



ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

Metodi di screening e di conferma per la ricerca di residui di sostanze antibiotiche e di pesticidi in alimenti

Ceci Roberta

IZS A&M - LNR PCDD/F e PCB in alimenti e mangimi
Teramo, 12 dicembre 2012



FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE



MISSION

Agenzia di sanità pubblica, operante sotto la direzione del **USDA**, che effettua controlli su **carne**, **pollame** e **prodotti a base di uova** al fine di verificare che essi siano sani, sicuri, correttamente etichettati e confezionati



Office of Public Health Science (OPHS)

- Fornisce consulenza scientifica, dati e raccomandazioni in materia di salute pubblica



- Effettua l'analisi del rischio

- Gestisce FSIS Field Laboratory Service



Office of Public Health Science (**OPHS**)

- Fornisce supporto analitico durante le ispezioni ai mattatoi e alle industrie di trasformazione degli alimenti
 - **Laboratori di Patologia, Microbiologia e Chimica**
 - **Athens, GA:** Chimica, Microbiologia, Patologia
 - **St. Louis, MO:** Chimica, Microbiologia
 - **Alameda, CA:** Chimica, Microbiologia
 - **Laboratorio QA/QC:** gestisce l'assicurazione qualità e il controllo qualità per i Field Service Laboratories

FSIS Field Laboratory Service

Alameda, CA



St. Louis, MO



Athens, GA



Midwestern Laboratory

Western
Laboratory



Eastern
Laboratory

US National Residue Program (**NRP**)

- Programma di controllo degli alimenti gestito dall'FSIS dal 1967
- Proteggere i consumatori dall'esposizione ai residui di **sostanze chimiche** presenti in **carne, pollame** e **prodotti a base di uova**
 - Identificare e quantificare i contaminanti chimici
 - Raccogliere, analizzare ed elaborare i risultati analitici
 - Identificare le misure di follow-up da adottare in caso di non conformità

US National Residue Program (**NRP**)

Ogni anno FSIS pubblica il piano di campionamento (**Blue Book**)

- Metodologia e procedure di campionamento
- Numero e tipologia di campioni da prelevare
- Composti chimici da ricercare
- Metodologie analitiche da utilizzare



