



Metodiche analitiche per il controllo del carry over da coccidiostatici e farmaci nei mangimi: attività dei laboratori ufficiali

Maria Cesarina Abete

creaa@izsto.it



Obiettivi:

- I laboratori preposti ai controlli ufficiali: la Rete II.ZZ.SS. e il C.Re.A.A.
- Il “cammino” legislativo
- Approccio analitico al problema carry-over
- Coccidiostatici: un mondo regolamentato
- Farmaci autorizzati e carry-over: che fare?



I laboratori preposti ai controlli ufficiali: la rete II.ZZ.SS e il C.Re.A.A.

Il controllo ufficiale dei mangimi

Il Regolamento 882/2004 sancisce che il Ministero della Salute designa i laboratori preposti ai controlli ufficiali

Istituti Zooprofilattici Sperimentali – I I.ZZ.SS

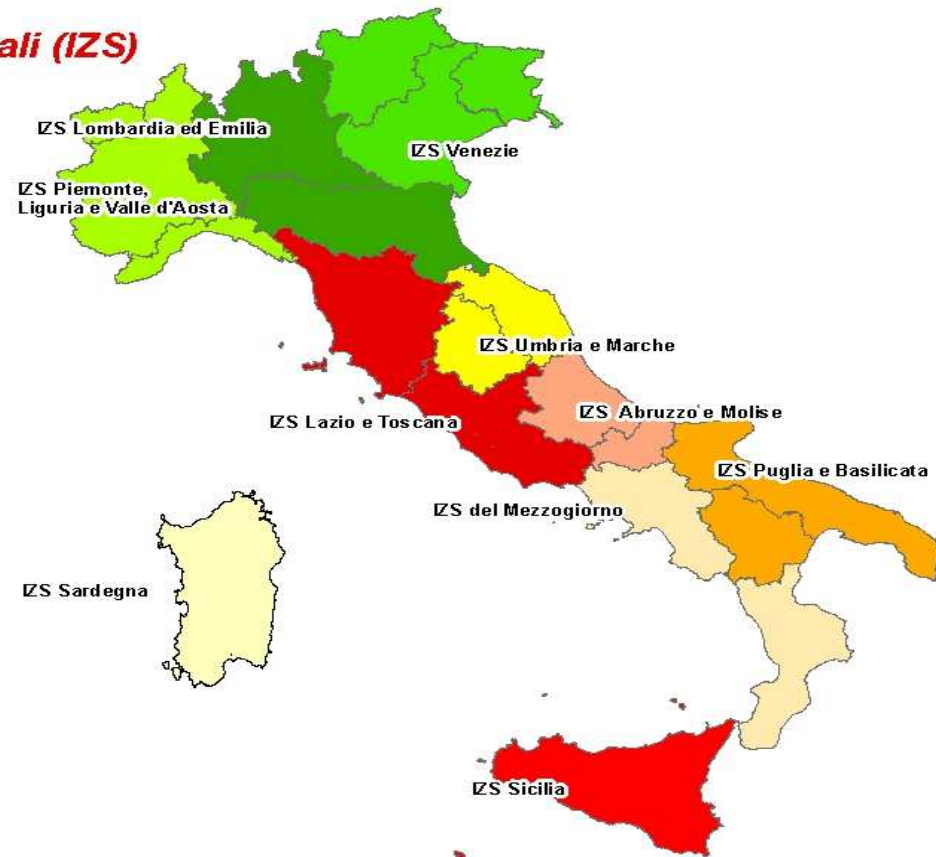


In Italia ci sono **10**
Istituti Zooprofilattici Sperimentali

Sono Enti di Diritto Pubblico e sono governati dal Ministero della Salute.

Operano quale strumento tecnico scientifico del Servizio Sanitario Nazionale e in particolare del Servizio Veterinario.

The Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS) Network





IL C.Re.A.A.

È stato istituito dal Ministero della Salute
il 13 febbraio 2003 presso l'Istituto Zooprofilattico del
Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta.

E' il Centro di Referenza Nazionale sull'alimentazione animale
C.Re.A.A.

I Centri di Referenza sono **Centri di Eccellenza**
(D.Lvo 270/1993) che, per aree specialistiche ben definite,
sono al servizio del Ministero della Salute e delle
organizzazioni internazionali.



