



**Università di Camerino**

**Scuola di Scienze del Farmaco e dei Prodotti della Salute**

*Corso di Laurea in Tossicologia del Farmaco, degli Alimenti e  
dell'Ambiente (cl 24)*

# **Validazione di un metodo di screening per la ricerca di stanozololo e metaboliti in urina animale**

Tesi sperimentale di laurea in  
Analisi dei Residui di Farmaci e Inquinanti negli Alimenti

Laureanda

*Eleonora Sciarrini*

Relatori

*Dr. Gianni Sagratini*

*Dr.ssa Roberta Galarini*

Anno Accademico 2009-2010

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Gli Steroidi

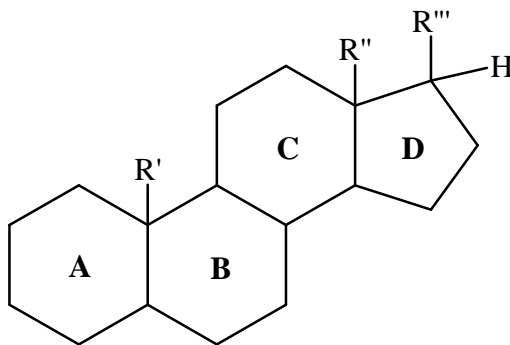
Gli steroidi (dal greco *stereos* = solido) costituiscono un gruppo di composti molto diffusi in natura che, dal punto di vista chimico strutturale contengono un sistema tetraciclico di atomi di carbonio (ciclopentanoperidrofenantrene) (Figura 1). Per convenzione gli anelli della struttura base degli steroidi si indicano con le lettere A, B, C, D: i primi tre sono anelli cicloesanicici, il quarto è un ciclopentano; gli atomi di carbonio hanno una numerazione specifica (Figura 2).

A parte le piccole, ma sostanziali, differenze dovute alla presenza di sostituenti nel nucleo ed al grado di insaturazione, i diversi tipi di composti si differenziano soprattutto per i gruppi R', R'' e R''' (Figura 1).

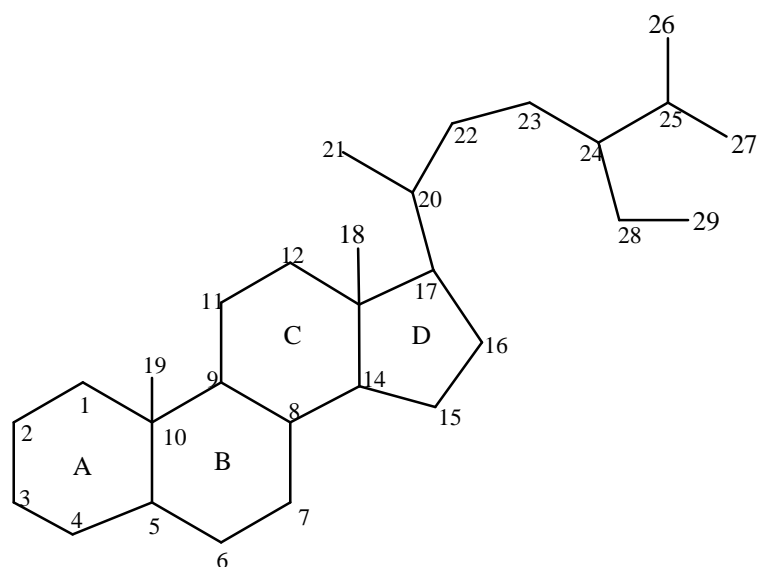
Il gruppo R' può essere assente quando l'anello A e/o B è aromatico. I sostituenti R' e R'' possono essere atomi di idrogeno o gruppi metilici, anche se a volte, in tali posizioni, si possono trovare residui parzialmente o completamente ossidati: CH<sub>2</sub>OH, CHO, COOH.

La catena laterale in posizione 17 (R''') può essere assente oppure può contenere 2, 4, 5, 8, 9, 10 o 11 atomi di carbonio e talvolta può essere associata ad atomi di ossigeno o più raramente di azoto. La sostituzione dei due atomi di idrogeno in posizione 4 e 14 con gruppi metilici porta ad un vasto gruppo di composti che viene denominato come 4, 4, 14 trimetilsteroidi o trimetilsteroli, presenti in natura sia nel regno animale che vegetale [1].

Quasi tutti gli steroidi naturali possiedono in posizione 3 un ossidrile (OH) o un gruppo chetonico (C=O).



**Figura 1. Struttura Generale degli Steroidi**



**Figura 2. Numerazione degli atomi di carbonio negli Steroidi**

Gli steroidi vengono comunemente classificati tra i lipidi, poiché sono presenti nella frazione non saponificabile dei grassi, ossia nel materiale insolubile in acqua, ma solubile in etere, che resta come residuo dopo la saponificazione di un grasso animale o vegetale. Tale classificazione, però, non si addice a tutti gli steroidi. Le differenze fra i vari tipi di steroidi sono determinate da molteplici fattori strutturali: la natura, il numero e la posizione dei doppi legami, ma soprattutto la disposizione spaziale dei gruppi sostituenti nonché degli anelli A, B, C e D.

Gli steroidi si possono suddividere in nove classi principali: steroli, acidi biliari, ormoni sessuali, ormoni corticosurrenali, glucosidi cardiaci ed agliconi, saponine e sapogenine, ecdisoni, vitamina D, trimetilsteroli.

### **1.1.1 Ormoni sessuali steroidei**

Gli ormoni prodotti dalle gonadi, tutti di natura steroidea, svolgono azioni multiple sull'organismo, ma soprattutto sugli organi sessuali accessori, condizionando lo sviluppo dei caratteri sessuali secondari. Le gonadi maschili e femminili producono un numero limitato di steroidi che agiscono sul comportamento sessuale in particolare e sulla funzione riproduttiva in generale. La corteccia surrenalica per contro, di norma, è in grado di produrre molti steroidi a diversa attività biologica.

Nel 1923 Edgar Allen fu il primo a mettere in evidenza l'azione degli estrogeni utilizzando la tecnica dello striscio vaginale seguita dall'isolamento dell'estrone, dall'urina di donna. Gli esperimenti condotti negli anni a seguire permisero di isolare altri ormoni e di determinarne la configurazione steroidea. Gli ormoni sessuali steroidei possono essere suddivisi in tre classi: Estrogeni e Gestageni (Progestinici) nella femmina, Androgeni nel maschio come riportato nella tabella che segue [I].

**Tabella 1. Classificazione degli ormoni sessuali steroidei**

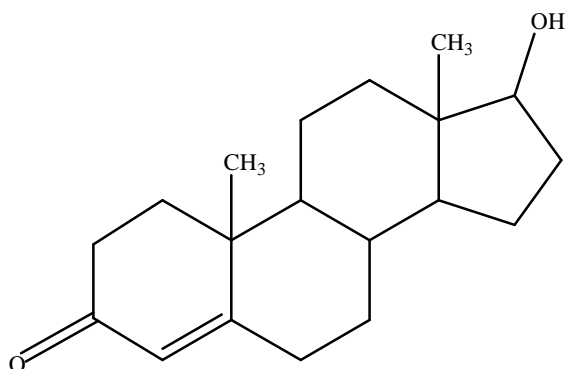
<b>Estrogeni</b>	<b>Gestageni</b>	<b>Androgeni</b>
17 $\beta$ -Estradiolo	Pregnenolone	Testosterone
Estrone	Progesterone	Androstenedione
Estriolo	(17 $\alpha$ -idrossi-Progesterone)	Deidroepiandrosterone
		Diidrotosterone

## 1.2 Steroidi Androgeni Anabolizzanti

Gli anabolizzanti sono sostanze in grado di stimolare la sintesi e l'accumulo di sostanze necessarie per la crescita cellulare e tissutale, espletando preminentemente azione proteico-sintetica a livello della muscolatura scheletrica. Essi possono essere classificati in base alla loro struttura chimica o alla loro origine in:

- ormoni sessuali endogeni (vedi Tabella 1);
- composti steroidei non endogeni (sintetici);
- composti non endogeni non steroidei ;
- ormoni polipeptidici

Gli steroidi sintetici hanno la struttura base del testosterone umano (Figura 3) e ad essa sono legati sia l'effetto anabolizzante (aumento della massa muscolare) che l'effetto androgeno (mascolinizzazione). Fisiologicamente i due effetti non possono essere separati perché, quando l'ormone si lega con i recettori dei vari tessuti, lo stesso tipo di recettore produce effetti anabolici ed androgeni a seconda delle parti del corpo cui lo stesso si lega.



**Figura 3. Struttura del testosterone**

### 1.2.1 Meccanismo d'azione

Il meccanismo d'azione degli steroidi anabolizzanti androgeni, si esplica con l'attivazione dei recettori di superficie localizzati sulla membrana, connessi a secondi messaggeri intracellulari, oppure con il superamento della membrana e l'attivazione di recettori interni. In entrambi i casi si ottiene la modificazione dei meccanismi di trascrizione del DNA mediante attivazione o recessione della trascrizione di specifiche sequenze geniche. Molte cellule del corpo, inclusi i muscoli scheletrici, possiedono dei recettori per legare il testosterone od ormoni simili. La formazione di un complesso steroide-recettore induce la produzione degli enzimi responsabili dell'attivazione della sintesi proteica in primis, l'RNA-polimerasi, perché è in grado di attivare la sintesi ed il metabolismo cellulare delle proteine, promuovendo l'azione anabolica che conduce all'aumento dei muscoli, della massa corporea e quindi allo sviluppo di una maggiore potenza fisica. Gli steroidi anabolizzanti agiscono anche attraverso altri due meccanismi oltre a quello sopra citato e sono:

- Anticatabolico, contrastando il catabolismo che porta alla degradazione proteica durante episodi di stress, come l'attività fisica intensa. Durante episodi di stress il corpo rilascia glucocorticoidi, che hanno un effetto catabolico sui tessuti; gli steroidi si legano ai siti specifici per i glucocorticoidi, limitandone gli effetti catabolici. Il risultato è l'inibizione della degradazione proteica.

- Sull'equilibrio dell'azoto, promuovendo la ritenzione dell'azoto ed uno spostamento dell'equilibrio dell'azoto verso un utilizzo dello stesso per la formazione delle proteine.

### 1.3 Stanozololo

Lo Stanozololo è uno steroide androgeno anabolizzante sintetizzato da Clinton et Al. nel 1959 avente formula bruta  $C_{21}H_{32}N_2O$ , chimicamente è 7 $\beta$ -idrossi-17-metil-5 $\alpha$ -andro-stano-[3,2-c]-pirazolo. La sua struttura è molto simile a quella del metiltestosterone dal quale differisce per la presenza di un anello pirazolico al posto del gruppo chetonico in posizione 3 (Fig. 4) e contiene inoltre, un gruppo metilico ( $CH_3$ ) legato all'atomo di carbonio 17. L'introduzione di questo gruppo metilico rende la molecola resistente al primo stadio metabolico a livello del fegato e la presenza dello stesso in posizione 17, come per tutti i casi simili nel campo degli steroidi, rende la molecola dannosa per il fegato, soprattutto se utilizzata in modo improprio con dosaggi elevati e periodi di trattamento prolungati [1].



**Figura 4. Strutture dello Stanozololo (sinistra) e del Metiltestosterone (destra)**

Lo stanozololo ha la capacità di stimolare la sintesi proteica (effetto anabolico) tanto da essere utilizzato sia in campo veterinario che umano, come promotore della crescita muscolare. Questo composto, nonostante la sua proibizione dalla Commissione Olimpica Internazionale dal 1974, è stato spesso utilizzato dagli atleti e nelle corse dei cavalli per aumentarne le prestazioni. A differenza degli Stati Uniti dove, alcuni composti anabolizzanti naturali o sintetici, possono essere usati come promotori di crescita negli

animali da produzione della carne, l'Unione europea proibisce l'uso delle sostanze anabolizzanti dalla fine degli anni ottanta. Le cause di ciò sono riconducibili ai potenziali effetti negativi per la salute umana. La distribuzione dei residui dei promotori di crescita anabolizzanti di tipo ormonale dipende dalle loro modalità di metabolismo ed escrezione. Gli studi sul metabolismo dello stanozololo nei bovini, hanno mostrato la presenza nelle urine degli animali trattati, di stanozololo e del suo metabolita 16 $\beta$ -idrossistanozololo, in caso di somministrazione orale. I metaboliti idrossilati 16 $\beta$ -idrossistanozololo e 4,16-diidrossistanozololo sono invece presenti in caso di somministrazione sottocutanea. Queste molecole non vengono eliminate naturalmente come tali nelle urine perché hanno una natura lipofila, ma sotto forma di glicuronidi, tramite una reazione di coniugazione con acido glicuronico, che le trasforma in sostanze idrosolubili e polari facilmente eliminabili.

### **1.3.1 Utilizzo nell'uomo (doping)**

Lo stanozololo trova utilizzo per le sue proprietà anabolizzanti particolarmente mirate all'accrescimento della forza muscolare. E' particolarmente gradito da parte degli atleti che si sottopongono a pratiche dopanti perché non si converte metabolicamente in estrogeni e pertanto non ha effetto androgeno, né provoca ritenzione di liquidi o incremento ponderale. Viene utilizzato in modo ciclico, soprattutto durante le fasi di allenamento, alternando periodi di assunzione con intervalli di "washing out". Come già precedentemente accennato, il gruppo metile legato all'atomo di carbonio 17 fa sì che questo steroide sia tossico per il fegato, soprattutto quando viene utilizzato a dosaggi elevati e ripetuti. Inoltre accresce il rischio delle malattie cardiovascolari perché agisce sul colesterolo aumentando la concentrazione di quello dannoso (low density cholesterol - LDL) e diminuendo quello buono (high density cholesterol - HDL). Nelle donne può avere effetto mascolinizzante (irsutismo, abbassamento del tono della voce, ecc.) in modo direttamente proporzionale ai dosaggi ed ai tempi di utilizzo.

## **2. IL CONTROLLO DEI RESIDUI NEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE**

### **2.1 Premessa**

Un fattore chiave per la salute umana è rappresentato da una corretta alimentazione che, intesa in senso ampio, può essere compromessa non solo da errate abitudini nutrizionali del singolo individuo, ma anche da fattori da lui indipendenti e non sempre facilmente controllabili e gestibili, quali l'intervento dell'uomo produttore-venditore di alimenti. Fin dall'antichità i governanti hanno stabilito regole per proteggere i "consumatori" contro le pratiche fraudolente associate al commercio di alimenti. Nell'antica Grecia si compivano ispezioni per accertare la purezza ed il buono stato della birra e del vino, e già in epoca romana, fu creato un sistema statale per tutelare i cittadini da frodi o da prodotti di qualità scadente. È solo nel XIX secolo tuttavia che i problemi relativi alla sicurezza alimentare diventano un impegno costante e crescente per i governi. Risalgono, infatti, alla seconda metà del XIX secolo le prime leggi sugli alimenti e, per verificare che queste fossero rispettate, s'istituirono dei sistemi di controllo. La chimica degli alimenti diventa così una vera e propria disciplina scientifica e la determinazione della purezza dei cibi cominciò a basarsi principalmente su parametri analitici relativi alla loro composizione [II].

#### **2.1.1 Il Piano Nazionale Residui**

L'alimentazione dei paesi industrializzati si basa soprattutto sui prodotti di origine animale, come carne, latte e uova. La sempre crescente richiesta di alimenti proteici ha stimolato e condizionato lo sviluppo della zootecnia, sia attraverso la selezione genetica ed il miglioramento delle tecniche di produzione, trasformazione e conservazione di mangimi e foraggi, sia attraverso il ricorso alla somministrazione in allevamento di sostanze diverse da quelle alimentari, quali farmaci, additivi, ormoni ecc. Le molecole maggiormente utilizzate per incrementare il rendimento delle produzioni zootecniche sono state e sono i prodotti ad azione ormonale ed antiormonale, i  $\beta$ -agonisti, il cui impiego, purtroppo, non è esente da rischi igienico-sanitari sulla salute del consumatore. Per questo motivo tali sostanze sono vietate in tutto il territorio dell'Unione europea (UE). D'altro canto negli allevamenti, per la prevenzione e per la cura delle malattie, vengono impiegati farmaci



veterinari costituiti da una serie di molecole autorizzate (antibiotici, antielmintici, anticoccidici, etc.) per le quali è stato fissato un Limite Massimo di Residuo (LMR).

Il problema del controllo dei residui nelle derrate alimentari di origine animale si è così intensificato con il passare del tempo, anche per l'attenzione e l'interesse sempre maggiori che il consumatore ha rivolto a questa tematica. D'altra parte, la preoccupazione è, come abbiamo visto, in parte giustificata dal fatto che un numero crescente di farmaci viene impiegato nelle produzioni animali e ciò, potenzialmente, espone il cittadino all'assunzione di residui di xenobiotici, se pur in piccole quantità, per la durata di tutta una vita. Di conseguenza negli ultimi decenni il legislatore, sia in ambito comunitario che nazionale, si è fortemente impegnato ad emanare una serie di normative atte a migliorare gli aspetti inerenti alla sicurezza alimentare. A tale proposito, va detto che il nostro Paese era stato tra i primi dell'Unione europea ad adottare normative molto severe relativamente all'impiego di sostanze ormonali come fattori di crescita. Risalgono infatti ai primi anni sessanta i divieti in tal senso: Legge del 3 Febbraio 1961<sup>(1)</sup> e Decreto Ministeriale del 15 Gennaio 1969<sup>(2)</sup>. Nell'allora Comunità Europea (CE) il problema dei residui delle sostanze ad azione anabolizzante utilizzate in zootecnica venne alla ribalta nel 1981 con la Direttiva 81/602/CEE<sup>(3,4)</sup>. Con questa Direttiva gli Stati membri decidevano di vietare la somministrazione agli animali in allevamento di sostanze ad azione tireostatica, estrogena, androgena e gestagena e conseguentemente, l'immissione sul mercato di animali ai quali fossero state somministrate dette sostanze. All'articolo 4 la Direttiva permetteva, tuttavia, l'utilizzo al solo scopo terapeutico, di alcune molecole ad azione ormonale, autorizzate in conformità alle direttive concernenti i medicinali veterinari. Infine, la possibilità di impiegare cinque ormoni in allevamento a scopo di ingrasso, rimaneva ancora oggetto di studi ulteriori allo scopo di determinarne la pericolosità per la salute pubblica e l'eventuale autorizzazione in futuro.

