

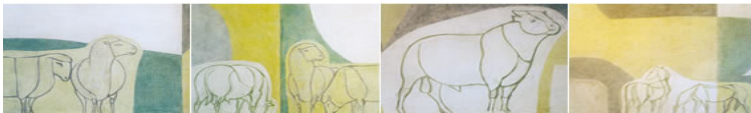
“PROVE PER LA DETERMINAZIONE DELLA FORMALDEIDE LIBERA NEI VACCINI STABULOGENI”

Dr. Claudia Focardi,

Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana,

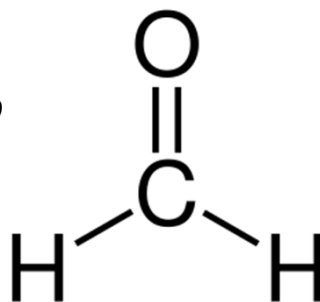
DO CHIMICA Firenze

SIENA, 26 novembre 2024



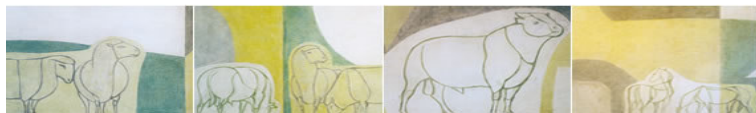
FORMALDEIDE

Agente chimico pericoloso



Formula bruta o molecolare	CH ₂ O
Massa molecolare (u)	30,03
Aspetto	gas incolore
Numero CAS	50-00-0 ↗
Numero EINECS	200-001-8
PubChem	712 ↗

La soluzione acquosa al 35-37% è commercialmente nota con il nome di **formalina**.



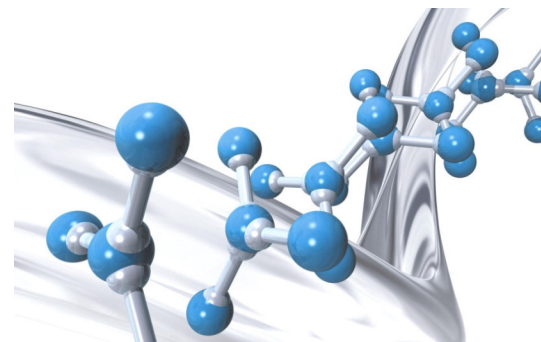
Rischi per la sicurezza e la salute

Rischi di lesioni dovute a manipolazione di sostanze pericolose

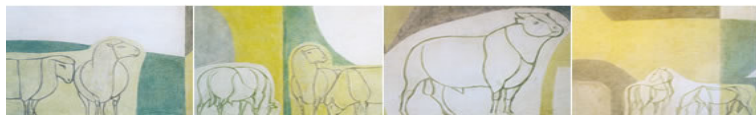
Agenti chimici

Tutti gli elementi o composti chimici, sia da soli sia nei loro miscugli, allo stato naturale o ottenuti, utilizzati o smaltiti, compreso lo smaltimento come rifiuti, mediante qualsiasi attività lavorativa, siano essi prodotti intenzionalmente o no e siano immessi o no sul mercato.

(Art.222 D.lgs 81/08)



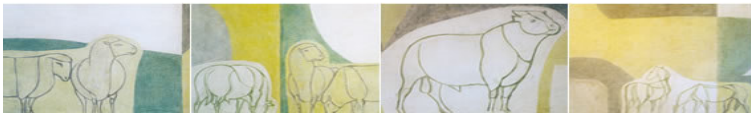
*Agenti chimici
classificati come
pericolosi (si cita il d.lvo
52/1997)*



Agenti chimici pericolosi

CLASSIFICAZIONE

*LA CLASSIFICAZIONE DELLE SOSTANZE
CHIMICHE PERICOLOSE SI BASA SIA SUL TIPO DI
AGENTE SIA SULL'EFFETTO TALE AGENTE
AVREBBE SULLA SALUTE DEI SOGGETTI AD ESSO
ESPOSTI*



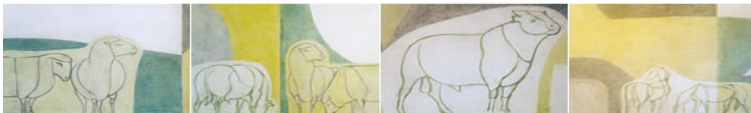
PERICOLOSI PER LA SALUTE: TOSSICITÀ AGENTI CHIMICI

Tossicità a lungo termine

*Il simbolo di un mezzo busto identifica i prodotti che causano danni a **lungo termine** come danni agli organi, alle vie respiratorie, alterazioni genetiche e cancro*

Tossicità acuta : proprietà di una sostanza o miscela di produrre effetti nocivi che si manifestano in seguito alla somministrazione per via orale o cutanea di una dose unica o più dosi ripartite nell'arco di 24 ore, o in seguito ad una esposizione per inalazione di 4 ore

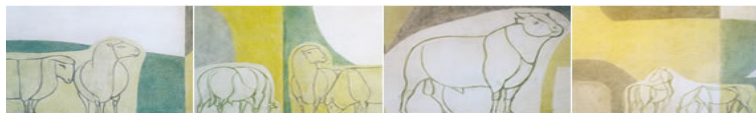
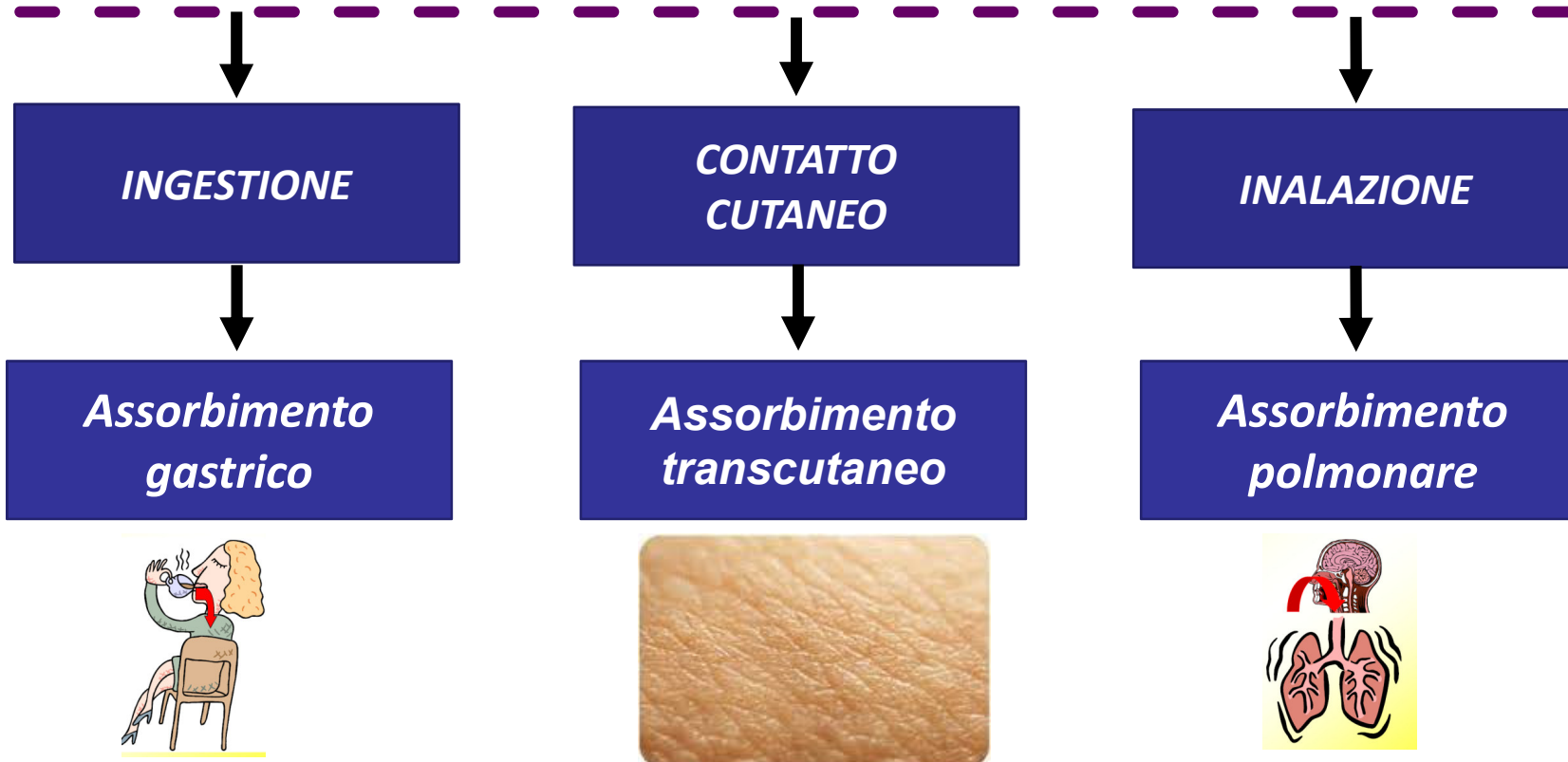
↓
***I criteri di
classificazione
cambiano in funzione
del DL50***







