

## **PROGETTI DI “RICERCA CORRENTE 2021”** **RELAZIONE FINALE**

**N. identificativo progetto: IZS LT 05/21 RC**

**Progetto presentato da:**

**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE**  
**LAZIO E TOSCANA “M. ALEANDRI”**

**Area tematica: Sanità Animale**

**Titolo del progetto:** “Sviluppo di metodi analitici e protocolli diagnostici per la determinazione delle principali tossine delle piante causa di avvelenamento degli animali d'affezione e da reddito sul territorio nazionale”

**Ricerca finanziata dal Ministero della Salute**

**Responsabile Scientifico: Claudia Focardi**

## SINTESI

### **Sviluppo di metodi analitici e protocolli diagnostici per la determinazione delle principali tossine delle piante causa di avvelenamento degli animali d'affezione e da reddito sul territorio nazionale.**

L'avvelenamento di animali per ingestione accidentale di piante è una problematica ancora sottostimata, ma con forti implicazioni a carattere sanitario ed economico. La presente ricerca si proponeva principalmente di migliorare le capacità di diagnosi e gestione dei casi di sospetto avvelenamento o intossicazione e di sviluppare metodologie analitiche per l'identificazione delle tossine che siano rapide, possibilmente a basso costo e che soprattutto possano essere usate nella routine delle analisi tossicologiche.

Uno dei punti di forza del progetto è stato il coinvolgimento di specifiche unità multidisciplinari composte da veterinari, botanici e chimici che, a diversi livelli, hanno operato per concorrere a formulare una diagnosi conclusiva di conferma o meno del sospetto. Il valore aggiunto di questo progetto è stata la creazione di una modalità operativa condivisa ed integrata. Il piano strategico risultante dalla collaborazione, prevede l'identificazione della pianta sospetta da parte dell'unità botanica a cui segue l'isolamento della tossina (che può essere o meno presente nel panel validato). Quindi viene effettuata la ricerca della stessa negli organi bersaglio dell'animale colpito per l'eventuale conferma dell'intossicazione

Per la realizzazione del progetto e l'ideazione delle nuove metodologie analitiche sono state utilizzate delle tecniche ad alta prestazione e ad alta sensibilità, di ultima generazione quali la GC-MS/MS e LC-MS/MS, entrambi a triplo quadrupolo. E' stato messo a punto un unico protocollo multiresiduale per la ricerca di molecole appartenenti a varie classi, fra cui alcaloidi glicosidi aminoacidi non proteogenici.

Il metodo messo a punto sia per le piante che per le matrici di origine animale risulta essere soddisfacente per quanto riguarda la rapidità dell'esecuzione sia nella fase di preparazione del campione, sia nella determinazione strumentale. I limiti di rivelabilità ottenuti sono sempre inferiori alle parti per milione, i recuperi sono compresi nell'intervallo di 50 -115% mentre la RSD inferiore al 15% L'effetto matrice come abbiamo visto è nella maggior parte dei casi contenuto e comunque ha una incidenza limitata trattandosi di metodi qualitativi atti a testare la presenza/ assenza della tossina e non la quantità.

L'importanza di un corretto approccio diagnostico è fondamentale. Molto spesso non si perviene ad una diagnosi per mancanza di formazione da parte del veterinario anatomo-

patologo nel riconoscimento delle lesioni provocate dalle tossine vegetali, per errori nel campionamento o nella scelta della matrice più idonea. In collaborazione il Centro di Referenza Nazionale di Medicina Forense, l'Università di Agraria e con le altre unità operative di diagnostica è stato elaborato un protocollo operativo da utilizzare per guidare il veterinario nel saper diagnosticare l'intossicazione da piante tossiche. Inoltre è stato predisposto un database informatico in continuo aggiornamento, che potrà essere inserito insieme al protocollo diagnostico in una sezione dedicata nel portale degli avvelenamenti o nel sito IZSLT

I metodi sviluppati e validati sono stati applicati a campioni da animali prevenuti alle sedi diagnostiche sia con sospetto di avvelenamento da tossine vegetali sia per quelli cui non è stato identificato l'analita responsabile. Durante il periodo di ricerca sono stati analizzati per fitotossine 31 campioni e di questi 3 sono risultati positivi. Uno di questi è risultato positivo per un alcaloide, la coniina, dall'analisi di screening, senza che vi fosse alcun sospetto da parte del veterinario.