---

<sup>(1)</sup> Legge 3 febbraio 1961, n. 4: "Divieto dell'impiego di estrogeni come fattore di crescita o di neutralizzazione sessuali negli animali.

<sup>(2)</sup> Decreto Ministeriale 15 gennaio 1969: "Divieto per gli allevatori di detenere o somministrare agli animali sostanze ad attività ormonale ed antiormonale".

<sup>(3)</sup> Per dare attuazione alle politiche in materia di sicurezza e qualità degli alimenti, la Comunità ha adottato principalmente due tipi di strumenti normativi: i Regolamenti e le Direttive. I primi non necessitano di normative particolari di recepimento da parte degli Stati membri, mentre le Direttive possono contenere solo principi generali della disciplina delle materie che vanno a regolare e sono rivolte ai singoli Stati membri, che devono attuarle con proprie leggi ordinarie.

<sup>(4)</sup> Direttiva 81/602/ CEE del Consiglio, del 31 luglio 1981, concernente il divieto di talune sostanze ad azione ormonica e delle sostanze ad azione tireostatica. G.U.C.E. 7 Agosto 1981 n. L 222. Recepita in Italia con il Decreto: Decreto Ministeriale 3 novembre 1981: " Divieto di vendita di medicinali (specialità di medicinali o galenici) per uso veterinario contenenti stilbenici e tireostatici".

A seguito di questo provvedimento, la CE, con la Direttiva 86/469/CEE<sup>(5)</sup>, decise di istituire dei piani annuali di controllo degli animali e delle carni fresche per la presenza di residui di medicinali veterinari e di altri contaminanti ritenuti un rischio per la salute del consumatore, oltre che un danno per la qualità delle carni. Fino ad allora, infatti, le modalità di controllo, la frequenza dei campionamenti e le concentrazioni massime consentite dei vari residui di farmaci erano disciplinate in maniera profondamente eterogenea nei vari Stati membri. Ciò comportava, fra l'altro, notevoli ostacoli agli scambi intracomunitari ed una distorsione delle condizioni di concorrenza tra produzioni. Pertanto fu necessario trovare una soluzione globale e uniforme per l'effettuazione dei controlli all'interno della Comunità per la ricerca di residui negli animali di allevamento, nelle carni e nei prodotti a base di carne, sia che questi prodotti fossero destinati al mercato nazionale degli Stati membri, oppure agli scambi intracomunitari. Venne, quindi, stabilito che gli Stati membri avrebbero dovuto elaborare un piano annuale di controllo tenendo conto della propria specifica situazione: tale piano, effettuato ancora oggi e va sotto il nome di Piano Nazionale Residui (PNR) [III].

La Direttiva 86/469/CEE sanciva, inoltre, che i campionamenti fossero eseguiti in modo ufficiale secondo criteri comuni per le diverse categorie di sostanze interessate e che i campioni venissero analizzati in laboratori ufficialmente autorizzati. Qualora una determinazione analitica avesse rilevato la presenza di residui di sostanze non consentite o di sostanze consentite in concentrazione superiore al limite ammesso (campione non conforme), si imponeva l'adozione di misure comuni intese ad accertarne la causa e ad eliminare il problema. Inoltre i prodotti coinvolti dovevano essere esclusi dal consumo.

Ciascun paese membro doveva, quindi, provvedere affinché la ricerca dei residui negli animali, nei loro escrementi e liquidi biologici nonché nei tessuti e nelle carni fresche venisse eseguita conformemente alle prescrizioni dettate dalla Direttiva 86/469/CEE. Inoltre, i singoli paesi della Comunità europea affidavano ad un servizio o organismo centrale il compito di coordinare l'esecuzione dei controlli previsti. Tale organismo doveva coordinare le attività dei servizi regionali effettivamente incaricati di effettuare i controlli, raccogliere i risultati e le informazioni da trasmettere alla Commissione europea, ed infine, e di primaria importanza, elaborare annualmente il piano stesso.

L'approvazione dei singoli piani nazionali veniva decisa dalla Commissione europea previa verifica della loro conformità ai requisiti della Direttiva CEE 86/469; in caso di

---

<sup>(5)</sup> Direttiva 86/469/CEE del 16 settembre 1986 concernente il controllo degli animali e delle carni fresche per la presenza di residui.

mancata approvazione lo Stato Membro avrebbe dovuto modificare e/o completare il piano proposto.

A partire dal 1988, quindi, anche l'Italia attua il proprio PNR che ha subito nel tempo modifiche derivanti dalla necessità di adeguamento alle nuove problematiche, nell'ambito dei residui, che negli anni si sono presentate. Nel tempo l'enorme progresso delle tecniche analitiche e i vari allarmi susseguitesesi nell'ambito della sicurezza alimentare, hanno portato, ad esempio, all'introduzione della ricerca di diossine, dei metaboliti dei nitrofuranici o di alcune molecole ad azione gestagena. Inoltre, nuovi settori produttivi sono stati progressivamente coinvolti nei campionamenti programmati tanto che i controlli che, inizialmente, riguardavano prevalentemente il settore bovino (1988), attualmente prevedono il settore suinicolo, ovi-caprino, equino, avicolo, della selvaggina allevata e dell'acquacoltura. Inoltre sono effettuati anche prelievi di alimenti quali il latte, miele e uova. Nel 1996<sup>(6)</sup> furono emanate due fondamentali Direttive promulgate dal Consiglio d'Europa (96/22/CE e 96/23/CE) che regolano ancor oggi la disciplina dei piani nazionali per il controllo dei residui. Queste due Direttive furono recepite nell'ordinamento nazionale solo qualche anno più tardi con il Decreto Legislativo n. 336 del 4 agosto 1999<sup>(7)</sup>. Tra le novità salienti, la Direttiva 96/23/CE comportava una riclassificazione delle sostanze da ricercare come riportato nelle Tabelle 2 e 3. Come si può osservare, nella Categoria A sono incluse le sostanze vietate in quanto considerate fonte di gravi rischi per la salute pubblica e per le quali non è, quindi, possibile fissare un LMR. Tra queste vi sono, ad esempio, gli steroidi che appartengono nello specifico alla categoria A3. Nella Categoria B, invece, si collocano i farmaci veterinari permessi provvisti di LMR ed i contaminanti ambientali (metalli pesanti, micotossine, pesticidi etc.).

---

<sup>(6)</sup> Direttiva 96/22/CE del 29 aprile 1996: "concernente il divieto di utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze beta-agoniste nelle produzioni animali e che abroga le direttive 81/602/CEE, 88/146/CEE". G.U.C.E. 23 Maggio 1996 n. L 125.

Direttiva 96/23/CE del 29 aprile 1996: "concernente le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti". G.U.C.E. 23 Maggio 1996 n. L 125

<sup>(7)</sup> Decreto Legislativo n. 336 del 4 agosto 1999: "Attuazione delle direttive 96/22/CE e 96/23/CE concernenti il divieto di utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze beta-agoniste nelle produzioni di animali e le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti". G.U.C.E. 30 Settembre n. L 230.

**Tabella 2. Classificazione delle sostanze come indicato nell'Allegato I della Direttiva 96/23/CEE: Categoria A – Sostanze ad effetto anabolizzante e non autorizzate**

<b>categoria A, 1</b>	stilbeni, loro derivati e loro sali ed esteri
<b>categoria A, 2</b>	agenti antitiroidei
<b>categoria A, 3</b>	Steroidi
<b>categoria A, 4</b>	lattoni dell'acido resorcilico (compreso lo zeranolo)
<b>categoria A, 5</b>	beta-agonisti
<b>categoria A, 6</b>	sostanze incluse nell'allegato VI del regolamento (CEE) n. 2377/90 del Consiglio, del 26 giugno 1990 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Con l'abolizione del Regolamento 2377/90 questi farmaci veterinari sono attualmente inclusi nella Tabella 2 dell'Allegato del Regolamento (UE) n. 37/2010 della Commissione del 22 Dicembre 2009

**Tabella 3. Classificazione delle sostanze come indicato nell'Allegato I della Direttiva 96/23/CEE: Categoria B – Farmaci veterinari<sup>a</sup> e contaminanti ambientali**

<b>categoria B, 1</b>	sostanze antibatteriche, compresi sulfamidi chinoloni	
<b>categoria B, 2</b>	altri prodotti medicinali veterinari:	
	<b>B, 2a</b>	antelmintici
	<b>B, 2b</b>	Coccidiostatici, compresi i nitroimidazoli
	<b>B, 2c</b>	Carbammati e piretroidi
	<b>B, 2d</b>	Tranquillanti
	<b>B, 2e</b>	Antinfiammatori non steroidei (AINS)
	<b>B, 2f</b>	Altre sostanze esercitanti un'attività farmacologica
<b>categoria B, 3</b>	altre sostanze e agenti contaminanti per l'ambiente:	
	<b>B, 3a</b>	composti organoclorurati, compresi i PCB
	<b>B, 3b</b>	composti organofosforati
	<b>B, 3c</b>	elementi chimici
	<b>B, 3d</b>	micotossine
	<b>B, 3e</b>	coloranti
	<b>B, 3f</b>	Altri

<sup>a</sup> Compresa le sostanze non registrate utilizzabili ai fini veterinari

In seguito alle indicazioni derivanti dai risultati analitici dei controlli effettuati, la determinazione dei residui di stanozololo e 16beta-OH-stanozololo (Cat. A3) entra per la prima volta nel PNR del 2000 nella matrice urina di vitelli e vitelloni con un limite di azione di 1 µg/L. Nel 2001 il controllo viene esteso anche ai settori suinicolo ed ovi-caprino con un aumento del limite di azione a 2 µg/L. Nel 2007 la ricerca delle sostanze di categoria A3 nei campioni di urina ovi-caprini, viene limitata al solo trenbolone e ai suoi metaboliti, escludendo quindi lo stanozololo. Dal 2007 il controllo è effettuato nelle urine di vitelli e vitelloni in allevamento e di suini da ingrasso in allevamento e in macello, con un limite di azione di 2 µg/L.

## 2.2 I Controlli Analitici

L'istituzione dei Piani Nazionali di controllo comportava l'esistenza di un sistema di laboratori in grado di garantire un'adeguata qualità del dato anche per determinazioni analitiche complesse come quelle riguardanti la presenza di sostanze in tracce. Negli anni, quindi l'UE si è apprestata ad una intensa attività legislativa riguardante i criteri di qualità in conformità ai quali i laboratori incaricati dello svolgimento delle analisi ufficiali dei residui devono operare. Ogni Stato membro, dal 1° novembre 1998, era in sostanza obbligato a prendere i provvedimenti necessari affinché:

- i laboratori fossero conformi ai criteri generali stabiliti dalla norma europea UNI CEI EN 45001, ovvero fossero accreditati;
- fossero designati gli organismi responsabili della valutazione e del riconoscimento dei laboratori preposti al controllo ufficiale. Tali organismi dovevano soddisfare i criteri generali stabiliti dalla norma europea UNI CEI EN 45003;
- la valutazione dei laboratori di prova doveva avvenire applicando requisiti stabiliti dalla norma UNI CEI EN 45002.

In Italia, nel novembre 1998, solo alcune strutture operavano in conformità alla norma EN 45001 o erano in attesa di ricevere gli *audit* (verifiche ispettive) da parte dell'unico organismo operante sul territorio nazionale in conformità alla UNI CEI EN 45003: il SINAL (Sistema Nazionale per l'Accreditamento dei Laboratori di prova).

Nel frattempo la Direttiva 96/23/CE cercò di migliorare l'efficacia dei piani di sorveglianza messi in opera ogni anno degli Stati membri, assicurare la comparabilità dei risultati ottenuti ed armonizzare le modalità di applicazione per il campionamento.

A tal fine, venne emanata la Decisione 98/179/CE<sup>(8)</sup> la quale, all'articolo 1, stabiliva che le analisi dei campioni dovevano essere effettuate esclusivamente presso laboratori per il controllo ufficiale dei residui riconosciuti dall'autorità competente, ribadendo la necessità di assicurare la qualità e la comparabilità dei risultati analitici. I laboratori autorizzati erano, quindi, tenuti a partecipare a un programma esterno, riconosciuto sul piano internazionale, di valutazione qualitativa e di accreditamento. Tale obiettivo doveva essere conseguito attraverso l'accREDITamento (da ottenersi prima del 1° gennaio 2002) e la partecipazione degli stessi a circuiti interlaboratorio (*proficiency testing schemes*), organizzati dai Laboratori Nazionali di Riferimento (LNR) o dai Laboratori Comunitari di Riferimento (LCR) [IV].

Con la Decisione 98/179/CE si richiedeva dunque che, a partire dal 2002, i laboratori per il controllo ufficiale dovessero essere accREDITati secondo la UNI CEI EN ISO/IEC 17025 che, dal 2000, ha sostituito la EN 45001.

La norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 è di tipo orizzontale e, quindi piuttosto generica, non essendo indirizzata ad un settore analitico in particolare. Da questa considerazione, si sviluppa dunque un punto fondamentale della strategia dell'UE, che richiede ai propri laboratori ufficiali ulteriori requisiti di qualità, considerando l'ambito analitico nei quali questi operano, ovvero la ricerca di sostanze in tracce (residui).

Prima del 1993, i criteri analitici da applicare ai metodi di riferimento erano riportati nella Decisione 89/610/CEE<sup>(9)</sup>.

Dal 1993 entrarono poi in vigore la Decisione 93/256/CE<sup>(10)</sup> e la Decisione 93/257/CE<sup>(11)</sup>.

Nel 2002 dopo una serie di rivisitazioni viene pubblicata la Decisione 2002/657/CE<sup>(12)</sup> che abroga sia la Decisione 93/256/CEE che la 93/257/CEE e, all'articolo 5, ribadisce che: "Gli Stati membri garantiscono la qualità dei risultati delle analisi dei campioni prelevati a norma della Direttiva 96/23/CE, in particolare attraverso la sorveglianza delle analisi e/o la calibrazione dei risultati in ossequio al capitolo 5.9 della ISO 17025" [V].

---

<sup>(8)</sup> 98/179/CE: Decisione della Commissione del 23 febbraio 1998 recante modalità d'applicazione per il prelievo ufficiale di campioni al fine della sorveglianza su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei prodotti di origine animale

<sup>(9)</sup> 89/610/CEE: Decisione della Commissione, del 14 novembre 1989, che stabilisce i metodi di riferimento e la lista dei laboratori nazionali da impiegare per la ricerca dei residui.

<sup>(10)</sup> 93/256/CE: Decisione della Commissione, del 14 aprile 1993, che stabilisce i metodi da impiegare per la ricerca dei residui di sostanze ad azione ormonica e di sostanze ad azione tireostatica.

<sup>(11)</sup> 93/257/CE Decisione della Commissione, del 15 aprile 1993, che stabilisce i metodi di riferimento e l'elenco dei laboratori di riferimento nazionali per la ricerca dei residui.

<sup>(12)</sup> 2002/657/CE: decisione della Commissione, del 12 agosto 2002, che attua la Direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati (GUCE L221/8 del 17.08.2002). Precedentemente, con il nome di SANCO/1085/2000, era stata diffusa una bozza di revisione della Decisione 93/256/CE.

La Decisione 2002/657/CE [VI] si configura come un provvedimento completo e complesso specifico per le determinazioni in tracce che rappresenta un punto di riferimento sia per i laboratori ufficiali che non, all'interno dell'UE e anche al di fuori dei suoi confini. Infatti, oltre a indicare i parametri di prestazione che devono essere determinati e i loro limiti di accettabilità, essa descrive anche il piano sperimentale per ottenerli. Indica, inoltre, i criteri da seguire nell'interpretazione dei risultati, modulando le prescrizioni anche in funzione della categoria delle sostanze analizzate (sostanze vietate appartenenti alla categoria A o permesse della categoria B).

La Decisione supera, inoltre, la precedente distinzione tra i metodi di *routine* e di riferimento, distinzione riportata nella stessa Direttiva 96/23/CE (art. 15), lasciando solo la differenziazione tra metodi di *screening* e di *conferma* [VI].

I metodi di *screening* sono usati per determinare la presenza di un analita o di una classe di analiti al di sopra o al di sotto del livello di interesse (LMR, presenza, etc..). Sono caratterizzati dalla capacità di analizzare un gran numero di campioni allo scopo di individuare quelli sospetti da processare, successivamente, con un metodo di conferma. Sono, quindi, sostanzialmente concepiti per evitare campioni falsi negativi (falsi conformi). L'utilizzo di un metodo di *screening* non è ovviamente obbligatorio. Tuttavia, quando disponibili, essi permettono di ottenere una maggiore produttività a costi contenuti. I metodi di *conferma*, invece, devono fornire informazioni strutturali univoche e definitive per l'identificazione e, se necessario, per il dosaggio dell'analita al livello d'interesse. Proprio per garantire questo, al contrario dello screening per cui non esistono prescrizioni particolari, la Decisione stabilisce che, per un esame di conferma, possano essere utilizzate solo determinate tecniche strumentali.