CRITERI UTILI A CARATTERIZZARE LA TOSSICITÀ DEGLI AGENTI CHIMICI

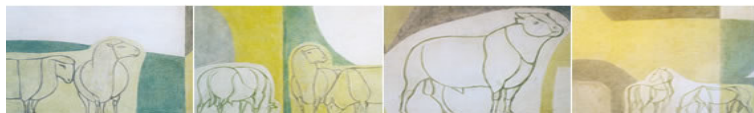
Modalità di esposizione

condizione di lavoro per la quale sussiste la possibilità che agenti chimici pericolosi, tal quali o sotto forma di emissioni (polveri, fumi, nebbie, gas e vapori) possano essere assorbiti dall'organismo attraverso:



TOSSICITA' ACUTA

	<i>GHS06</i>		<i>GHS07</i>	
Orale	Categoria 1 $DL_{50} \leq 5\text{mg/kg}$	Categoria 2 $5 < DL_{50} \leq 50$	Categoria 3 $50 < DL_{50} \leq 300$	Categoria 4 $300 < DL_{50} \leq 2000$
Cutanea	Categoria 1 $DL_{50} \leq 50\text{mg/kg}$	Categoria 2 $50 < DL_{50} \leq 2000$	Categoria 3 $200 < DL_{50} < 1000$	Categoria 4 $1000 < DL_{50} \leq 2000$
Inalatoria	Categoria 1 $CL_{50}/STA \leq 100\text{mg/l/4h}$ (gas) $CL_{50}/STA \leq 0.5\text{mg/l/4h}$ (vapori) $CL_{50}/STA \leq 0.05\text{mg/l/4h}$ (aerosol/polveri)	Categoria 2 $100 < CL_{50}/STA \leq 500\text{mg/l/4h}$ (gas) $0.5 < CL_{50}/STA \leq 2\text{mg/l/4h}$ (vapori) $0.05 < CL_{50}/STA \leq 0.5\text{mg/l/4h}$ (aerosol/polveri)	Categoria 3 $500 < CL_{50}/STA \leq 2500\text{mg/l/4h}$ (gas) $2 < CL_{50}/STA \leq 10\text{mg/l/4h}$ (vapori) $0.5 < CL_{50}/STA \leq 1\text{mg/l/4h}$ (aerosol/polveri)	Categoria 4 $2500 < CL_{50}/STA \leq 20000\text{mg/l/4h}$ (gas) $10 < CL_{50}/STA \leq 20\text{mg/l/4h}$ (vapori) $1 < CL_{50}/STA \leq 5\text{mg/l/4h}$ (aerosol/polveri)
				

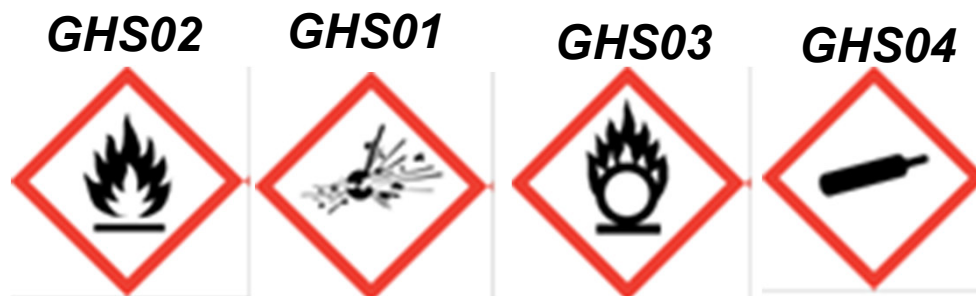


Agenti chimici pericolosi

CLASSIFICAZIONE

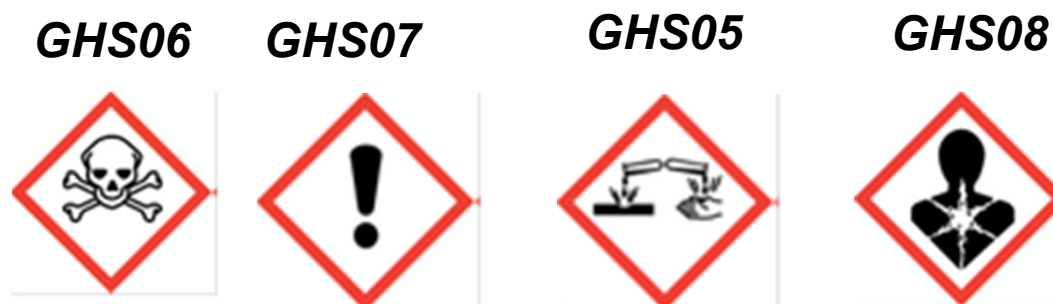
Pericoli fisici:

- **Infiammabili (GHS02)**
- **Comburenti (GHS03)**
- **Esplosivi (GHS01)**
- **gas sotto pressione (GHS04)**



pericolosi per la salute:

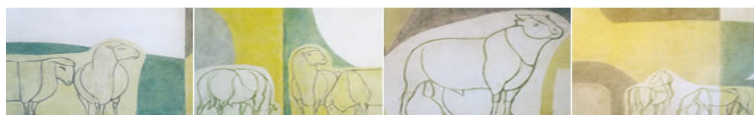
- **Tossicità acuta (GHS06)**
- **Tossicità a lungo termine (GHS07)**
- **Nocivi (GHS08)**
- **Corrosivi (GHS05)**
- **irritanti**
- **sensibilizzanti**
- **cancerogeni**
- **mutageni**
- **tossici per la riproduzione**



