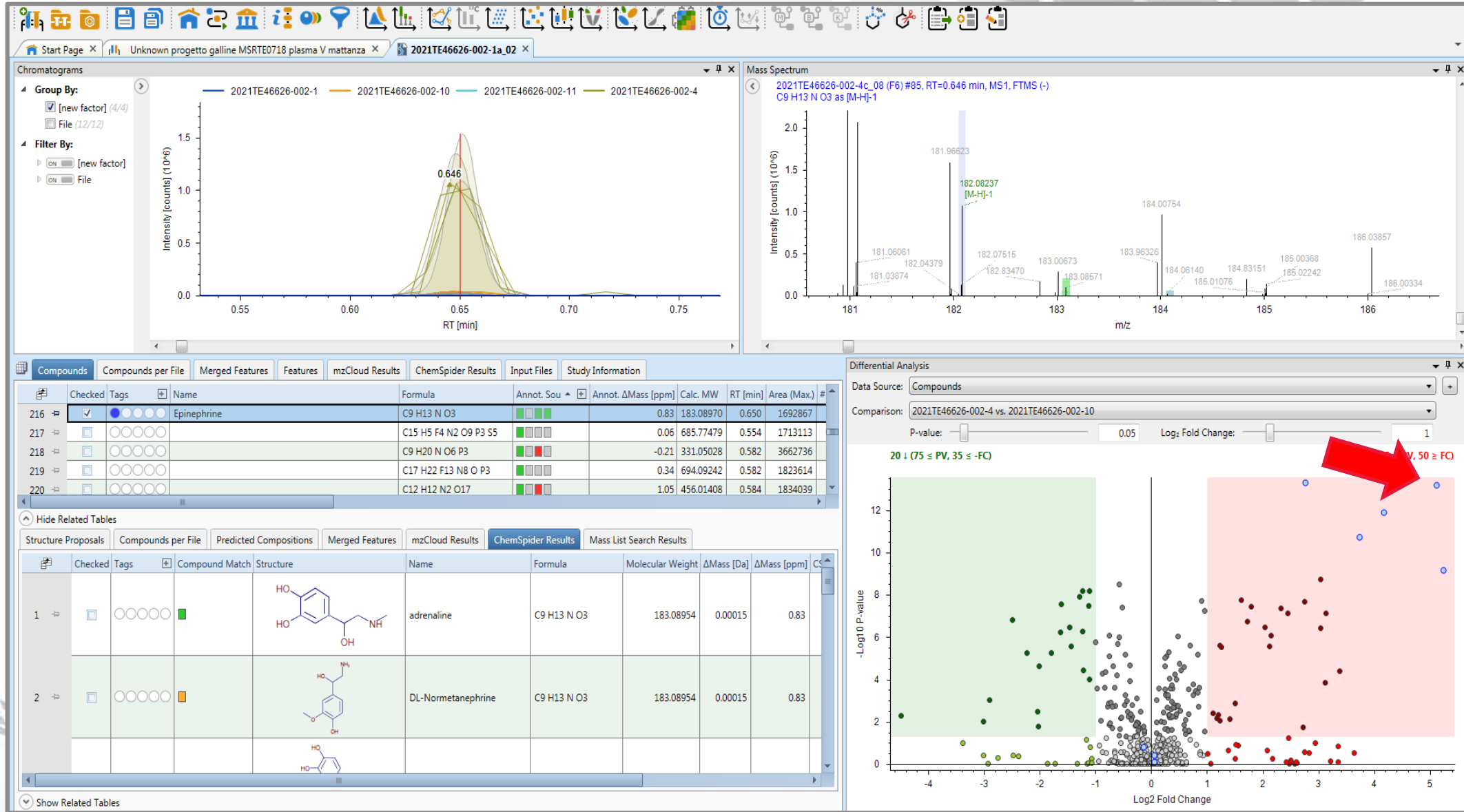
### Parametri HRMS

- ESI negative
- Acquisition mode: FullScan-ddMS2
- Mass range: 110-600 m/z
- Resolving power: 70,000 FWHM (FullScan)  
17,500 FWHM (ddMS2)
- Mass accuracy ≤ 5 ppm