Con la 2002/657/CE l'obiettivo della Commissione è stato quello di garantire l'adozione di procedure analitiche con performances prestabilite e controllate (*performances-based approach*). La filosofia perseguita dall'UE si configura quindi, da un lato, come molto flessibile dal punto di vista delle scelte di ciascun laboratorio che adottano protocolli analitici interni, ma dall'altro come estremamente rigida sui criteri minimi di qualità da rispettare affinché un metodo di prova sia da considerarsi adeguato per il controllo ufficiale dei residui negli alimenti. Tutto ciò si è reso necessario anche per il fatto che l'utilizzo di metodi standardizzati ufficialmente riconosciuti (di riferimento), che costituirebbe già di per sé una garanzia di confrontabilità del dato analitico, si era dimostrata una strada inadatta in virtù del continuo progresso tecnico-scientifico di questo settore della chimica analitica. Inoltre la strategia dell'Unione permette una maggiore flessibilità rispetto alle

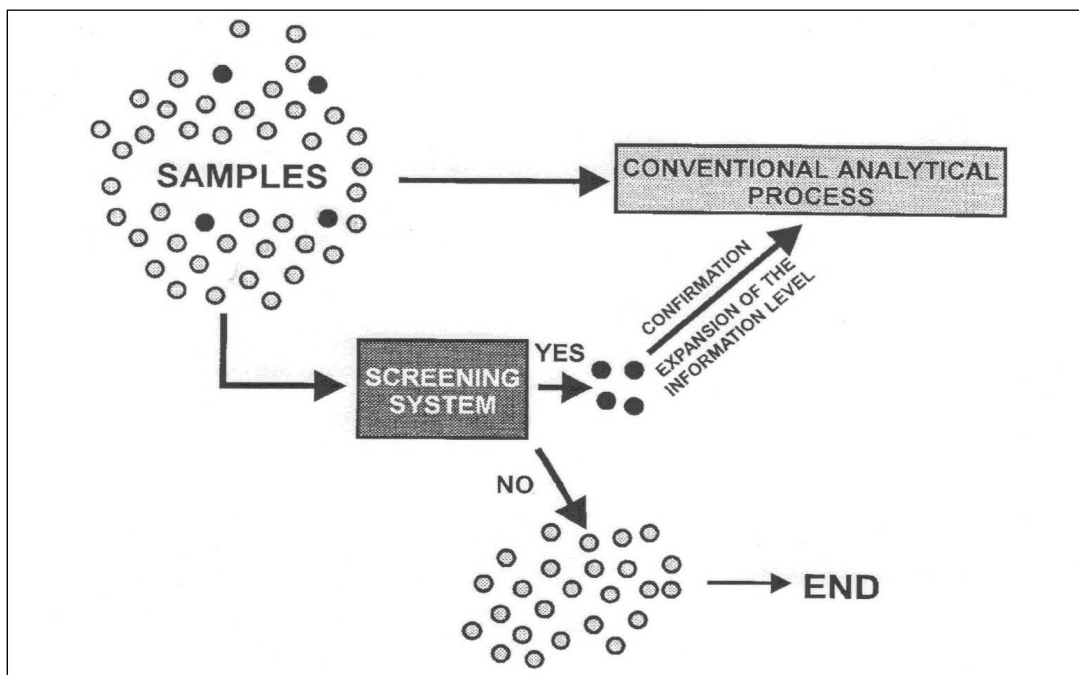
varie allerte planetarie che via via sono presentate anche su analiti/matrici inusuali nell'ambito della sicurezza alimentare. In conclusione, anche se molta strada rimane ancora da percorrere nell'armonizzazione e nella semplificazione delle norme che fissano i requisiti tecnici riguardanti gli obblighi dei laboratori, l'impegnativa strategia comunitaria ha comunque fatto registrare imponenti miglioramenti. A dimostrazione di ciò, un esempio per tutti è rappresentato dall'abbassamento dei livelli medi di controllo per le sostanze vietate di oltre un ordine di grandezza dall'istituzione dei piani nazionali (1988) ad oggi.

### **2.3 I metodi analitici di screening: Validazione e Tecniche**

La normativa europea vigente, riguardo alle *performances* dei metodi analitici per la ricerca di residui negli animali vivi e nei loro prodotti (Decisione 2002/657/CE), prevede espressamente l'utilizzo di metodi di *screening*. Tecnicamente i metodi di conferma, generalmente più sofisticati e costosi, possono essere utilizzati anche come primo approccio analitico e, nel caso in cui non siano disponibili adeguati metodi di *screening*, questo avviene sistematicamente. Tuttavia, quando è possibile, è conveniente avere a disposizione procedure di *screening* che permettano di ottenere una maggiore produttività e costi più contenuti in tempi più brevi.

Sostanzialmente il flusso dei campioni può essere schematizzato come in Figura 5, dove per *conventional analytical process* si intende il metodo di conferma attuato prevalentemente con tecniche cromatografiche (HPLC o GC). Il ruolo del metodo di *screening* è quindi quello di selezionare, tra la massa dei campioni in arrivo, quelli sospetti che poi verranno rianalizzati con una idonea procedura di conferma.





**Figura 5. Flusso dei campioni in laboratorio: metodi di screening e di conferma**

Per i metodi di conferma, la Decisione 2002/657/CE prevede l'utilizzo solo di determinate tecniche analitiche strumentali elencate nella Tabella 1 della stessa Decisione: tali tecniche sono quelle in grado di fornire adeguate garanzie di riconoscimento strutturale delle molecole da determinare, come ad esempio, l'utilizzo della spettrometria di massa. Per lo *screening*, invece, non è prevista alcuna restrizione da questo punto di vista, ma sono altresì richieste rigide *performances* metodologiche che sono solo meno numerose rispetto alla conferma, come si evince dalla Tabella 4 (Tabella 9 della Decisione 2002/657/CE). Essendo spesso di tipo qualitativo, i metodi di screening non necessitano di approfondimenti sulle caratteristiche che sono invece fondamentali per le procedure quantitative (es. esattezza e precisione).

**Tabella 4. Classificazione di metodi analitici in base alle caratteristiche di rendimento che devono essere determinate nella validazione di un metodo**

		CC $\beta$	CC $\alpha$	Esattezza/ Recupero	Preci- sione	Selettività/ Specificità	Applicabilità/ Robustezza/ Stabilità
<b>Metodi qualitativi</b>	S	+	-	-	-	+	+
	C	+	+	-	-	+	+
<b>Metodi quantitativi</b>	S	+	-	-	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+

S = metodi di screening; C = metodi di conferma; + = determinazione obbligatoria; - = determinazione facoltativa.

Lo *screening* è un test a risposta binaria (negativo/sospetto) che, quindi, non presenta le problematiche legate ad un esito quantitativo, quale quello ottenuto con i metodi di conferma.

Riguardo ai parametri della Tabella 4, essi devono essere determinati durante lo studio di validazione. La validazione di un metodo è la “conferma attraverso l’esame e l’apporto di evidenza oggettiva che i requisiti particolari per l’utilizzazione prevista siano soddisfatti”. Le definizioni dei parametri di *performances* importanti per un metodo di Screening qualitativo sono riportati di seguito.

- **Limite di decisione ( $CC\alpha = \text{Critical Concentration } \alpha$ ):** limite al quale e oltre il quale è possibile concludere con una probabilità di errore pari ad  $\alpha$  che un campione è non conforme. L’errore alfa rappresenta la probabilità che il campione sottoposto ad analisi sia conforme, sebbene sia stata ottenuta una misura non conforme (decisione di falsa non conformità o falsa positività). Come si vede in Tabella 4 il  $CC\alpha$  non è un parametro obbligatorio per lo screening qualitativo. Tuttavia, come vedremo, esso è utile per definire il cut-off del metodo.

- **Capacità di rilevazione ( $CC\beta = \text{Critical Concentration } \beta$ ):** è il contenuto più piccolo della sostanza che è possibile rilevare, identificare e/o quantificare in un campione con la probabilità di un errore  $\beta$ . L’errore  $\beta$  rappresenta la probabilità che il campione sottoposto ad analisi sia effettivamente non conforme, sebbene sia stata ottenuta una misura conforme (decisione di falsa conformità o falsa negatività). Questo parametro è fondamentale per i metodi di screening in quanto, se una decisione falsa positiva comporta un’analisi “inutile” di un campione con un metodo di conferma, diversamente una decisione falsa negativa ha come ripercussione la commercializzazione di alimenti potenzialmente contaminati. La massima percentuale di errore beta che viene ammessa dalla Decisione 2002/657/CE è il 5%. Per metodi qualitativi, la verifica di tale percentuale è generalmente effettuata sulla base dei risultati ottenuti dall’analisi di almeno venti bianchi-campione e di almeno venti fortificati al livello di interesse.

- **Robustezza:** è la capacità posseduta da un metodo di non essere influenzato significativamente, in termini di risultati finali, da variazioni deliberatamente introdotte nelle sue fasi di effettuazione. Questo parametro serve a qualificare l’affidabilità di una procedura durante il suo utilizzo routinario o la possibilità di riprodurre il metodo analitico in differenti laboratori e in tempi diversi, senza una differenza significativa nei risultati.

Sperimentalmente la valutazione della robustezza può essere ottimizzata mediante l'utilizzo di tecniche di disegno sperimentale, come suggerito dalla stessa Decisione 2002/657/CE (schema di *Youden*).

- **Specificità:** è l'abilità di un metodo di rilevare solo quello che intende rilevare, ovvero la sua capacità di non risentire della presenza di interferenti o di altri componenti diversi dagli analiti in esame. La mancanza di specificità si ripercuote sulla presenza di campioni falsi positivi e falsi negativi. Se per i falsi negativi, come abbiamo visto, la Decisione 2002/657/CE impone una percentuale massima del 5%, il controllo della percentuale dei falsi positivi è importante ai fini della gestione della prova stessa. Infatti, per lo screening una percentuale elevata di falsi positivi, vanifica l'utilità della prova stessa, costringendo a rianalizzare inutilmente i campioni con un metodo di conferma.

Tra le tecniche di screening più utilizzate, soprattutto nel settore della ricerca di sostanze ad azione anabolizzante (estrogeni, androgeni, beta-agonisti etc...) ci sono i metodi immunoenzimatici e, in particolare, l'ELISA.

La tabella che segue riporta nello specifico quali sono le tecniche di screening e di conferma per la ricerca di stanozololo e dei suoi metaboliti nelle urine bovine e suine così come riportato nel PNR.

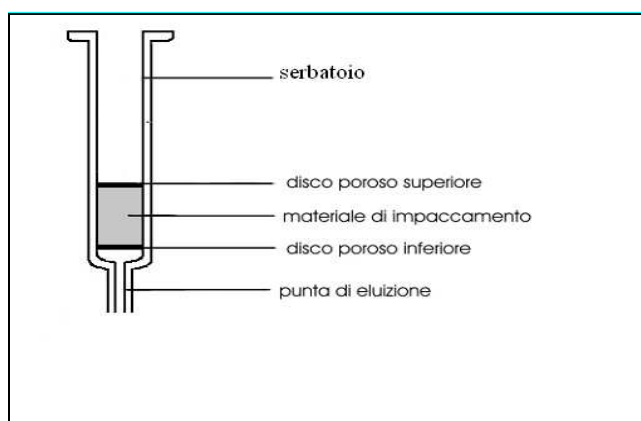
**Tabella 5. Tecniche di Screening e Conferma per la ricerca di Stanozololo (PNR)**

<b>Categoria residui</b>	<b>Molecola</b>	<b>Matrice</b>	<b>Tecniche di screening</b>	<b>Tecniche di conferma</b>	<b>CC<math>\beta</math> (screening)</b>	<b>Limite di azione</b>	<b>Categorie animali</b>
<b>A3</b>	Stanozololo e metaboliti	URINA	ELISA	GC MS/MS LC-MS/MS	2.0 $\mu$ g/L	presenza	Bovini e suini

### 2.3.1 Preparazione del campione

Prima di essere analizzati, i campioni biologici possono essere purificati allo scopo di rimuovere i potenziali interferenti ed aumentare quindi la selettività e la sensibilità del metodo.

La purificazione con il metodo SPE (solid phase extraction) è un metodo di preparazione del campione messo a punto a metà degli anni '70 come approccio alternativo all'estrazione liquido-liquido. La SPE concentra e purifica gli analiti in soluzione mediante adsorbimento su cartucce usa e getta ed eluizione con adeguati solventi. Le caratteristiche di una generica colonnina SPE sono schematizzate in Figura 6.



**Figura 6. Schematizzazione di una Colonnina SPE**

L'estrazione per adsorbimento è il processo fisico che s'instaura tra una fase solida (stazionaria) e una fase liquida (mobile), la cui fase solida (impaccata in una colonnina) ha un'affinità maggiore per il composto da isolare rispetto al solvente in cui lo stesso composto è disciolto. Il campione da analizzare è fatto percolare attraverso la fase solida e gli analiti sono trattenuti sulla superficie del materiale adsorbente mentre molti altri composti co-presenti nel campione eluiscono. Ciò si ottiene grazie ad interazioni specifiche tra i gruppi funzionali dei composti e la fase solida. Successivamente, gli analiti sono eluiti con un opportuno solvente in grado di scindere i legami tra sostanza ed adsorbente. Il risultato è la purificazione e la concentrazione delle sostanze isolate dal materiale adsorbente. La purificazione può essere effettuata secondo due differenti meccanismi, che si basano sulla *ritensività* e sulla *non ritensività* degli analiti nei confronti della fase

stazionaria. Nel primo caso gli analiti vengono trattenuti in seguito alle interazioni chimiche che si instaurano con i gruppi funzionali della fase stazionaria, nel secondo caso invece gli analiti interagiscono con la fase stazionaria in maniera più blanda e di conseguenza non vengono trattenuti dalla fase stessa. Si distinguono tre tipi principali di fase stazionaria:

- *fase diretta* che sfrutta una fase stazionaria polare ed una fase mobile apolare;
- *fase inversa* costituito da una fase stazionaria apolare e da una fase mobile polare;
- *scambio ionico* che comporta lo scambio di un soluto organico caricato con un solvente polare o apolare con un adsorbente di carica opposta.

### 2.3.2 I test immunoenzimatici ELISA

ELISA è l'acronimo dell'espressione Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay. Si tratta di una tecnica di analisi immunologica, usata per rilevare l'eventuale presenza di un dato antigene in un campione, oppure per misurare la concentrazione di anticorpi nel plasma sanguigno, come ad esempio nei test per l'AIDS.

L'ELISA unisce la specificità della reazione antigene-anticorpo (reazione immunologica) con la sensibilità di un semplice dosaggio spettrofotometrico di un enzima. Nell'ambito dei vari metodi immunoenzimatici, la denominazione ELISA si riferisce esclusivamente ai sistemi in fase eterogenea, sistemi in cui anticorpi o antigeni sono adsorbiti o legati ad un substrato solido [VII]. L'**Antigene** è una molecola che può legarsi ad un specifico anticorpo, grazie ad una struttura specifica detta **epitopo**. Una singola molecola di antigene può contenere diversi epitopi riconosciuti da anticorpi differenti.

L'**anticorpo** (o **immunoglobulina**) è una glicoproteina del sistema immunitario a forma di "Y" con funzione di eliminare elementi estranei come virus e batteri, che sono in grado di riconoscere ogni antigene legato al patogeno come un bersaglio. Gli anticorpi sono tetrameri, cioè costituiti da proteine formate da 4 catene: 2 corte (leggere) e 2 lunghe (pesanti). Ogni catena possiede una parte variabile e una fissa. La parte costante (dominio effettore) avvia la reazione di difesa immunitaria dell'anticorpo, mentre la catena variabile (dominio legante) è la parte dove risiede il sito di combinazione con l'antigene e pertanto ne determina la specificità. L'ELISA ha un'elevata selettività nei confronti degli analiti da determinare. L'anticorpo, infatti, è in grado di riconoscere specificamente l'antigene che ha portato alla sua formazione. La costante di affinità per la formazione dei complessi

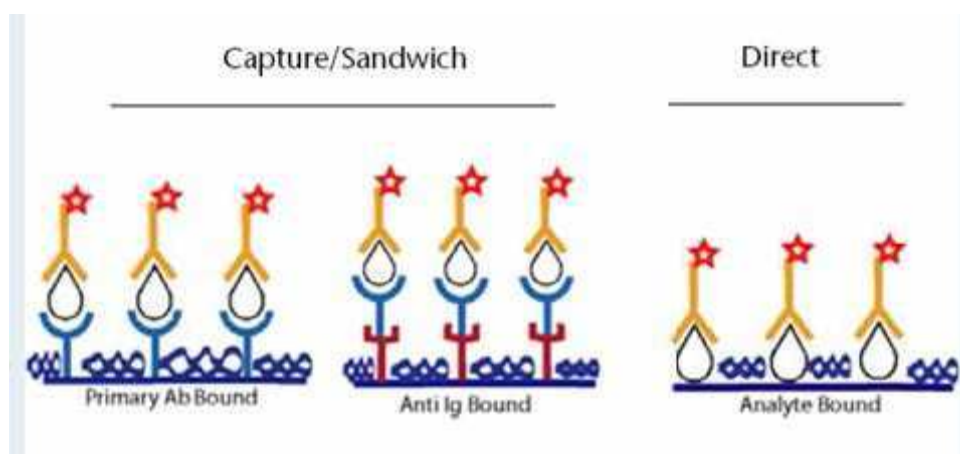
antigene-anticorpo è estremamente elevata e, benché la reazione sia di tipo reversibile, l'equilibrio è di gran lunga spostato verso la formazione dei complessi antigene-anticorpo. La tecnica si basa sul fatto che, con adatti procedimenti, è possibile coniugare gli anticorpi di un siero con alcuni enzimi (perossidasi, fosfatasi alcalina, beta-galattosidasi) senza alterarne la capacità di combinazione con gli antigeni corrispondenti. Gli enzimi utilizzati sono in grado di catalizzare una reazione su un idoneo substrato (ad esempio la tetrametilbenzidina) con la formazione di un prodotto terminale colorato che permette così di evidenziare la quantità di antigene presente. Nei formati commerciali (Figura 7) le reazioni vengono, di norma, eseguite all'interno di pozzetti di polivinile o polistirene (micropiastre da 12 strip da 8 pozzetti ciascuna per un totale di 96 pozzetti) su cui sono adesi, a seconda dei casi, gli anticorpi specifici per l'antigene di interesse o l'antigene stesso.



