

**Argomenti di Sanità Pubblica Veterinaria
e Sicurezza Alimentare.
Seminari dipartimentali 2011**

A cura di
Valeria Patriarca, Ilaria Di Bartolo, Rosangela Tozzoli e Umberto Agrimi
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare

Istituto Superiore di Sanità

Argomenti di sanità pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare. Seminari dipartimentali 2011.

A cura di Valeria Patriarca, Ilaria Di Bartolo, Rosangela Tozzoli e Umberto Agrimi

2012, XXX p. Rapporti ISTISAN 12/XX

Come da alcuni anni, anche nel 2011, i ricercatori più giovani del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare dell'Istituto Superiore di Sanità si sono fatti promotori dell'organizzazione di un ciclo di seminari dipartimentali. I seminari, **per lo più tenuti dagli stessi giovani ricercatori con contratto a tempo determinato o dottorandi di ricerca**, hanno avuto lo scopo di far conoscere, all'interno e fuori dal Dipartimento, alcune delle attività svolte, fornire un'occasione di dibattito e discussione e rappresentare, specialmente per i dottorandi di ricerca, un momento del percorso formativo offerto dal Dipartimento relativamente alla comunicazione dei risultati delle proprie ricerche. Le tematiche affrontate nei seminari sono eterogenee e comprendono i meccanismi di virulenza e di plasticità dei microorganismi (compresa l'acquisizione di resistenza ai farmaci), i programmi di sorveglianza ed epidemiologia delle malattie gastroenteriche e del botulismo, la valutazione dell'attività antibatterica delle batteriocine nei confronti dei patogeni alimentari, lo stato dell'arte sugli OGM (**Organismo Geneticamente Modificato**), la valutazione del rischio dei nanomateriali. Tale eterogeneità è indicativa della varietà delle problematiche di ricerca e intervento affrontate dal Dipartimento. La qualità dei seminari testimonia la competenza e la professionalità del personale al quale va il particolare riconoscimento per l'impegno profuso nella realizzazione di questa iniziativa.

Parole chiave: Malattie infettive; Virulenza batterica; Farmacoresistenza; Sorveglianza; Epidemiologia; Batteriocine; OGM; nanomateriali.

Istituto Superiore di Sanità

Issues of Public Veterinary Health and Food Safety. Seminars of the Department for 2011.

Edited by Valeria Patriarca, Ilaria Di Bartolo, Rosangela Tozzoli and Umberto Agrimi

2012, XXX p. Rapporti ISTISAN 12/XX (in Italian)

In 2011, **like** as in the previous years, the young researchers of the Department of Veterinary Public Health and Food Safety at the Istituto Superiore di Sanità **have been promoting the organization of** organized a series of department seminars. The seminars, **held mostly by young researchers with temporary position or PhD students**, were intended to promote knowledge, both within and outside the Department, on some of the activities of the Department, to provide a forum for debate and discussion and to represent, especially for PhD students, an opportunity of training in communication of research results. The topics covered in the seminars included the mechanisms of virulence and plasticity of micro-organisms (including the acquisition of drug resistance), the surveillance and epidemiology of gastro-intestinal diseases and botulism, the evaluation of antibacterial activity of bacteriocins against food-borne pathogens, the state-of the art on GMO (**Genetically Modified Organism**) and the risk assessment of nanomaterials. This heterogeneity is indicative of the range of issues of research and intervention addressed by the Department. The quality of the seminars demonstrates the competence and professionalism of the researchers to whom a special recognition for their efforts in the finalization of this initiative is recognised.

Key words: Infectious diseases; Bacterial virulence; Drug resistance; Surveillance; Epidemiology; Bacteriocins; GMOs; Nanomaterials.

Per informazioni su questo documento scrivere a: umberto.agrimi@iss.it.

INDICE

Premessa	iii
Plasticità genomica e virulenza batterica: il paradigma degli <i>attaching and effacing escherichia coli</i> <i>Laura Grande, Valeria Michelacci, Stefano Morabito</i>	1
Resistenza agli antibiotici e attività di ricerca <i>Caterina Graziani</i>	6
La sorveglianza in sanità pubblica. Malattie gastroenteriche acute trasmesse da alimenti (MTA): principi e definizioni <i>Gaia Scavia.....</i>	9
Epidemiologia delle gastroenteriti acute a eziologia infettiva in Italia: le esperienze delle regioni Lombardia e Piemonte, 1992-2009 <i>Lapo Mughini Gras</i>	15
Centro nazionale di riferimento per il botulismo: sorveglianza e ricerca <i>Fabrizio Anniballi, Bruna Auricchio, Alfonsina Fiore, Lucia Fenicia, Luciana Croci</i>	24
Valutazione dell'attività antibatterica delle batteriocine nei confronti di patogeni alimentari <i>Alfonsina Fiore, Alessandra Vilmercati, Fabrizio Anniballi, Dario De Medici</i>	28
OGM in alimenti e mangimi: <i>overview</i> sullo stato dell'arte, valutazione del rischio, strumenti diagnostici di controllo <i>Marzia De Giacomo, Roberta Onori, Carlo Brera</i>	36
Valutazione del rischio dei nanomateriali negli alimenti <i>Francesco Cubadda, Federica Aureli, Marilena D'Amato, Gabriele Moracci, Andrea Raggi.....</i>	41

Metterei qui in prefazione la questione
dei precari

PREMESSA

Tra le iniziative di formazione del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, anche nel 2011, come negli anni scorsi, i ricercatori più giovani del Dipartimento hanno organizzato un ciclo di seminari con gli obiettivi di facilitare lo scambio di esperienze all'interno e all'esterno del Dipartimento, di promuovere la collaborazione, di avere un'occasione per presentare i risultati delle proprie ricerche.

I seminari hanno anche rappresentato, per i dottorandi di ricerca del Dipartimento, un momento del percorso formativo in merito alla comunicazione scientifica.

Rendere disponibili ad un pubblico ampio questa esperienza attraverso la pubblicazione dei testi dei seminari su questo fascicolo dei Rapporti ISTISAN è l'occasione di far conoscere alcune delle attività del Dipartimento.

Le tematiche affrontate negli otto articoli, sebbene eterogenee, rappresentano un piccolo esempio della varietà di ambiti di ricerca e intervento che costituiscono lo spazio di competenza di uno dei Dipartimenti più complessi dell'Istituto Superiore di Sanità.

Umberto Agrimi

*Direttore del Dipartimento di
Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare*

PLASTICITÀ GENOMICA E VIRULENZA BATTERICA: IL PARADIGMA DEGLI ATTACHING AND EFFACING ESCHERICHIA COLI

Laura Grande, Valeria Michelacci, Stefano Morabito
Reparto Zoonosi trasmesse dagli alimenti

Escherichia coli (*E. coli*) è un microrganismo ubiquitario, commensale dell'uomo e degli animali.

Alcuni ceppi di *E. coli* possono indurre nell'uomo quadri morbosi talvolta anche con esiti fatali. Questi includono le infezioni del tratto urinario, le sepsi, le meningiti e le infezioni enteriche associate a diarrea. I ceppi patogeni di *E. coli* sono caratterizzati dalla capacità di produrre fattori di virulenza. Questi tipicamente comprendono sia fattori coinvolti nella colonizzazione del distretto in cui provocano infezione, quali fimbrie, pili e adesine, che tossine; queste ultime spesso responsabili delle sequele più gravi conseguenti all'infezione.

Gli stipiti di *E. coli* patogeni si possono suddividere in due categorie: i ceppi che causano patologie intestinali (*Diarrheagenic E. coli*, DEC) e quelli che infettano distretti extraintestinali (*Extraintestinal Pathogenic E. coli*, ExPEC).