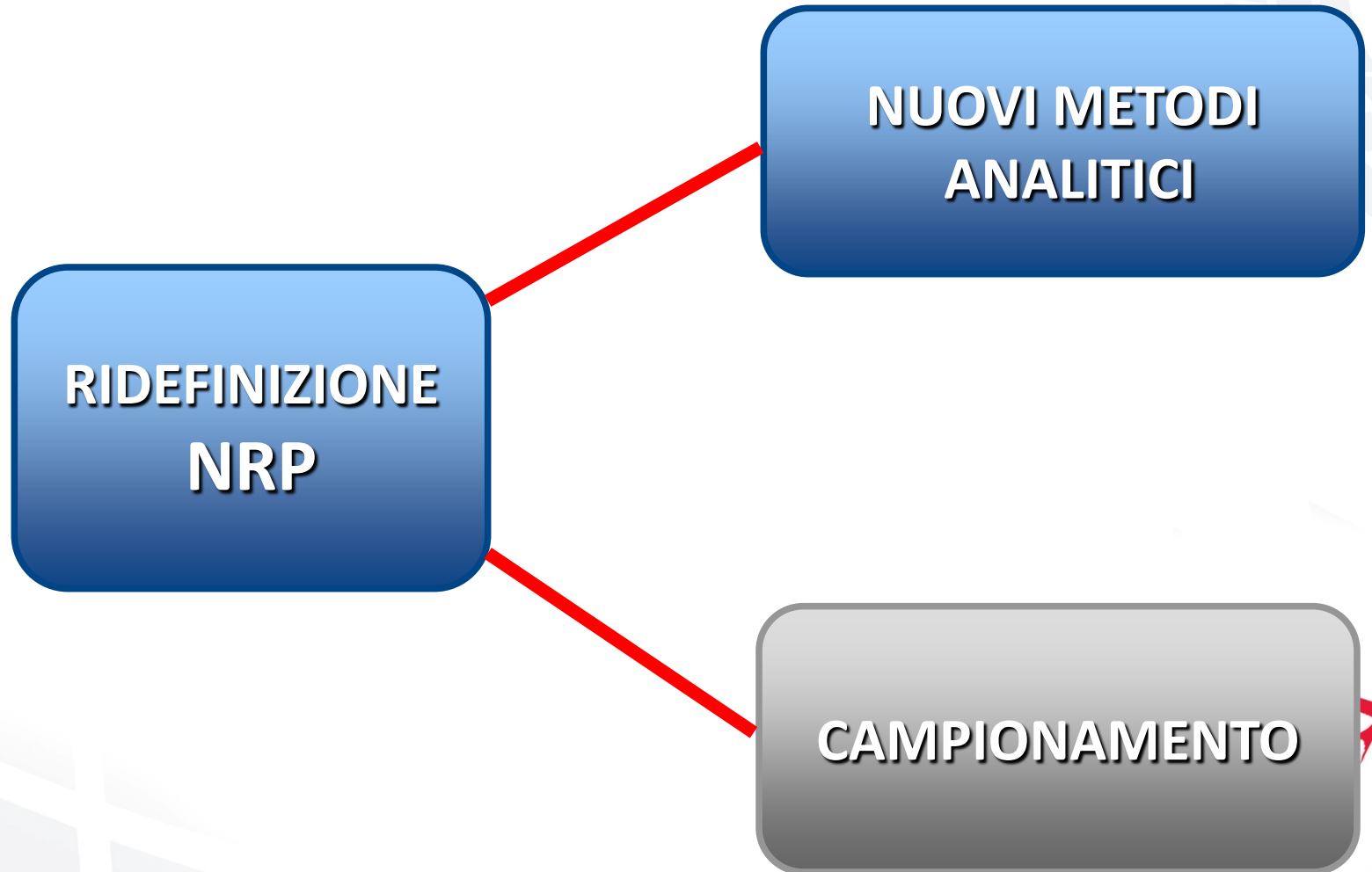




FDA

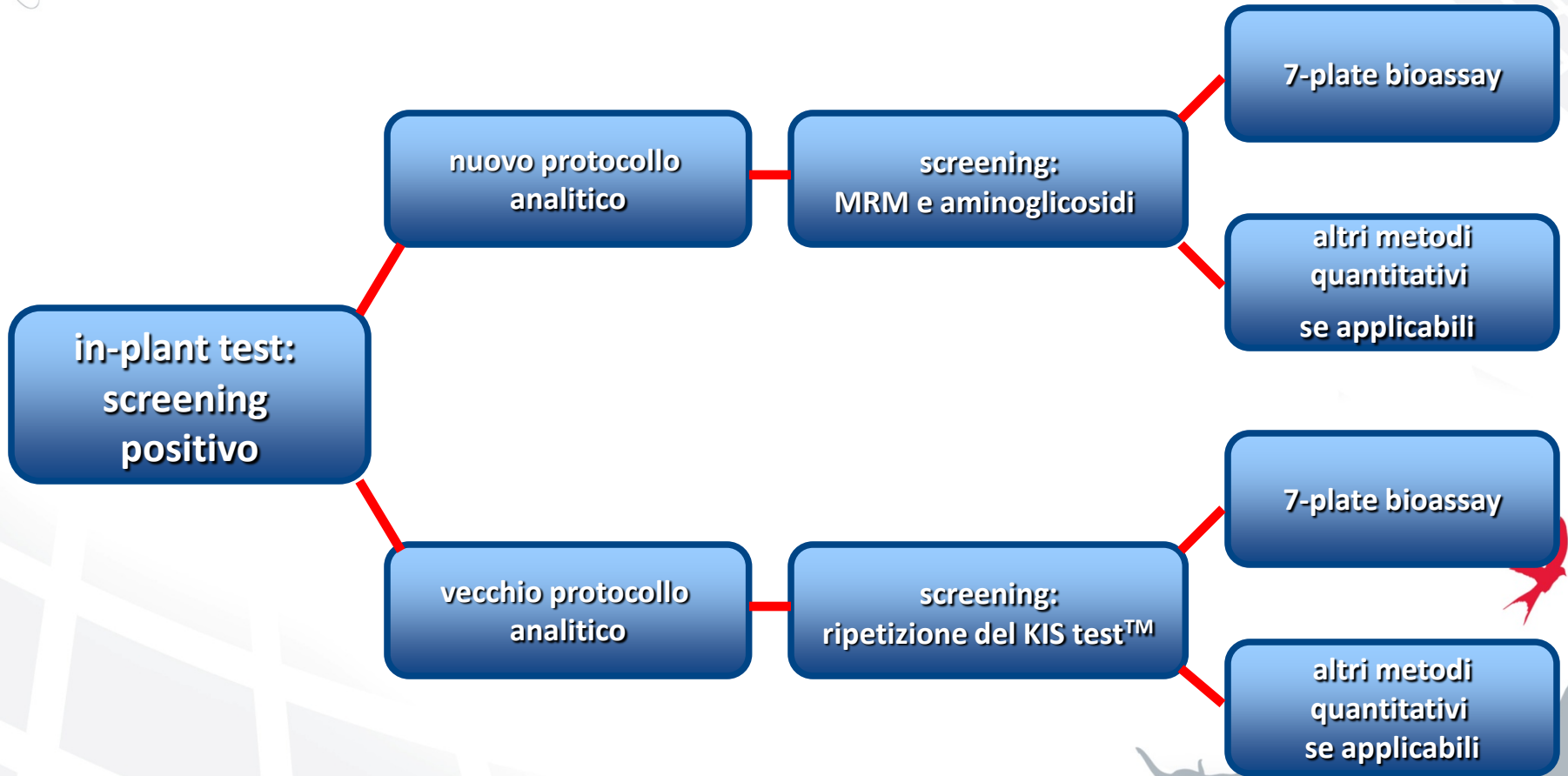
EPA

- Gestisce le analisi farm-to-fork e le analisi dei mangimi
 - Effettua ispezioni nelle aziende
 - Impedisce le violazioni mediante analisi e azioni regolamentative
 - Fissa i limiti di tolleranza dei residui di farmaci veterinari nelle carni, pollame e prodotti a base di uova e impedisce l'uso illecito di tali sostanze da parte delle aziende alimentari
- Migliora il coordinamento e la comunicazione tra i diversi piani di campionamento del NRP
 - Condivide i dati analitici sui residui, i livelli massimi, di azione e i metodi analitici
- Fornisce i dati per i piani di campionamento
 - Utilizza i dati sui residui per aggiornare o fissare i limiti massimi consentiti e i livelli di azione
 - Regolamenta l'uso dei pesticidi fissando i limiti di tolleranza nella carne, pollame e prodotti a base di uova e impedisce l'utilizzo illecito di tali sostanze da parte delle aziende alimentari



MULTI-CLASS RESIDUE METHODS (**MRM**)

- Metodo di screening chimico
- Analizzare contemporaneamente più classi di sostanze chimiche in un singolo campione (non solo antibiotici)
 - Specificità fino a 120 sostanze contemporaneamente
 - Sensibilità
 - Accuratezza e ripetibilità del risultato analitico
 - Tempi di analisi



CLASSI MRM

Beta-Agonisti

**Beta-Lattamici
e Cefalosporine**

Ormoni

Macrolidi e Lincosamidi

Analgesici e Antiinfiammatori

Fenicoli

Fluorochinoloni

Sulfamidici

Tetracicline

ANALITI DETERMINATI

Fluoroquinolone

Desethylene Ciprofloxacin
Norfloxacin
Ciprofloxacin
Danofloxacin
Enrofloxacin
Sarafloxacin

Hormones

Prednisone*
Melengestrol acetate

Macrolide/Lincosamide

Lincomycin
Pirlimycin
Clindamycin
Gamithromycin*
Tilmicosin
Erythromycin
Tylosin
Tulathromycin