**Figura 7. Formato commerciale con micropiestra a 96 pozzetti di un Kit ELISA**

All'interno dei pozzetti vengono incubati i campioni da analizzare (plasma, siero, omogenati tissutali, latte etc.) e gli opportuni reagenti intervallati da lavaggi atti a rimuovere l'eccesso. Per ultimo si aggiunge il substrato che dà origine al prodotto colorato. La positività è valutata analizzando la comparsa o meno del colore, in seguito alla reazione catalizzata dall'enzima sul substrato. La tecnica immunoenzimatica può essere impiegata per la ricerca sia di antigeni che anticorpi e si presta a numerose variazioni per altrettante

applicazioni diverse. I test ELISA possono essere, infatti, di tipo competitivo o non competitivo (*sandwich*). (Figura 8)



**Figura 8. Rappresentazione schematica di un saggio ELISA tipo *sandwich* (non competitivo) e competitivo diretto**

I saggi tipo *sandwich* sono generalmente utilizzati per la ricerca di molecole ad alto peso molecolare, come ad esempio, le proteine. Quando invece gli antigeni sono molecole a basso peso molecolare, come nel caso della ricerca di residui di farmaci o ormoni, i saggi sono sempre di tipo competitivo e possono essere a loro volta ulteriormente classificati in diretti e indiretti. Per i *test* competitivi, maggiore è la concentrazione di antigene, minore sarà il numero di immunocomplessi rilevabili per cui, contrariamente a quanto avviene generalmente in chimica analitica, esiste una proporzionalità inversa tra il segnale registrato (assorbanza) e concentrazione.

### **2.3.2.1 ELISA competitivo di tipo diretto**

L'anticorpo specifico per l'analita è adsorbito sulla superficie dei pozzetti della micropietra. Il campione in esame, nel quale si deve determinare la presenza dell'analita (antigene libero), e una quantità prefissata di coniugato (antigene legato all'enzima) vengono depositati nei vari pozzetti. Durante la fase di incubazione, l'antigene coniugato compete con l'antigene libero, eventualmente presente nel campione, per i siti di legame

degli anticorpi adesi nei pozzetti. Quindi, il materiale non reagito viene rimosso grazie ad opportuni lavaggi e la quantità di analita coniugato, legata dagli anticorpi immobilizzati, è quantificata mediante l'aggiunta di un substrato che forma un prodotto colorato. La reazione viene arrestata mediante l'aggiunta di una soluzione acida (*stop solution*) e la lettura spettrofotometrica è effettuata a 450 nm (giallo).

### **2.3.2.2. ELISA competitivo di tipo indiretto**

In questo caso è l'analita, generalmente legato ad una proteina carrier come l'albumina di siero bovino, ad essere adsorbito sulla superficie dei pozzetti. Il campione viene addizionato nei pozzetti e successivamente si aggiunge una quantità prefissata di anticorpo specifico per l'analita. Durante la fase di incubazione, gli anticorpi in soluzione si ripartiscono tra l'analita libero, eventualmente presente nel campione in analisi, e l'analita immobilizzato sulla superficie solida del pozzetto. Tutto ciò che non ha reagito durante l'incubazione viene successivamente rimosso mediante lavaggi e la quantità di anticorpo legato all'analita specifico nel pozzetto viene quantificata mediante aggiunta di un secondo anticorpo enzima-coniugato che si lega al primo. In seguito ad una seconda fase di incubazione e ai lavaggi, si aggiunge il substrato, si arresta la reazione e si procede alla lettura. Anche in questo caso, la quantità di colore sviluppatosi risulterà inversamente proporzionale alla quantità di analita libero nel campione. Sempre nei saggi competitivi di tipo indiretto, in alcuni casi, nella superficie dei pozzetti sono adesi, invece che gli antigeni, degli anticorpi in grado di legare anticorpi anti-antigene. Durante l'esecuzione del *test*, si aggiunge la soluzione contenente gli anticorpi anti-antigene che si legano agli anticorpi adesi. Con l'aggiunta simultanea del coniugato e del campione (in cui può essere eventualmente presente l'analita libero si origina la reazione di competizione per i siti anticorpali già vista sopra. Si procede infine ai lavaggi e all'aggiunta del substrato. La reazione viene arrestata mediante una soluzione acida (*stop solution*), che muta il colore da blu a giallo e la lettura spettrofotometrica è effettuata a 450 nm.



## 2.4 Il Controllo di Qualità dei Metodi Analitici

Terminata la prima fase (ottimizzazione) e la seconda (validazione), il metodo può essere finalmente inserito tra quelli utilizzati dal laboratorio nelle analisi di *routine* per il controllo ufficiale (PNR).

Lo scopo del controllo di qualità (CQ) è, in linea generale, quello di documentare la variabilità nel tempo delle osservazioni di determinate grandezze. Attuato su scala sistematica all'*interno* del laboratorio (ICQ), il controllo di qualità comprende i sistemi ed i metodi adottati al fine di individuare tempestivamente un qualunque evento che pregiudichi l'accuratezza (esattezza e precisione) del metodo analitico, correntemente utilizzato, rispetto a ciascun analita d'interesse. Il controllo di qualità *esterno* (ECQ), d'altra parte, si concretizza principalmente mediante la partecipazione del laboratorio a Studi Collaborativi (*ring test*), in cui si confrontano le prestazioni di laboratori diversi.

L'adozione di procedure di CQ nel laboratorio consente, pertanto, di monitorare i risultati prodotti nell'attività analitica di routine del laboratorio, garantendo che essi siano sotto controllo statistico e affidabili nel tempo.

### 2.4.1 Il controllo di qualità interno (ICQ)

Il controllo di qualità interno (ICQ) è un aspetto fondamentale per i laboratori accreditati, e deve essere regolato da specifiche procedure. Esso è connesso, in qualche modo, alla fase di validazione in quanto, permette di valutare in modo esaustivo la robustezza del metodo nel tempo, registrando le prestazioni della procedura per i vari operatori, strumenti, lotti di reagenti e per una gamma molto più rappresentativa di matrici reali. Questi fattori, infatti, non possono essere valutati nell'esperimento di robustezza (schema di Youden) in quanto ossevabili solo dopo un lungo periodo di tempo.

Gli elementi fondanti del ICQ sono generalmente rappresentati dai campioni per il CQ e dalle carte di controllo.

I **campioni di controllo** possono includere:

1) *bianchi reagenti*: sono campioni costituiti dall'insieme dei reagenti sottoposti all'intero processo analitico (a partire dall'estrazione) nelle stesse condizioni e con gli stessi materiali impiegati per l'analisi dei campioni reali, in assenza della matrice oggetto di esame;

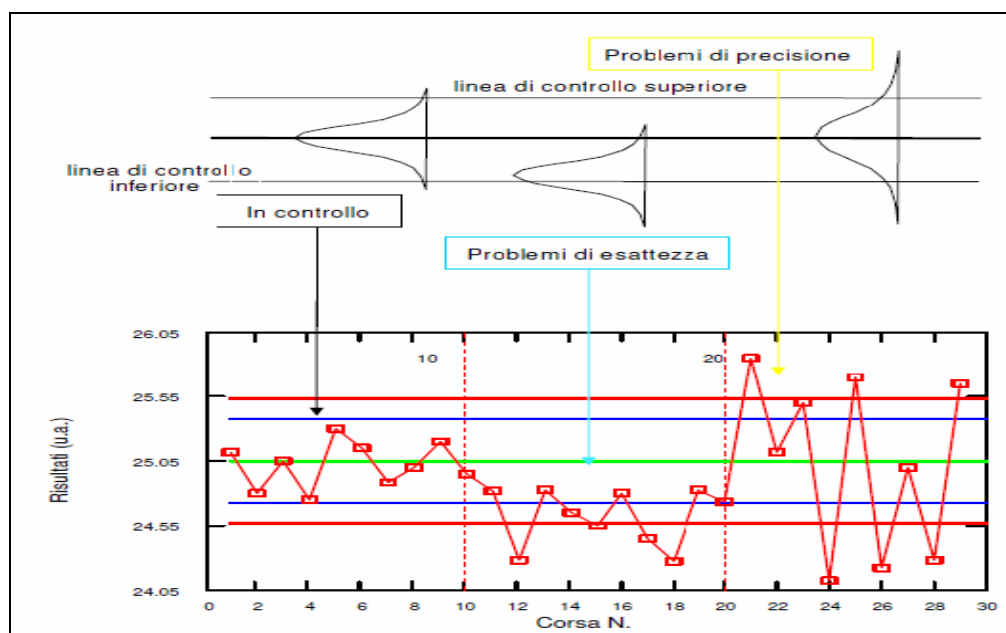
2) *bianchi campione*: sono campioni ottenuti dall'applicazione del processo analitico su una matrice in cui l'analita è assente;

3) *campioni di controllo a concentrazione nota di analita*: sono campioni ottenuti dall'applicazione del processo analitico su una matrice in cui è contenuto l'analita in concentrazione nota. Questi ultimi possono comprendere, in particolare:

- **materiali di riferimento certificati**: sono campioni contenenti l'analita in concentrazione nota e certificata da organismi internazionali (NIST, BCR etc.)
- **materiali di riferimento non certificato**: rappresentati da una matrice a composizione molto simile alla matrice d'interesse, in cui l'analita è presente in concentrazione nota, mediante determinazione con un metodo validato, ma senza la relativa stima dell'incertezza ad un livello di confidenza indicato;
- **matrici addizionate** (campione addizionato o fortificato): sono campioni ottenuti dall'applicazione del processo analitico ad una matrice identica a quella oggetto di analisi, ma priva dell'analita di interesse (bianco campione), alla quale viene addizionato in laboratorio l'analita di interesse in concentrazione nota, generalmente prossima al valore del parametro imposto per legge. Il ricorso alla matrice addizionata si giustifica nel caso di difficoltà di reperimento o di esiguità dei quantitativi di materiali di riferimento certificati e non;
- **campioni di laboratorio a concentrazione nota di analita**: sono campioni conservati da precedenti analisi effettuate in laboratorio contenenti l'analita in concentrazione nota.

Le **carte di controllo** sono uno degli strumenti più usati per monitorare e controllare le analisi di routine all'interno di un laboratorio chimico. La carta più nota è sicuramente quella di Shewhart: si tratta di un grafico bidimensionale in cui sull'asse delle ordinate sono riportati i risultati delle misure consecutive ottenute a ogni seduta da una certa procedura analitica applicata ad un campione di controllo del tipo di quelli precedentemente descritti. Sull'asse delle ascisse sono invece riportati i tempi successivi in cui le misure sono state effettuate, oppure il numero ordinale della seduta. Generalmente, i dati ottenuti durante la validazione servono anche per definire gli intervalli di accettabilità dei parametri monitorati dalla carta di controllo. Nel grafico la linea centrale  $\bar{x}$  rappresenta il valore medio (segnali o concentrazioni) ottenuto durante lo studio di validazione ed "s"

rappresenta lo scarto tipo (deviazione standard). Oltre alla linea centrale sono presenti altre due coppie di linee orizzontali: una coppia corrisponde ai valori di " $\bar{x} \pm 2s$ " definiti Limiti di Attenzione Superiore (UWL) e Limite di Attenzione Inferiore (LWL) e l'altra coppia corrisponde ai valori di " $\bar{x} \pm 3s$ " definiti Limite di Controllo Superiore (UCL) e Limite di Controllo Inferiore (LCL). Le regioni esterne ed interne ai due Limiti di Controllo identificano, rispettivamente, i "valori non attesi" e i "valori attesi" in base alla variabilità, per così dire, naturale del processo. L'andamento fornito dal grafico è quindi uno strumento importante per stabilire quando un processo abbia generato, per la grandezza d'interesse, un valore anomalo (fuori controllo). Sebbene la carta non fornisca, com'è ovvio, le cause che hanno generato l'elemento fuori controllo, indicazioni utili possono derivare dall'interpretazione dell'andamento nel tempo dei valori riportati sulla carta (Figura 9). Essa consente, in ogni caso, di segnalare in tempo reale eventuali anomalie consentendo al responsabile del laboratorio di non procedere eventualmente a emettere gli esiti analitici per i campioni incogniti appartenenti a quel *batch*. Infine va sottolineato che se molta letteratura esiste sulle carte di controllo nell'ambito dei tradizionali metodi quantitativi (HPLC, GC, AAS etc), molto meno è stato scritto per i metodi qualitativi biochimici. L'importanza assunta da queste tecniche, tuttavia, anche nell'ambito delle analisi ufficiali comporta l'adozione di adeguate procedure per il controllo di qualità interno.



**Figura 9. Esempio di carta di controllo di Shewhart per un metodo analitico**

#### **2.4.2 Il controllo di qualità esterno (ECQ)**

Il controllo di qualità (ECQ) si attua mediante la partecipazione a circuiti interlaboratorio, che rappresentano uno strumento indispensabile per la valutazione esterna nell'affidabilità dei risultati analitici e per il miglioramento delle prestazioni di un laboratorio. La partecipazione ai circuiti interlaboratorio è una modalità indicata della norma ISO 17025/2005. Tali circuiti si possono utilizzare per molteplici scopi: per la validazione dei metodi di prova, per l'assicurazione della qualità dei dati e per la valutazione della competenza del personale. La partecipazione a programmi collaborativi agevola, inoltre, l'individuazione di eventuali problemi di tipo analitico, difficilmente evidenziabili con le prove intralaboratorio, stimolando il miglioramento continuo delle prestazioni. Nei campioni inviati ai laboratori partecipanti, la presenza dell'analita/i è generalmente *incurred*, ovvero naturale. Ciò è importante in quanto, in alcuni casi, la validazione viene effettuata mediante matrici fortificate in modo artificiale, non garantendo così le prestazioni del metodo per campioni in cui le sostanze da ricercare siano invece naturalmente presenti e che, quindi hanno subito i processi metabolici dell'animale a cui sono state somministrate.

Il controllo di qualità esterno non potendo essere attuato in maniera sistematica per disponibilità e costi, non può comunque sostituire le procedure di ICQ atte a garantire, piuttosto, l'affidabilità dei risultati giorno per giorno.

### 3. SCOPO DEL LAVORO

Il mio lavoro di tesi è stato svolto presso il “Laboratorio Residui” dell’Area di Sicurezza Alimenti dell’Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Umbria e delle Marche con sede a Perugia.

Lo scopo è stato quello di ottimizzare il protocollo di preparazione del campione, effettuare la validazione del metodo e implementare gli strumenti per il controllo di qualità interno di un test ELISA qualitativo per la ricerca simultanea di stanozololo e del suo metabolita 16-beta-idrossi-stanozololo nelle urine bovine e suine. La determinazione di queste molecole è quella richiesta dal controllo ufficiale dei residui negli animali vivi e nei loro prodotti [XV]. A questo scopo inizialmente sono stati messi a confronto un protocollo di preparazione del campione suggerito dal produttore del kit (metodo diretto) e una doppia purificazione mediante colonnine SPE C18 e SPE NH2.

Dopo aver messo a punto il metodo, si è passati alla validazione dello stesso. Per lo stanozololo il livello di controllo per lo screening previsto dal PNR è pari a 2 µg/L.

La validazione del metodo è stata effettuata in accordo con la Decisione 2002/657/CE.

Anche se gli obiettivi riguardano il metodo specifico qui indagato, gli aspetti trattati sono di carattere generale e applicabili a qualsivoglia *screening* biochimico da utilizzare nel controllo ufficiale di sostanze vietate negli alimenti di origine animale e nei loro fluidi biologici. Infatti, se a livello tecnico e normativo le indicazioni per i tradizionali metodi analitici quantitativi di tipo chimico-fisico sono ben definite, esistono scarse informazioni in tal senso riguardo alla strategia da seguire per i cosiddetti test di screening. La stessa Decisione 2002/657/CE è di fatto prevalentemente rivolta ai metodi di conferma tanto che di recente i Laboratori Comunitari di Riferimento (CRL) hanno pubblicato una Linea Guida, per chiarire gli aspetti pratici legati alla validazione e alla gestione degli screening.

## **4. MATERIALI E METODI**

### **4.1 Preparazione del Campione**

Durante la prima fase di ottimizzazione del metodo di trattamento del campione, si sono messe a confronto urine, bovine e suine, trattate con due diversi protocolli di esecuzione:

- metodo diretto (suggerito dal produttore del kit);
- metodo con doppia purificazione SPE C18-NH<sub>2</sub>;

Si sono eseguite quindi prove ripetute in parallelo su bianchi-campione e gli stessi fortificati a 2 µg/L con 16-β-idrossistanozololo.

Qui di seguito vengono riportati i reagenti, i materiali e le apparecchiature utilizzati in entrambi i protocolli.