# Ricerca di molecole untarget



# Impatto degli acaricidi sull'animale: valutazione

- ❖ Peso dell'animale
- ❖ Esame anatomo-patologico di tutti gli animali mattati
- ❖ Ovodeposizione: numerosità e peso
- ❖ Parametri biochimici: creatinina, transaminasi (GPT), LDH, creatina chinasi, cortisolo
- ❖ Scheda di valutazione dei parametri del benessere dell'animale

*Studio della farmacocinetica di acaricidi emergenti nella filiera avicola, inseriti nei recenti piani di monitoraggio per la sicurezza alimentare SCH sintomi clinici e HEP*

Autorizzazione N°: 169/2020-PR dell'10/03/2020  
(Risposta a prot. BDF16.23)

DATA 03-04-2021

OPERATORE  
VINCESAO BIANCOVAIO

4  
Punteggio

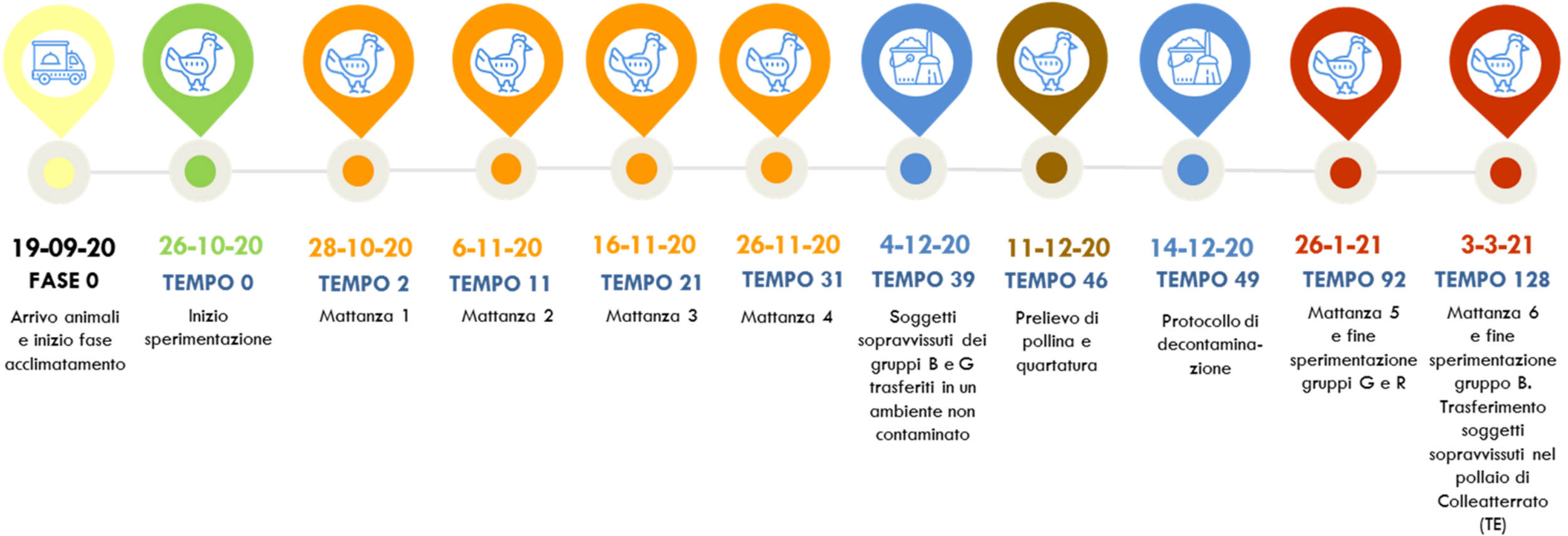
1. ASPETTO		
1.1 Assenza di ferite	<input checked="" type="checkbox"/>	NO
1.2 Colorito di cresta e bargigli marcatamente rosso	<input checked="" type="checkbox"/>	2
Colorito di cresta e bargigli roseo	<input type="checkbox"/>	2
Colorito di cresta e bargigli debolmente roseo	<input type="checkbox"/>	3
1.3 Perdita piume 10%	<input type="checkbox"/>	1
Perdita piume 30%	<input type="checkbox"/>	2
Perdita piume 50%	<input type="checkbox"/>	3
1.4 Calo ponderale 5-10%	<input type="checkbox"/>	1
Calo ponderale 11-15%	<input type="checkbox"/>	2
Calo ponderale 16-20%	<input type="checkbox"/>	3