■ Analgesic/Anti-inflammatory

- **Oxyphenylbutazone (pork only)***
- Flunixin
- Phenylbutazone (pork only)
- **Beta/Dexa-methasone***

■ Tetracycline

- Oxytetracine
- Tetracyline
- Chlortetracycline

■ Phenicol

- Florfenicol Amine (pork only)
- Florfenicol
- Chloramphenicol



ANALITI DETERMINATI

Sulfonamide

Sulfanilamide (pork only)*

Sulfadiazine

Sulfathiazole

Sulfapyridine

Sulfamerazine

Sulfamethiazole

Sulfamethazine

Sulfamethoxypyridazine

Sulfachloropyridazine

Sulfadoxine

Sulfamethoxazole

Sulfaethoxypyridazine

Sulfadimethoxine

Sulfaquinoxaline

Sulfanitran*

■ β -Agonist

- Salbutamol
- Cimaterol
- Ractopamine

■ B-Lactam/ Cephalosporin

- Amoxicillin
- Cefazolin
- DCCD
- Ampicillin
- Difloxacin
- Penicillin G
- Oxacillin
- Cloxacillin
- Nafcillin
- Dicloxacillin



Screening e conferma dei residui di farmaci veterinari mediante UPLC-MS/MS

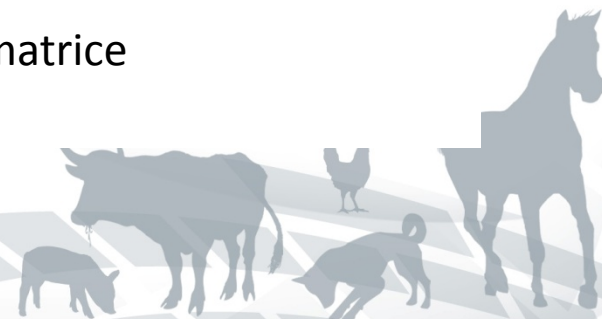
Metodo di screening e di conferma per la ricerca di residui di farmaci veterinari in campioni di muscolo e rene di bovini e suini

I residui di farmaci veterinari vengono estratti dal tessuto mediante estrazione in fase solida (SPE) sia nella fase di estrazione che in quella di purificazione del campione

Gli analiti estratti sono determinati mediante UPLC-MS/MS utilizzando uno spettrometro di massa triplo quadrupolo con ionizzazione elettrospray (ESI)

Durata della corsa cromatografica 12,9 minuti

Gli analiti sono identificati per confronto con la curva in matrice



Screening e conferma dei residui di farmaci veterinari mediante UPLC-MS/MS

Campione: 2g
Controllo negativo
Controllo positivo (0,5X)
Curva in matrice (0,5X, 1X, 2X, 3X)
Controllo campione

Preparare la curva in matrice
Aggiungere 140 ul di acetonitrile a tutte le rimanenti vials

Diluire a 1 ml con 0,1% di acido formico in acqua

Agitare su vortex per 10 sec
Far riposare per 5 min

Evaporare l'estratto fino a 5 ml
mediante TurboVap

Agitare su vortex per 5 sec

Aggiungere 9,7 ml di miscela
acetonitrile/acqua 4/1 (v/v)
Agitare per 5 min

Eliminare l'esano e trasferire
un'aliquota da 5 ml di estratto
in una vial da 15 ml

Trasferire 500ul di estratto sul
fondo di una vial provvista di
tappo con filtro PVDF 0,2um