#### **4.1.1 Reagenti**

- Acido acetico 1 M
- Acqua grado MilliQ
- Dilution buffer “10 X” fornito dal kit (diluire 1 a 10 con acqua)
- Enzima Beta-glucuronidasi da Helix Pomatia (Sigma cod.0876)
- Etanolo assoluto (EtOH)
- Etileacetato
- Metanolo (MeOH)
- Tampone sodio acetato 0.2 M pH 5.2

#### **4.1.2. Materiali di Riferimento**

- Standard di 16-beta-idrossistanozololo (per la preparazione del campione di controllo positivo)

##### **4.1.2.1. Soluzioni Madre del Materiale di Riferimento**

La soluzione madre è conservata a – 20°C per un anno

- Soluzione Madre di 16-beta-idrossistanozololo a 1 mg/mL in etanolo assoluto

#### **4.1.2.2. Soluzione Intermedia del Materiale di Riferimento**

La soluzione madre è conservata a – 20°C per sei mesi

- Soluzione intermedia del Materiale di Riferimento a 10 µg/mL in etanolo assoluto
- Porre in un matraccio tarato da 10 mL 100 µL della soluzione madre e portare a volume con etanolo assoluto

#### **4.1.2.3. Soluzione di Lavoro dei Materiali di Riferimento**

La soluzione di Lavoro è conservata a – 20°C per sei mesi

- Soluzione di lavoro del Materiale di Riferimento a 0.1 µg/mL in etanolo assoluto
- Porre in un matraccio tarato da 10 mL 100 µL della soluzione intermedia e portare a volume con etanolo assoluto.

#### **4.1.3. Materiali**

- Cartina indicatrice di pH
- Colonnine NH<sub>2</sub> (100 mg / 3-6 mL) IST (cod. 470-0010-B / 470-0010-C)
- Colonnine SPE C18-U Strata (200 mg / 3mL) Phenomenex (cod. 8B-S002-FBJ) oppure C18 (100 mg / 3 mL) Varian (cod. 12102099)
- Kit immunoenzimatico Europroxima (cod. ED46)
- Micropipette
- Pipette graduate da 1,2, 5,10 mL
- Provette Falcon da 15 e 50 mL
- Puntali per micropipette

#### **4.1.4. Apparecchiature**

- Bilancia analitica (sensibilità 0.1 mg)
- Bilancia tecnica (sensibilità 0.01 g )
- Centrifuga
- Evaporatore termostato a flusso di azoto
- Frigorifero (+ 4°C ± 2°C)

- Lettore di micropiastre
- pH-metro
- Stazione da vuoto
- Stufa termostata
- Vortex

#### **4.2 Metodo Diretto**

- Diluire 200  $\mu\text{L}$  di urina centrifugata con 800  $\mu\text{L}$  di dilution buffer “10x” fornito dal kit.
- Vortexare e misurare il valore di pH ( $7.0 \pm 0.5$ ).
- Dispensare 50  $\mu\text{L}$  direttamente nel test ELISA.

#### **4.3 Metodo con doppia Purificazione SPE C18-NH<sub>2</sub>**

##### **4.3.1 Estrazione**

- Prelevare 1 mL di urina centrifugata e aggiungere 6 mL di tampone acetato 0.2 M pH 5.2
- Aggiungere 20  $\mu\text{L}$  di enzima beta-glucuronidasi
- Incubare per l'idrolisi a 55°C per 2 ore o per tutta la notte a 37°C

##### **4.3.2 Purificazione C18-NH<sub>2</sub>**

- Condizionare la colonnina C18 (100 mg/3 mL) in sequenza con 3 mL di Metanolo e 3 mL di acqua MilliQ
- Caricare 3.5 mL di campione idrolizzato e lasciar percolare
- Lavare la colonnina SPE con 3 mL di acqua MilliQ e 3mL di Metanolo al 45%
- Asciugare la colonnina con il vuoto per circa 2 minuti
- Condizionare le colonnine NH<sub>2</sub> (100 mg / 6mL) con 3 mL di Metanolo
- Raccordare la colonnina C18 sopra la colonnina NH<sub>2</sub>



- Eluire gli analiti con 2 mL di etilacetato per 2 volte (2x2 mL) in provette tipo Falcon da 15 mL
- Evaporare sotto flusso d'azoto a 40°C
- Riprendere con 2 mL di “*Dilution Buffer 10x*” fornito dal kit (1:10)
- Vortexare
- Dispensare in doppio 50 µL di ciascun campione nei pozzetti della piastra (4.4.2)

#### 4.4 Reazione Immunoenzimatica (saggio ELISA)

##### 4.4.1 Operazioni preliminari

- Estrarre il kit dal frigorifero almeno un'ora prima dell'esecuzione del saggio e porre a temperatura ambiente
- Prelevare il numero di pozzetti necessari alla esecuzione del saggio considerando una semina in doppio sia degli standard che dei campioni
- Diluire il “dilution buffer” 1:10 (1 mL di buffer concentrato e 9 mL di acqua distillata, da preparare di fresco prima dell'uso)
- Diluire il “rinsing buffer” 1:20 (2 mL di rinsing buffer concentrato e 38 mL di acqua distillata, da preparare di fresco prima dell'uso)
- Diluire il coniugato concentrato: 10 µL di coniugato e 990 µL di “dilution buffer”, da preparare di fresco al momento dell'uso. Il rimanente coniugato concentrato va conservato in frigorifero a +4°C, quello diluito va conservato a – 20°C
- Ricostituire l'anticorpo liofilizzato con 4 mL di “dilution buffer” diluito come sopra indicato. Suddividere in aliquote e stoccare a – 20°C.
- Diluire la soluzione standard madre fornita dal kit a 1 µg/mL con il dilution buffer diluito per ottenere gli standards alla concentrazione desiderata come segue:
  - Standard da 10 ng/mL: prelevare 10 µL dello standard da 1 µg/mL in 990 µL di “dilution buffer” diluito
  - Standard da 2 ng/mL: prelevare 200 µL dello standard da 10 ng/mL in 800 µL di dilution buffer diluito
  - Standard da 1 ng/mL prelevare 200 µL dello standard da 10 ng/mL in 1800 µL di dilution buffer diluito

- Standard da 0.5 ng/mL: prelevare 500  $\mu$ L dello standard da 1 ng/mL in 500  $\mu$ L di dilution buffer diluito
- Standard da 0.2 ng/mL: prelevare 200  $\mu$ L dello standard da 1 ng/mL in 800  $\mu$ L di dilution buffer diluito
- Standard da 0.1 ng/mL: prelevare 100  $\mu$ L dello standard da 1 ng/mL in 900  $\mu$ L di dilution buffer diluito
- Standard da 0.05 ng/mL: prelevare 50  $\mu$ L dello standard da 1 ng/mL in 950  $\mu$ L di dilution buffer diluito

#### **4.4.2 Esecuzione del saggio**

- Dispensare in doppio 100  $\mu$ L di dilution buffer (bianco)
- Dispensare in doppio 50  $\mu$ L di dilution buffer (segnale massimo, B<sub>0</sub>)
- Dispensare in doppio 50  $\mu$ L degli standard di stanozololo preparati come sopra indicato
- Dispensare in doppio 50  $\mu$ L di ciascun campione
- Aggiungere 25  $\mu$ L di enzima coniugato diluito in tutti i pozzetti tranne in quelli del bianco
- Aggiungere 25  $\mu$ L di anticorpo in tutti i pozzetti tranne in quelli del bianco
- Agitare dolcemente la piastra con un movimento rotatorio
- Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (20°-25°C)
- Scaricare il contenuto dei pozzetti e lavare per 3 volte, eliminando ogni volta i residui capovolgendo energicamente la piastra su carta assorbente
- Aggiungere 100  $\mu$ L di substrato/cromogeno in tutti i pozzetti e agitare
- Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente (20°-25°C) al buio
- Aggiungere 100  $\mu$ L di soluzione di arresto (stop solution) in tutti i pozzetti
- Leggere le assorbanze immediatamente a 450 nm

#### 4.5 Interpretazione dei dati

Alla media delle assorbanze (optical density, OD) registrate per un campione o per uno *standard* è sottratta la media delle assorbanze del bianco: si ottiene così una quantità indicata con “B”. Analogamente, alla media delle assorbanze registrate per il segnale massimo (standard zero) è sottratta la media delle assorbanze del bianco: si ottiene così una quantità indicata con “B<sub>0</sub>”.

Quindi si procede ad effettuare il rapporto tra B e B<sub>0</sub> moltiplicando per 100:

$$\frac{B}{B_0} \% = \frac{OD_{standard/campione} - OD_{bianco}}{OD_{segnale\ massimo} - OD_{bianco}} \cdot 100$$

Successivamente, tramite la curva di taratura in tampone fornita dal kit, per ciascun campione vengono calcolate le concentrazioni corrispondenti, considerando il fattore di diluizione adottato durante la preparazione del campione. Per il metodo diretto il fattore di diluizione è pari a 5, mentre per il metodo con doppia purificazione SPE C18-NH2 è pari a 4.

#### 4.6 Studio di Validazione

La prima parte dello studio di validazione/ottimizzazione del metodo, come precedentemente accennato, è stata condotta in parallelo applicando le due diverse procedure (metodo diretto e con purificazione SPE C18-NH2). Il confronto tra i valori ottenuti ha permesso di scegliere il metodo più efficace. La validazione è stata perciò completata utilizzando esclusivamente il protocollo migliore. Lo studio di validazione è stato eseguito in conformità ai criteri della Decisione della Commissione 2002/657/CE per metodi di *screening* qualitativi.

Le caratteristiche di performance considerate sono state, quindi, le seguenti: capacità di rilevazione (CC $\beta$ ), specificità e robustezza.

#### **4.6.1 Capacità di rilevazione (CC $\beta$ )**

##### *Scelta del livello di fortificazione*

Poiché per lo stanozololo non è stato mai fissato un livello minimo di rendimento (MRPL), il livello di fortificazione è stato scelto in base al livello minimo richiesto dal PNR italiano, ovvero trattasi di un MRPL nazionale (NMRPL). Ciò deriva dal livello fissato pari a 2  $\mu\text{g/L}$  dal Documento del CRL (Community Reference Laboratories) che si esprime in materia di sostanze per le quali non è fissato un LMR in quanto potenzialmente dannose ad ogni livello.

##### *Scelta della molecola per la fortificazione*

Poiché in base a quanto dichiarato dal produttore entrambe le molecole (stanozololo e 16- $\beta$ -idrossistanozololo) hanno una cross-reattività pari al 100% non è possibile individuare, neanche in via indicativa, la molecola, per così dire, più sfavorita da utilizzare negli esperimenti di fortificazione. Inoltre, per quanto concerne il metodo con doppia colonna SPE, è necessario considerare anche eventuali perdite durante il trattamento dell'urina per effetto di un recupero non quantitativo. A questo scopo si sono effettuati esperimenti preliminari di fortificazione in parallelo aggiungendo separatamente lo stanozololo e il suo metabolita entrambi a 2  $\mu\text{g/L}$ . Come si vedrà nel paragrafo 5.1, la molecola più sfavorita è risultata il 16-beta idrossistanozololo che quindi sarà utilizzata in tutto lo studio di validazione.

Sono stati analizzati quindi almeno venti bianchi-campione sicuramente esenti dagli analiti e, in parallelo, questi stessi campioni fortificati con il 16 $\beta$ -idrossistanozololo ad un livello di concentrazione di 2  $\mu\text{g/L}$ , applicando entrambi i metodi di preparazione del campione.

#### **4.6.2 Specificità**

##### *Composti endogeni*

Dall'esperimento effettuato per la determinazione CC $\beta$  (vedi paragrafo precedente) durante l'analisi del gruppo dei bianchi-campioni e dei fortificati è possibile anche verificare la specificità del metodo rispetto ai composti naturalmente presenti nelle urine (endogeni) che potrebbero portare a risultati sia falsi positivi che negativi.

##### *Composti esogeni*

In aggiunta all'esperimento sopracitato, è stata eseguita l'analisi fortificando un'urina con quattro steroidi (etinilestradiolo, alfa-nortestosterone, alfa-trenbolone e beta-boldenone) in

assenza e in presenza di 16 $\beta$ -idrossistanozololo. Tale esperimento serve a verificare la specificità del metodo (C18-NH2) rispetto a molecole esogene strutturalmente simili agli analiti e che potrebbero essere potenzialmente presenti nelle urine.

#### 4.6.3 Robustezza

Per il test di robustezza sono state identificate alcune variabili (fattori) ritenute potenzialmente critiche. Su queste sono state introdotte deliberatamente lievi cambiamenti corrispondenti a piccole variazioni generalmente riscontrabili nei laboratori. Le prove di robustezza sono state condotte applicando lo schema sperimentale proposto da Youden e riportato anche dalla Decisione 2002/657/CE. Si tratta di un disegno sperimentale di tipo fattoriale frazionario, che permette di valutare simultaneamente l'effetto di un massimo di sette variabili con otto esperimenti come indicato nello schema sottostante (tabella 6).

**Tabella 6. Piano sperimentale per gli studi di robustezza (schema di Youden)**

Variabile selezionata	Esperimento N°							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	A	A	A	A	a	a	a	a
2	B	B	b	b	B	B	b	b
3	C	c	C	c	C	c	C	c
4	D	D	d	d	d	d	D	D
5	E	e	E	e	e	E	e	E
6	F	f	f	F	F	f	f	F
7	G	g	g	G	g	G	G	g
<b>Risultato ottenuto</b>	<b>s</b>	<b>t</b>	<b>u</b>	<b>v</b>	<b>w</b>	<b>x</b>	<b>y</b>	<b>z</b>

Lo schema di Youden prevede due diversi livelli per una stessa variabile. Uno dei due livelli può corrispondere al valore normalmente usato (non variato) nella procedura, il cosiddetto valore nominale. La lettera maiuscola corrisponde generalmente al valore di quella variabile mantenuta in condizioni nominali, ovvero non alterate, viceversa per la lettera minuscola. I risultati di ciascun esperimento sono indicati come S-Z.

L'idea che sottende l'utilizzo di tale schema è quella di non effettuare un cambiamento alla volta, ma introdurre più variazioni contemporaneamente permettendo di ottimizzare il numero degli esperimenti, riducendolo al minimo.

L'approccio di Youden non consente di rilevare le interazioni tra i differenti fattori scelti per cui può essere attuato a condizione che tali interazioni siano trascurabili (variabili indipendenti tra loro).

L'effetto di una certa variabile è calcolato sottraendo dalla media dei risultati con la variabile al “livello nominale” la media dei risultati con la variabile al “livello alterato”. Per ogni variabile, la differenza calcolata è indicata con  $D_i$ .

Ad esempio, volendo calcolare l'effetto della variabile 1 A/a, esso sarà dato dalla differenza in valore assoluto fra la media dei 4 risultati delle prove in cui questa variabile è al livello “A” (S, T, U, V) e la media dei 4 risultati con la variabile al livello “a” (W, X, Y, Z). Quindi :

$$D_A = |A - a| = \left| \frac{(S + T + U + V)}{4} - \frac{(W + X + Y + Z)}{4} \right|$$

Analogamente si procede per calcolare gli altri effetti nelle altre sei variabili da  $D_B$  a  $D_G$

$$D_B = |B - b| = \left| \frac{(S + T + W + X)}{4} - \frac{(U + V + Y + Z)}{4} \right|$$

$$D_C = |C - c| = \left| \frac{(S + U + W + Y)}{4} - \frac{(T + V + X + Z)}{4} \right|$$

$$D_D = |D - d| = \left| \frac{(S + T + Y + Z)}{4} - \frac{(U + V + W + X)}{4} \right|$$

$$D_E = |E - e| = \left| \frac{(S + U + X + Z)}{4} - \frac{(T + V + W + Y)}{4} \right|$$

$$D_F = |F - f| = \left| \frac{(S + V + W + Z)}{4} - \frac{(T + U + X + Y)}{4} \right|$$

Dalla valutazione delle differenze così ottenute, è subito possibile individuare i fattori che potrebbero essere più critici. Si calcola, quindi, lo scarto tipo delle differenze  $D_i$  ( $S_{Di}$ ) mediante la formula:

$$S_{Di} = \sqrt{2 \cdot \sum \left( \frac{D_i^2}{7} \right)}$$

Se  $S_{D_i}$  risulta essere significativamente maggiore della deviazione standard  $S_{RW}$  (ottenuta in condizioni di riproducibilità intralaboratorio per il metodo effettuato in condizioni nominali, ovvero senza deliberate variazioni), si conclude che almeno uno dei fattori individuati influenza il risultato finale. In questo caso è possibile determinare esattamente quali, tra fattori scelti, siano effettivamente critici utilizzando un  $t$ -test. Ad esempio per la variabile  $i$ -esima:

$$t = \frac{\sqrt{n} \cdot |V_i|}{\sqrt{2} \cdot S_{RW}}$$

Dove:

- $D_i$  =  $i$ -esima differenza calcolata per una delle variabili indagate

- $n$  = numero di esperimenti effettuati a ogni livello per ciascun fattore (4)

- $S_{RW}$  = scarto tipo di riproducibilità intralaboratorio

Se il  $t$  osservato è maggiore del  $t$  critico a due code tabulato per il numero di gradi di libertà ( $n$ ) con cui è stato ottenuto  $S_{RW}$  (livello di confidenza 95% ovvero  $\alpha=0.05$ ), significa che la variabile indagata è critica e quindi da tenere sotto controllo.

