



C I B 



## **Anabolizzanti**

L'utilizzo dei trattamenti illeciti con sostanze promotrici di crescita (DOPING) negli animali in produzione zootecnica è purtroppo un problema ancora molto diffuso. E' indispensabile promuovere la tutela delle produzioni caratterizzate da elevati standard qualitativi e di salubrità per difenderle e per salvaguardare la salute del consumatore.

Il CIBA si impegna costantemente nello sviluppo di nuovi approcci diagnostici per mettere a punto metodiche di screening a basso costo ed elevata sensibilità in grado di evidenziare i residui di trattamento anche dopo più giorni di sospensione.

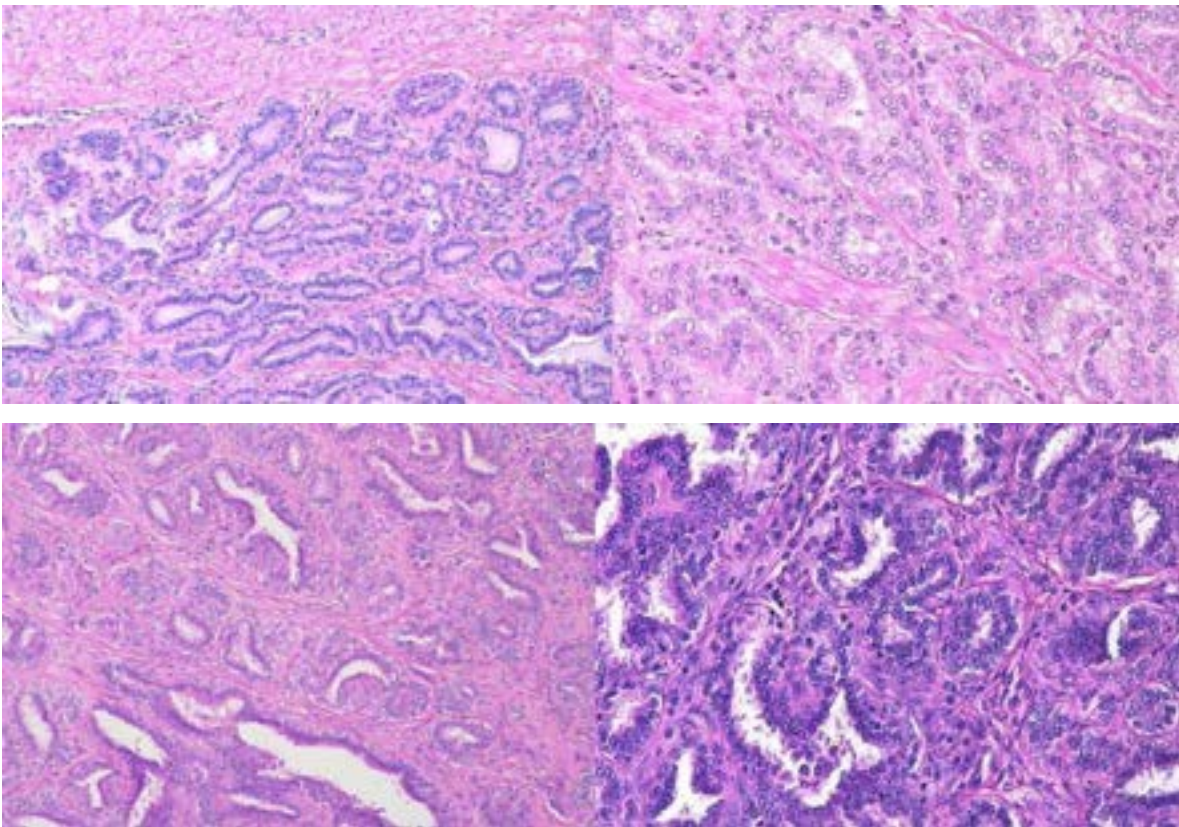
## **Piano di Monitoraggio con Test Istologico**

Dal 2008 il Ministero della Salute affianca al Piano Nazionale Residui, un piano di sorveglianza basato sul metodo istologico. Il piano ha l'obiettivo di verificare se, a livello nazionale, le partite inviate al macello superino un livello soglia di prevalenza predefinito per trattamenti illeciti con corticosteroidi e steroidi sessuali (13% steroidi e 10% steroidi sessuali considerando una sensibilità