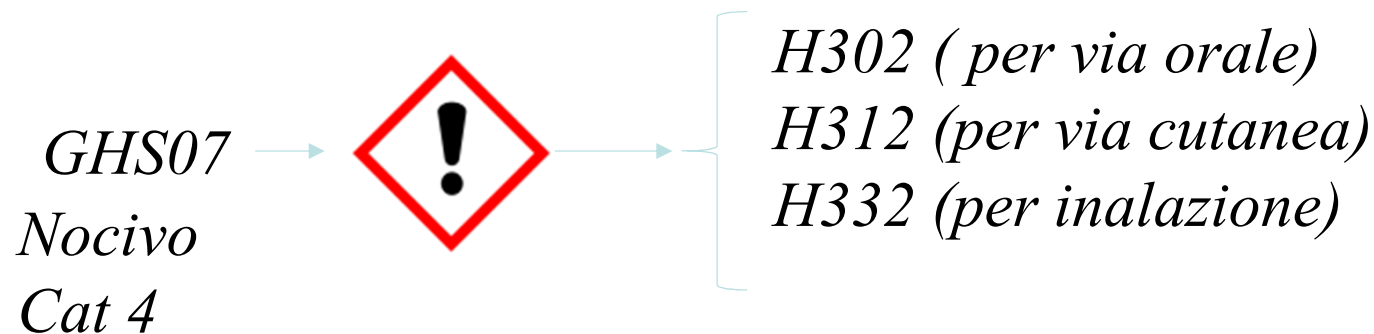
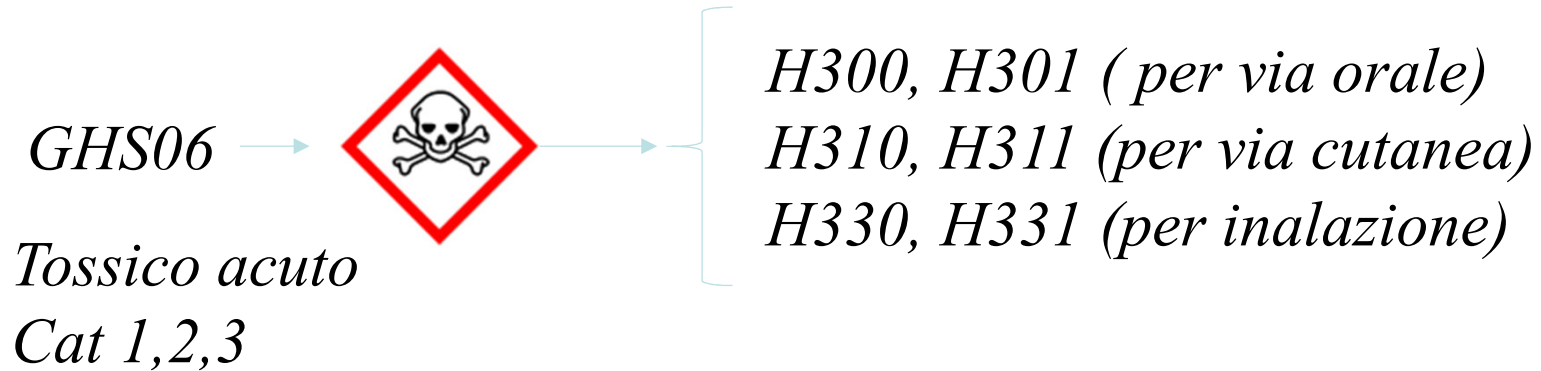
pericolosi per l'ambiente:

- **acquatico**
- **strato di ozono**

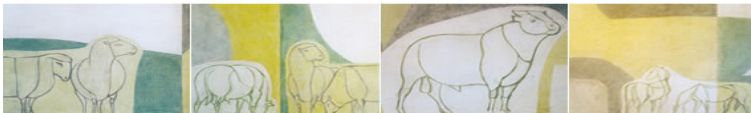
GHS09



Tossicità acuta



- *Da H 200 a H 290: pericoli fisici*
- *Da H 300 a H 373: pericoli per la salute*
- *Da H 400 a H 413: pericoli per l'ambiente.*



Classificazione secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008

Pericolo fisico → Liquidi infiammabili (Categoria 3), H226

Pericolo per la salute → Tossicità acuta,
Orale (Categoria 3), H301
Inalazione (Categoria 2), H330
Dermico (Categoria 3), H311



Corrosione cutanea (Sottocategoria 1B), H314

Lesioni oculari gravi (*Categoria 1*), H318

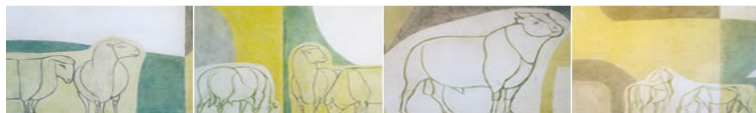
Sensibilizzazione cutanea (*Categoria 1*), H317

Mutagenicità delle cellule germinali (Categoria 2), H341

Cancerogenicità (Categoria 1B), H350

Tossicità specifica per organi bersaglio - esposizione singola
(Categoria 1), Occhi, Sistema nervoso centrale, H370

Cit. Pubchem

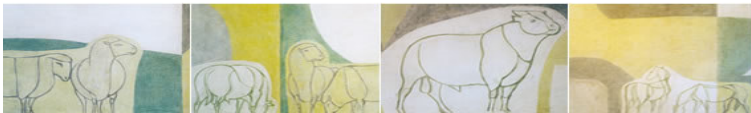


FORMALDEIDE LIBERA

I residui di formaldeide libera possono rimanere nel vaccine finale nonostante i diversi passaggi che si susseguono nel processo di inattivazione.

Pertanto è importante monitorare i livelli residui di formaldeide nei vaccini

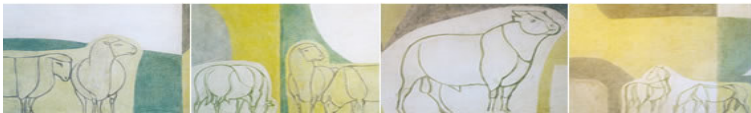
Ed infatti è stato attivato dal 2021 un un
programma di controllo di questo
composto avente proprietà cancerogene



FORMALDEIDE LIBERA

Norma di riferimento:

- European Pharmacopoeia 10.2, Cap 2.4.18 Free Formaldehyde METHOD A.*
- Ministero della salute, DECRETO 9 febbraio 2020 “Entrata in vigore dei testi, nelle lingue inglese e francese, pubblicati nella 10ª edizione della Farmacopea Europea. GU R I n.79 del 25-3-2020 - Suppl. Ordinario n. 14*