Tutti gli aspetti più interessanti del lavoro svolto in questi due anni sono stati discussi e condivisi con gli operatori del settore nel corso di due eventi formativi dal titolo "Medicina Forense Veterinaria approccio multidisciplinare e gestione dei casi forensi" in seno alla presentazione della Dr "Focardi "L'analisi tossicologica: dai casi risolti alle problematiche ancora aperte"

E' stato inoltre presentato un poster "Determinazione simultanea di 21 fitotossine in LC-MS/MS e applicazioni in ambito tossicologico " (Marmo G, Giulia Biancalani, Silvia Lamanna., Claudia Focardi , Bruno Neri.) nell'ambito del V congresso Nazionale "Micotossine e Tossine Vegetali nella Filiera Agro-Alimentare" tenutosi a Roma, 5-7 giugno 2024.

Saranno seguiti da pubblicazioni a carattere tematico su riviste scientifiche nazionali e internazionali con fattore d'impatto adeguato.

Parole chiave: Avvelenamento di animali, tossine delle Piante, LC MS/MS

## SUMMARY

The animal poisoning due to accidental ingestion of plants is a problem that is still underestimated, but with strong health and economic implications. The main goal of present research is to improve the capabilities of diagnosis and management of cases of suspected poisoning or intoxication and to develop analytical methodologies for the identification of toxins rapid, possibly low cost and that can be used in the routine of toxicological analyses.

One of the main strengths of the project is the involvement of specific multidisciplinary units made up of veterinarians, botanists and chemists who, at different levels, worked to formulate a conclusive diagnosis confirming or not confirming the suspicion. The added value of this project was the creation of a shared and integrated operating mode. The strategic plan resulting from the collaboration provides for the identification of the suspect plant by the botanicals followed by the isolation of the toxin (which may or not be present in the validated panel). Then the target organs of the affected animal are analysed for confirmation.

For the realization of the project and the creation of the new analytical methodologies, high performance and high sensitivity, latest generation techniques such as GC-MS/MS and LC-MS/MS, both triple quadrupole, were used. A single multiresidue protocol has been developed for the search for molecules belonging to various classes, including alkaloids, glycosides, non-proteogenic amino acids.

The method developed for both plants and matrices of animal origin seems to be satisfactory in terms of speed of execution both in the sample preparation phase and in instrumental determination. The detection limits obtained are always lower than parts per million, the recoveries are within the range of 50 -115% while the RSD is lower than 15%.. Matrix effect is contained in most cases and it can be noticed that it has a limited incidence due to the fact that these are qualitative methods designed to test the presence/absence of the toxin and not the quantity.

The importance of a correct diagnostic approach is fundamental. Not rarely a diagnosis is not reached due to lack of training on the part of the veterinary pathologist in the recognition of lesions caused by plant toxins, due to errors in sampling or in the choice of the most suitable matrix. In collaboration with the National Reference Center for Forensic Medicine, the University of Agriculture and other diagnostic operational units, an operational protocol has been developed to be used to guide the veterinarian in knowing

how to diagnose intoxication from toxic plants. Furthermore, a continuously updated computer database has been set up, which can be inserted together with the diagnostic protocol in a dedicated section on the poisoning portal or on the IZSLT website.

The developed and validated methods have been applied to samples from animals sent by diagnostics both with suspicion of poisoning by plant toxins or not.

During the research period, 31 samples were analyzed for phytotoxins and of these 3 tested positive. One of these tested positive for an alkaloid, coniine, from the screening analysis, without there being any suspicion on the part of the veterinarians.

All the most interesting aspects of the work carried out in these two years, have been discussed and shared with the operators of the sector (IIZZSS and ARPA) during the events “Medicina Forense Veterinaria approccio multidisciplinare e gestione dei casi forensi” in the oral contribution of Dr “Focardi “L'analisi tossicologica: dai casi risolti alle problematiche ancora aperte”

During the “ V congresso Nazionale “Micotossine e Tossine Vegetali nella Filiera Agro-Alimentare” in Rome, 5-7 giugno 2024 the authors have been submitted a poster “Determinazione simultanea di 21 fitotossine in LC-MS/MS e applicazioni in ambito tossicologico “ (Marmo G, Giulia Biancalani, Silvia Lamanna., Claudia Focardi , Bruno Neri.) nell'ambito del

will be followed by publications in national and international scientific journals with appropriate impact factor.

**Keywords :** *animal poisoning, Plant toxin, LC MS/MS*