Il C.Re.A.A. e IIZZSS lavorano insieme per:

- Condividere conoscenze e competenze
- Garantire il confronto dei risultati tra i laboratori
IIZZSS
- Garantire l'armonizzazione delle metodiche,
secondo quanto previsto dagli standard
internazionali (ISO 17025)



Il Regolamento 882 /2004 sancisce che:

I laboratori che eseguono controlli ufficiali debbano utilizzare metodi di prova **validati** attraverso la verifica di precisi parametri.

I metodi di prova utilizzati devono esser **accreditati**
in conformità alla norma ISO 17025/2005 che stabilisce i
“**Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova**”.



La rete **II.ZZ.SS** è **accreditata** è quindi conforme ai requisiti richiesti dalla ISO/IEC 17025:2005 : possiede sia la competenza tecnica richiesta per effettuare le analisi sia un sistema di gestione della qualità, indispensabile per garantire la correttezza del dato analitico e la riferibilità delle misure.





Il "cammino" legislativo





Il “cammino” legislativo

Fino al 2002 non vi era alcuna regolamentazione in merito; vi erano alcuni **pareri EFSA** che sembravano orientati a considerare come livello di concentrazione di farmaco ascrivibile a carry-over inevitabile il **10%** della dose massima di utilizzo.

(2% per salinomicina a causa della tossicità per equidi)

Il “cammino” legislativo

La Direttiva 2002/32/EC nella **SEZIONE VII dell'allegato I** dava indicazioni sui tenori massimi ammessi in mangimi destinati a specie non bersaglio in seguito a carry-over inevitabile.

Il Regolamento 183/2005 EC dava disposizioni in merito a **GMP** da applicare per **minimizzare** il fenomeno nella produzione di alimenti con coccidiostatici.

Direttiva 8/2009/EC

“modifica l'allegato 1 della Dir. 2002/32/CE per quanto riguarda i tenori massimi di coccidiostatici e istomonostatici presenti per effetto di carry-over inevitabile in mangimi destinati a specie non bersaglio”.

Tale Direttiva viene consolidata nel 2011

REGOLAMENTO (UE) N. 574/2011 del 16 giugno 2011

che modifica l'allegato I della direttiva 2002/32/CE del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda i livelli massimi carry-over di alcuni coccidiostatici e istomonostatici e che consolida gli allegati I e II

Regolamento 574/2011

Allegato I - SEZIONE VII: contenuto massimo di additivi presenti in mangimi destinati a specie non bersaglio in seguito a carry-over inevitabile

Prevede 2 diversi livelli di tolleranza per cross-contamination di coccidiostatici autorizzati in specie non-target:

- 3% : alimenti per specie non-target non sensibili
- 1% : alimenti per specie non-target sensibili, per finissaggio e per specie da produzione alimentare continua (se vi è evidenza di carry-over da mangime ad alimento).

Piano Nazionale alimentazione animale (PNAA)

I campionamenti sono mirati a:

- Rilevare sostanze non ammesse in assoluto o per alcune specie a dose terapeutica;
- Determinare la quantità di additivi e farmaci dichiarati;
- Rilevare la presenza di sostanze non dichiarate ed utilizzi fraudolenti;

- Evidenziare fenomeni di contaminazione crociata.



Approccio analitico al problema carry-over





Gli II.ZZ.SS. da anni si sono sensibilizzati al problema della ricerca di farmaci e additivi nei mangimi a livello di cross-contaminazione.

Il primo problema era rappresentato dalla definizione dei **livelli di concentrazione** a cui adeguare i metodi di prova.

A seguire sorgeva il problema delle **tecniche analitiche necessarie** per raggiungere tali livelli di **sensibilità**.

Raddoppiano le linee di analisi:

Dose terapeutica

Analisi per la verifica della conformità al dichiarato in mangimi additivati o medicati.

Livello carry over

Analisi per la verifica di presenza di fenomeni di carry-over da additivi o farmaci in mangimi "bianchi".