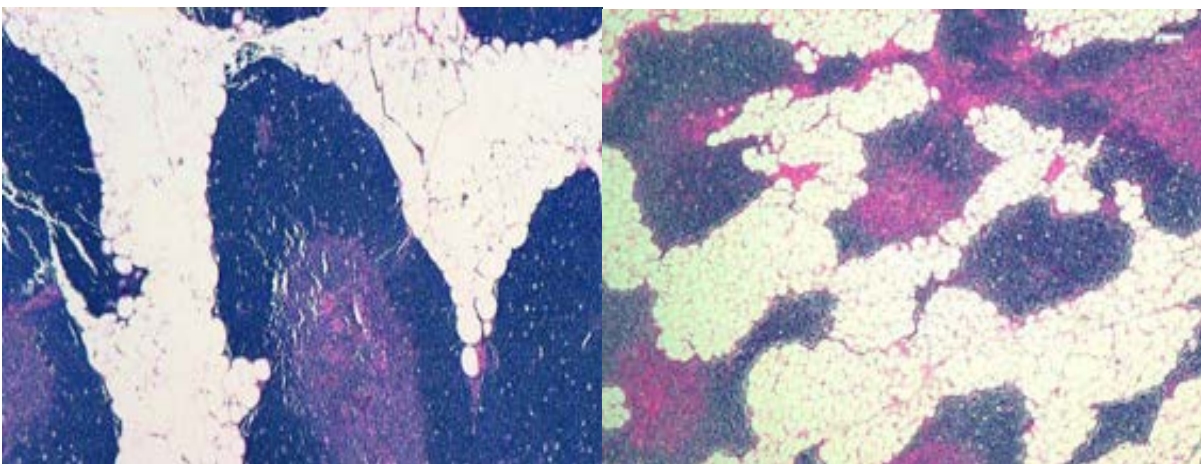
pari al 95% e una specificità pari al 90% del sistema di sorveglianza e una potenza statistica del 90%) e di fornire una stima della prevalenza di sospetti per trattamento.

Sono inserite nel piano due tecniche:

- istochimica classica, ematossilina ed eosina, per valutare la presenza delle lesioni patognomoniche da trattamenti illeciti quali:
  - grave metaplasia dell'epitelio ghiandolare degli organi sessuali in seguito a trattamento con estrogeni

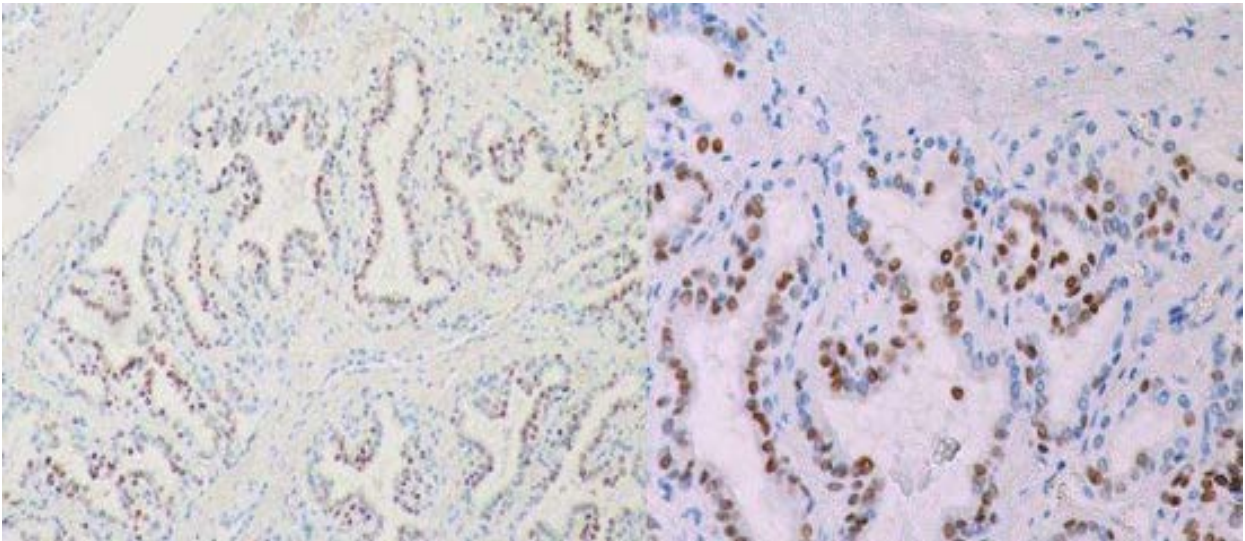


- alterazioni riscontrate a livello timico in seguito a trattamento con corticosteroidi





- immunoistochimica per valutare l'espressione del progesterone (PGR) per evidenziare i trattamenti illeciti con steroidi sessuali (segnatamente il 17 $\beta$ -estradiolo) nel vitello.



# La ricerca...

## Istologia...

Ricerca di nuovi anticorpi che possano essere utilizzati per individuare l'uso di sostanze illecite in allevamento.