Il gruppo degli *E. coli* diarreagenici è quello che mostra la maggiore variabilità, sia in termini di meccanismi di virulenza che di complessità genomica. La categoria dei DEC, a sua volta, è suddivisa in sei patogruppi: gli *E. coli* enteropatogeni (EPEC), gli *E. coli* produttori di verocitotossina (VTEC), gli *E. coli* enterotossigenici (ETEC), gli *E. coli* enteroaggregativi (EAggEC), gli *E. coli* enteroinvasivi (EIEC) e gli *E. coli* che causano adesione diffusa (DAEC).

Le relazioni filogenetiche esistenti tra i patogruppi DEC sono complesse (Figura 1) (Donnenberg M, 2002). I ceppi appartenenti ai patogruppi VTEC, EPEC, EIEC e DAEC hanno alcuni tratti genetici in comune, che nel caso dei VTEC e degli EPEC sono molto estesi e includono molti degli elementi genetici mobili veicolanti fattori di virulenza.

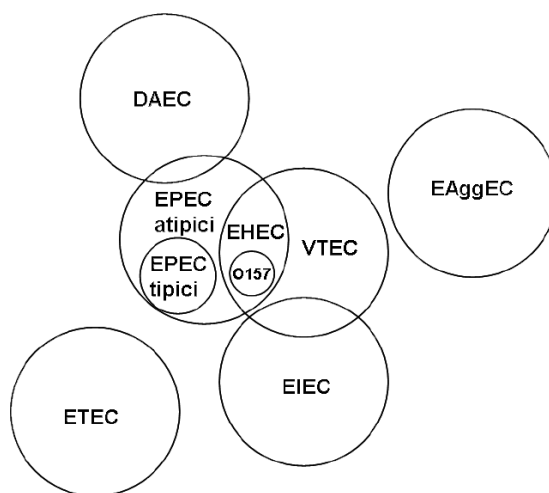


Figura 1. Schematizzazione delle relazioni filogenetiche tra patogruppi di *E. coli* diarreagenici

Le evidenze filogenetiche indicano che questi due patogruppi si siano probabilmente evoluti a partire da un antenato comune o attraverso fenomeni di convergenza evolutiva, rappresentando pertanto un modello per comprendere le relazioni evolutive che hanno portato all'emergenza dei diversi patogruppi di *E. coli*.

I ceppi VTEC e EPEC dal punto di vista patogenetico sono accomunati dalla capacità di indurre una caratteristica lesione istopatologica a carico dell'epitelio intestinale dell'ospite nota come *attaching and effacing* (A/E), caratterizzata dalla distruzione dell'orletto a spazzola e da una profonda alterazione della struttura del citoscheletro dell'enterocita che consente l'adesione intima del batterio alla membrana plasmatica. L'abilità di indurre questa lesione è conferita da geni veicolati da un'isola di patogenicità denominata *locus of enterocyte effacement* (LEE). I geni presenti nel *locus* LEE sono organizzati in cinque operoni (Figura 2) e codificano le proteine strutturali e i regolatori necessari all'attività di un sistema di secrezione di tipo III (T3SS) utilizzato per la traslocazione diretta nella cellula ospite di effettori che causano il riarrangiamento del citoscheletro e la conseguente lesione intestinale di tipo A/E.

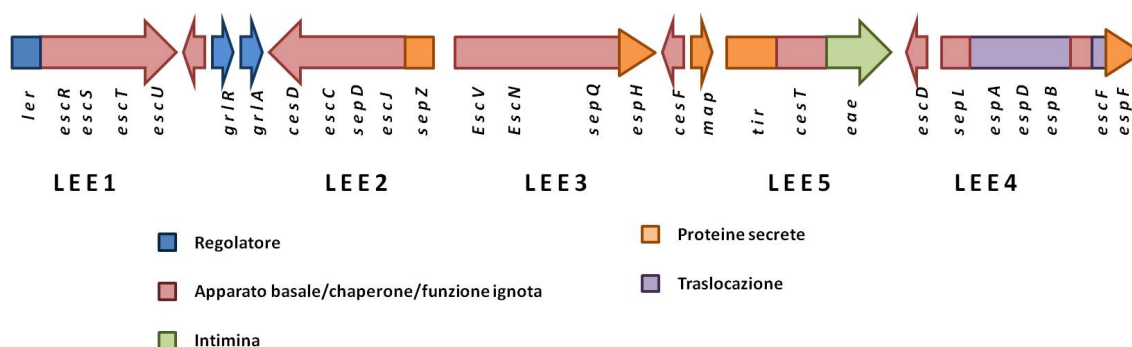


Figura 2. Organizzazione genetica del *locus* LEE

Tra i geni più importanti veicolati dal *locus* LEE sono il gene *eae*, codificante l'intimina, proteina necessaria per l'adesione batterica alla cellula ospite, e il gene *tir*, che codifica il recettore per l'intimina che viene traslocato nella cellula ospite attraverso il T3SS.

A differenza degli EPEC, i VTEC producono potenti citotossine, le verocitotossine, responsabili della progressione dell'infezione verso le forme più gravi, ed hanno un serbatoio naturale animale, costituito principalmente dal tratto gastro-intestinale dei ruminanti. I VTEC, pertanto, sono microorganismi zoonotici.

Ad oggi sono stati descritti più di 300 sierotipi diversi di *E. coli* in grado di produrre le Verocitotossine tra quelli circolanti nel serbatoio animale. Tuttavia, soltanto quelli appartenenti ad un limitato numero di sierogruppi, in particolare O157, O26, O111, O103 e O145, sono finora stati associati alla capacità di causare le forme d'infezione più gravi. Questi sierotipi sono caratterizzati dalla presenza del *locus* LEE e di un elevato numero di geni di virulenza accessori, e sono frequentemente causa di episodi epidemici anche di grandi dimensioni.

Il primo sequenziamento del corredo genomico completo di un ceppo VTEC è avvenuto nel 2001, con la pubblicazione del genoma del ceppo VTEC O157:H7, EDL933. Dal confronto con la sequenza del cromosoma del ceppo non patogeno di *E. coli* K-12, MG1655, è emerso che i genomi di entrambi i ceppi, di circa 5 Mb, sono costituiti da una larga porzione condivisa (4,1 Mb) costellata di centinaia di isole genomiche specifiche dell'uno o dell'altro ceppo. Queste

sono distribuite nei due genomi sotto forma di isole di dimensioni variabili, da meno di 50 bp fino ad un massimo di 88 kb, che veicolano circa il 25% dei geni presenti nell'intero genoma del ceppo VTEC EDL933. Molti tra questi elementi genetici mobili (MGE) sono presenti anche nei ceppi EPEC. In particolare, il *locus* LEE e un gran numero di MGE codificanti effettori traslocati attraverso il T3SS collegati alla capacità di indurre la lesione A/E. A causa di questa capacità gli EPEC e i VTEC in grado di causare malattia nell'uomo sono anche noti come "attaching and effacing *E. coli*" (AEEC).

Di seguito sono descritti i principali elementi genetici mobili presenti negli EPEC e nei VTEC patogeni per l'uomo.

Fagi. I principali fattori di virulenza dei VTEC, le verocitotossine (VT), sono codificati da geni presenti su profagi lambdoidi integrati nel cromosoma. Esistono due varianti di VT, denominate VT1 e VT2, e ciascuna variante a sua volta può includere numerosi sottotipi, alcuni dei quali strettamente associati a particolari specie animali. I membri della famiglia VT sono olotossine di circa 70 kDa costituite da una singola subunità catalitica di 32 kDa, la subunità A, e da un pentamero di subunità B (di 7,7 kDa ciascuna) coinvolto nel legame specifico a recettori presenti sulla superficie delle cellule bersaglio. In seguito al legame con i recettori specifici, il meccanismo di endocitosi mediata da recettore permette l'internalizzazione delle tossine che, in cellule sensibili, raggiungono per trasporto retrogrado il reticolo endoplasmatico dove vengono attivate attraverso un taglio proteolitico della subunità A che determina la liberazione del frammento A1, il quale esplica la propria attività N-glicosidasi sull'rRNA 28S con conseguente inibizione della sintesi proteica.