Centrifugare a 3000 rcf 5 min

Agitare per 1 min e centrifugare
a 3000 rcf per 5 min

Spingere il tappo provvisto di
filtro all'interno della vial

Far decantare in una provetta
da 50 ml contenente 0,5 g di C₁₈

Aggiungere 10 ml di una
soluzione satura di acetonitrile
in esano

Analisi UPLC-MS/MS

Table 18 - Minimum Level of Applicability for kidney

Analyte (for kidney) Level (ng/g)	Screen		Confirmation	
	Bovine	Porcine	Bovine	Porcine
Ampicillin	20	20	20	20
Beta/Dexamethasone	50	50	50	50
Cefazolin	200	200	200	200
Chloramphenicol	6	6		
Chlortetracycline	1000	1000	1000	1000
Cimaterol	12	3	12	3
Ciprofloxacin	25	25	50	25
Clindamycin	50	50	50	50
Cloxacillin	20	20	20	20
Danofloxacin	25	25	25	25
DCCD (marker for Ceftiofur)	200	200	200	400
Desethylene Ciprofloxacin	25	25	25	25
Dicloxacillin	200	200	200	200
Difloxacin	25	25	25	25
Enrofloxacin	25	25	50	25
Erythromycin A	50	50	50	50
Florfenicol	100	100	100	100
Flunixin	12.5	12.5	12.5	12.5
Gamithromycin	50	50	100	100
Lincomycin	50	50	50	50
Nafcillin	200	200	200	200
Norfloxacin	25	25	25	25
Oxacillin	200	200	200	200
Oxyphenylbutazone		50		
Oxytetracycline	500	500	500	500
Penicillin G	100	100	100	100
Phenylbutazone		50		50
Pirlimycin	250	250	250	250
Prednisone	50	50	50	50
Ractopamine	3	3	12	
Salbutamol	6	3		

Analyte (for kidney) Level (ng/g)	Screen		Confirmation	
	Bovine	Porcine	Bovine	Porcine
Sarafloxacin	25	25	25	25
Sulfachloropyridazine	50	50	50	200
Sulfadiazine	50	50	50	50
Sulfadimethoxine	50	50	50	50
Sulfadoxine	50	50	50	50
Sulfaethoxypyridazine	50	50	50	50
Sulfamerazine	50	50	50	50
Sulfamethazine	50	50	50	50
Sulfamethizole	50	50	50	50
Sulfamethoxazole	50	50	100	50
Sulfamethoxypyridazine	50	50	50	50
Sulfanilamide		100		200
Sulfantran	50	50	100	50
Sulfapyridine	50	50	50	50
Sulfaquinoxaline	50	50	50	50
Sulfathiazole	50	50	50	50
Tetracycline	500	500	2000	500
Tilmicosin	120	240		
Tylosin	100	200	100	200
Zearalanol		12		12

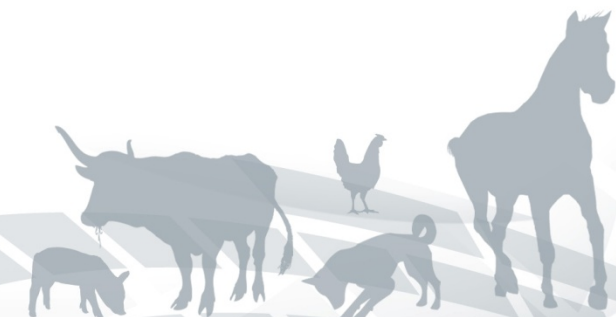


Table 19 - Minimum Level of Applicability for muscle

Analyte (for muscle) <i>Level (ng/g)</i>	Screen		Confirmation	
	Bovine	Porcine	Bovine	Porcine
Amoxicillin	80	80		
Ampicillin	20	20	20	20
Betamethasone	50	50	50	50
Cefazolin	200	200	200	200
Chloramphenicol	6	6		
Chlortetracycline	1000	1000	1000	1000
Cimaterol	3	3		
Ciprofloxacin	25	25	50	25
Clindamycin	50	50	50	50

Analyte (for muscle) <i>Level (ng/g)</i>	Screen		Confirmation	
	Bovine	Porcine	Bovine	Porcine
Sulfamethoxypridazine	50	50	50	50
Sulfantran	50	50	200	100
Sulfapyridine	50	50	50	50
Sulfaquinoxaline	50	50	50	50
Sulfathiazole	50	50	50	50
Tetracycline	500	500	2000	1000
Tilmicosin	60	60	60	60
Tulathromycin A	1000	1000	1000	1000
Tylosin	100	100	100	100