1.5 BCS- osso della chiglia a forma di U (muscolo pettorale infiltrato di grasso)	<input checked="" type="checkbox"/>	1
BCS- osso della chiglia meno apprezzabile, liscio e a forma di U stretta	<input type="checkbox"/>	2
BCS- osso della chiglia apprezzabile ed a forma di V	<input type="checkbox"/>	3
2. COMPORTAMENTO		
2.1 Locomozione lievemente anormale	<input type="checkbox"/>	1
Locomozione marcatamente anormale	<input type="checkbox"/>	2
Problemi di mobilità significativi	<input type="checkbox"/>	3
Immobilità > 1 ora	<input type="checkbox"/>	HEP
2.2 Animali nervosi	<input type="checkbox"/>	SI
2.3 Produzione di uova normale	<input checked="" type="checkbox"/>	NO
Produzione di uova diminuita	<input type="checkbox"/>	2
Produzione di uova assente	<input type="checkbox"/>	3
2.4 Interazione uomo/animale confidente	<input checked="" type="checkbox"/>	1
Interazione uomo/animale neutra	<input type="checkbox"/>	2
Interazione uomo/animale diffidente	<input type="checkbox"/>	3
3. ALIMENTAZIONE		
3.1 Assenza di fame	<input type="checkbox"/>	SI
3.2 Assenza di sete	<input type="checkbox"/>	SI
4. BUONA STABILIZZAZIONE		
4.1 Comfort in riposo	<input checked="" type="checkbox"/>	NO
4.2 Comfort termico	<input checked="" type="checkbox"/>	NO
4.3 Facilità di movimento	<input checked="" type="checkbox"/>	NO