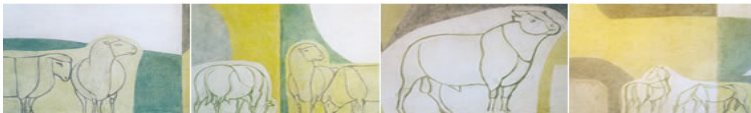


FORMALDEIDE LIBERA

European Pharmacopoeia 10.2

07/2020: 0062

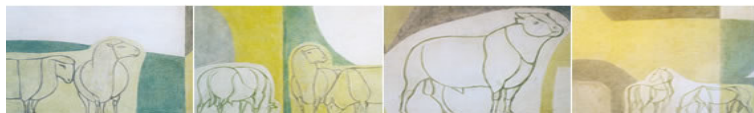
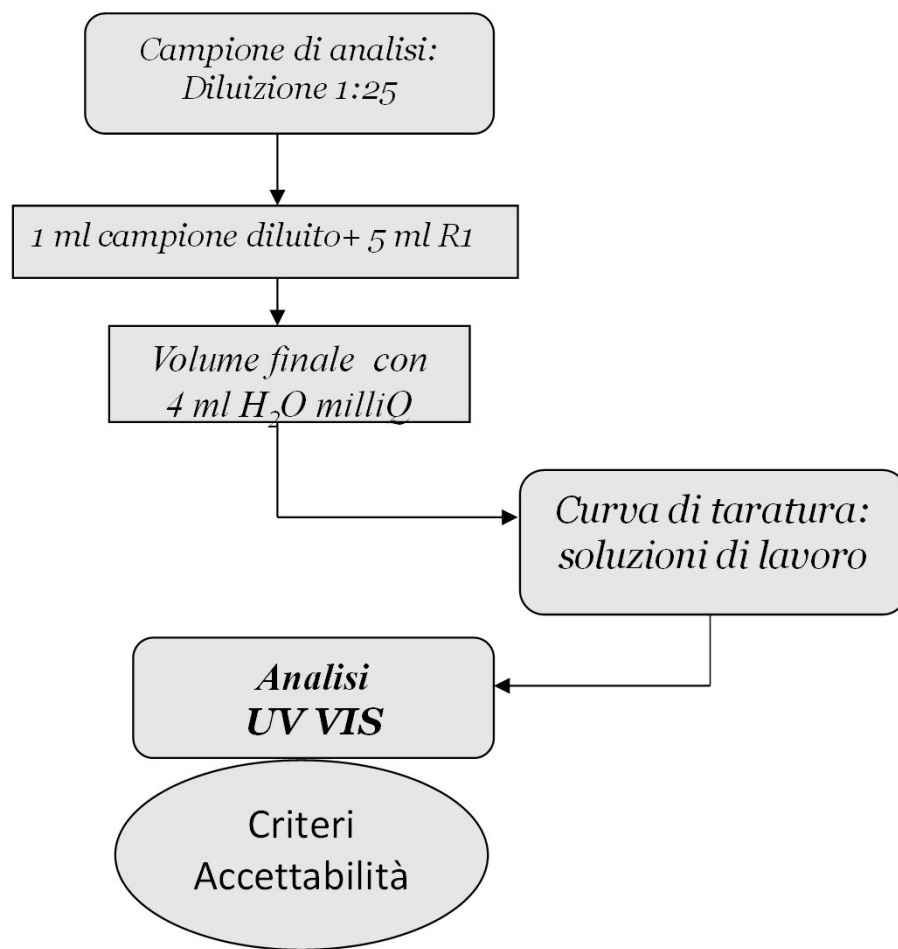
3-6. Formaldehyde (2.4.18; use Method B if sodium metabisulfite has been used to neutralise excess formaldehyde). Where formaldehyde has been used in the preparation, the concentration of free formaldehyde is not greater than 0.5 g/L, unless a higher amount has been shown to be safe.



Farmacopea Europea edizione 10^a

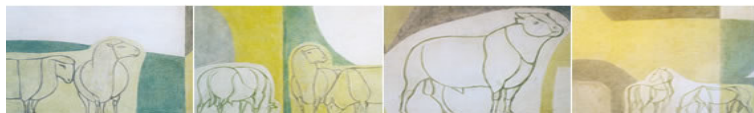
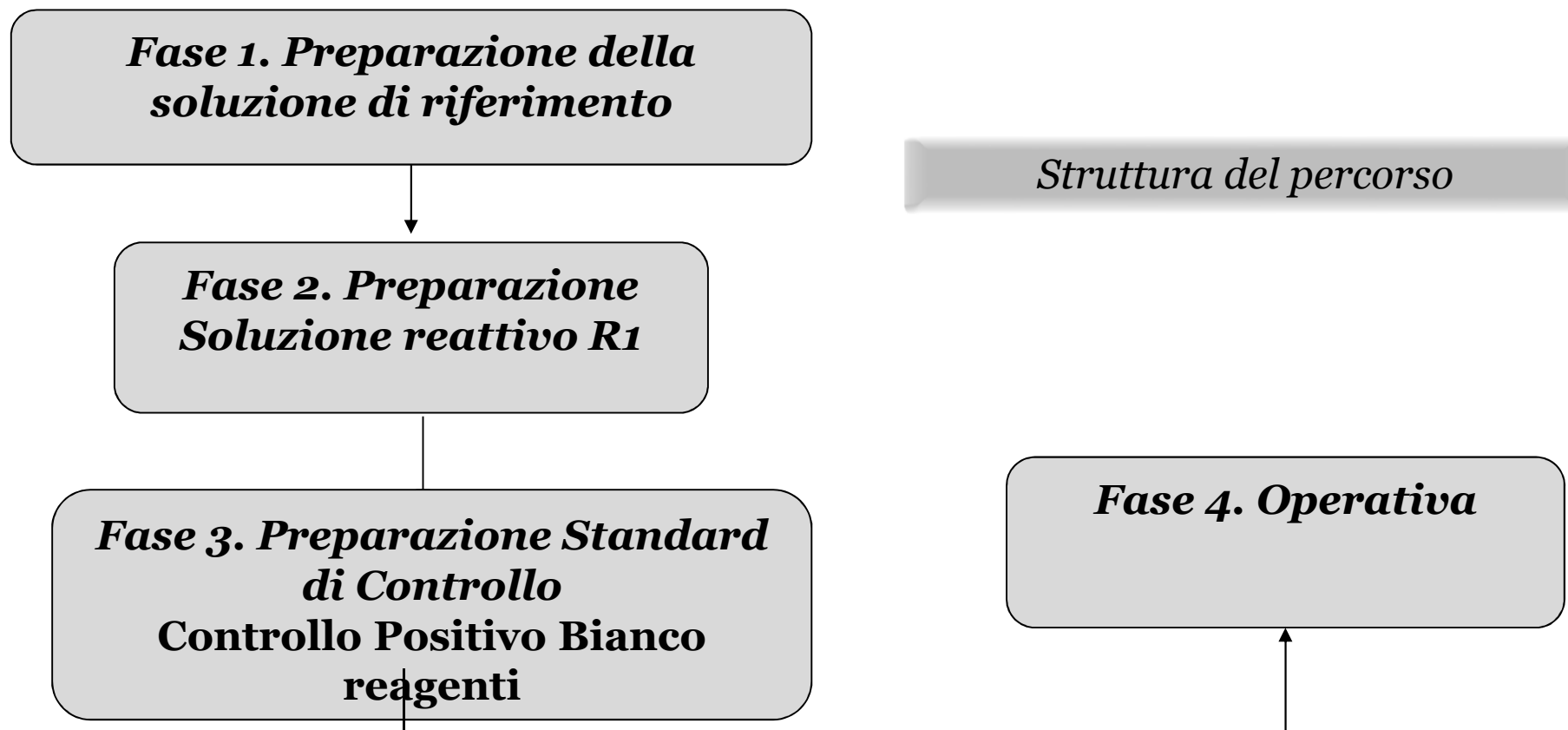
“Formaldeide 2.4.18 metodo A

Il metodo si basa sulla reazione colorimetrica tra la formaldeide libera con il reattivo acetilacetone (R1) in presenza di ammonio acetato forma la 3,5diacetil-1,4-diidrotoluidina che presenta una colorazione gialla. Le soluzioni ottenute vengono lette allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 410nm e l'assorbanza del campione viene confrontata con quella di una soluzione a concentrazione di 20 mg/l corrispondente a 0,5 g /L sul vaccino tal quale.



Farmacopea Europea edizione 10^a

“Formaldeide 2.4.18 metodo A



Fase 1. Preparazione della soluzione di riferimento

C_1 ($C_1 = 1000 \text{ mg/l}$ di formaldeide $\equiv C_1\% = 0,1\%$)

Se $C_{ST}(\%)$ è la concentrazione della formaldeide nel materiale di riferimento, per ottenere la soluzione $C_1(\%)$, basta effettuare una diluzione in volume noto secondo la seguente formula

$$C_1(\%) = \frac{C_{ST}(\%) \times X(\text{ml})}{V_F(\text{ml})}$$

Dove X è il volume in ml di soluzione da prelevare della soluzione di riferimento, e V è il volume finale. Pertanto considerando il volume da prelevare per ottenere la soluzione C1 è il seguente:

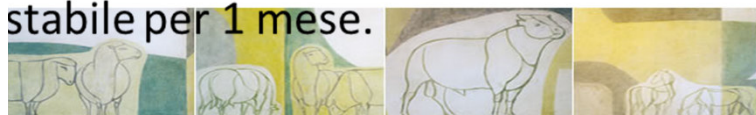
$$X(\text{ml}) = \frac{(C_1(\%) \times V(\text{ml}))}{C_{ST}(\%)} = \frac{0,1 \times V_F(\text{ml})}{C_{ST}(\%)}$$

Se consideriamo un volume finale di 500 ml, per ottenere una soluzione di formaldeide pari a $C_1 = 1000 \text{ mg/l}$ partendo da una soluzione di riferimento di formaldeide al 35% occorre prelevare

$$X(\text{ml}) = \frac{(0,1 \times 500)}{C_{ST}(\%)} = \frac{50}{35} = 1,43 \text{ ml}$$

di formaldeide e portati a volume di 500 ml in un matraccio tarato con acqua MilliQ.