Isole di patogenicità (PAIs). La maggior parte degli stipiti EPEC e VTEC patogeni per l'uomo possiede un'isola di patogenicità denominata O#122. In alcuni ceppi, la PAI O#122 e il *locus* LEE sono strettamente associati a formare un'unica struttura a mosaico integrata nello stesso *locus*, mentre in altri, come i VTEC O157, la PAI O#122 è localizzata in un *locus* distinto. È possibile che le due isole possano essere state originariamente acquisite come un unico MGE da un progenitore comune agli EPEC e ai VTEC e successivamente si sia operata la separazione in alcuni cloni in seguito ad eventi di riarrangiamento cromosomico. La PAI O#122 ospita *efal/lifA*, un gene di virulenza di 10 kb il cui prodotto sembra essere coinvolto nell'inibizione della risposta immunitaria dell'ospite mediata da linfociti T attivati e nel meccanismo di adesione alle cellule in coltura.

Un'altra PAI associata significativamente ai ceppi VTEC patogeni per l'uomo è la PAI O#57. Questa veicola il gene *adfO*, codificante un fattore che stimola l'adesività batterica, e il gene di origine profagica *ckf*, codificante un fattore con una azione citotossica putativa per la cellula batterica. Poiché questa isola è presente nella gran parte dei genomi VTEC e degli stipiti EPEC umani, è stato ipotizzato che essa possa svolgere un ruolo nella colonizzazione intestinale degli AEEC.

Plasmidi. Gli stipiti VTEC patogeni per l'uomo possiedono un grande plasmide di virulenza di 90 Kb chiamato pO157 nei VTEC di sierogruppo O157. Questo codifica 35 proteine, tra cui alcune probabilmente coinvolte nella patogenesi delle infezioni, tra cui l'enteroemolisina, una catalasi perossidasi e una serin-proteasi. Il pO157, inoltre, veicola un altro gene, *tox*B, anch'esso di grandi dimensioni (circa 10 Kb). Come per il prodotto di *efal*, la proteina codificata da *tox*B è associata ad una inibizione dell'attivazione dei linfociti T e, quindi, della risposta immunitaria dell'ospite.

Anche i ceppi EPEC posseggono un plasmide di grandi dimensioni, denominato EAF (*EPEC Factor for Adherence*), che ospita i geni codificanti alcune fimbrie che innescano il processo di adesione all'epitelio intestinale. La presenza di questo plasmide è associata agli stipiti EPEC umani che costituiscono una delle principali cause di gastroenterite nei paesi in via di sviluppo, denominati EPEC tipici (tEPEC). Gli EPEC atipici (aEPEC), invece, sono stipiti di *E. coli* in

grado di causare la lesione A/E ma con un meccanismo lievemente differente. Questi ceppi posseggono un plasmide di virulenza del tutto simile a quello dei VTEC patogeni per l'uomo in sostituzione del plasmide EAF.

Nonostante i patogruppi VTEC e EPEC mostrino importanti analogie da un punto di vista genomico e patogenetico, essi risultano notevolmente diversi da un punto di vista epidemiologico. I ceppi tEPEC sono responsabili di epidemie di diarrea infantile protratta nei paesi in via di sviluppo, con una trasmissione interumana dell'infezione. I ceppi VTEC, invece, hanno il loro serbatoio naturale nel tratto gastrointestinale dei ruminanti e l'acquisizione dell'infezione avviene principalmente attraverso l'ingestione di alimenti o acqua contaminati. Queste infezioni hanno il loro maggiore impatto nei paesi industrializzati e causano patologie che spaziano dalla diarrea non complicata, alla colite emorragica, fino alla sindrome emolitico-uremica, che è la più grave delle manifestazioni cliniche, con un tasso di mortalità del 5-10%.

Gli aEPEC presentano un quadro epidemiologico sovrapponibile a quello che caratterizza i VTEC. Infatti, questi stipiti vengono spesso isolati dagli animali e da casi clinici di diarrea protratta nei paesi industrializzati.

Sull'esistenza degli aEPEC sono state formulate diverse teorie. È stato proposto che gli aEPEC rappresentino ceppi VTEC nei quali il profago veicolante i geni per la verocitotossina sia andato incontro ad escissione, con conseguente perdita della capacità di produrre le tossine. Alcune evidenze, tuttavia, suggerirebbero che gli aEPEC derivino dai ceppi tEPEC in seguito ad un meccanismo detto di *plasmid displacement* in cui un plasmide del tipo pO157 ha rimpiazzato il plasmide EAF. L'identificazione di sequenze parziali del gene *tox B*, proprie del pO157, nei plasmidi del tipo EAF sosterebbe la teoria del contatto tra i due plasmidi. Quest'ultima ipotesi è in linea con osservazioni filogenetiche che suggerirebbero il seguente scenario evolutivo (Figura 3): un ceppo di *E. coli* commensale, attraverso fenomeni di trasferimento genico orizzontale, potrebbe avere acquisito il *locus* LEE e le PAI che veicolano i "non-LEE encoded effectors", avviando la selezione di un progenitore AECC. La successiva acquisizione del plasmide EAF potrebbe quindi aver permesso la radiazione dei ceppi enteropatogeni dalla linea progenitrice comune (tEPEC). In tempi più recenti il plasmide EAF potrebbe essere stato sostituito da plasmidi simili a quelli dei ceppi VTEC (pO157) permettendo così la radiazione dei ceppi oggi noti come aEPEC. Infine l'acquisizione di geni codificanti verocitotossine attraverso successive infezioni da parte dei batteriofagi che veicolano tali geni, può aver permesso l'emergenza di ceppi VTEC in grado di causare malattia nell'uomo.

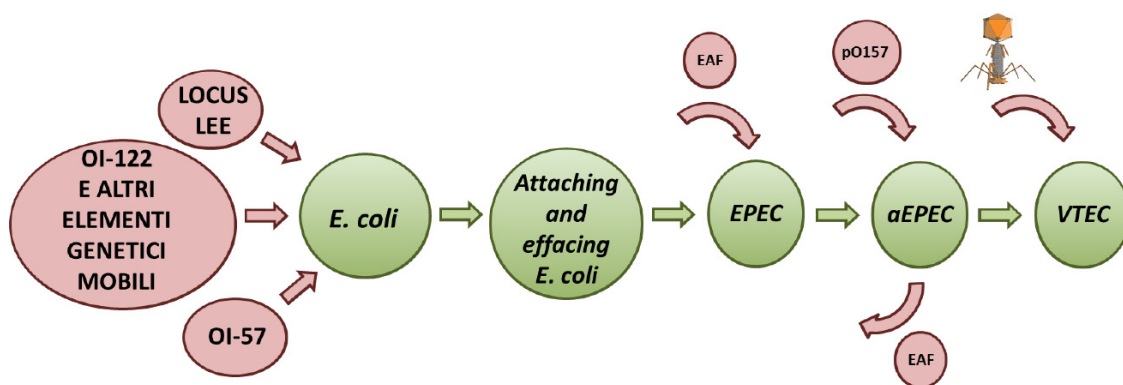


Figura 3. Ipotesi della radiazione degli *E. coli* attaching and effacing da un *E. coli* commensale

Bibliografia consigliata

- Bielazewska M, Prager R, Köck R, Mellmann A, Zhang W, Tschäpe H, Tarr PI, Karch H. Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(10):3144-50.
- Donnenberg M. (Ed.) *Escherichia Coli: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen*. Waltham, Massachusetts: Academic Press; 2002.
- Fratamico PM, Yan X, Caprioli A, Esposito G, Needleman DS, Pepe T, Tozzoli R, Cortesi ML, Morabito S. The complete DNA sequence and analysis of the virulence plasmid and of five additional plasmids carried by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 strain H30. *Int J Med Microbiol* 2011;301(3):192-203.
- Imamovic L, Tozzoli R, Michelacci V, Minelli F, Marziano ML, Caprioli A, Morabito S. OI-57, a genomic island of *Escherichia coli* O157, is present in other seropathotypes of Shiga toxin-producing *E. coli* associated with severe human disease. *Infect Immun* 2010;78 (11):4697-704.
- Kaper GB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2004;2:123-40
- Morabito S, Tozzoli R, Oswald E, Caprioli A. A mosaic pathogenicity island made up of the locus of enterocyte effacement and a pathogenicity island of *Escherichia coli* O157:H7 is frequently present in attaching and effacing *E. coli*. *Infection and Immunity* 2003;71:3343-8.
- O'Brien AD, Holmes RK. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Rev* 1987;51:206-20.
- Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* 1998;11(3):450-79.
- Tozzoli R, Caprioli A, Morabito S. Detection of *tox*B, a plasmid virulence gene of *Escherichia coli* O157, in Enterohemorrhagic and Enteropathogenic *E. coli*. *J Clin Microbiol* 2005;43:4052-6.
- Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA. Typical and Atypical Enteropathogenic *E. coli*. *Emerg Infect Dis* 2002;8(5):508-13.

RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI E ATTIVITÀ DI RICERCA

Caterina Graziani

Reparto Epidemiologia veterinaria e analisi del rischio

Gli antibiotici sono sostanze prodotte da alcune specie di microrganismi quali muffe e funghi che hanno la capacità di sopprimere la crescita di altri microrganismi e indurne la morte.

Nel 1929 Alexander Fleming studiando ceppi batterici di *Stafilococcus* osservò che la presenza di una muffa inibiva la crescita del microrganismo, venne così scoperto il primo antibiotico che prese il nome di Penicillina (antibiotico β -lattamico) dal nome della muffa che lo aveva prodotto (*Penicillium notatum*) (1). Oggi gli antibiotici vengono prevalentemente ottenuti attraverso la sintesi chimica.

La classificazione degli antibiotici può essere effettuata in: famiglie, secondo lo spettro d'azione, secondo il tipo di azione e in base al meccanismo d'azione.

La classificazione in base al meccanismo d'azione (2-5) è indubbiamente quella più importante ed è così costituita:

- modificazione della permeabilità di membrana del batterio;
- efflusso attivo dell'antibiotico dalla cellula batterica;
- modificazione enzimatica dell'antibiotico;
- degradazione dell'antibiotico;
- utilizzo di vie metaboliche alternative a quelle inibite dall'antibiotico;
- modifica del target;
- overproduzione del target.

La resistenza agli antibiotici risale ai primordi della terapia antibiotica quando si osservò che alcuni batteri non risultavano sensibili a determinati farmaci, in sostanza presentavano una resistenza intrinseca.

Accanto a questa resistenza, ben presto si osservò la comparsa di una resistenza acquisita in ceppi batterici che originariamente erano sensibili ad un determinato antibiotico. Questo tipo di resistenza può essere cromosomica (endogena) oppure extracromosomica (esogena).

La resistenza cromosomica è di tipo darwiniano, si realizza tramite fenomeni di selezione e mutazione quindi interessa l'antibiotico verso il quale sono stati selezionati i mutanti resistenti e si trasmette per trasmissione verticale.

La resistenza extracromosomica è l'acquisizione di nuova informazione genetica da altri microrganismi, può interessare più antibiotici contemporaneamente (resistenza multipla) e può essere trasferita anche a batteri appartenenti a specie differenti. In questo caso la trasmissione è di tipo orizzontale e lo scambio dei geni può avvenire attraverso meccanismi di coniugazione, trasformazione e trasduzione.

I geni della resistenza agli antibiotici sono frequentemente contenuti in elementi genetici mobili che possono essere definiti come segmenti di DNA che hanno la capacità di spostarsi da una parte del genoma ad un'altra o tra genomi.

Il meccanismo della coniugazione è indubbiamente quello più diffuso nel trasferimento della resistenza agli antibiotici e si verifica attraverso plasmidi e trasposoni (elementi genetici mobili). L'abilità di questi elementi di spostarsi da un batterio ad un altro dipende da vari fattori come la pressione selettiva dell'ambiente, fattori dell'ospite e proprietà intrinseche dello stesso elemento.

Oggi la resistenza agli antibiotici, a causa dell'aumento della morbidità, della durata della malattia e dei costi aggiuntivi è diventata un problema e una priorità di sanità pubblica a livello mondiale. Tale priorità si è aggravata con la comparsa di patogeni multiresistenti (patogeni resistenti contemporaneamente a più antibiotici) in particolare in ambiente nosocomiale, che ha ridotto la possibilità di un trattamento efficace ponendo gravi problemi di terapia.

L'impiego degli antibiotici nel settore veterinario ha favorito lo sviluppo delle produzioni di tipo intensivo, consentendo il controllo delle forme infettive anche in condizioni di alta concentrazione di animali. Inizialmente alcuni farmaci antimicrobici sono stati estensivamente utilizzati come additivi nei mangimi, con funzione di "profilassi" di alcune malattie (specialmente enteriche e respiratorie) e di promozione della crescita. Questo ha fatto sì che vi sia stato un uso intensivo e indiscriminato nel settore veterinario spesso con l'impiego di molecole di classe o struttura analoghe a quelle usate in medicina umana. Tale utilizzo ha portato all'insorgenza di fenomeni di antibiotico resistenza anche in batteri di origine animale sia patogeni che commensali aumentando il rischio di trasmissione all'uomo di malattie di origine animale (zoonosi) sostenute da agenti antibiotico resistenti.

In merito a quanto appena discusso, negli ultimi anni si è assistito ad un incremento dei ceppi di *Escherichia coli* fluorochinoloni-resistenti (FQ-R) nell'uomo e nelle specie aviarie e questo ha portato la comunità scientifica ad ipotizzare che tale specie animale possa essere la fonte di *Escherichia coli* fluorochinoloni resistenti (FQ-R) per l'uomo. I fluorochinoloni (FQ) sono farmaci di scelta nelle infezioni extra-intestinali da *Escherichia coli* nell'uomo e sono ampiamente utilizzati negli allevamenti avicoli.

Al fine di identificare cloni resistenti ai fluorochinoloni nell'uomo e investigare la loro possibile origine sono stati effettuati studi specifici in alcuni paesi compresa l'Italia (6-7).

Nello specifico sono stati selezionati 277 ceppi di *Escherichia coli* umani (142 Ciprofloxacina-S; 135 Ciprofloxacina-R) da infezioni urinarie (UTI) e da sangue (Sepsi) e 101 ceppi commensali da specie aviaria (68 Ciprofloxacina-S; 33 Ciprofloxacina-R) (Tabella 1).

Tabella 1. Gruppo filogenetico in ceppi di *Escherichia coli* isolati dall'uomo e da specie aviarie

Gruppo filogenetico	Totale ceppi		ceppi Ciprofloxacina-S		ceppi Ciprofloxacina-R	
	Uomo (n. 277)	Aviario (n. 101)	Uomo (n. 142)	Aviario (n. 68)	Uomo (n. 135)	Aviario (n. 33)
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
A	45 (16,2)	35 (34,7)	13 (9,2)**	22 (32,4)	32 (23,7)	13 (39,4)
B1	26 (9,4)	30 (29,7)	17 (12,0)**	18 (26,5)	9 (6,7)**	12 (36,4)
B2	157 (56,7)	8 (7,9)	88 (62)**	7 (10,3)	69 (51,1)**	1 (3,0)
D	49 (17,7)	28 (27,7)	24 (16,9)	21 (30,8)	25 (18,5)	7 (21,2)

* differenza statisticamente significativa tra ceppi Ciprofloxacina-sensibili e ciprofloxacina-resistenti

** differenza statisticamente significativa tra ceppi aviari ed ExPEC

È stato determinato il gruppo filogenetico attraverso la multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) (8) e sono state effettuate le sequenze al fine di identificare attraverso la Multi-Locus Sequence Typing (MLST) il Sequence Type (ST) e il Clonal Complex (CC). La MLST è una tecnica di biologia molecolare che utilizza le sequenze di DNA di frammenti interni di specifici geni costitutivi. Per ogni gene costitutivo possono esistere diverse sequenze che consentono di definire il tipo di sequenza. Sui ceppi umani e aviari con gruppo filogenetico B2 è stato ricercato il clone ST131 attraverso un metodo in PCR e le conferme sono state effettuate attraverso il sequenziamento dei geni *mdh* e *gyrB* sempre in accordo allo schema della MLST (9).