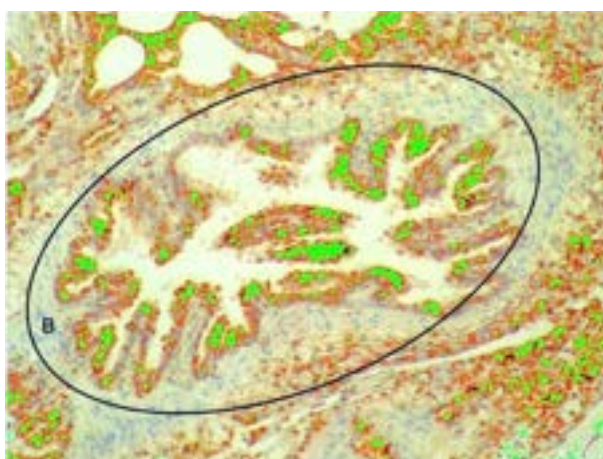
Pur essendo dotato di ottime performance, il test istologico è spesso oggetto di contestazione in termini di “soggettività” dell'interpretazione del risultato; il risultato inseguito negli ultimi anni è trovare colorazioni immunoistochimiche **quantificabili** che possano essere associate ad iper- o ipo-espressione di marcatori correlati alle diverse categorie di trattamenti.

## WORK IN PROGRESS



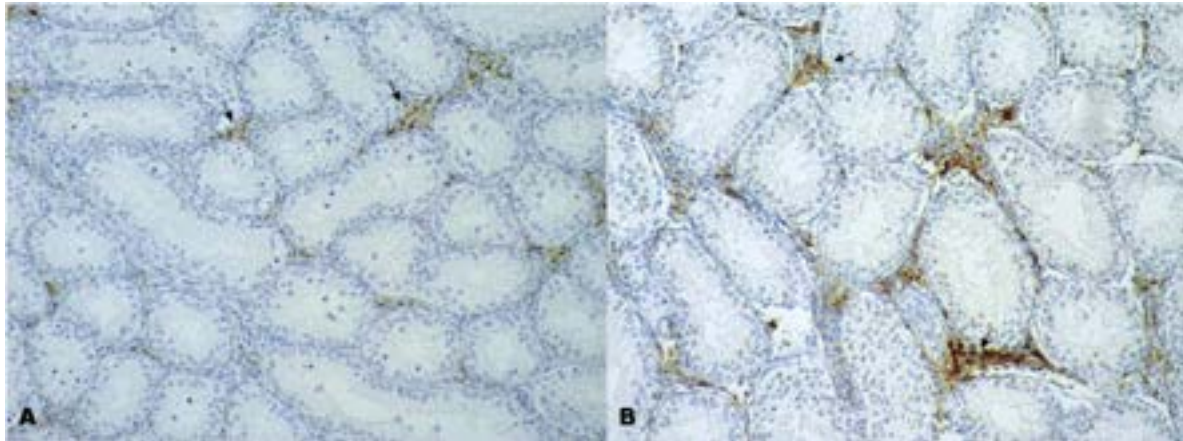
## Immunoistochimica

- la valutazione di un anticorpo monoclonale, rivolto verso i recettori  $\beta$ 2-adrenergici, ben espressi in ambito polmonare, segnatamente a livello bronchiale e bronchiolare, che potrebbero essere dei potenziali indicatori dei trattamenti illeciti dei  $\beta$  agonisti

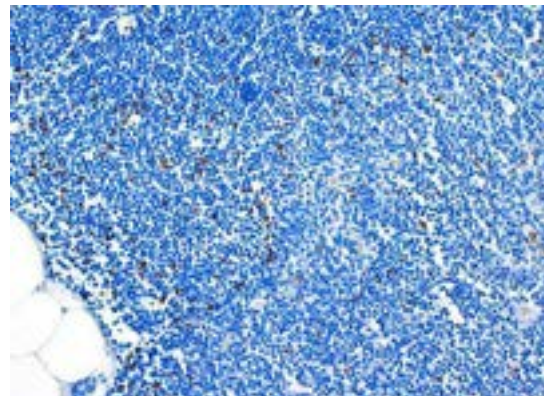


*Colorazione immunoistochimica per i recettori  $\beta$ 2-adrenergici a livello di bronchiolo su sezione di polmone di vitello quantificata attraverso l'uso del software NIS-Elements*

- l'espressione proteica della regucalcina a livello dei testicoli potrebbe essere correlata ai trattamenti androgenici. Espressione della regucalcina (RGN) a livello di testicoli: A: animali trattati mostrano una minore distribuzione del recettore e di minore intensità; B: animali controlli: mostrano una maggiore distribuzione ed intensità della reazione.