Questa soluzione deve essere conservata alla temperatura di refrigerazione ($4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) ed è stabile per 1 mese.



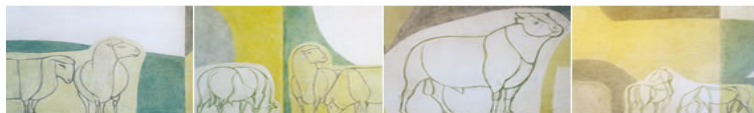
Fase 1. Preparazione della soluzione di riferimento

Soluzione di lavoro STD 1-4 (curva di taratura)

Le soluzioni STD1-4 vengono preparate per diluizione in acqua MilliQ della soluzione C_1 in matracci da 50 ml.

	Prelievo (ml) da C_1	C (ug/mL)
STD1	0.1	2
STD2	0.25	5
STD3	0.5	10
STD4	1	20

Queste soluzioni di lavoro devono essere preparate prima dell'uso



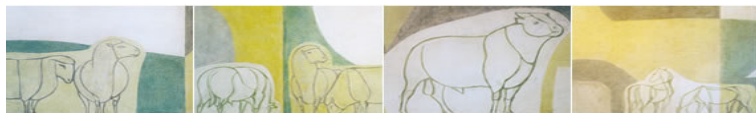
Fase 2. Preparazione Soluzione reattivo R1

☐ *Soluzione ammonio acetato R*

Disciogliere in un matraccio da 1L 150 g di ammonio acetato con circa 500 ml di acqua milliQ.

☐ *Reagente acetilacetone reattivo R1*

Aggiungere a 100 ml di ammonio acetato soluzione R, 0,2 ml di acetilacetone



Fase 3. Preparazione Standard di Controllo **Controllo Positivo Bianco reagenti**

- *Soluzione di Controllo (SC) conc = 20ug/ml)*

La soluzione di controllo è alla stessa concentrazione della soluzione STD4. Prelevare quindi 1 ml della soluzione C₁ di formaldeide e portare a volume in un matraccio da 50 ml con acqua MilliQ

- *Bianco reagenti (BR)*

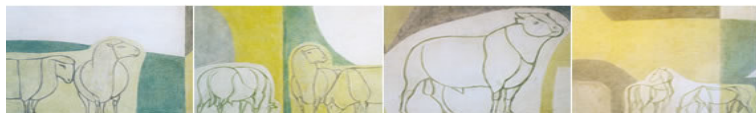
Il bianco reagenti è costituito da acqua MilliQ

- *Controllo Positivo (CP) C_f = 0,5 g/L)*

Prelevare quindi 50 ml della soluzione C₁ di formaldeide e portare a volume in un matraccio da 50 ml con acqua MilliQ

Queste soluzione deve essere preparata prima dell'uso

Fase 4. Operativa



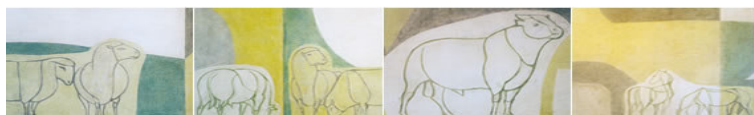
Spettrofotometro UV VIS



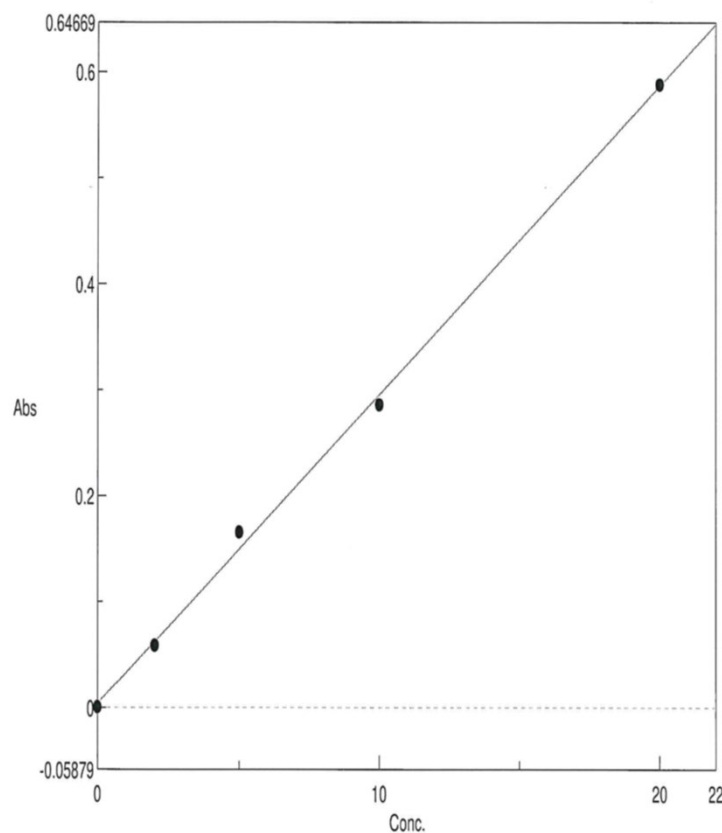
Jasco modello V-530

A doppio raggio

Si misura l'assorbanza della soluzione di controllo SC e dei campioni, ivi compreso il controllo positivo, alla lunghezza d'onda di **410 nm** usando come riferimento la soluzione BR.

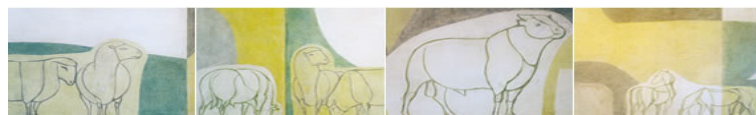


Curva di taratura



Calib Curve: Linear
 Expression: $Abs = A + B * Conc$
 Factor: $A = 0.0037$
 $B = 0.0291$
 Coefficient: 0.999147

No.	Conc.	Abs
1	0.0000	0.0000
2	2.0000	0.0583
3	5.0000	0.1653
4	10.0000	0.2857
5	20.0000	0.5879



Risultati

No. of WL: 1-WL method
 Peak : 410.0 nm
 Response: Medium
 BandWidth: 2.0 nm
 No. of cycles: 1

 Calib Curve: Linear
 Expression: Abs = A + B * Conc
 Factor: A = 0.0037
 B = 0.0291
 Coefficient: 0.999147

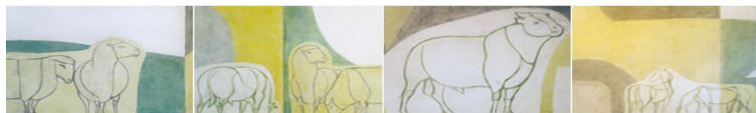
 Sample blank: 0.0000
 Blank correct: On