La distribuzione dei ceppi umani e aviari nei quattro gruppi filogenetici (A, B1, B2, D) è risultata essere differente, nello specifico i ceppi umani appartengono prevalentemente al gruppo B2 (56,7%) mentre quelli aviari al gruppo A (34,6%). Se consideriamo la sensibilità alla ciprofloxacina si osserva che i ceppi sensibili umani e aviari si distribuiscono in modo diverso nei gruppi filogenetici mentre, i ceppi resistenti se comparati differiscono in modo significativo solo per il gruppo B1 e B2. Un campione random dei ceppi umani (n. 129) e aviari (n. 43) sono stati selezionati per il sequenziamento, mentre tutti quelli con gruppo filogenetico B2 sono stati analizzati in PCR per la ricerca del clone ST131 e confermati con sequenziamento. I 129 ceppi umani si sono distribuiti in 37 STs e solo 8 di questi comprendevano tre o più ceppi. I 37 STs si raggruppavano in 15 CC, definito come un gruppo in cui un ST differisce solo per un allele. Nell'uomo il ST prevalente era ST131 e associato al gruppo filogenetico B2. I 43 ceppi aviari sono stati associati a 30 differenti ST e in 10 CC. Il ST prevalente nell'uomo è risultato essere ST131, mentre nell'aviario ST23. Un solo ceppo aviario era ST131. In generale questo studio ha dimostrato eterogeneità dei cloni ma con ST131 predominante nell'uomo e non nell'aviario. Tuttavia CC10 e CC23 sono risultati essere i due maggiori Clonal Complex in entrambi i ceppi umani e aviari. Questo supporta l'ipotesi che le specie aviarie possano fungere da serbatoio per gli *Escherichia coli* (ExPEC) causa di infezione nell'uomo ma vi è la necessità di ulteriori approfondimenti in merito.

Bibliografia

1. Fleming A. Classics in infectious diseases: on the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. (Reprinted from *Brit J Exp Pathol* 1929;10:226-36) *Rev Infect Dis* 1980;2(1):129-39.
2. Spratt BG. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* 1994;264:388-93.
3. McDermott PF, Walker RD, White DG. Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. *Int J Toxicol* 2003;22:135-43.
4. Magnet S, Blanchard JS. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev* 2005;105:477-97.
5. Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:1451-70.
6. Graziani C, Luzzi I, Corro' M, Tomei F, Parisi G, Giufrè M, Morabito S, Caprioli A, Cerquetti M. Phylogenetic background and virulence genotype of ciprofloxacin-susceptible and ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strains of human and avian origin. *J Infect Dis* 2009;199:1209-17.
7. Giufrè M, Graziani C, Accogli M, Luzzi I, Busani L, Cerquetti M, on behalf of the *Escherichia coli* Study Group. *Escherichia coli* of human and avian origin: detection of clonal groups associated with fluoroquinolone and multidrug resistance in Italy. *J Antimicrob Chemother* 2012;67(4):860-7.
8. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *E. coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:4555-8.
9. MLST Databases at the ERI, University College Cork, Ireland. Disponibile all'indirizzo: mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli; ultima consultazione 19/12/2012.

LA SORVEGLIANZA IN SANITÀ PUBBLICA. MALATTIE GASTROENTERICHE ACUTE TRASMESSE DA ALIMENTI (MTA): PRINCIPI E DEFINIZIONI

Gaia Scavia

Reparto Epidemiologia veterinaria e analisi del rischio

Il concetto di sorveglianza epidemiologica delle malattie infettive in sanità pubblica è andato progressivamente mutando, con l'evolversi delle prospettive e delle funzioni cui tale disciplina, nel tempo, è stata chiamata a rispondere. Se il primitivo scopo delle attività di sorveglianza mirato a individuare ed evitare il diffondersi delle malattie, attraverso il monitoraggio e la quarantena delle persone e degli animali potenzialmente esposti a fonti di contagio, appare ormai superato anche se non del tutto tramontato, anche le caratteristiche fondanti del moderno concetto di sorveglianza hanno subito importanti evoluzioni nel corso degli ultimi anni.

Da strumento di raccolta sistematica, consolidamento e analisi delle informazioni per conoscere la diffusione delle malattie infettive in una determinata popolazione, anche al fine di poterne prevedere le tendenze, la sorveglianza ha visto accrescere le proprie funzioni e potenzialità. Ciò anche in virtù della disponibilità di nuove risorse tecnologiche – diagnostiche, informative, statistiche, ecc. – che ne hanno via via ampliato gli scopi e l'oggetto, fino a caratterizzarne l'attuale valenza di strumento utile alla programmazione, valutazione e riprogrammazione delle attività e interventi di controllo.

Nell'ambito delle malattie gastroenteriche acute dell'uomo, principalmente associate a patogeni zoonotici trasmessi per via alimentare (MTA), ciò si è concretizzato nella possibilità di orientare la raccolta e l'analisi dei dati in modo da permettere di caratterizzare e quantificare i rischi per l'uomo. Ciò consente agli attuali sistemi di sorveglianza epidemiologica delle MTA nell'Unione Europea (UE) di produrre informazioni utili all'adozione di adeguate opzioni di controllo lungo la filiera di produzione degli alimenti. Ciò realizza l'approccio integrato dettato dai principi generali di sicurezza alimentare contenuti nel Regolamento 178/2002/CE che prevede la necessità di basare gli interventi di controllo, a protezione della salute dell'uomo, sulla base dell'analisi del rischio.

Il contributo informativo della sorveglianza integrata delle MTA e relativi agenti eziologici, nell'uomo e negli animali assume, in tale prospettiva, un ruolo di primaria importanza come riconosciuto dalla normativa di riferimento europea in materia di zoonosi (Direttiva 99/2003/CE). Infatti, i dati relativi all'occorrenza delle MTA nell'uomo e alla loro caratterizzazione sul piano diagnostico ed epidemiologico sono di importanza cruciale ai fini della valutazione dell'efficacia delle attività di controllo, poiché forniscono informazioni sui *trend* di incidenza ovvero rappresentano il *target* diretto su cui misurare l'efficacia dei programmi di controllo lungo la filiera.

Nella UE le MTA sono oggetto di sorveglianza, ai sensi della Decisione 2000/96/CE, nell'ambito di uno specifico programma dell'*European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), dedicato alle malattie infettive trasmesse da acqua e alimenti (*Foodborne and Waterborne Programme*, FWD) che comprende diverse entità nosologiche. Tra queste, le infezioni associate a *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Shigella* spp., *E.coli* produttori di Verocitotossina (VTEC) e *Yersinia* spp., sono individuate come prioritarie.

Le malattie soggette a sorveglianza nell'ambito del programma *Food-borne and waterborne disease* dell'*European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), ai sensi della

Decisione 2000/96/CE sono elencate di seguito; le malattie prioritarie sono indicate con l'asterisco:

- Antrace
- Botulismo
- Brucellosi *
- Campylobatteriosi*
- Colera
- Malattia di Creutzfeldt-Jacob
- Criptosporidiosi
- Echinococcosi*
- Giardiasi
- Epatite A
- Listeriosi*
- Leptosirosi
- Salmonellosi*
- Shigellosi*
- Infezioni da E.coli produttori di verocitotossina (VTEC) *
- Toxoplasmosi
- Trichinosi
- Tularemia
- Febbri Tifoidee e paratifoidee*
- Yersiniosi*

Come si può osservare si tratta per la maggioranza degli agenti patogeni per i quali la direttiva sul monitoraggio degli agenti di zoonosi (Direttiva 99/2003/CE) nell'uomo, animali e alimenti dispone obbligatoriamente, negli Stati Membri, l'avvio di programmi coordinati di sorveglianza nelle popolazioni umana e animale, negli alimenti e nei mangimi, definendone metodi e criteri.