La scheda deve essere compilata giornalmente dall'addetto all'animal care per ogni soggetto che all'esame visivo presenterà eventuali anomalie e, sulla base del punteggio finale, dovranno essere adottate le seguenti misure:

Applicazione HEP se compreso tra 19 - 21 e/o immobilità > 1 ora  
Se compreso tra 14-18 chiamare immediatamente PI, RBA e VD  
Se compreso tra 10-14 aumentare frequenza giornaliera di monitoraggio e in caso di necessità chiamare RBA e VD  
Se < 10 resoconto giornaliero a PI e RBA (range di normalità).

Nel caso in cui non si riscontrino situazioni difformi si procederà per ogni gruppo sperimentale, alla registrazione dei parametri ambientali come previsto da SOP B5.1.4005 ed alla compilazione dei campi 2.1,2.2,2.3,2.4-3.1,3.2-4.1,4.2,4.3.

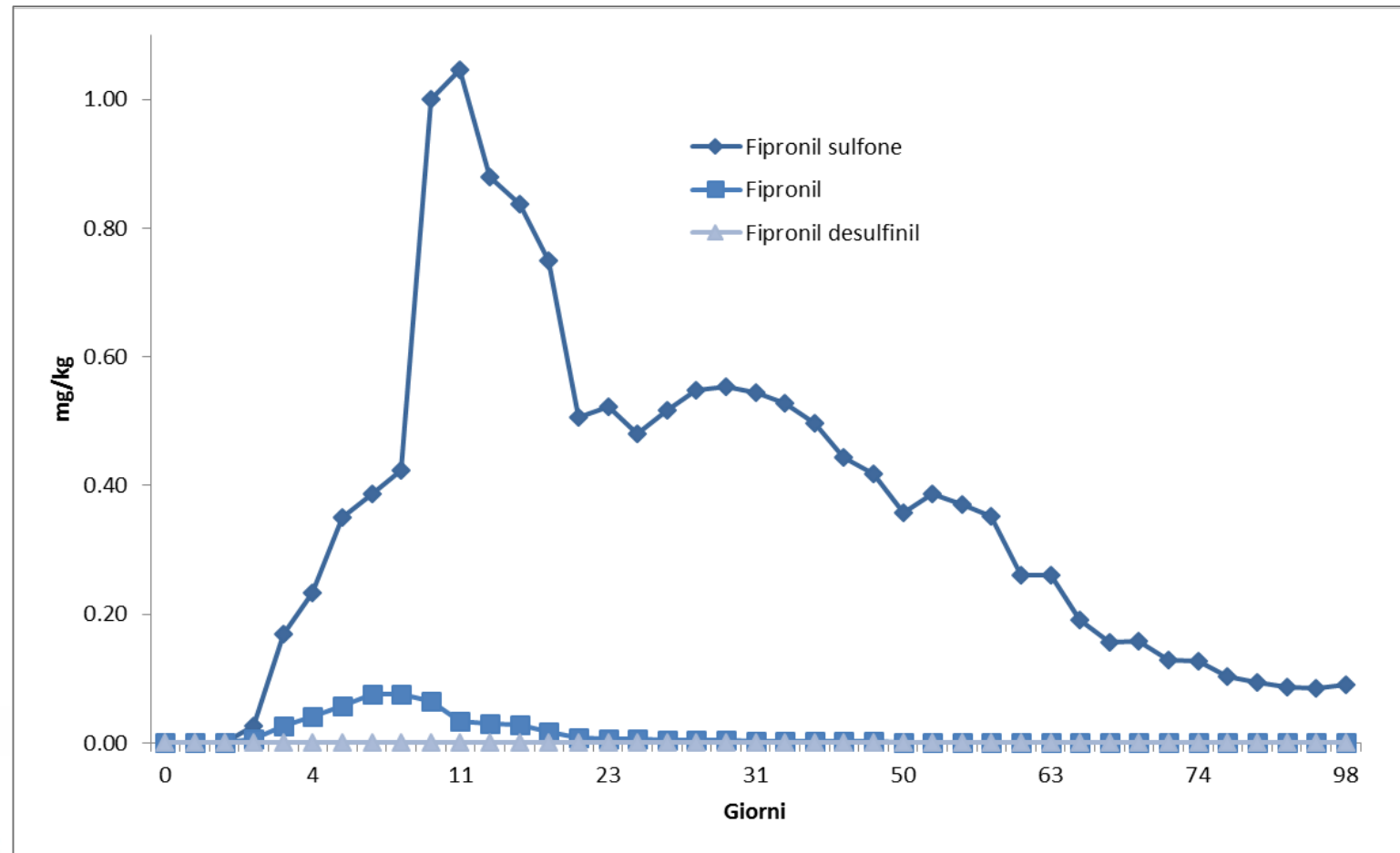
# Fasi della sperimentazione



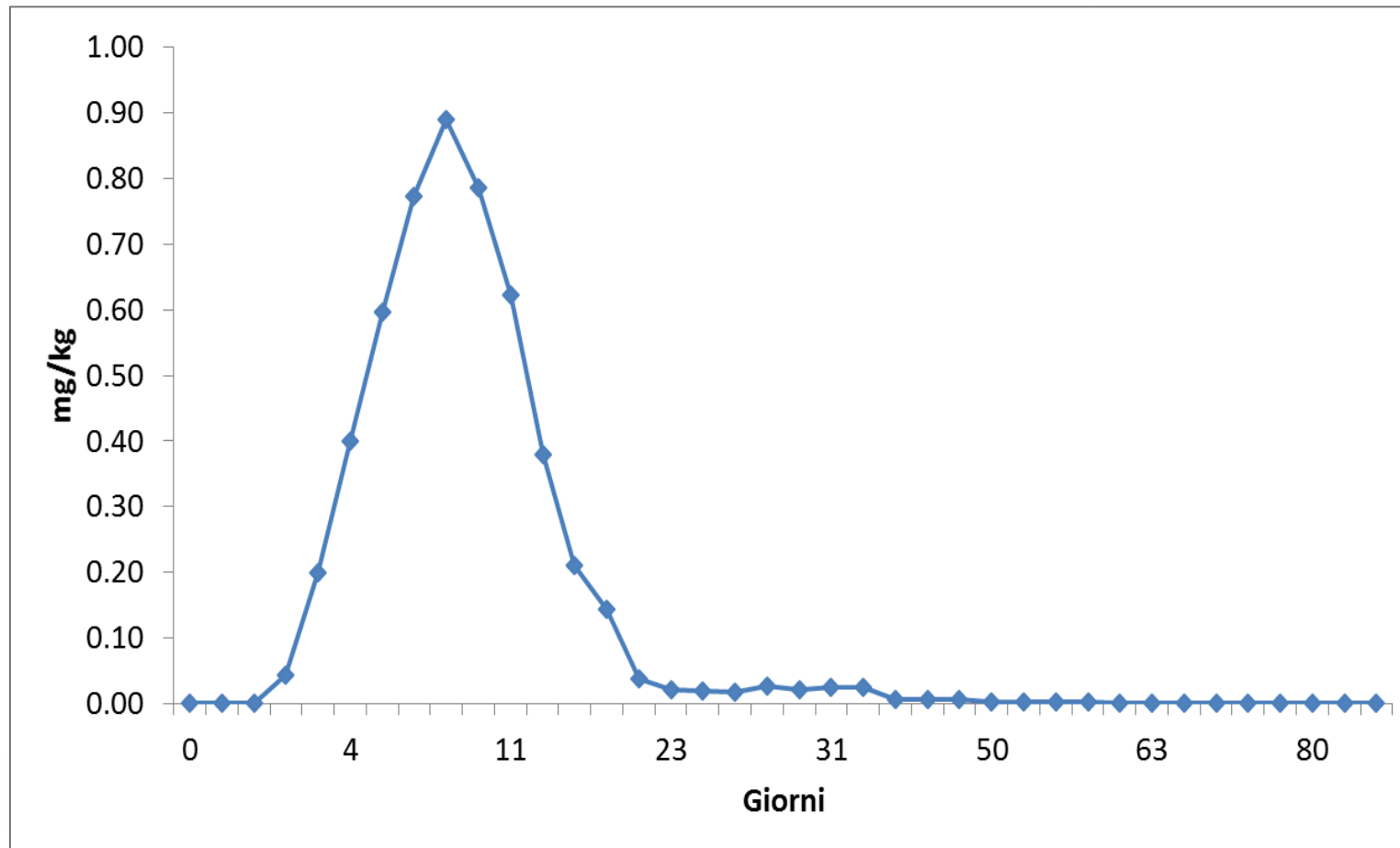
Mattanze intermedie: 15 soggetti gruppi B e G, 8 soggetti gruppo R