- valutazione della performance dell'immunoistochimica (IHC) utilizzando l'anticorpo anti-cleaved-Lamin A come marcatore apoptotico, per migliorare le prestazioni (sensibilità e specificità) dell'analisi istologica dell'atrofia del timo nell'ambito



*Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2018 Oct 10:1-8, doi: 10.1080/19440049.2018.1503422. [Epub ahead of print]

### **Immunohistochemistry by anti-cleaved-Lamin A: an improved approach to tackle the misuse of glucocorticoids in cattle.**

Zanardello C<sup>1</sup>, Pezzolato M<sup>2</sup>, Capello K<sup>3</sup>, Botta M<sup>2</sup>, Baioni E<sup>2</sup>, Mutinelli F<sup>1</sup>, Vascellari M<sup>1</sup>, Bozzetta E<sup>2</sup>

## “OMICS & BIOMARKER”

Ormai da qualche anno si stanno studiando -grazie ai notevoli progressi delle scienze “omiche” (proteomica, metabolomica, peptidomica, trascrittomica)- i possibili biomarcatori indicativi dell’uso illecito di alcune classi di sostanze anabolizzanti e/o in specifici gruppi di animali

- In collaborazione con Laboratori nazionali di riferimento UE come il laboratorio francese **Laberca** – Nantes si sviluppano progetti di ricerca per la messa a punto di metodiche innovative basate sui bioassay, nonché per la standardizzazione di metodiche genomiche, metabolomiche. In particolare è stato messo a punto un modello metabolomico dedicato all'individuazione dei  $\beta$ -agonisti nei bovini in accordo con le aspettative dell'UE (dic. 2002/657) con prestazioni sono conformi ai requisiti di screening.

*Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2018 Oct 35(10): 1948-1958. doi: 10.1080/19440049.2018.1496280. Epub 2018 Aug 3.

**When LC-HRMS metabolomics gets ISO17025 accredited and ready for official controls - application to the screening of forbidden compounds in livestock.**

Derville-Pinel G<sup>1</sup>, Rover AL<sup>1</sup>, Bozzetta E<sup>2</sup>, Pezzolato M<sup>2</sup>, Heron L<sup>1</sup>, Prevost S<sup>1</sup>, Le Bizec B<sup>1</sup>.

- SC Istopatologia e Test Rapidi hanno validato il test bioassay GR-CALUX per la determinazione dei trattamenti con corticosteroidi. Questo metodo in vitro valuta l’attività glucocorticoide indiretta di urine di vitelli e vitelloni, tramite la produzione di un segnale luminoso di intensità proporzionale alla concentrazione di cortisonici presenti nei campioni di urina analizzati. Il GR-CALUX test si configura come strumento di controllo efficace, a basso costo e in grado di rilevare la presenza di associazioni di molecole utilizzate a basso dosaggio (low-dose drug cocktails). Pur non essendo ancora rientrato nella routine dei controlli, tale metodo è stato fino ad oggi impiegato nei protocolli sperimentali per incrementare la sensibilità dei piani di monitoraggio.

*Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2015 32(2): 194-204. doi: 10.1080/19440049.2014.996788. Epub 2015 Jan 8.

**Effect-based detection of synthetic glucocorticoids in bovine urine.**

Pitardi D<sup>1</sup>, Cini B, Paleologop M, Brouwer A, Behnisch P, van der Linden S, Vincenti M, Caera P, Gili M, Pezzolato M, Meloni D, Bozzetta E.

- La Paraoxonasi/Arilesterasi-1 (PON1) viene sintetizzata nel fegato e rilasciata nel sangue, svolge un importante ruolo nel metabolismo dei lipidi. Studi in vitro hanno evidenziato una forte

inibizione del desametasone sull'attività di questa proteina. Il suo studio in diversi progetti ha permesso di mettere a punto una metodica in proteomica per l'uso di questo biomarker per un test di screening di semplice e rapido grazie al quale è possibile identificare eventuali trattamenti illeciti desametasone. L'analisi statistica ha stimato una SENSIBILITÀ del 95% (95% CI: 75.1% - 99.9%) ed una SPECIFICITÀ del 100% (95% CI: 90.3%-100%).

*Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2014;31(5): 833-8. doi: 10.1080/19440049.2014.900191. Epub 2014 Apr 10.

**Identification by a proteomic approach of a plasma protein as a possible biomarker of illicit dexamethasone treatment in veal calves.**

Guasimetti C<sup>1</sup>, Mazza M, Papano M, Carrella S, Scuto S, Nodari S, Pezzolato M, Richeimi GB, Raioni E, Caramelli M, Acidis PL, Bozzetta E