Le malattie per le quali gli Stati Membri della UE devono obbligatoriamente predisporre programmi coordinati di monitoraggio nell'uomo, nelle popolazioni animali, negli alimenti e nei mangimi, ai sensi della Direttiva 99/2003/CE, sono:

- Brucellosi e relativi agenti zoonotici
- Campilobatteriosi e relativi agenti zoonotici
- Echinococcosi e relativi agenti zoonotici
- Listeriosi e relativi agenti zoonotici
- Salmonellosi e relativi agenti zoonotici
- Trichinellosi e relativi agenti zoonotici
- Tubercolosi causata da *Mycobacterium bovis*
- *E.coli* produttori di verocitotossina (VTEC)

Lo scopo finale del programma FWD è di contribuire a ridurre l'incidenza e la prevalenza delle MTA nella UE. È interessante notare come gli obiettivi specifici della sorveglianza del programma FWD non comprendano solo il monitoraggio dei casi di MTA e relativi agenti eziologici, ma siano più estensivi, includendo anche la raccolta di dati sui fattori di rischio legati all'ospite (ad esempio: sesso, età, provenienza, tipo di esposizione al patogeno), ai potenziali veicoli d'infezione, alle modalità di trasmissione e fonti di infezione, sia su casi sporadici che epidemici. Si tratta di informazioni indispensabili non solo per la caratterizzazione e valutazione del rischio ma anche per stimare l'impatto di salute complessivo delle MTA, in termini di mortalità e morbidità.

Su quest'ultimo aspetto, più comunemente noto con il termine anglosassone di stima del *burden of illness*, negli anni recenti si è concentrata l'attenzione non solo di organismi internazionali quali l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ed ECDC, che hanno avviato programmi specifici per la valutazione del *burden of illness* delle MTA (1, 2), ma più in generale della comunità scientifica che ha contribuito attraverso l'elaborazione di diversi modelli concettuali e metodologie per la stima del *burden of illness* (3).

È da sottolineare che la sorveglianza europea delle MTA nella popolazione si configura solo parzialmente come un vero e proprio sistema unitario di sorveglianza, dal momento che soltanto alcune delle componenti strutturali costitutive del sistema, sono codificate e uniformemente applicate nei diversi Paesi Membri della UE, mentre altre componenti strutturali sono mutate dai sistemi di sorveglianza attivi in ciascun Paese Membro, attraverso una sorta di *networking*.

Ciò significa che non vi è uniformità, tra i diversi Paesi, nei criteri che individuano alcune componenti strutturali di un sistema di sorveglianza, quali le popolazioni oggetto di sorveglianza, le fonti dei dati, le procedure e gli strumenti di raccolta dei dati, rispetto ai quali continuano a valere i principi e gli strumenti esistenti in ciascun Paese Membro. Ciò ovviamente ha importanti conseguenze sull'efficacia della sorveglianza e deve essere attentamente considerato nella fase di analisi, interpretazione dei dati e utilizzo delle informazioni.

Per esempio, è utile sottolineare che il dato di occorrenza delle MTA viene rappresentato nella sorveglianza europea TESSy, mediante il "tasso di notifica" dei casi di MTA e non già con il "tasso d'incidenza", di cui pure rappresenta un *proxy*, data la diversa sensibilità dei sistemi di sorveglianza operanti nei Paesi Membri.

Tra le componenti strutturali della sorveglianza definite in modo unitario a livello europeo, troviamo le modalità attraverso cui vengono identificati i casi di MTA nella popolazione, basate essenzialmente su criteri di tipo clinico, diagnostico ed epidemiologico. La consistenza di tali criteri è specificata, per ciascuna entità nosologica, in un'apposita decisione della Commissione Europea (4). La diversa sussistenza, o meno, e combinazione di ciascun criterio permette di individuare, laddove applicabili, definizioni standard di caso "possibile", caso "probabile" e caso "confermato", per ciascuno dei patogeni elencati in Tabella 1. Ciò consente di uniformare e rendere coerente non solo la raccolta dei dati sui casi di MTA da tutti i Paesi della UE, ma anche di poter analizzare per gruppi omogenei, le informazioni fornite dai diversi Paesi, indipendentemente dalle diversa strutturazione dei sistemi di sorveglianza implementati in ciascun Paese Membro.

Comune a tutti i Paesi della UE è pure il sistema informativo europeo per la raccolta, validazione, analisi e disseminazione delle informazioni di sorveglianza delle malattie infettive TESSy, attivo su piattaforma web dal 2007 (5).

È utile sottolineare che, benché il flusso europeo preveda la possibilità di raccogliere dati anche solo sui casi sospetti di malattia che non abbiano cioè conferma di laboratorio – cosa che risulta particolarmente utile nel caso di eventi epidemiologicamente correlati o di emergenze come nel caso dell'epidemia da *E.coli* O104:H4 in Germania nel 2011 – la disponibilità di informazioni diagnostiche di laboratorio risulta avere un significato centrale ai fini della sorveglianza.

Il consolidamento delle attività di sorveglianza di laboratorio è uno dei temi che ha ricevuto maggior attenzione nel corso degli ultimi anni nell'ambito del programma FWD, laddove si è perseguito l'obiettivo non solo di migliorare nel flusso TESSy la rappresentazione del diverso valore delle evidenze diagnostiche di conferma di laboratorio dei casi di MTA, ma anche di dare impulso ad una progressiva omogeneizzazione, razionalizzazione e miglioramento dell'offerta diagnostica nei diversi Paesi Membri, attraverso l'individuazione e il *networking* di laboratori nazionali ed europei di riferimento nel settore medico.

Questo costituisce anche uno dei principali ambiti attraverso i quali si realizza l'integrazione medico-veterinaria nell'ambito della sorveglianza delle MTA e delle zoonosi. Le reti di laboratorio che si vanno via via costruendo in ambito umano (6), infatti, trovano un ormai consolidato corrispettivo ed esempio nelle reti dei laboratori nazionali (LNR) ed europei di riferimento (EURL), previste dal Regolamento 822/2004/CE nel settore della sicurezza alimentare e sanità animale. Il raccordo tra le reti di laboratorio operanti nei due ambiti, si realizza a diversi livelli (ad esempio: sviluppo e condivisione dei metodi diagnostici, verifica delle performance diagnostiche mediante studi interlaboratorio congiunti, implementazione di sistemi di sorveglianza basati su metodi molecolari) e rappresenta un importante punto di sintesi dell'approccio europeo alla sorveglianza integrata delle MTA. La possibilità di fornire informazioni sui casi di MTA corredate da dati di laboratorio prodotti attraverso l'applicazione di protocolli analitici condivisi e comuni ai due settori costituisce, infatti, un elemento assai utile per l'individuazione delle fonti d'infezione.

Altri elementi di grande rilevanza ai fini del progressivo consolidamento dell'approccio integrato medico-veterinario al controllo delle MTA, riguardano sia la modalità di diffusione dei risultati della sorveglianza del programma FWD, sia lo scambio informativo sulle potenziali situazioni di rischio ed emergenza, attraverso i sistemi informativi di allerta rapida.