Mattanze finali: 8 soggetti per ogni gruppo

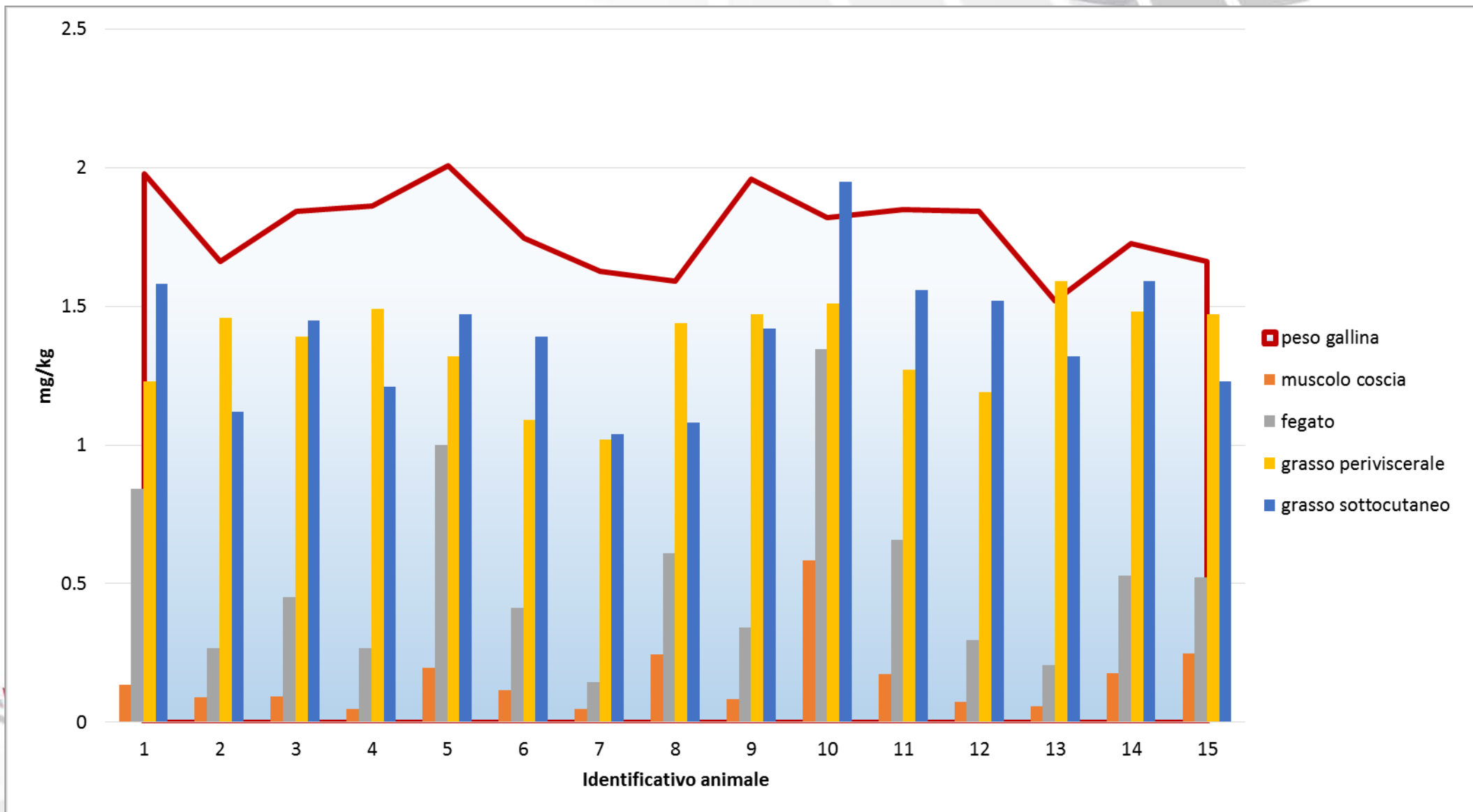
# Risultati preliminari: Farmacocinetica del Fipronil e suoi metaboliti nelle uova