Analyte (for muscle) <i>Level (ng/g)</i>	Screen		Confirmation	
	Bovine	Porcine	Bovine	Porcine
Cloxacillin	20	20	20	20
Danofloxacin	25	25	25	25
DCCD	200	400	800	800
Desethylene Ciprofloxacin	25	25	25	25
Dicloxacillin	200	200	200	200
Difloxacin	25	25	25	25
Enrofloxacin	25	25	25	50
Erythromycin A	50	50	50	50
Florfenicol	100	100	100	100
Flunixin	12.5	12.5	12.5	12.5
Gamithromycin	50	50	50	200
Lincomycin	50	50	50	50
Melengestrol Acetate	10	10		
Nafcillin	200	200	200	200
Norfloxacin	25	25	25	25
Oxacillin	200	200	200	200
Oxyphenylbutazone	50	50	50	100
Oxytetracycline	500	500	500	500
Penicillin G	100	100	100	100
Phenylbutazone	50	200	50	200
Pirlimycin	250	250	250	250
Prednisone	50	50	100	50
Ractopamine	3	3	6	6
Salbutamol	3	3		
Sarafloxacin	25	25	25	25
Sulfachloropyridazine	50	50	50	50
Sulfadiazine	50	100	50	100
Sulfadimethoxine	50	50	50	50
Sulfadoxine	50	50	50	50
Sulfaethoxypridazine	50	50	50	50
Sulfamerazine	50	50	50	50
Sulfamethazine	50	50	200	50
Sulfamethizole	50	50	50	50
Sulfamethoxazole	50	50	50	50

AMINOGLICOSIDI

ANALITI AMINOGLICOSIDI

Neomicina B

Gentamicina

Spectinomina

Apramicina

Diidrostreptomicina

Igromicina B

Amicacina

Streptomicina

Kanamicina



AMINOGLICOSIDI

Screening e conferma di antibiotici aminoglicosidi mediante UPLC-MS/MS

Metodo di screening e di conferma per la ricerca di 9 aminoglicosidi in campioni di muscolo, fegato e rene di bovini e suini

Gli aminoglicosidi vengono estratti dal rene mediante un tampone acquoso contenente acido tricloroacetico per far precipitare le proteine

Il surnatante viene raccolto e neutralizzato a pH tra 7,5 e 8,0

L'estratto acquoso neutralizzato viene fatto passare su una colonna SPE Weak CBX Cation Exchange

Gli analiti sono raccolti e portati a secco

L'estratto viene ricostituito in presenza di un agente "ion pairing"

Gli estratti vengono centrifugati in ultracentrifuga ed analizzati mediante UPLC-MS/MS