La concentrazione di formaldeide libera, in g/L sul campione iniziale si ottiene mediante la seguente equazione:

$$C(g/l) = \frac{C_x \cdot V}{M} \cdot \frac{1}{1000} \cdot D$$

C_x → concentrazione (in mg/l) di formaldeide dalla curva di taratura
 V → volume di diluizione iniziale (25ml)
 M → Volume (in ml) di campione prelevato
 D → Diluizione ulteriore, se non si effettuano diluizioni del campione D=1

Sample ID	Conc.	Abs	410 nm
bc	-0.08	0.0014	0.0014
spk20	20.92	0.6136	0.6136
81637	6.41	0.1907	0.1907
82527	3.83	0.1155	0.1155
82528	3.24	0.0982	0.0982
82529	3.42	0.1034	0.1034
83511	5.99	0.1782	0.1782
83512	5.70	0.1698	0.1698
83513	5.28	0.1577	0.1577
83515	7.94	0.2352	0.2352
83516	6.99	0.2074	0.2074



Risultati

No. of WL: 1-WL method
 Peak : 410.0 nm
 Response: Medium
 BandWidth: 2.0 nm
 No. of cycles: 1

 Calib Curve: Linear
 Expression: $Abs = A + B * Conc$
 Factor: $A = 0.0037$
 $B = 0.0291$
 Coefficient: 0.999147

 Sample blank: 0.0000
 Blank correct: On

Sample ID	Conc.	Abs	410 nm
bc	-0.08	0.0014	0.0014
spk20	20.92	0.6136	0.6136
81637	6.41	0.1907	0.1907
82527	3.83	0.1155	0.1155
82528	3.24	0.0982	0.0982
82529	3.42	0.1034	0.1034
83511	5.99	0.1782	0.1782
83512	5.70	0.1698	0.1698
83513	5.28	0.1577	0.1577
83515	7.94	0.2352	0.2352
83516	6.99	0.2074	0.2074

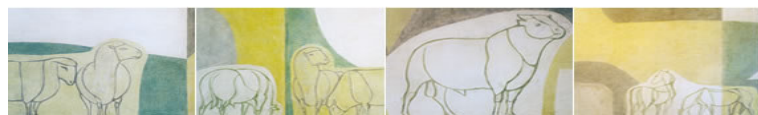
ACCETTABILITA'

- *Standard di controllo (SC)*

La concentrazione risultante dall'analisi UV VIS deve essere di 20 ± 2 mg/L.

- *Controllo positivo*

Calcolare la concentrazione mediante la formula), è accettabile una variazione di ± 10 % rispetto alla concentrazione nominale

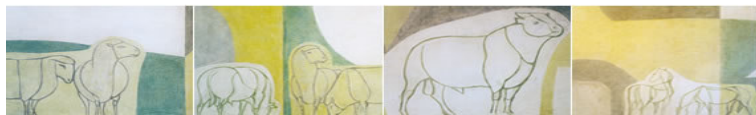


POS CHI 037 NOR rev. 0

Validazione del metodo

PG CHI 003 « Guida per la validazione dei metodi di prova chimici»

Accuratezza	Misure ripetute su campioni con formaldeide superiore ed inferiore al valore di soglia
LOQ*	$X_{(LOD)} = \frac{3.9 * s_{y,b}}{b}$ $X_{(LOQ)} = 3.3 * X_{(LOD)}$ $LOQ = \frac{X_{(LOQ)} \times V}{M \times 1000}$
Robustezza	Analisi eseguita da operatori diversi



POS CHI 037 NOR rev. 0

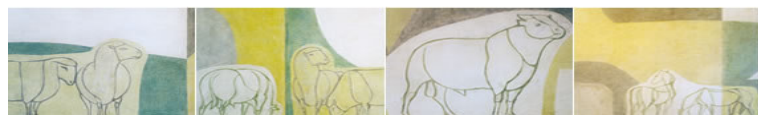
Validazione del metodo

LOD = 0.02 g/L

LOQ = 0.05 g/L

Per la validazione sono stati impiegati questi vaccini:

NR	Tipo di vaccino	Lotto	Formaldeide libera
21019115-1	Salmonella abortus Ovis	91/20	> 0.5 g/L
21019115-2	Anticoli agnelli	117/20	> 0.5 g/L
21017796-1	Mastite stafilococcica	17/2021	< 0.5g/L
21017796-2	Colibacillosi degli agnelli	18/2021	< 0.5 g/L



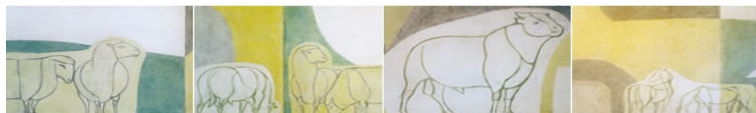
POS CHI 037 NOR rev. 0

Validazione del metodo

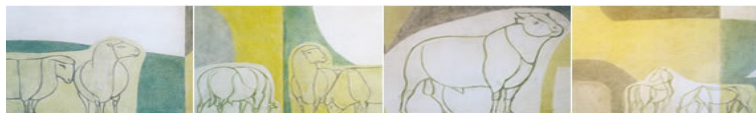
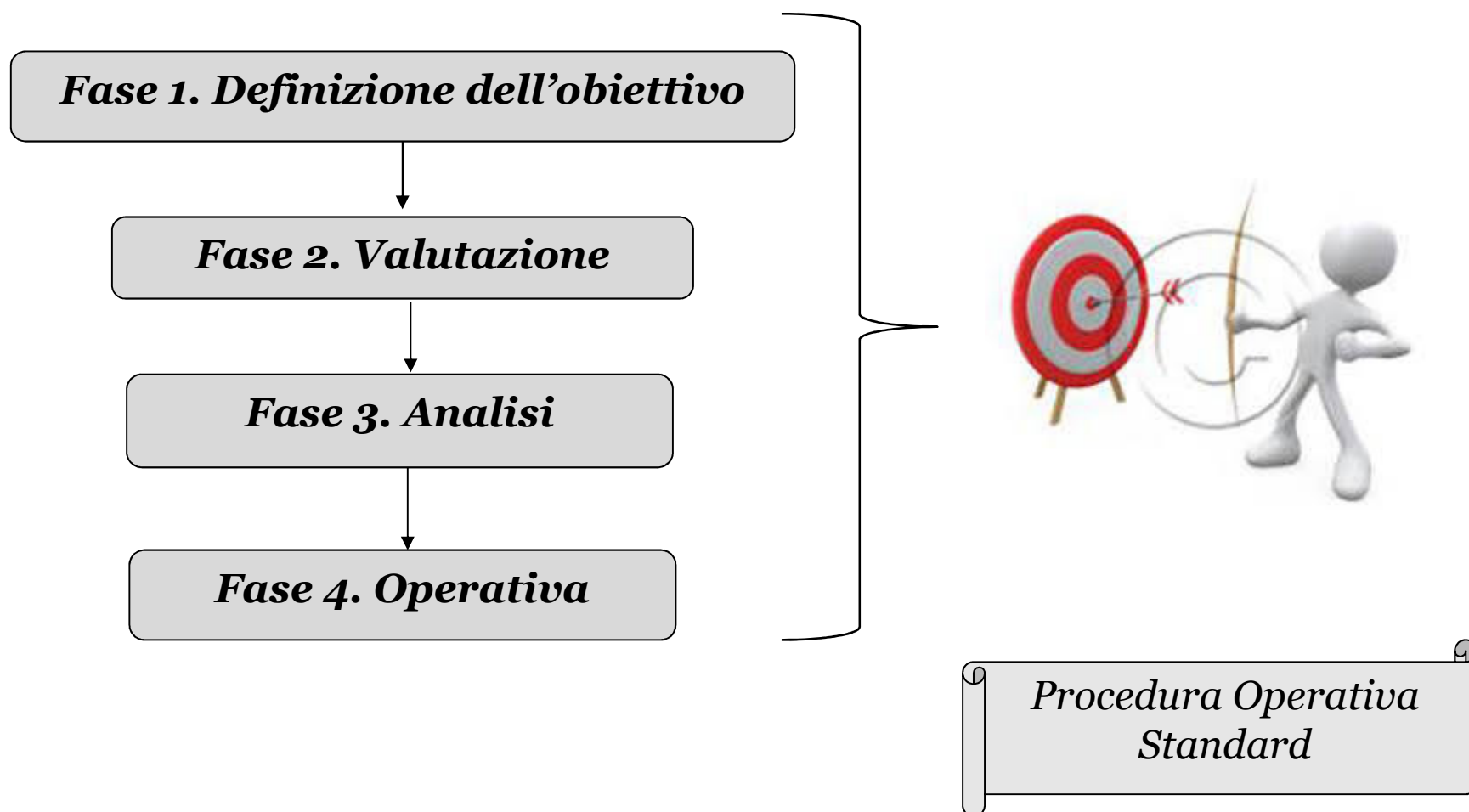
$LOD = 0.02 \text{ g/L}$