In questo lavoro di tesi, per la robustezza del metodo si sono eseguite due prove, considerando per ciascuna esperimenti in doppio su otto aliquote della stessa urina suina fortificate con 2  $\mu\text{g/L}$  di 16- $\beta$ -idrossistanozololo. Le variabili e i livelli indagati sono riportati nella tabella 7 e sono relativi al trattamento del campione che prevede l'uso delle colonnine SPE C18 e NH2. In questo esperimento la procedura di esecuzione del saggio ELISA è stata condotta in condizioni nominali. Con un esperimento di Youden si possono valutare fino a sette variabili (tabella 8) ma, in questo caso, ne sono state individuate solo cinque potenzialmente critiche. Quindi due fattori sono fittizi.

**Tabella 7. Variabili e livelli indagati nel test di robustezza preparativa campione**

N°	VARIABILE	VALORE NOMINALE <sup>a</sup>	LIVELLO 1 maiuscola (nominale)	LIVELLO 2 Minuscola (alterato)
1	Tipo di colonnina SPE C18	VARIAN (100 mg/3mL)	VARIAN (100 mg/3mL)	OASIS HLB (30 mg/1ml)
2	MeOH mix lavaggio (%)	45	45	55
3	Asciugatura colonnina SPE C18 prima dell'eluizione	Sì	Sì	No
4	Tempo evaporazione	A secco	A secco	A secco + 5 min
5	Temperatura evaporazione (°C)	40	40	40

<sup>a</sup> Valore / specifica utilizzata come descritta nel protocollo di trattamento

**Tabella 8. Piano sperimentale per gli studi di robustezza**

Variabile individuata	Esperimento							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Tipo di colonnina SPE C18	A	A	A	A	a	a	a	a
MeOH mix lavaggio (%)	B	B	b	b	B	B	b	b
Asciugatura colonnina SPE C18 prima dell'eluizione	C	c	C	c	C	c	C	c
Tempo evaporazione	D	D	d	d	d	d	D	D
Temperatura evaporazione (°C)	E	e	E	e	e	E	e	E
Variabile fittizia	F	f	f	F	F	f	f	F
Variabile fittizia	G	g	g	G	g	G	G	g
<b>Risultati ottenuti</b>	<b>s</b>	<b>t</b>	<b>u</b>	<b>v</b>	<b>w</b>	<b>x</b>	<b>y</b>	<b>z</b>

#### 4.7 Controllo di qualità interno (ICQ)

Durante l'esecuzione del metodo in routine, insieme ai campioni da analizzare (incogniti), si inseriscono due campioni aggiuntivi ad esito noto: QCneg (urina esente dagli analiti) e QC pos (urina addizionata con 2 µg/L di 16-β-idrossi-stanozololo). L'inserimento di questi campioni di controllo permette di evidenziare se, in fase di applicazione del metodo analitico, i risultati prodotti siano o meno sotto controllo statistico.



## 5. RISULTATI E DISCUSSIONE

La Decisione 2002/657/CE indica le caratteristiche di performances da determinare per i metodi da impiegarsi per la ricerca dei residui di sostanze ad azione anabolizzante e di medicinali veterinari negli alimenti di origine animale. Insieme con la norma ISO 17025 essa garantisce la qualità dei risultati mediante l'obbligo di impiego di metodi validati e di procedure definite, sia per l'esecuzione dei metodi di prova che per il loro controllo di qualità durante l'esecuzione in routine. Affinché i risultati delle misurazioni possano essere accettati come validi dalle parti interessate, infatti, le misurazioni analitiche devono essere affidabili e l'affidabilità valutata su basi oggettive e rigorose, senza le quali non sarebbe attuabile il mutuo riconoscimento di risultati e tarature a livello internazionale. Ciò premesso, gli step che un analista deve generalmente affrontare nell'implementazione di un nuovo metodo analitico sono:

- 1) definizione e ottimizzazione
- 2) validazione
- 3) controllo di qualità in continuo durante l'utilizzo in routine

Ottimizzazione e validazione sono due momenti strettamente interconnessi, poiché è solo durante serie di prove ripetute che si possono valutare in profondità le caratteristiche di performances della procedura che si sta cercando di ottimizzare e se questa sia effettivamente adeguata allo scopo (*fit for purpose*). I parametri stabiliti durante lo studio di validazione vengono poi utilizzati come criteri di accettabilità per il controllo di qualità (CQ) attuato nelle terza fase.

### 5.1 Scelta dell'Analita

Allorquando si affronta un metodo multiresiduo immunoenzimatico, prima di procedere alla sua ottimizzazione e validazione è necessario individuare l'analita che risulta più sfavorito tra tutti quelli determinati da utilizzare negli esperimenti di fortificazione. Maggiormente sfavorito è quell'analita che per effetto sia della cross-reattività dell'anticorpo sia della strategia di purificazione del campione viene rilevato nel modo peggiore dal metodo in studio. In altri termini più sfavorito è quell'analita per il quale il metodo risulta meno sensibile. Nel nostro caso è quindi necessario scegliere tra lo stanozololo e il 16 $\beta$ -idrossistanozololo. In tabella 9 sono riportate le cross-reattività

dichiarate dal produttore del kit. Per cross-reattività s'intende la possibilità (da parte dell'anticorpo di un kit immunochimico) di identificare più di una sostanza nel fluido biologico in esame (urina). Esistono test specifici per una sola molecola e test specifici per classi di molecole strutturalmente simili, appartenenti alla stessa classe farmaceutica. Una cross-reattività indesiderata può essere all'origine di falsi positivi.

**Tabella 9. Cross-reattività riportate dal produttore del kit stanozololo (Europroxima)**

<b>Molecola</b>	<b>Cross-Reattività (%)</b>
Stanozololo	100
16 $\beta$ -idrossistanozololo	100
4 $\beta$ -idrossistanozololo	0.30
3'-idrossistanozololo	< 0.01
Metiltestosterone	< 0.01
Testosterone	< 0.01

Non essendo note le condizioni in cui tali cross-reattività siano state determinate e poiché il metodo di preparazione del campione può influenzare la risposta relativa del kit ELISA attraverso i recuperi, sono stati condotti due esperimenti in sei urine bovine e suine bianche e fortificate in parallelo con entrambi gli analiti (livello d'aggiunta 2  $\mu\text{g/L}$ ). I risultati riportati nelle tabelle 10 e 11 dimostrano che la molecola più sfavorita (sia in termini di segnale,  $B/B_0$  che in termini di concentrazione,  $\mu\text{g/L}$ ) è il metabolita. A questo punto è importante ricordare che nel caso dei test ELISA competitivi esiste una proporzionalità inversa tra il segnale registrato (assorbanza) e la concentrazione dell'antigene. Quindi il 16 $\beta$ -idrossistanozololo viene utilizzato in tutti gli esperimenti successivi quale molecola per la fortificazione.

**Tabella 10. Segnali (B/B<sub>0</sub> %) ottenuti con il protocollo di purificazione C18-NH<sub>2</sub> fortificando in parallelo con stanozololo e il suo metabolita a 2 µg/L**

N° URINE	BIANCO-CAMPIONE (B/B <sub>0</sub> ) %	FORTIFICATI con STANOZOLOLO (B/B <sub>0</sub> )%	FORTIFICATI con 16β-IDROSSISTANOZOLOLO (B/B <sub>0</sub> )%
1	70.21	38.93	51.67
2	78.37	39.98	56.08
3	79.02	37.80	40.63
4	71.14	44.75	51.26
5	60.84	32.49	52.55
6	73.71	38.39	55.82
Media	72.21	38.72	51.34
DS	6.65	3.94	5.64

**Tabella 11. Concentrazioni (µg/L) ottenute con il protocollo di purificazione C18-NH<sub>2</sub> fortificando in parallelo con stanozololo e il suo metabolita a 2 µg/L**

N° URINE	BIANCO-CAMPIONE (µg/L)	FORTIFICATI con STANOZOLOLO con (µg/L)	FORTIFICATI con 16β-IDROSSISTANOZOLOLO (µg/L)
1	1.42	3.70	2.62
2	1.03	3.60	2.32
3	1.00	3.81	3.53
4	1.37	3.16	2.65
5	2.04	5.52	2.56
6	1.23	3.75	2.34
Media	1.35	3.92	2.67
DS	0.38	0.82	0.44

## 5.2 Ottimizzazione e validazione del metodo

### 5.2.1 Capacità di rilevazione (CCβ)

Per le sostanze vietate di categoria A non esiste un Limite Massimo Residuale (LMR) in quanto esse rappresentano un rischio per la salute pubblica a qualsiasi concentrazione. Per tali motivi è importante mettere a punto metodi in grado di rilevare la concentrazione più bassa possibile. In particolare la Commissione europea raccomanda che il CCβ dovrebbe essere “as low as reasonably achievable” (ALARA).

A tale scopo nella prima fase di questo lavoro di tesi sono stati messi a confronto due diversi protocolli di preparazione del campione (metodo diretto vs metodo C18-NH<sub>2</sub>). Poiché la validazione di un metodo analitico è strettamente legata allo sviluppo dello stesso, il confronto è stato fatto valutando preliminarmente in parallelo alcune delle caratteristiche di *performances* richieste. Il parametro fondamentale per un test di *screening* è la capacità di rilevazione o  $CC\beta$  (vedi paragrafo 2.3) definita in funzione dell'errore falso negativo. Intuitivamente, nel caso dei metodi immunoenzimatici, tanto più esiste una netta differenziazione tra i segnali/concentrazione dei bianchi-campione e dei relativi fortificati, tanto minore sarà la percentuale di falsi negativi [X]. Per procedere al calcolo della percentuale di falsi negativi (errore beta) sui risultati relativi ai campioni fortificati, tuttavia, è necessario introdurre un valore soglia (altrimenti detto Cut-off).

Per le sostanze vietate nel caso in cui si lavori nel campo delle concentrazioni, tale valore soglia può essere efficacemente rappresentato dal  $CC\alpha$  (vedi paragrafo 2.3) stabilito a partire dai dati ottenuti per i bianchi campione. Quindi, sebbene la Decisione 2002/657/CE nella validazione degli screening non preveda di determinare obbligatoriamente il limite di decisione (LD), in questo lavoro di tesi esso è stato stimato in quanto si presta ad essere il Cut-off ideale in base al quale interpretare i risultati.

Questa apparente contraddizione si spiega anche con il fatto che la Decisione 2002/657/CE approfondisce soprattutto gli aspetti relativi ai metodi di conferma quantitativi, mentre gli screening qualitativi sono sì introdotti, ma trattati solo superficialmente. Uno dei punti dove si parla di metodi qualitativi è nel paragrafo 3.1.2.6. della Decisione dove si discute delle tre possibili modalità operative per determinare la capacità di rilevazione ( $CC\beta$ ). Una di queste è così formulata: “Quando non sono disponibili risultati quantitativi la capacità di rilevazione può essere determinata dallo studio del materiale bianco fortificato al limite di decisione e oltre. In questo caso il livello di concentrazione, dove rimangono solo  $\leq 5\%$  di falsi risultati conformi, equivale alla capacità di rilevazione del metodo. Al fine di garantire una base affidabile per tale determinazione si devono pertanto eseguire almeno 20 studi per almeno un livello di concentrazione”. Al di là della traduzione italiana del documento ufficiale non sempre brillante, è da questo paragrafo che si evince il numero minimo di 20 prove da effettuare e la strategia adottata per la validazione degli screening (20 bianchi e 20 fortificati).

L'utilizzo del  $CC\alpha$  come Cut-Off non è però universale tanto che molti autori determinano il valore soglia, ad esempio, a partire dai dati delle urine fortificate così come anche suggerito dalla Linea Guida dei CRL (“Guidelines for the Validation of Screening Methods

for Residues of Veterinary Medicines”) [VIII]. Bisogna essere tuttavia consapevoli che se si stabilisce il Cut-Off a partire dai bianchi-campione la prova viene utilizzata alla sua massima sensibilità. Diversamente, se il Cut-Off è stimato sulla base dei campioni fortificati, si accetta di utilizzare il metodo, per così dire, alla sensibilità di interesse.

Per determinare il limite di decisione ( $CC\alpha$ ), possiamo quindi applicare la seguente formula:

$$CC\alpha = \bar{C}_0 + k \times S_{c0} \quad (1)$$

dove  $\bar{C}_0$  e  $S_{c0}$  sono rispettivamente la concentrazione media e lo scarto tipo ottenuti per i bianchi-campione (almeno venti).  $k$  che è una costante numerica il cui valore determina la percentuale di errore alfa (falsi positivi) che si intende accettare, tenendo conto dei gradi di libertà del sistema  $v$  ( $v-1$ , dove  $n$  è il numero di prove eseguite). La scelta della costante moltiplicativa  $k$  ha un preciso significato, sebbene in letteratura si trovino applicati svariati valori numerici (2, 2.33 e 3) la cui scelta sembrerebbe più legata ad alcune consuetudini dei chimici analitici che ad una riflessione sul suo significato.  $k$  infatti assume i valori pertinenti alla distribuzione  $t$  di Student ad una coda. Quindi, se, ad esempio, si sono eseguite 20 prove (19 gradi di libertà), l'utilizzo di un  $k=2.33$  [XI] [XII], comporta un errore a uguale al 1.5 %. Se, invece, si applica un fattore  $k$  pari a 3, si avrà un errore pari a 0.35%. Al crescere del valore di  $k$ , dunque, diminuisce la percentuale accettata di errore falso positivo. Per stabilire il  $CC\alpha$  [XIII] dei metodi di conferma per le sostanze vietate la Decisione 2002/657/CE indica un fattore pari a 2.33 (da qui il suo utilizzo da parte di molti autori anche nel calcolo del limite di decisione per un test di screening) che dovrebbe corrispondere, ad un errore  $\alpha$  pari all'1%. E così sarebbe se si effettuassero un numero molto elevato di prove visto che 2.33 è il valore della  $t$  di Student ad una coda per un numero infinito di gradi di libertà. Per questo motivo, considerando le 20 prove classiche dei test di screening, l'errore alfa accettato è in realtà più alto dell'1% (circa 1.5%).

Una volta stabilito il valore soglia, ovvero il  $CC\alpha$ , se, ad esempio, tra i venti segnali dei fortificati solo uno risultasse inferiore a tale valore, quel campione sarebbe giudicato come falso negativo e il tasso di errore beta pari esattamente al 5% (1/20).

Lo stesso ragionamento può essere applicato in maniera del tutto analoga riscrivendo la relazione (1) nel campo dei segnali (% ,  $B/B_0$ ), invece che in quello delle concentrazioni, tenendo conto della relazione di proporzionalità inversa tra le due grandezze nel caso dei test ELISA di tipo competitivo:

$$S_{CC\alpha} = \bar{S}_0 \pm k \cdot s_{s0} \quad (2)$$

dove  $\bar{S}_0$  e  $s_{s0}$  sono rispettivamente la media e lo scarto tipo dei segnali ottenuti per i bianchi-campione.

Una stima approssimativa non sperimentale del  $CC\beta$  può poi essere calcolata tramite la formula (3):

$$CC\beta \approx CC\alpha + k' \cdot S_{c0} \quad (3)$$

dove  $k'$  è sempre una costante riferita alla distribuzione  $t$  di Student ad una coda legato però in questo caso alla % di errore  $\beta$  che si intende accettare (5%).

Di seguito sono riportati i risultati, sia in segnale (% ,  $B/B_0$ ) che in concentrazione ( $\mu\text{g/L}$ ), dei bianchi campione di urina e degli stessi fortificati con 16-beta-idrossistanozololo ottenuti applicando sia il metodo diretto (Tabella 12) che il metodo con purificazione C18-NH2 (Tabella 13).

Il calcolo del  $CC\alpha$  è stato effettuato utilizzando un  $k$  pari a 2.33 con una percentuale di errore falso positivo ( $\alpha$ ), come detto, solo approssimativamente pari all'1%.

Osservando i risultati ottenuti con il metodo diretto per i 33 campioni di urina bovina e suina si evidenzia la presenza di numerosi campioni falsi negativi (urine evidenziate in Tabella 12 ): 16 in termini di segnale ( $B/B_0$ ) e 2 in concentrazione ( $\mu\text{g/L}$ ).

La percentuale di falsi negativi è quindi sicuramente maggiore del 5%. Per il metodo di purificazione C18-NH2 (Tabella 13), invece, non si riscontra tra le urine fortificate nessun falso negativo. Si conclude, quindi, che solo quest'ultimo protocollo analitico è da considerarsi adatto allo scopo in base alla normativa comunitaria. D'altra parte, anche ad una osservazione superficiale, la stima dei  $CC\beta$  è in grado di testimoniare immediatamente l'inadeguatezza del metodo diretto a rilevare il livello d'interesse pari a  $2 \mu\text{g/L}$ .

Osservando i risultati dei bianchi-campione non si riscontrano falsi positivi né per il metodo diretto, né per quello con la doppia purificazione SPE.