Durata della corsa cromatografica 3 minuti



Screening

Conferma

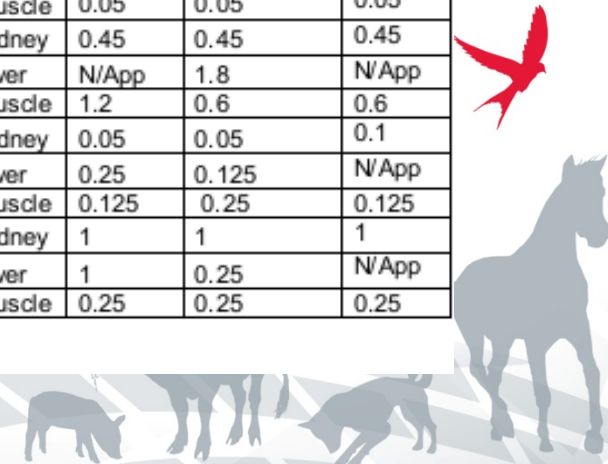
Table 11 – Screening levels per Species

AMG	Matrix	Bovine (µg/g)	Porcine (µg/g)	Poultry (µg/g)
Amikacin	Kidney	0.05	0.05	0.05
	Liver	0.1	0.05	N/App
	Muscle	0.05	0.05	0.05
Apramycin	Kidney	0.05	0.05	0.05
	Liver	0.1	0.05	N/App
	Muscle	0.05	0.05	0.05
Dihydrostreptomycin	Kidney	1	1	1
	Liver	0.5	0.25	N/App
	Muscle	0.25	0.25	0.25
Gentamicin	Kidney	0.05	0.05	0.05
	Liver	0.1	0.05	N/App
	Muscle	0.05	0.05	0.05
Hygromycin B	Kidney	0.05	0.05	0.05
	Liver	0.1	0.05	N/App
	Muscle	0.05	0.05	0.05
Kanamycin	Kidney	0.05	0.05	0.05
	Liver	0.1	0.05	N/App
	Muscle	0.05	0.05	0.05
Neomycin*	Kidney	0.45	0.45	0.45
	Liver	1.8	1.8	N/App
	Muscle	0.6	0.6	0.6
Spectinomycin	Kidney	0.05	0.05	0.05
	Liver	0.125	0.125	N/App
	Muscle	0.125	0.125	0.125
Streptomycin	Kidney	1	1	1
	Liver	0.5	0.25	N/App
	Muscle	0.25	0.25	0.25

Table 12 – Confirmation levels per Species

AMG	Matrix	Bovine (µg/g)	Porcine (µg/g)	Poultry (µg/g)
Amikacin	Kidney	0.05	0.05	0.05
	Liver	0.1	0.05	N/App
	Muscle	0.05	0.05	0.05
Apramycin	Kidney	0.05	0.05	0.05
	Liver	0.2	0.05	N/App
	Muscle	0.1	0.05	0.05
Dihydrostreptomycin	Kidney	1	1	1
	Liver	1	0.25	N/App
	Muscle	0.25	0.25	0.25
Gentamicin	Kidney	0.1	N/App	0.2
	Liver	N/App	0.2	N/App
	Muscle	N/App	0.2	0.2
Hygromycin B	Kidney	0.05	0.05	0.05
	Liver	N/App	0.05	N/App
	Muscle	0.2	0.05	0.05
Kanamycin	Kidney	0.05	0.05	0.05
	Liver	N/App	0.05	N/App
	Muscle	0.05	0.05	0.05
Neomycin*	Kidney	0.45	0.45	0.45
	Liver	N/App	1.8	N/App
	Muscle	1.2	0.6	0.6
Spectinomycin	Kidney	0.05	0.05	0.1
	Liver	0.25	0.125	N/App
	Muscle	0.125	0.25	0.125
Streptomycin	Kidney	1	1	1
	Liver	1	0.25	N/App
	Muscle	0.25	0.25	0.25

N/App = Not Applicable



CLASSI PESTICIDI

Benzimidazoli

Carbammati

Conazoli / Triazoli

Alogenati

Imidazolici

Organoazotati

Organofosforati

Piretroidi

Triazine



ANALITI DETERMINATI

Benzimidazole

Thiabendazole

Carbamate

Carbaryl

Carbofuran

Methomyl

Organophosphorus

Acephate

Azinphos-methyl

Chlorpyrifos

Chlorpyrifos-methyl

Dichlorvos (DDVP)

Ethofumesate

Tetrachlorvinphos

Organonitrogen

Metalaxyl

Tebufenozide

Pyrethroids

Bifenthrin

Cyhalothrin-L

Cypermethrin

Deltamethrin

Permethrin (cis & trans)

Tefluthrin

Triazines

Simazine

Conazoles / Triazoles

Difenoconazole

Myclobutanil

Propiconazole

Tetraconazole



ANALITI DETERMINATI

Halogenated

- Alachlor
- Aldrin
- Boscalid
- Carfentrazone-ethyl
- Chlordane, cis-
- Chlordane, trans-
- Clofentezine
- Dieldrin
- Diflubenzuron
- Diuron
- Endosulfan I
- Endosulfan II
- Endosulfan sulfate
- Fipronil
- Heptachlor

Halogenated

Heptachlor epoxide (cis & trans)
Imidacloprid
Linuron
Nonachlor, trans-
Norflurazon
Oxychlordane
Pronamide
Propachlor
Propanil
Pyridaben
Thiamethoxam