# Risultati preliminari: Farmacocinetica del Fluralaner nelle uova



# Risultati preliminari - Mattanza 2: Fipronil Sulfone nel muscolo, grasso e fegato

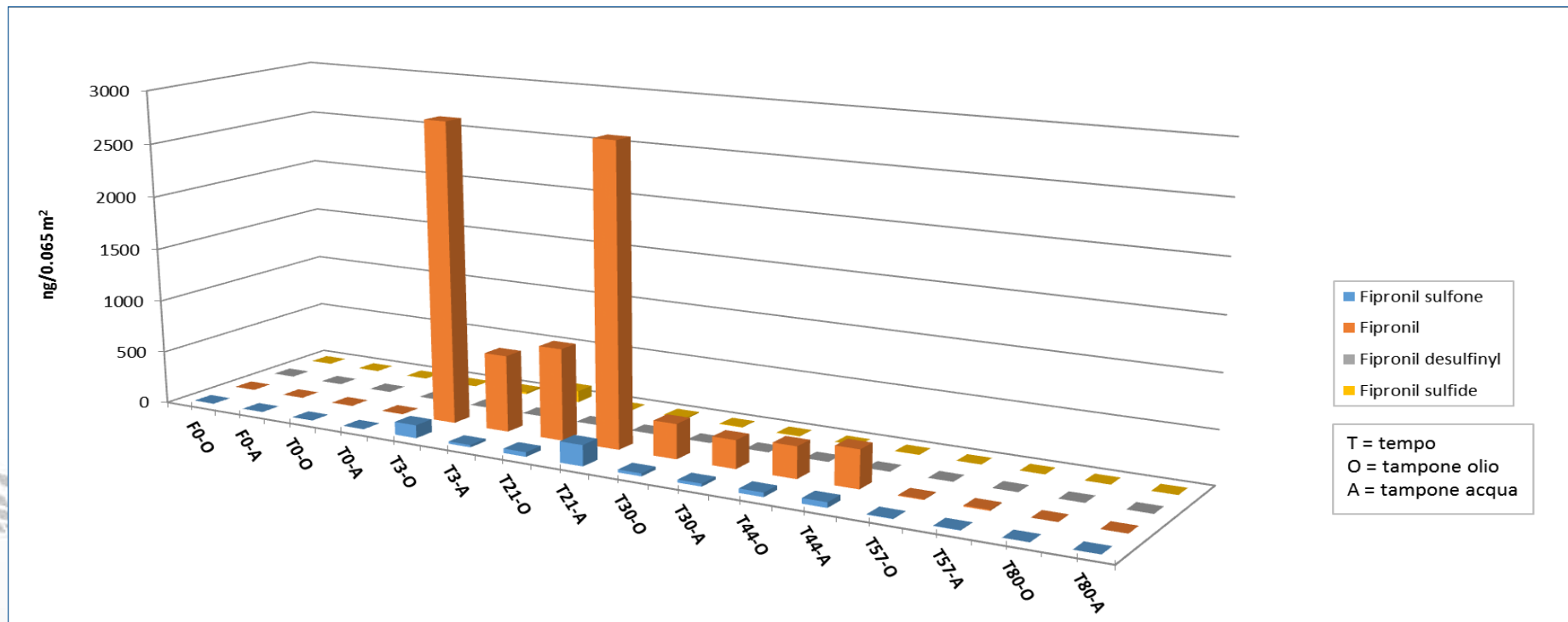


# Protocollo di decontaminazione



1. Rimozione meccanica della lettiera
2. Lavaggio con acqua e detergente neutro e risciacquo con abbondante acqua calda per due volte
3. Trattamento di decontaminazione mediante soluzione di **Ipoclorito di sodio al 3%** nebulizzata mediante un compressore per 20 min. Risciacquo con acqua calda e ripetizione del trattamento
4. Risciacquo

## Risultati preliminari





**Grazie per l'attenzione**