**Tabella 12. Metodo diretto: risultati delle prove su bianchi-campione e relativi fortificati con 16- $\beta$ -idrossistanozololo a 2  $\mu\text{g/L}$**

NUMERO SEDUTA	CAMPIONI	Bianchi-Campione (B/B <sub>0</sub> )	Bianchi-Campione ( $\mu\text{g/L}$ )	Fortificati (B/B <sub>0</sub> )	Fortificati ( $\mu\text{g/L}$ ) <sup>a</sup>
I	1	50.81	2.02	21.15	9.89
	2	72.94	0.84	<b>31.08<sup>b</sup></b>	5.39
	3	67.41	1.12	<b>28.54<sup>b</sup></b>	6.29
	4	86.21	0.38	<b>32.04<sup>b</sup></b>	5.08
	5	59.92	1.46	21.15	9.89
	6	75.35	0.69	<b>31.80<sup>b</sup></b>	5.16
II	7	75.02	0.78	<b>29.80<sup>b</sup></b>	4.29
	8	78.47	0.68	<b>34.03<sup>b</sup></b>	<b>3.46<sup>b</sup></b>
	9	50.35	1.81	20.51	7.71
	10	56.62	1.48	23.89	6.10
	11	80.40	0.63	<b>27.83<sup>b</sup></b>	4.73
	12	60.10	1.32	23.05	6.47
	13	77.90	0.69	<b>26.81<sup>b</sup></b>	4.98
	14	54.43	1.59	21.50	7.20
III	15	78.11	0.69	<b>32.23<sup>b</sup></b>	<b>3.79<sup>b</sup></b>
	16	78.47	0.68	<b>29.03<sup>b</sup></b>	4.46
	17	73.68	0.82	<b>27.62<sup>b</sup></b>	4.78
	18	73.36	0.83	<b>27.48<sup>b</sup></b>	4.82
IV	19	94.59	0.31	<b>36.33<sup>b</sup></b>	4.43
	20	93.43	0.34	<b>37.01<sup>b</sup></b>	4.35
	21	40.95	3.92	19.63	10.00
	22	77.65	1.09	<b>30.44<sup>b</sup></b>	5.41
	23	41.61	3.85	19.89	10.00
	24	76.70	1.13	<b>32.63<sup>b</sup></b>	4.88
	25	46.26	3.41	19.16	10.00
	26	54.37	2.75	23.28	8.46
	27	45.53	3.47	22.23	9.03
	28	43.10	3.70	18.48	10.00
V	29	40.74	2.49	13.99	10.00
	30	54.29	1.56	21.76	5.29
	31	42.98	2.30	14.36	10.00
	32	48.48	1.91	19.33	7.28
	33	55.74	1.49	21.07	5.79
<b>media</b>		<b>63.82</b>	<b>1.58</b>	<b>25.43</b>	<b>6.65</b>
<b>scarto tipo</b>		<b>16.19</b>	<b>1.09</b>	<b>6.12</b>	<b>2.27</b>
<b>LD (k=2.33)</b>		<b>26.10</b>	<b>4.11</b>		
<b>CC<math>\beta</math> (k'= 1.64)</b>			<b><math>\approx</math> 5.90</b>		

<sup>a</sup> I campioni che leggevano fuori curva (> 10  $\mu\text{g/L}$ ) sono stati posti pari a 10  $\mu\text{g/L}$ ; <sup>b</sup> Campione falso negativo (falso conforme)

**Tabella 13. Metodo C18-NH2: risultati delle prove su bianchi-campione e relativi fortificati**

NUMERO SEDUTA	CAMPIONI	Bianchi-Campione (B/B <sub>0</sub> )	Bianchi-Campione (µg/L)	Fortificati (B/B <sub>0</sub> )	Fortificati (µg/L)
I	1	68.60	0.74	39.64	1.90
	2	78.85	0.53	45.04	1.59
	3	79.93	0.51	40.74	1.71
	4	87.97	0.52	40.92	3.02
	5	71.57	0.79	42.39	2.02
	6	81.82	0.56	47.54	1.70
II	7	67.39	0.91	42.41	2.01
	8	64.96	0.76	40.09	1.70
	9	70.40	0.63	27.69	3.17
	10	54.95	1.05	23.42	4.23
	11	58.25	0.94	30.01	2.75
	12	67.25	0.70	27.36	3.24
	13	76.11	0.52	28.82	2.96
	14	79.02	1.00	40.63	3.53
III	15	64.02	0.76	34.32	2.56
	16	60.73	0.86	46.08	1.53
	17	78.17	0.51	36.31	2.32
	18	61.98	0.82	38.04	2.14
IV	19	60.61	0.86	31.52	2.93
	20	73.77	0.56	33.32	2.24
	21	73.84	0.56	31.04	2.58
	22	57.32	0.97	26.16	3.49
	23	57.52	0.97	30.08	2.74
	24	71.13	0.61	35.44	1.98
	25	67.15	0.70	34.26	2.11
<b>media</b>		<b>69.33</b>	<b>0.73</b>	<b>35.73</b>	<b>2.49</b>
<b>scarto tipo</b>		<b>8.78</b>	<b>0.18</b>	<b>6.70</b>	<b>0.71</b>
<b>LD (k=2.33)</b>		<b>48.87</b>	<b>1.14</b>		
<b>CCβ (k'=1.64)</b>			<b>≈ 1.44</b>		

Il risultato ottenuto è quello sperato in quanto l'introduzione di una purificazione con due colonnine SPE permette di rimuovere gli interferenti dalla matrice urina in modo più efficace.

Le due colonnine SPE utilizzate sono: C18 ed NH2 con diverse caratteristiche. La colonnina SPE C18 è costituita da una fase inversa ed utilizza un meccanismo ritensivo. La prima fase della purificazione è rappresentata dall'attivazione della colonna con metanolo e acqua per preparare le catene alchiliche alle interazioni con gli analiti. In questa fase è molto importante non lasciare andare a secco le colonnine per evitare che le catene, una volta attivate e "stirate", si disattivino. Il condizionamento successivo con acqua permette di riprodurre lo stesso ambiente dell'urina. A questo punto il campione viene caricato sulla



colonnina e viene lasciato percolare. Si effettuano quindi dei lavaggi con diverse soluzioni, in modo tale che le sostanze interferenti presenti nella matrice non vengono trattenute perché, incapaci di instaurare un legame specifico, e quindi sono eliminate attraverso la colonnina con il resto della soluzione acquosa. La colonnina NH<sub>2</sub>, a fase diretta, viene utilizzata per una semplice filtrazione degli analiti che vengono eluiti con l'etilacetato mentre gli interferenti rimangono "legati" alla fase stazionaria della colonna (*non ritensivo*). Le due colonnine utilizzate vengono raccordate in serie. La fase finale di questa doppia purificazione prevede l'eluizione degli analiti indagati con un solvente polare (etile acetato). Questo solvente deve essere in grado di svolgere una doppia funzione: "sciogliere" gli analiti rompendo le interazioni apolari che si sono formate con le catene alchiliche della colonna C18 e trasportare le molecole inalterate lungo la colonnina a fase diretta NH<sub>2</sub>.

### **5.2.2 Specificità**

Nel paragrafo 3.1.1.1 della Decisione 2002/657/CE la verifica sperimentale della specificità viene fatta con due approcci: nel primo, come si è accennato, l'esperimento per la determinazione della capacità di rilevazione del metodo permette di fare anche una parziale verifica della specificità. Infatti, se i composti naturalmente presenti nell'urina (endogeni) fossero in grado di interferire con la determinazione degli analiti, si produrrebbero sia risultati falsi positivi nei bianchi-campione che falsi negativi nei fortificati. Il secondo approccio per la verifica della specificità è quello che prevede l'aggiunta di steroidi esogeni. In tabella 14 si riportano i risultati dell'esperimento di fortificazione con quattro molecole di steroidi che potrebbero essere potenzialmente presenti. Come si vede il limite di decisione precedentemente stabilito è il parametro chiave per interpretare i dati permettendo di dare un giudizio oggettivo sull'esito del saggio. Si evince che il metodo è specifico in quanto il risultato ottenuto non è influenzato dagli altri steroidi sia in presenza (errore falso negativo) che in assenza (errore falso positivo) di 16 $\beta$ -idrossistanozololo (2  $\mu$ g/L).

**Tabella 14. Risultati dell'esperimento di specificità eseguito aggiungendo quattro steroidi esogeni**

Molecola	Livello di fortificazione (µg/L)	Segnali (%B/B <sub>0</sub> )	Concentrazione (µg/L)	Interpretazione del risultato <sup>a</sup>
Bianco-campione	0	86.90	0.38	Non rilevato (<2µg/L)
Bianco-campione	0	91.78	0.25	Non rilevato (<2µg/L)
α-Trenbolone	2	84.88	0.42	Non rilevato (<2µg/L)
α-Trenbolone	2			
16-β-OH-stanozololo	2	44.21	1.24	Sospetto
α-Nortestosterone	2	84.74	0.42	Non rilevato (<2µg/L)
α-Nortestosterone	2			
16-β-OH-stanozololo	2	48.00	1.53	Sospetto
β-Boldenone	2	80.78	0.49	Non rilevato (<2µg/L)
β-Boldenone	2			
16-β-OH-stanozololo	2	45.53	1.68	Sospetto
17-α-Etinilestradiolo	2	89.30	0.31	Non rilevato (<2µg/L)
17-α-Etinilestradiolo	2			
16-β-OH-stanozololo	2	41.96	1.91	Sospetto

<sup>a</sup> L'interpretazione è effettuata considerando il limite di decisione (=1.14 µg/L) stimato durante l'esperimento precedente. Se il valore di concentrazione letto per un'urina è <1.14 µg/L, il campione è considerato negativo; viceversa l'urina è sospetta.

### 5.2.3 Robustezza

Per la robustezza del metodo è stato effettuato un esperimento considerando cinque variabili relative alla preparazione del campione di urina, secondo lo schema di Youden. L'esperimento è stato ripetuto per due volte al fine di corroborare i risultati. L'elaborazione dei dati è riportata nelle tabelle 15 e 16.

L'analisi dei dati è stata eseguita sia sui segnali registrati (B/B<sub>0</sub>) che sulle concentrazioni (µg/L) ricavate tramite la curva di taratura.

**Tabella 15. Elaborazione dati dell'esperimento di Youden per la robustezza (I prova)**

N°	Variabile	Segnali	Concentrazioni
		$D_i$ (B/B <sub>0</sub> )	$D_i$ (µg/L)
1	Tipo di colonnina C18	1.495	0.245
2	MeOH mix lavaggio (%)	4.665	0.660
3	Asciugatura colonnina C18 prima dell'eluizione	1.375	0.240
4	Tempo di evaporazione	0.650	0.210
5	Temperatura evaporazione (°C)	9.090	0.860
	$S_{D_i}$	<b>6.612</b>	<b>0.739</b>
	$S_{R_W}$	<b>7.048</b>	<b>0.760</b>

**Tabella 16. Elaborazione dati dell'esperimento di Youden per la robustezza (II prova)**

N°	Variabile	Segnali	Concentrazioni
		$D_i$ (B/B <sub>0</sub> )	$D_i$ (µg/L)
1	Tipo di colonnina C18	2.545	0.233
2	MeOH mix lavaggio (%)	4.630	0.443
3	Asciugatura colonnina C18 prima dell'eluizione	5.075	0.508
4	Tempo di evaporazione	2.280	0.113
5	Temperatura evaporazione (°C)	4.195	0.343
	$S_{D_i}$	<b>6.264</b>	<b>0.563</b>
	$S_{R_W}$	<b>7.048</b>	<b>0.760</b>

Confrontando lo scarto tipo delle differenze ( $S_{D_i}$ ) e quello ottenuto in condizioni di riproducibilità intra-laboratorio ( $S_{R_W}$ ) sia per i segnali che per le concentrazioni, il valore  $S_{D_i}$  è sempre minore rispetto al valore  $S_{R_W}$ . È così possibile stabilire che, le cinque variabili e i livelli scelti non influenzano il risultato finale. Si conclude quindi che il metodo con purificazione C18-NH<sub>2</sub> risulta essere robusto.

### 5.3 Controllo di qualità

Il Controllo di Qualità è anch'esso in qualche modo connesso alla fase precedente in quanto permette di valutare esaustivamente la robustezza di una procedura nel tempo, registrando le prestazioni per i vari operatori, strumenti, lotti di reagenti e kit e per una gamma molto rappresentativa di matrici reali. Questi aspetti, infatti, non possono essere completamente valutati durante il periodo ristretto in cui si completa la validazione. Come si è detto, al contrario che per i metodi chimico-fisici di tipo quantitativo, non esistono indicazioni consolidate rispetto alla costruzione delle carte di controllo nell'ambito dei metodi qualitativi. Nelle Figure 10 e 11 sono riportate le due carte di controllo costruite, rispettivamente, per il monitoraggio in continuo delle concentrazioni misurate per i campioni di urina denominati  $QC_{neg}$  e  $QC_{pos}$ .

Le carte sono state costruite utilizzando i dati della validazione (Tabella 13).

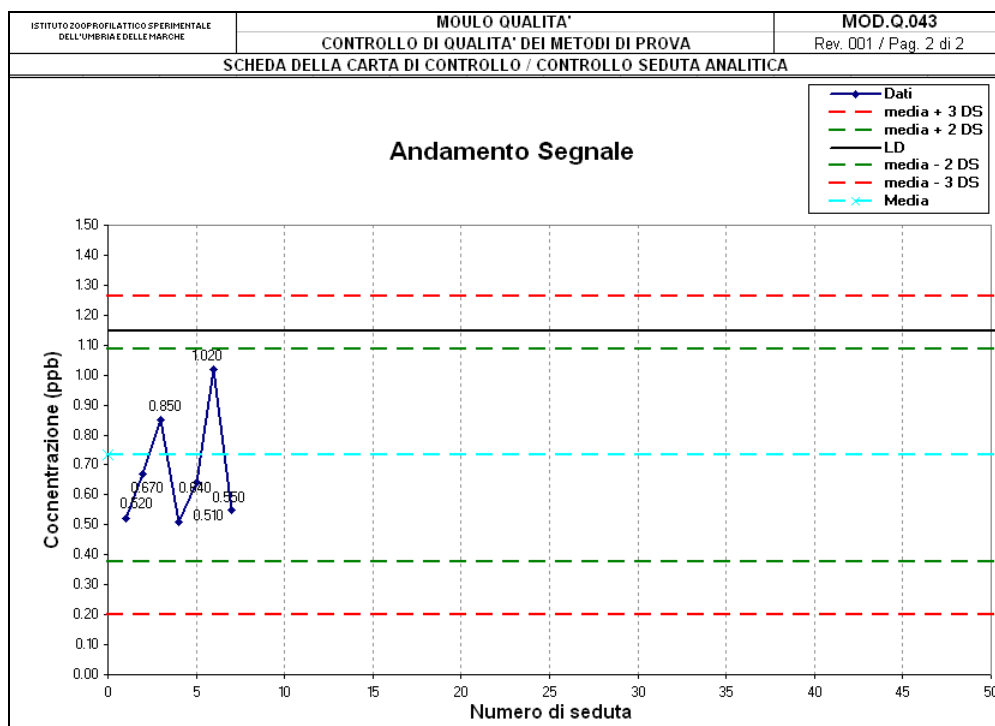
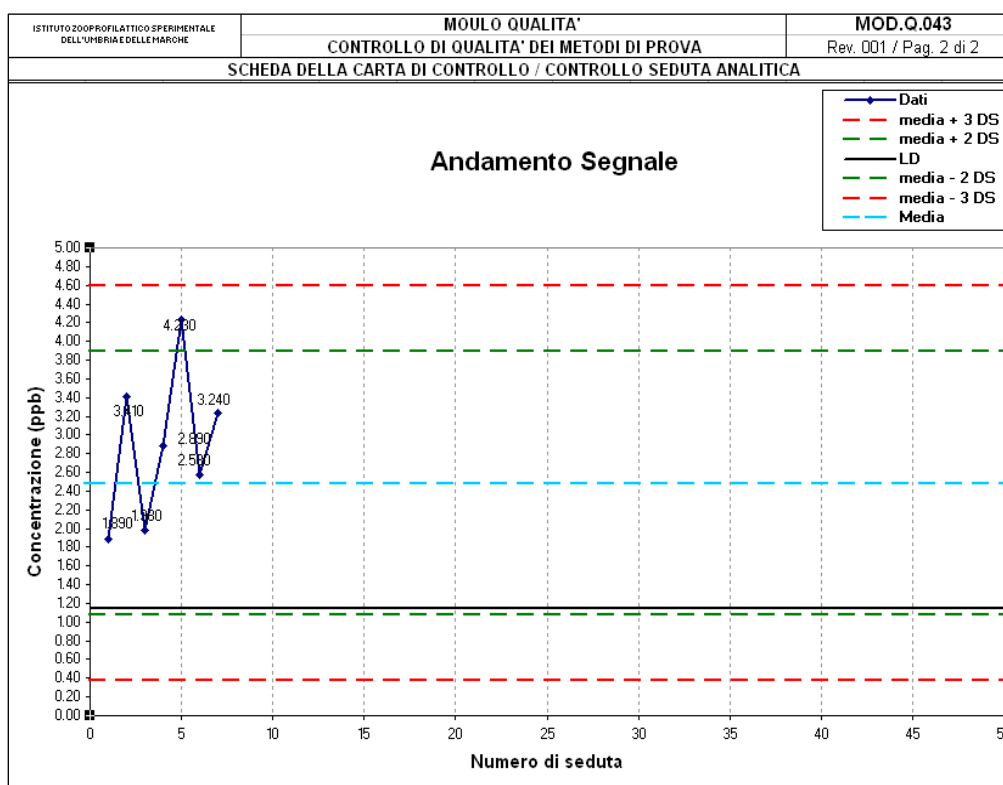