Imidazoles

Imazalil

Other Compounds

Indoxacarb
Methoxyfenozide
Mirex
Piperonyl butoxide



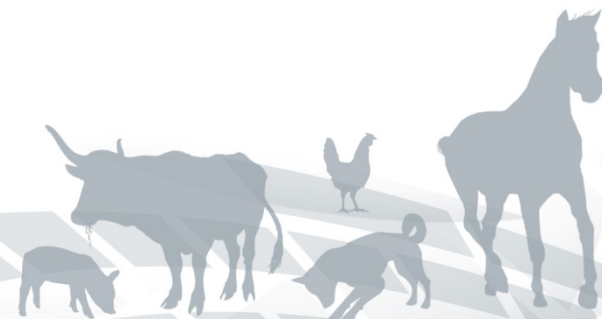
Screening di Pesticidi per LC/MS/MS and GC/MS/MS

Metodo di screening per la ricerca di pesticidi in campioni di muscolo di bovini, ovini, capre, suini e polli

I pesticidi vengono estratti dal tessuto mediante la tecnica QuEChERS

Gli analiti estratti sono determinati mediante LC-MS/MS e GC-MS/MS

Durata della corsa cromatografica: LC-MS/MS 9 minuti GC-MS/MS 45 minuti



4. Minimum Level of Applicability (MLA)

Compound #	Name	Level (ppb)
1	Alachlor	10
2	Aldrin	25
3	Azinphos methyl	10
4	Bifenthrin	5
5	Boscalid	15
6	Carfentrazone ethyl	5
7	Chlordane cis	5
8	Chlordane trans	5
9	Chlorpyrifos	7.5
10	Chlorpyrifos methyl	5
11	L-Cyhalothrin	5
12	Cypermethrin	15
13	Deltamethrin	10
14	Dichlorvos (DDVP)	15

Compound #	Name	Level (ppb)
15	Dieldrin	25
16	Difenoconazole	15
17	Endosulfan I	22.5
18	Endosulfan II	22.5
19	Endosulfan sulfate	7.5
20	Fipronil	5
21	Heptachlor	25
22	Heptachlor epoxide, cis	25
23	Heptachlor epoxide, trans	25
24	Mirex	10
25	Nonachlor trans	5
26	Oxychlordane	10
27	Permethrin (cis & trans)	15
28	Piperonyl butoxide	22.5
29	Pronamide	5
30	Propanil	6
31	Propiconazole	15
32	Tefluthrin	5
33	Tetrachlorvinphos	10
34	Tetraconazole	5
35	3-Hydroxycarbofuran	20
36	Acephate	10
37	Carbaryl	25
38	Carbofuran	10
39	Clofentezine	25
40	Diflubenzuron	25
41	Diuron	80
42	Ethofumesate	20
43	Imazalil	5
44	Imidacloprid	25
45	Indoxacarb	50
46	Linuron	25
47	Metalaxyl	10

Compound #	Name	Level (ppb)
48	Methomyl	30
49	Methoxyfenozide	10
50	Myclobutanil	10
51	Norflurazon	10
52	Pyridaben	9
53	Simazine	10
54	Tebufenozide	40
55	Thiabendazole	15
56	Thiamethoxam	10





FSIS Webpage:

<http://www.fsis.usda.gov/>

FSIS Regulations, Directives and Notices:

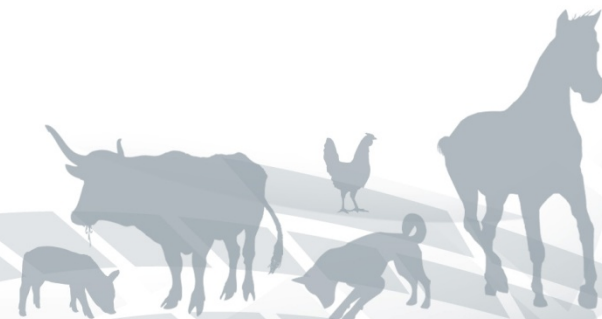
<http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/default.htm>

FSIS International Affairs Webpage:

http://www.fsis.usda.gov/Regulations_&_Policies/International_Affairs/index.asp

Chemistry laboratory Guide Book:

http://www.fsis.usda.gov/Science/Chemistry_Lab_Guidebook/index.asp





GRAZIE PER L'ATTENZIONE