2 metodi

Raddoppiano le linee di analisi:

Problemi connessi: i livelli di concentrazione di analita tra dose di utilizzo e carry-over differiscono di circa 2 ordini di grandezza



- in generale sono necessari **2 diversi metodi** di analisi;
- poiché non sono disponibili metodi ufficiali, il laboratorio deve **sviluppare e validare in house 2 diversi metodi di prova.**

Raddoppiano le linee di analisi:

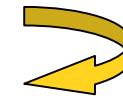
Problemi connessi: le ricerche al carry-over richiedono dosaggio dell'analita a livelli di concentrazione circa 2 ordini di grandezza inferiori alla dose di utilizzo



- è necessaria una **fase di purificazione e concentrazione** del campione prima dell'analisi;
- sono richiesti livelli di sensibilità strumentale elevati e quindi in alcuni casi **apparecchiature più complesse e costose (LC-MS/MS)**.

Raddoppiano le linee di analisi:

Problemi connessi: aumenta significativamente il rischio di contaminazione in laboratorio da parte di campioni contenenti l'analita a livello terapeutico, con conseguente risultato **FALSO POSITIVO**



- sono richieste **procedure di pulizia degli impianti di macinazione e preparazione** del campione molto rigorose;
- sono richiesti **controlli di qualità dei risultati** molto efficaci.

L'effetto della matrice:

In generale i metodi chimici risentono molto dell'effetto della matrice.

Nel caso dei mangimi, questo effetto è accentuato dalla eterogeneità di composizione a seconda della tipologia e della specie di destinazione:



diventa ancor più rilevante per le ricerche a livelli di carry-over, **che richiedono una pre-concentrazione degli estratti del campione.**



Coccidiostatici: un mondo regolamentato

Regolamento CE N.1831/2003

Coccidiostatici autorizzati come additivi:

ANTIBIOTICI IONOFORI
ALOFUGINONE BROMIDRATO
DECOCHINATO
DICLAZURIL
NICARBAZINA
ROBENIDINA CLORIDRATO

LASALOCID SODICO
MONENSIN SODICO
NARASIN
SALINOMICINA SODICA
MADURAMICINA AMMONIO
SEMDURAMICINA SODICA

Regolamento 2011/574/EC

Prevede tenori massimi dovuti a carry-over

APPROCCIO ANALITICO

- metodo di analisi **multiresiduo LC-MS/MS**;
- validazione del metodo da parte del laboratorio in accordo al **Reg. 882/2004/EC**
- limite di quantificazione pari a **0.5 volte il limite di tolleranza più basso** previsto per ogni analita dal Regolamento;
- **identificazione inequivocabile** dell'analita basata sulle transizioni MS/MS.

APPROCCIO ANALITICO

- stima dell'incertezza di misura estesa del risultato
($n = 2, k = 2, p = 95\%$),
- determinazione contestuale dell'umidità;
- espressione della concentrazione trovata di analita nel campione:
 - corretta per il recupero,
 - come forma commerciale,
 - riferita al 12% di umidità.



Farmaci autorizzati e carry-over: che fare ?

Casi più frequenti di cross contaminazione DA FARMACI AUTORIZZATI:

TETRACICLINE

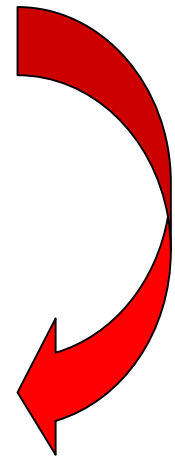
SULFAMIDICI

MACROLIDI

CHINOLONI

LIVELLO DI CONCENTRAZIONE

- **non** sono regolamentati limiti massimi tollerabili;
- non vi è un documento che definisca **a livello nazionale** la percentuale di concentrazione di principio attivo rispetto alla dose terapeutica che può essere considerata come carry-over.



LIVELLO DI CONCENTRAZIONE

- in mancanza di un livello di riferimento, la Rete II.ZZ.SS., **per poter operare in modo armonizzato**, attraverso il C.Re.A.A. ha dapprima effettuato un **censimento** dei metodi di screening e di conferma in uso o in fase di sviluppo per la ricerca di farmaci a livello di carry-over, con relativi **limiti di sensibilità analitica**.