I risultati della sorveglianza del programma FWD nell'uomo vengono pubblicati congiuntamente alla sintesi dei dati di monitoraggio degli agenti di zoonosi negli animali, alimenti e mangimi previsti dalla cosiddetta "direttiva zoonosi" (Direttiva 99/2003/CE), nel report unitario *Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union* (7), pubblicato annualmente a cura dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) in collaborazione con l'ECDC. Ciò dovrebbe consentire la lettura integrata dei trend epidemiologici di incidenza delle MTA nell'uomo, alla luce delle tendenze osservate nel comparto animale, permettendo una valutazione diretta dell'efficacia degli interventi di controllo lungo la filiera, in termini di guadagno di salute per l'uomo. Un esempio significativo in tal senso deriva dal trend in costante diminuzione delle salmonellosi umane associato alla crescente efficacia dei piani di controllo delle Salmonelle nelle specie avicole.

Un altro scopo della lettura integrata dei dati è quello di fornire indicazioni utili all'identificazione dei segmenti critici della filiera produttiva degli alimenti, maggiormente implicati nella trasmissione dei diversi agenti di MTA all'uomo. L'individuazione delle "fonti", anche nota con il termine inglese di *source attribution*, consente di indirizzare opportunamente gli interventi di controllo lungo la filiera e viene eseguita, primariamente, tramite il confronto e l'integrazione dei dati epidemiologici e microbiologici sulle caratteristiche dei patogeni isolati dai casi umani, dagli alimenti e dagli animali. Anche i più sofisticati modelli di stima della *source attribution* che permettono di quantificare con precisione, per i diversi agenti eziologici, il contributo relativo delle diverse specie animali e tipologie di alimenti, nel causare le MTA nell'uomo, si basano su dati di sorveglianza (8).

I sistemi di allerta rapida consentono di diffondere informazioni su eventi di potenziale rilevanza in sanità pubblica, su vasta scala e in tempo reale. Nell'UE, esistono sistemi di allerta a supporto dei flussi ufficiali cogenti nell'ambito della sicurezza alimentare (*Rapid Alert System for Food and Feed*, RASFF) e delle malattie infettive (*Early Warning and Response System*, EWRS). Queste due reti rappresentano le vie attraverso le quali le istituzioni degli Stati Membri, possono scambiare informazioni sulla sicurezza alimentare e sugli eventi inattesi, riguardanti le malattie infettive nell'UE. Recentemente, si sono aggiunti a tali sistemi piattaforme informative e d'allerta connesse ai flussi informativi di sorveglianza, che hanno consentito di migliorarne la tempestività. Nell'ambito delle MTA, a partire dal 2010, l'ECDC ha sviluppato il sistema di *Epidemic Intelligence Information System* (EPIS), attivo nei 27 Paesi Membri e in 8 Paesi extra-UE, che ha permesso di individuare tempestivamente numerosi

focolai internazionali di zoonosi e MTA, attraverso lo scambio di informazioni epidemiologiche, microbiologiche e di tipizzazione nonché sui metodi per individuare e tracciare le fonti di infezione, coinvolgendo numerosi esperti a livello europeo. Quando si tratta di fronteggiare pericoli di origine zoonotica e in generale i pericoli derivanti dalla filiera agro-alimentare, l'integrazione medico-veterinaria costituisce un importante valore aggiunto per i sistemi di allerta. Aspetti importanti sono la possibilità di incrociare i dati dei diversi sistemi di allerta e in relazione ad essi effettuare ricerche retrospettive nelle banche dati umane e veterinarie.

Per quanto riguarda la sorveglianza delle MTA in Italia, sebbene sia la Decisione 96/2000/CE sia la direttiva europea sulle zoonosi (Direttiva 99/2003/CE), da tempo recepita nel nostro Paese dal DL 191/2006, identifichino con chiarezza le malattie zoonotiche prioritarie da sottoporre obbligatoriamente a sorveglianza, l'attuale sistema ufficiale di notifica delle malattie infettive operante sul territorio nazionale (DM 15/12/1990) consente di attuare la sorveglianza epidemiologica soltanto per alcune di esse e di soddisfare solo parzialmente il debito informativo previsto dalla UE. Tale sistema, infatti, è basato sulla notifica delle malattie cliniche e non fornisce, se non in modo generico o per macro-categorie, informazioni diagnostiche utili a dettagliare il criterio di laboratorio per la categorizzazione dei casi, previsto dal flusso informativo TESSy. Per quanto riguarda la rappresentatività e sensibilità del sistema ufficiale è da sottolineare che i dati raccolti non comprendono alcune delle malattie considerate prioritarie dalla normativa europea (ad esempio: *Campylobacteriosi*, *Echinococcosi*, infezioni da *VTEC*). Sul piano informativo ciò si traduce nella necessità, per il nostro paese, di far fronte al debito connesso al flusso europeo, anche attraverso altri sistemi di sorveglianza speciali quali EnterNet-Italia (www.iss.it/ente) (9), e il Registro Italiano della Sindrome Emolitico Uremica (www.iss.it/seu/) (10) che attualmente sono attivi solo su base volontaria e non prevedono una diretta integrazione con il sistema di notifica.

In generale appare evidente l'alto livello di sottonotifica connesso alla sorveglianza ufficiale, come risulta evidente dai risultati di un recente studio trasversale di popolazione condotto nel 2008/2009 sull'intero territorio nazionale con la finalità di stimare, tramite interviste telefoniche, l'incidenza delle malattie gastroenteriche acute nella popolazione italiana (11). I dati mostrano non solo che l'incidenza di tali malattie, stimata in media pari a 1,08 episodi/persona-anno, sia tutt'altro che trascurabile ma anche che i casi di malattia indagati sul piano eziologico e potenzialmente notificabili, rappresentano solo l'1% del totale, con un fattore di sottonotifica teorico non inferiore a 1:103.

Anche le informazioni sui focolai di MTA, prevalentemente associati nel nostro paese a *Salmonella* spp. relative agli anni 1998-2011, appaiono fortemente sottostimati se comparati ai dati degli altri Paesi EU e solo raramente corredati dalle informazioni sulle fonti e veicoli d'infezione.

Infine, tra i vantaggi dell'integrazione della sorveglianza speciale di laboratorio in ambito medico-veterinario si può indicare, nel nostro paese, la capacità di lettura integrata dell'epidemiologia delle salmonellosi, resa possibile grazie alla disponibilità dei dati di tipizzazione degli isolati di *Salmonella*, forniti da EnterNet-Italia, e dal sistema di sorveglianza Enter-Vet (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi. *Enter-Vet Report 2009*?????????????) negli animali e alimenti.

Bibliografia

1. WHO. *Initiative to estimate the Global Burden of Foodborne Diseases*. Disponibile all'indirizzo: www.who.int/foodsafety/foodborne_disease/ferg/en/; ultima consultazione: 19/12/2012.

2. European Centre for Disease Prevention and Control. *Methodology protocol for estimating burden of communicable diseases*. Stockholm: ECDC; 2010.
3. Kuchenmüller T, Hird S, Stein C, Kramarz P, Nanda A, Havelaar A. Estimating the Global Burden of Foodborne Diseases - a collaborative effort. *Eurosurv* 2009;14(18):1-4.
4. Europa. EU Commission Decision of 28 April 2008 amending Decision 2002/253/EC laying down case definitions for reporting communicable diseases to the Community network under Decision No 2119/98/EC of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union* 2008.
5. Amato-Gauci A, Ammon A. The surveillance of communicable diseases in the European Union – a long-term strategy (2008-2013). *Euro Surv* 2008;13(26):pii.
6. EC/ECDC. *Update of the position statement of the Commission and ECDC on human pathogen laboratories: A joint vision and strategy for the future*. Disponibile all'indirizzo: ec.europa.eu/health/communicable_diseases/docs/ref_lab_statement_en.pdf; ultima consultazione 19/12/2012.
7. The European Food Safety Authority (EFSA). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. *EFSA Journal* 2011;3:2090.
8. Pires SM, Evers EG, van Pelt W, Ayers T, Scallan E, Angulo FJ, Havelaar A, Hald T. Attributing the human disease burden of foodborne infections to specific sources. *Foodborne Pathog Dis* 2009;4:417-24.
9. Dionisi AM, Filetici E, Ocwzarek S, Arena S, Benedetti I, Lucarelli C, Luzzi I, Scavia G, Minelli F, Ciaravino G, Marziano ML, Caprioli A. Enter-Net: sorveglianza delle infezioni trasmesse da alimenti e acqua. Rapporto dell'attività 2007-2009. *Not Ist Super Sanità* 2011;24:3-10.
10. Scavia G, Brigotti M, Ciofi degli Atti ML, Escher M, Ferretti A, Fioravanti A, Marziano ML, Minelli F, Morabito S, Pecoraro C, Tozzi AE, Tozzoli R, Babsa S, Caprioli A. Infezioni da *Escherichia coli* produttori di verocitotossina (VTEC) nei pazienti del Registro Italiano della Sindrome Emolitico Uremica pediatrica negli anni 2005-2006. *Not Ist Super Sanità* 2007;12:11-5.
11. Scavia G, Baldinelli F, Busani L, Caprioli A. The burden of self-reported acute gastrointestinal illness in Italy: a retrospective survey, 2008-2009. *Epidemiol Infect* 2012;140:1193-206.
- ~~12. Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi. (Ed.) Enter Vet Report 2009.~~