$LOQ = 0.05 \text{ g/L}$

NR		n	C_M (g/L)	s (g/L)	RSD %	R (%)
21019115-1	Operatore 1	10	1.35	0.02	1.6	
	Operatore 2	10	1.37	0.04	3.0	
21019115-2	Operatore 2	10	1.41	0.03	1.9	
21017796-1	Operatore 1	10	0.060	0.002	3.6	
	Operatore 2	10	0.063	0.011	17.9	
21017796-2	Operatore 1	10	0.038	0.001	3.7	
	Operatore 2	10	0.046	0.01	14.5	
SPK	Operatore 1	6	0.498	0.004	0.9	99.6
	Operatore 2	10	0.486	0.031	6.3	97.2

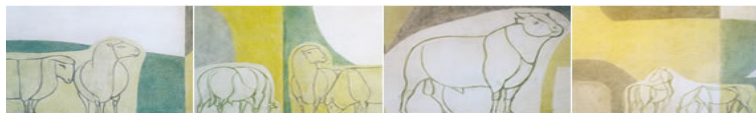
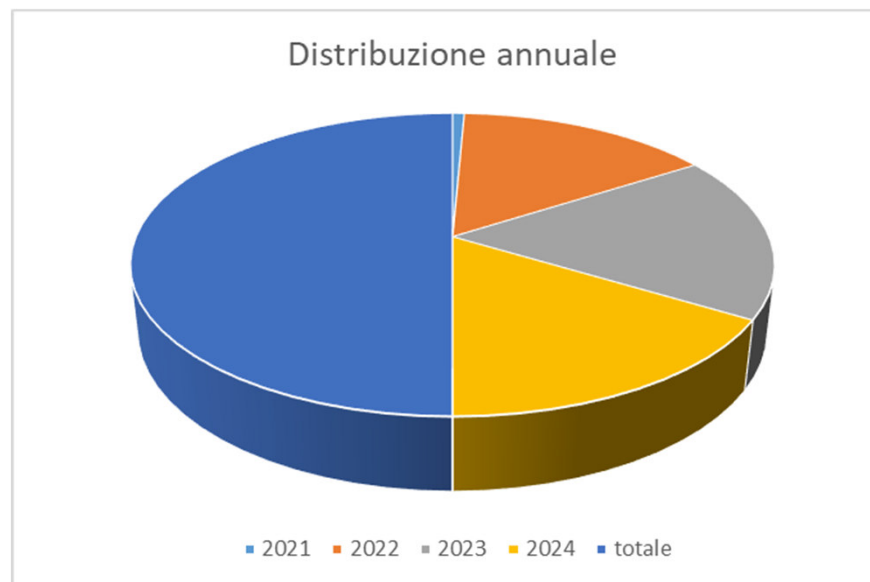


POS CHI 037 NOR rev. 0

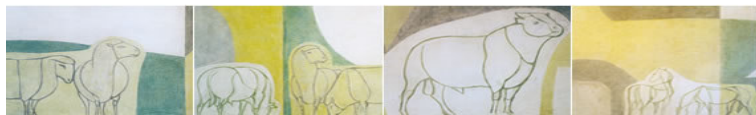
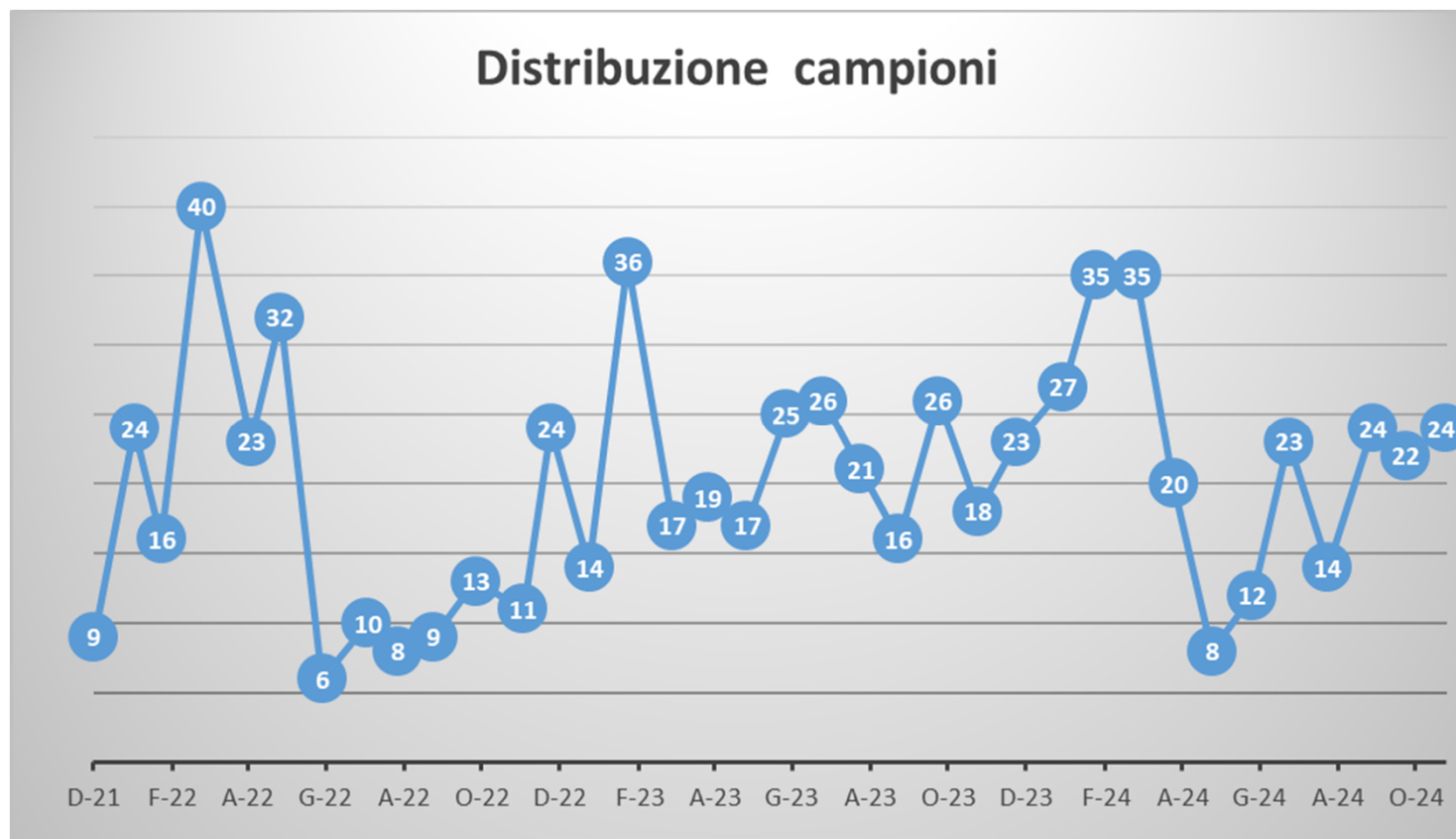