LOQ (mg/kg) dei metodi di conferma accreditati

Famiglia	Principio attivo	PLV	LER	VE	LT	UM	AM	ME	PB	SI	SA
SULFAMIDICI	Sulfachinossalina	1	-	-	0,1	-	0,3	-	2,1	0,90	-
	Sulfadiazina	1	1	-	0,1	-	0,2	-	2,1	-	-
	Sulfadimetossina	1	1	-	0,1	-	0,3	-	2,1	0,84	-
	Sulfamerazina	1	1	-	0,1	-	0,3	-	2,1	1,26	-
	Sulfametazina	1	1	-	0,1	-	0,3	-	2,1	1,00	-
	Sulfamonometossina	1	-	-	0,1	-	-	-	2,1	0,83	-
	Sulfatiazolo	1	-	-	0,1	-	0,3	-	2,1	0,70	-
TETRACICLINE	Clortetraciclina	50	0,5	0,25	0,2	1	-	-	-	-	0,5
	Doxiciclina	50	0,5	0,25	0,2	1	-	-	-	-	0,5
	Ossitetraciclina	50	0,5	0,25	0,2	1	4	-	-	1,24	0,5
	Tetraciclina	50	-	0,25	0,2	1	6	-	-	0,87	0,5
CHINOLONICI	Acido Nalidissico	2	-	-	0,2	1	0,01	-	-	1,5	-
	Acido Ossolinico	2	-	-	0,2	1	0,01	-	-	1,3	-
	Ciprofloxacina	2	-	-	0,2	1	0,1	-	-	1	-
	Danofloxacina	1	-	-	0,2	1	0,1	-	-	-	-
	Difloxacina	2	-	-	0,2	1	0,1	-	-	0,8	-
	Enflofloxacina	2	-	-	0,2	1	0,4	-	-	1	-
	Flumequinone	2	-	-	0,2	1	0,1	-	-	1,5	-
	Norfloxacina	2	-	-	0,2	1	0,1	-	-	1	-
MACROLIDI	Eritromicina	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	-
	Spiramicina	-	1	-	0,2	-	1	-	-	1,1	-
	Tilmicosina	-	1	-	0,2	-	1	-	-	1	-
	Tilosina	-	1	-	0,2	-	2	-	-	0,8	-

LIVELLO DI CONCENTRAZIONE

- all'interno della Rete II.ZZ.SS., per ogni analita/famiglia di sostanze **almeno un laboratorio ha sviluppato e validato un metodo di conferma** a livello di carry-over, con **limiti di sensibilità analitica** congrui con la tendenza attuale (1-2% della dose terapeutica) e eventualmente abbassabili senza grossi oneri.

Verso il metodo multiresiduo/multiclasse

Per garantire un **risultato efficace** in un controllo al carry-over, il laboratorio dovrebbe usare metodi **MULTIRESIDUO/MULTICLASSE**, in grado di ricercare simultaneamente il maggior numero di analiti di una stessa famiglia che consentano di rilevare simultaneamente il maggior numero di analiti della stessa famiglia o di famiglie diverse, utilizzando tecniche di spettrometria di massa ad alta risoluzione.



Brussels, 10.9.2014
COM(2014) 556 final
2014/0255 (COD)

Proposal for a
REGULATION OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL
on the manufacture, placing on the market and use of medicated feed and repealing
Council Directive 90/167/EEC
 (Text with EEA relevance)
 {SWD(2014) 271 final}
 {SWD(2014) 272 final}

Article 7

Carry-over

1. Feed business operators manufacturing, storing, transporting and placing on the market medicated feed and intermediate products shall apply measures in accordance with Article 3 and 4 to avoid carry-over
2. The Commission shall be empowered to adopt delegated acts in accordance with Article 19 concerning the establishment of specific carry-over limits for active substances.

Where no specific carry-over limits have been set for an active substance, the following carry-over limits shall apply:

- (a) for antimicrobial active substances, **1%** of the active substance in the last batch of medicated feed or of intermediate product produced before the production of non-target feed;
- (b) for the other active substances, **3%** of the active substance in the last batch of medicated feed or of intermediate product produced before the production of non-target feed.



...ma qual'è la reale entità del carry-over nei mangimifici?

Ministero della Salute - C.Re.A.A.- ASSALZOO

Progetto: Carry-over Stato dell'Arte Mangimifici Italia

Si valuterà l'entità del carry-over nella situazione reale di produzione:

i campioni verranno effettuati seguendo una produzione già pianificata dal mangimificio al fine di permettere una valutazione del livello di carry-over (da tetracicline e sulfamidici) nella situazione reale.

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

**Cosa mangiano
le nostre mucche.
Se vivono bene loro
viviamo meglio
anche noi.**