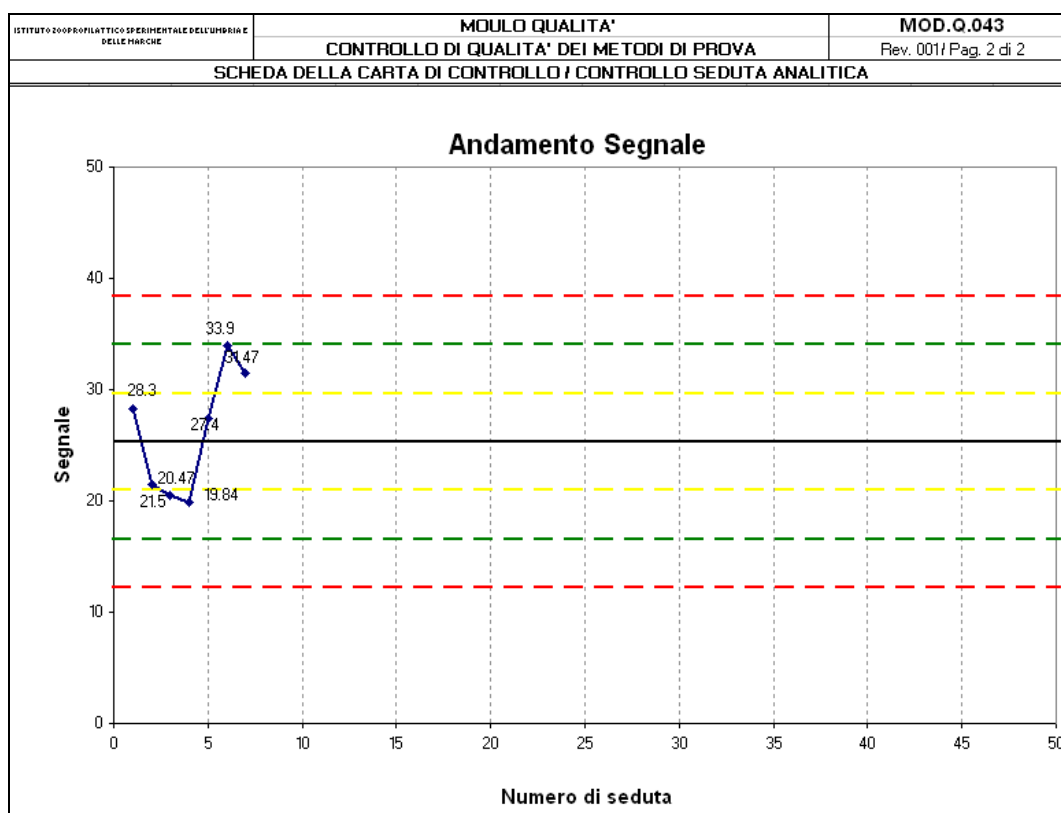
Figura 10. Carta di controllo per l'urina esente dagli analiti ( $QC_{neg}$ )



**Figura 11. Carta di controllo per l'urina fortificata con 2 µg/L di 16β-idrossi-stanozololo (QC<sub>pos</sub>)**

Il campione QC<sub>neg</sub> tiene sotto controllo i falsi positivi, mentre il QC<sub>pos</sub> i falsi negativi [XIV]. Inizialmente le carte erano state costruite in maniera più semplice monitorando che il QC<sub>neg</sub> e il QC<sub>pos</sub> avessero una concentrazione, rispettivamente, inferiore e superiore al valore soglia stabilito nella validazione del metodo pari a 1.14 µg/L (CC<sub>α</sub> o limite di decisione). Tuttavia, successivamente, si è proceduto ad una revisione della struttura delle carte impostandole esattamente come quelle dei metodi quantitativi con l'aggiunta della linea corrispondente al valore del CC<sub>α</sub>. Senza la presenza di limiti di Attenzione (UWL e LWL) e di Controllo (UCL e LCL) non era infatti possibile evidenziare chiaramente eventuali problemi, soprattutto nel monitoraggio del QC<sub>pos</sub>. Ad esempio, se per un errore dell'operatore la quantità di 16-β-idrossi-stanozololo con cui si era fortificato il QC<sub>pos</sub> fosse stata maggiore di quella stabilita, una carta di tipo binario (sopra/sotto la soglia) non avrebbe fornito nessun allarme in quanto il valore di concentrazione letto per il QC<sub>pos</sub> sarebbe stato comunque maggiore del limite di decisione. È chiaro che la mancanza di adeguati materiali di riferimento certificati (e non) deve costringere ad un ICQ molto rigoroso. In aggiunta relativamente al saggio ELISA, sono monitorati: il segnale massimo

(B<sub>0</sub>) e due standard intermedi della curva in tampone a 0.1 e 1 ng/mL. Un esempio di carta di controllo per lo standard in tampone a 1 ng/mL è riportato in Figura 12. La costruzione di queste tre carte è stata approntata elaborando i dati in Tabella 17, acquisiti progressivamente durante le sedute analitiche nella fase di ottimizzazione/validazione del metodo. Essi sono stati anche confrontati con le specifiche del produttore del kit, le quali però in genere sono meno restrittive.



**Figura 12. Carta di controllo per lo standard a 1 ng/mL della curva in tampone**

L'insieme dei parametri monitorati consente di avere informazioni complete su tutte le fasi del metodo: preparazione del campione, esecuzione del saggio ELISA e qualità del lotto del kit diagnostico. In questo modo viene facilitata, in caso di anomalia, l'analisi delle cause che l'hanno prodotta (errore umano, qualità del lotto del kit commerciale, degradazione dello standard aggiunto...).

**Tabella 17. Dati raccolti per la costruzione delle carte di controllo per due degli standard in tampone**

<b>DATA SEDUTA ANALITICA</b>	<b>0.1 ng/mL (%)</b>	<b>1 ng/mL (%)</b>
09/06/2010	87.90	23.20
06/10/2010	88.60	21.80
12/10/2010	85.52	21.99
14/10/2010	92.84	32.79
20/10/2010	91.84	25.53
25/10/2010	82.85	19.57
15/12/2010	83.63	23.94
28/12/2009	79.27	32.30
12/01/2010	86.31	26.74
14/01/2010	86.85	31.70
19/04/2010	88.33	22.20
26/08/2010	88.74	22.51
14/12/2010	82.11	24.76
<b>MEDIA</b>	<b>86.52</b>	<b>25.31</b>
<b>DS</b>	<b>3.85</b>	<b>4.36</b>
<b>MEDIA-2DS</b>	<b>78.83</b>	<b>16.59</b>
<b>MEDIA+2DS</b>	<b>94.22</b>	<b>34.03</b>

## 6. CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi riporta un esempio di ottimizzazione, validazione e sviluppo di procedure per il controllo di qualità interno di un test di screening qualitativo immunoenzimatico in accordo ai criteri stabiliti dalle norme comunitarie per i metodi analitici utilizzati nel controllo ufficiale dei residui negli alimenti di origine animale. L'interesse nella descrizione di un approccio sistematico e oggettivo alle tre fasi di cui sopra è un risultato importante in quanto, per i metodi biochimici qualitativi, sia gli aspetti normativi che la letteratura tecnico-scientifica sono meno sviluppati e chiari che per i tradizionali metodi analitici chimico-fisici quantitativi.

Per quanto riguarda l'applicazione specifica qui riportata, ovvero la ricerca di stanozololo e dei suoi metaboliti nelle urine bovine e suine, in primo luogo si sono confrontati due diversi approcci al trattamento del campione: un semplice metodo diretto suggerito dal produttore del kit ELISA e un protocollo di purificazione che prevede l'utilizzo in tandem di due colonnine SPE di tipo C18 e NH<sub>2</sub>. L'aspetto dell'ottimizzazione è fondamentale soprattutto nella determinazione di residui di sostanze vietate come in questo caso. Lo sviluppo di un metodo interno, infatti, dovrebbe inizialmente sempre prevedere una valutazione sulla possibilità di migliorare e/o adattare le fasi operative in modo da poter non solo avere a disposizione una procedura adatta allo scopo, ma anche in grado di garantire i più bassi livelli di controllo.

Si è così dimostrato che il protocollo che prevedeva la purificazione mediante colonnine SPE (C18-NH<sub>2</sub>) non solo è in grado di garantire le migliori caratteristiche di performances così come ci si poteva aspettare, ma è anche l'unico dei due a essere adatto allo scopo al livello richiesto dal controllo ufficiale (2 µg/L). Era quindi scelto per il prosieguo delle fasi successive. Ciò è nettamente evidenziato dal valore della capacità di rilevazione (CC $\beta$ ), parametro chiave nella validazione per i saggi di screening: 1.44 µg/L per il metodo con C18-NH<sub>2</sub> contro 5.90 µg/L per il metodo diretto. Successivamente il completamento dello studio di validazione con la valutazione della robustezza e della specificità ha confermato in via definitiva l'adeguatezza della procedura scelta.

Infine la progettazione del controllo di qualità interno mediante l'inserimento di campioni di controllo (QC<sub>neg</sub> e QC<sub>pos</sub>) in ogni batch analitico e la costruzione di carte tipo Shewhart opportunamente modificate per il tipo di applicazione descritta permette di avere a



disposizione strumenti puntuali per il monitoraggio in continuo dei risultati durante l'utilizzo del saggio nelle attività di routine.

## BIBLIOGRAFIA

[I]. N.A. Botsoglou, D.J. Fletouris. *Drug residues in foods. Pharmacology, Food Safety, and Analysis*. 1a ed., Marcel Dekker, Inc., Fennema O. R., Karel M., Sanderson G. W., Walstra P., Whitaker J. R., New York (USA) (2001).

[II]. Galarini R., Antonini C. *Il Piano Nazionale Residui: origine, scopi ed evoluzione.*, Webzine di Sanità Pubblica Veterinaria, 38, (2006).

[www.spvet.it](http://www.spvet.it)

[III]. Decisione 2002/657/CE: *Decisione della Commissione del 12 agosto 2002 che attua la direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati*. G.U.C.E. L 221/8, (2002).

[IV]. Caroli.S. *La rete dei laboratori comunitari e nazionali di riferimento per i residui*. Annuali Istituto Superiore di Sanità, 38 (1), (2002) 69-76.

[V]. UNI CEI EN ISO/IEC 17025 *Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura*. UNI-CEI, Milano (Italy), (2000).

[VI]. SANCO/2004/2726 rev4. *Guidelines for implementation of Decision 2002/657/EC*. European Commission- Health and Consumer Protection Directorate-General.

[VI]. Gowik P. *Criteria and Requirements of Commission Decision 2002/657/EC*. Bulletin- International Dairy Federation, 283 (2003) 52-56.

[VII]. Kelner R., Mermet J.-M., Otto M., Widmer H.M. *Analytical Chemistry*. 1<sup>a</sup> ed., WILEY- VCH, Kelner R., Mermet J.-M., Otto M., Weinheim (Germany), (1998).

[VIII]. Community Reference Laboratories Residues (CRLs) “ *Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines*” 20/01/2010  
[http://crl.fougeres.afssa.fr/publicdoc/Guideline\\_Validation\\_Screening\\_en.pdf](http://crl.fougeres.afssa.fr/publicdoc/Guideline_Validation_Screening_en.pdf)

- [IX]. EU- Workshop 8-12 May 1995, Bilthoven, NL: Annex 4 “*Multi-Residue Method for the Determination of Anabolic Compounds in Samples of Bovine Urine*”. (1995)
- [X]. J.J.P. Lasaroms, H. Van Rhijn, *Validation of ELISA for banned substances*, in: *CRL Workshop on the validation of screening methods*, AFSSA-LERMVD, Fougère (France), 2005.
- [XI]. E. Trullos, I. Ruisánchez, F.X. Rius, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 137-145.
- [XII]. T.F.H. Bovee, H.H. Heskamp, A.R.M. Hamers, R.L.A.P. Hoogenboom, M.W.F. Nielen, *Anal. Chim. Acta* 529 (2005) 57-64.
- [XIII]. G. Scortichini, L. Annunziata, V. Di Girolamo, R. Buratti, R. Galarini, *Anal. Chim. Acta* 637 (2009) 273-278.
- [XIV]. B.M. Simonet, *Trends Anal. Chem* 24 (2005) 525-531.
- [XV]. CRL Guidance Paper of 7th December 2007. *CRLs view on state of the art analytical methods for national residue control plants*, 1-8.

## RINGRAZIAMENTI

Da dove cominciare?

Un ringraziamento speciale e pieno d'amore va ai miei genitori, che mi hanno dato l'opportunità di studiare, ciò che lo avrebbero voluto fare ma non ne hanno avuta la possibilità. Sono stati i loro rimproveri e i loro sorrisi a sostenermi in ogni momento difficile senza farmi mai abbassare la testa. Grazie per avermi cresciuta ed educata in questo modo.

Un ringraziamento speciale va a Leonardo, mio fratello, che mi ha chiamata Dott.ssa sin dal primo giorno di Università e che ha sempre creduto nelle mie possibilità; a mia cognata Daniela e alla piccola Matilde, la gioia più grande della mia vita. Sin dai primi mesi di vita ha ascoltato le mie parole, lei che a un anno e mezzo mi diceva: "zia, il glucosio è uno zucchero e i trigliceridi sono grassi".

Grazie anche ai miei zii Emanuele e Marcella per avermi trasportata, sostenuta e incoraggiata ad andare avanti.

Un grazie colorato e colorito va ai miei colleghi di corso Filippo, Giovanna ed Eleonora con i quali ho condiviso gioie, dolori, risate, paure senza di voi sarebbe stato tutto ancora più difficile; questa è un'occasione per dirvi che per voi anche a centinaia di chilometri di distanza io ci sarò sempre.

Ringrazio il mio Professore Gianni Sagratini sempre presente e disponibile che nonostante la sua giovane età mi ha insegnato tanto e mi ha permesso di conoscere l'Istituto Zooprofilattico dell'Umbria e delle Marche nelle vesti della Dott.ssa Roberta Galarini. Grazie a lei ho avuto l'opportunità di poter svolgere il mio lavoro di tesi nei laboratori dell'Istituto ma soprattutto ho potuto conoscere la sua persona, le sue capacità e la sua professionalità. Mi auguro di averle dato tanto così come lei ha dato a me.

Grazie a tutta la chimica:

a Roberta Buratti un uomo e una donna in un unico corpo, la robustezza in persona, grazie per la disponibilità, l'accoglienza e per le splendide serate passate insieme;

a Domenico Boccia il ringhio test colui che ha cercato in primis di farmi conoscere lo screening;

a Gloria, Laura, Elisa, Angela, Alviero, Giorgio e Simone che mi hanno fatto sentire come a casa sin dal primo momento.

Un ringraziamento sincero va anche alla Dott.ssa Laura Fioroni per i suoi preziosi consigli e la sua disponibilità.

E poi cosa dire di Sabrina e Maria Lucia mie compagne di merende e di lunghe telefonate per lavare “due panni” a casa.

Grazie anche a Marisa e Stefania per avermi sempre detto: “Cocca sembra na vita che sei di qui”.

Grazie comunque a tutti per avermi fatto trascorrere due mesi così intensi di emozioni.

Ed ora un ringraziamento pieno d’amore al mio fidanzato Patrizio per avere sopportato i miei sbalzi d’umore e le mie paure. Grazie alla splendida persona quale sei per non avermi mai abbandonata a vivere la mia difficile vita da studentessa, grazie per esserti impegnato a vivermi accanto.

Grazie anche a Giacomo e Mirka per i loro sorrisi e per avermi sempre spronata a non mollare.

Alla fine di questa lunga esperienza vorrei soprattutto ringraziare me stessa perché, sono orgogliosa di essere la persona che sono e grazie a tutte le persone che non sono state nominate ma che hanno meritato di fare parte della mia vita.

# INDICE

<b>1.INTRODUZIONE</b>	1
1.1 Gli Steroidi	1
1.1.1 Ormoni sessuali steroidei	2
1.2 Steroidi androgeni anabolizzanti	3
1.2.1 Meccanismo d'azione	4
1.3 Stanozololo	5
1.3.1 Utilizzo nell'uomo (Doping)	6
<b>2. II CONTROLLO DEI RESIDUI NEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE</b>	7
2.1 Premessa	7
2.1.1 Il Piano Nazionale Residui	7
2.2 I Controlli analitici	12
2.3 I metodi analitici di screening: validazione e tecniche	15
2.3.1 Preparazione del campione	19
2.3.2 I test immunoenzimatici ELISA	20
2.3.2.1 ELISA competitivo di tipo diretto	22
2.3.2.2 ELISA competitivo di tipo indiretto	23
2.4 Il controllo di qualità dei metodi analitici	24
2.4.1 Il controllo di qualità interno (ICQ)	24
2.4.2 Il controllo di qualità esterno (ECQ)	27
<b>3. SCOPO DEL LAVORO</b>	28
<b>4. MATERIALI E METODI</b>	29
4.1 Preparazione del campione	29
4.1.1 Reagenti	29
4.1.2 Materiali di riferimento	29
4.1.2.1 Soluzioni Madre del Materiale di Riferimento	29
4.1.2.2 Soluzione Intermedia del materiale di Riferimento	30
4.1.2.3 Soluzioni Intermedie di Lavoro dei Materiali di Riferimento	30

4.1.3 Materiali	30
4.1.4 Apparecchiature	30
4.2 Metodo Diretto	31
4.3 Metodo con purificazione SPE C18-NH <sub>2</sub>	31
4.3.1 Estrazione	31
4.3.2 Purificazione C18-NH <sub>2</sub>	31
4.4 Reazione Immunoenzimatica (saggio ELISA)	32
4.4.1 Operazioni preliminari	32
4.4.2 Esecuzione del saggio	33
4.5 Interpretazione dei dati	34
4.6 Studio di validazione	34
4.6.1 Capacità di rilevazione (CC $\beta$ )	35
4.6.2 Specificità	35
4.6.3 Robustezza	36
4.7 Controllo di qualità interno	39
<b>5. RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>40</b>
5.1 Scelta dell'analita	40
5.2 Ottimizzazione e validazione del metodo	42
5.2.1 Capacità di rilevazione (CC $\beta$ )	42
5.2.2 Specificità	48
5.2.3 Robustezza	49
5.3 Controllo di qualità	51
<b>6. CONCLUSIONI</b>	<b>55</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>57</b>
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	<b>59</b>