Attività

2021	10
2022	217
2023	252
2024	233
Totale	712

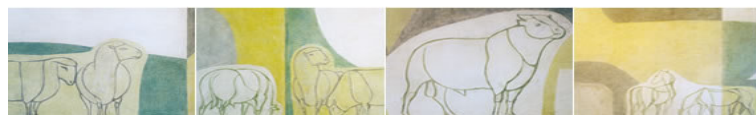
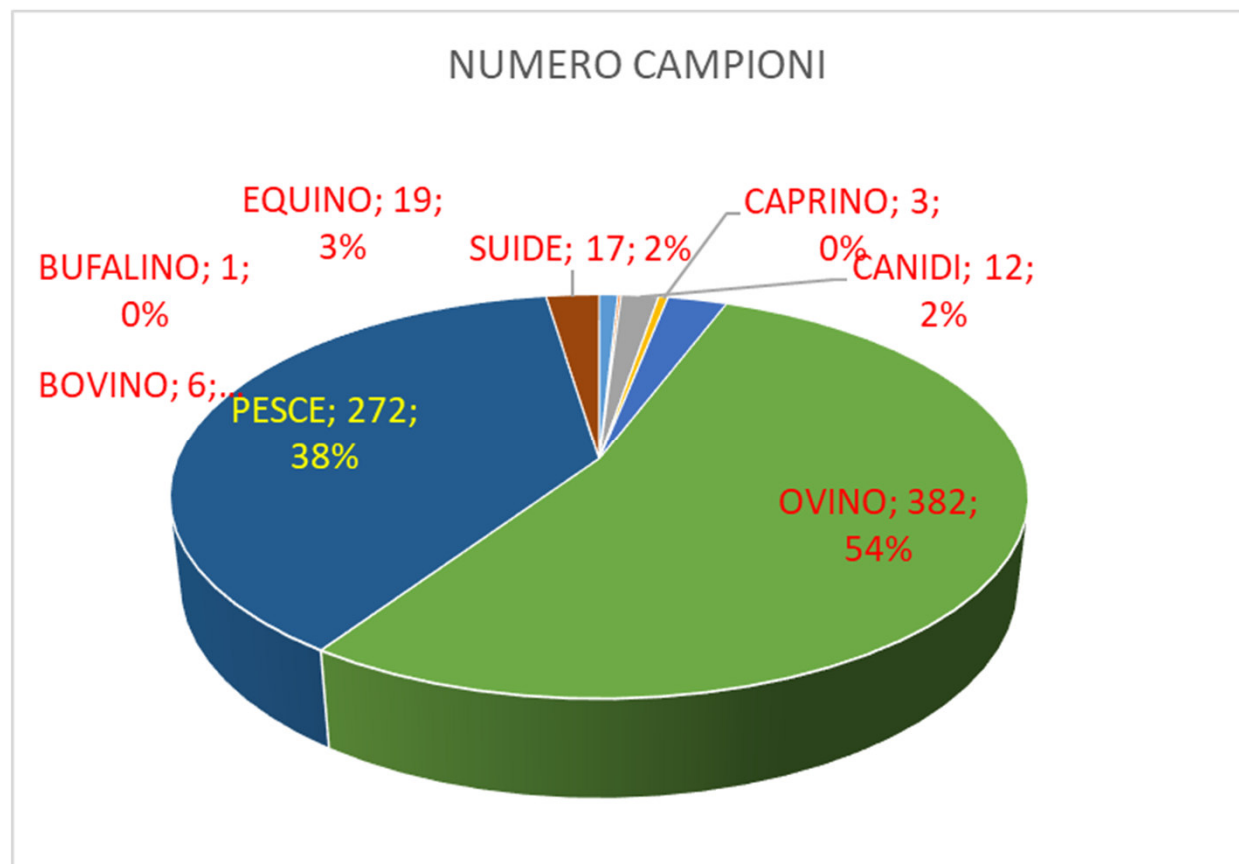


Attività



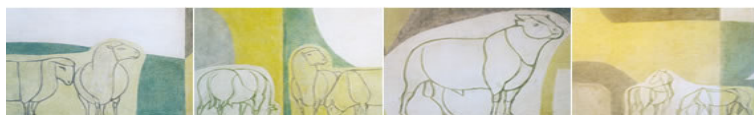
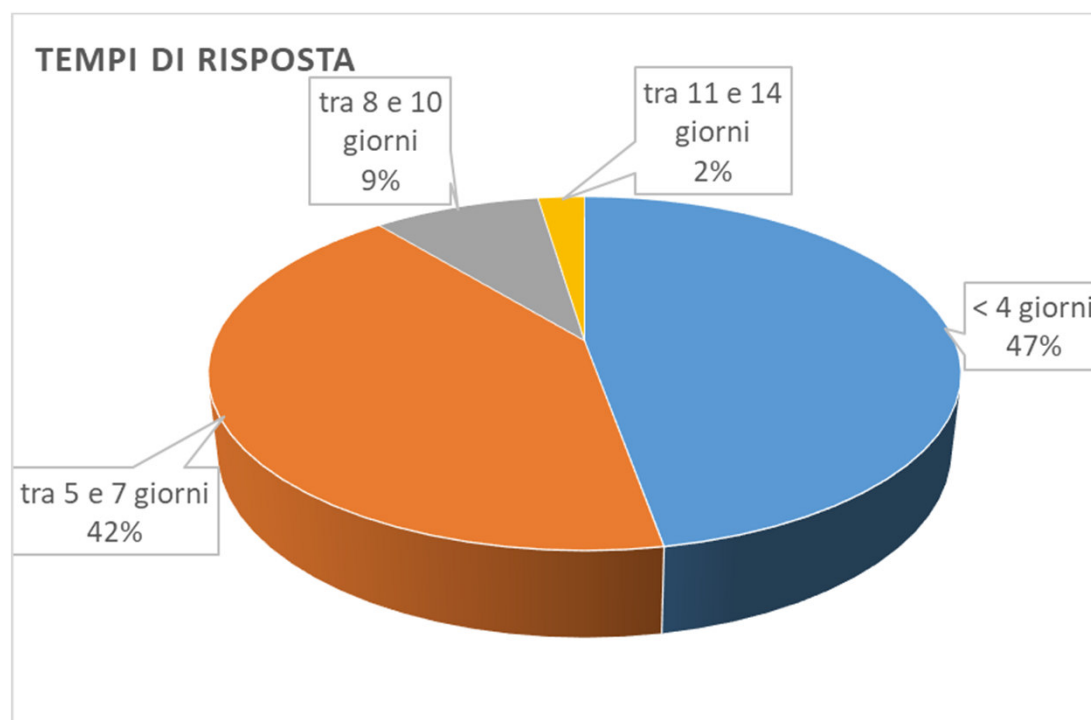
Attività

CATEGORIA	NUMERO CAMPIONI
BOVINO	6
BUFALINO	1
CANIDI	12
CAPRINO	3
EQUINO	19
OVINO	382
PESCE	272
SUIDE	17



Attività

Tempi di risposta	
< 4 giorni	336
tra 5 e 7 giorni	298
tra 8 e 10 giorni	61
tra 11 e 14 giorni	17



D.O. Chimica Firenze

***Ilaria Amidei
Giulia Biancalani
Gerardina Marmo
Federica Ramundi***