EPIDEMIOLOGIA DELLE GASTROENTERITI ACUTE A EZIOLOGIA INFETTIVA IN ITALIA: LE ESPERIENZE DELLE REGIONI LOMBARDIA E PIEMONTE, 1992-2009

Lapo Mughini Gras

Reperto Epidemiologia veterinaria e analisi del rischio

Introduzione

Le gastroenteriti acute (GA) a eziologia infettiva (gastroenteriti virali, enteriti batteriche e diarree di origine parassitaria) sono un problema di sanità pubblica a livello mondiale (1, 2). Benché nei Paesi industrializzati le GA siano caratterizzate da una bassa mortalità, la morbilità e l'impatto sanitario ed economico sui servizi assistenziali (costi diretti) e sulla società in generale (costi indiretti) sono piuttosto elevati (3).

L'impatto delle GA sulla sanità pubblica italiana è fortemente sottostimato (4). Questo problema può essere attribuito a diversi fattori:

- la maggior parte dei casi di GA si manifesta con una forma clinica lieve che non motiva il malato a rivolgersi ad un medico;
- non sempre viene prescritto un esame coprologico o si raggiunge una diagnosi eziologica definitiva;
- le capacità diagnostiche e i protocolli utilizzati nei vari laboratori non sono uniformi tra loro;
- la notifica dei casi confermati è, in generale, fortemente disattesa.

Il Sistema Informatizzato delle Malattie Infettive (SIMI) non raccoglie dati sulle GA come sindrome, ma le GA vengono notificate come “salmonellosi non tifoidee” (SNT), “diarree infettive non da *Salmonella*” (DINS) e “focolai di tossinfezione alimentare” (FTA). Le SNT e DINS vengono notificate come malattie di classe II, mentre i FTA come malattie di classe IV.

I dati del SIMI, tuttavia, presentano limiti che rendono difficile la valutazione della situazione epidemiologica nazionale e il confronto con gli altri Paesi. Queste difficoltà sono state in parte compensate dai sistemi di sorveglianza speciali. In Italia è infatti attivo il sistema di sorveglianza speciale EnterNet-Italia (www.iss.it/ente/), specifico per i patogeni enterici, che si basa su una rete di laboratori diagnostici attivi sul territorio nazionale (5).

Sebbene la sorveglianza delle GA basata sui laboratori diagnostici garantisca un maggior dettaglio eziologico dei casi segnalati (es. siero e fagotipizzazione, antibiogramma ecc.), questi non rappresentano tutti i casi effettivi, ma solo quelli a cui è stato prescritto un esame diagnostico per la ricerca di patogeni enterici e per i quali si è raggiunta una diagnosi definitiva in uno dei laboratori aderenti (su base volontaria) alla rete EnterNet-Italia, i quali non sono distribuiti in maniera omogenea e rappresentativa su tutto il territorio nazionale.

La rilevanza degli aspetti di sanità pubblica e di sicurezza alimentare legati ai patogeni enterici ha incentivato alcune regioni italiane ad adottare iniziative mirate alla sorveglianza delle GA sul proprio territorio. Le regioni Piemonte e Lombardia, con modalità e obiettivi diversi, hanno attivato, rispettivamente dal 2002 (DGR 85-4977/2001) e 2004 (DGR 18853/2004), dei sistemi di sorveglianza su scala **regionale (6) che comprendono** anche le GA, le quali vengono poi notificate da questi sistemi direttamente al SIMI sotto forma di SNT, DINS e FTA.

Il sistema di sorveglianza lombardo (Figura 1) è, tuttavia, un sistema trasversale che comprende tutte le malattie infettive notificabili dell'uomo, di cui le GA rappresentano solo una parte, focalizzandosi in particolar modo sulla qualità e completezza dei dati di notifica al fine di ottenere informazioni dettagliate sulla situazione epidemiologica.

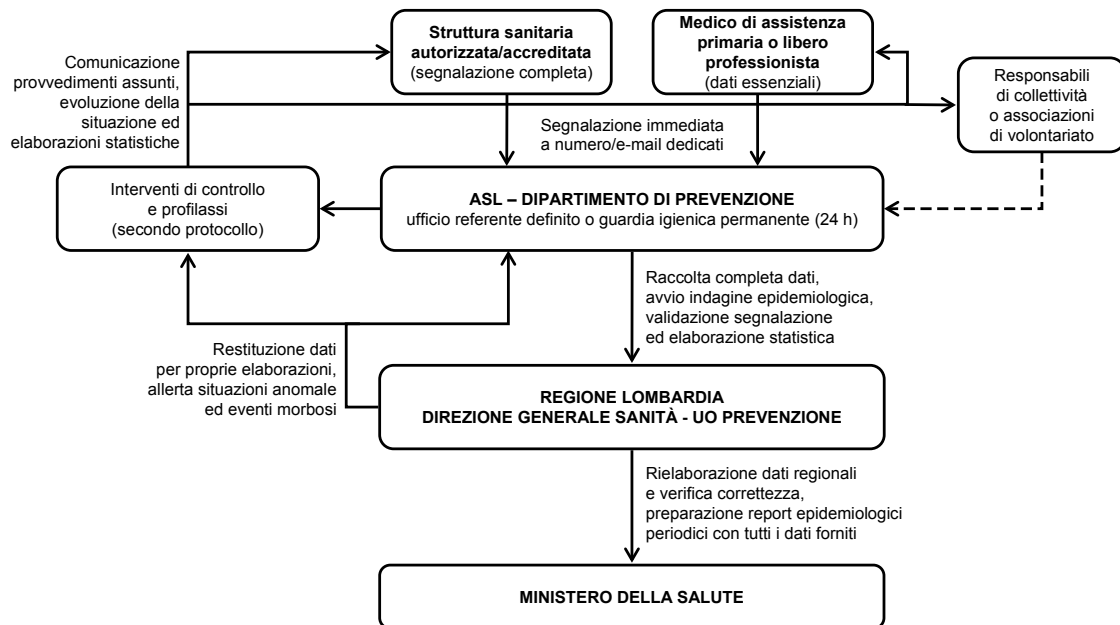


Figura 1. Flusso informativo del sistema di sorveglianza della regione Lombardia

Il sistema di sorveglianza piemontese (Figura 2) è, invece, un sistema dedicato alle malattie a trasmissione alimentare e in particolare al rilevamento tempestivo dei focolai epidemici, di cui ne approfondisce le cause e i fattori di rischio correlati al fine di garantire interventi tempestivi e una prevenzione mirata.

In questo seminario si descrive l'andamento delle GA in Italia, in particolare nelle regioni Piemonte e Lombardia, nei periodi 1992-2009 e 1996-2009. Inoltre, viene valutato quantitativamente l'impatto che l'attivazione dei due sistemi di sorveglianza regionale ha avuto sulle GA nelle rispettive regioni.

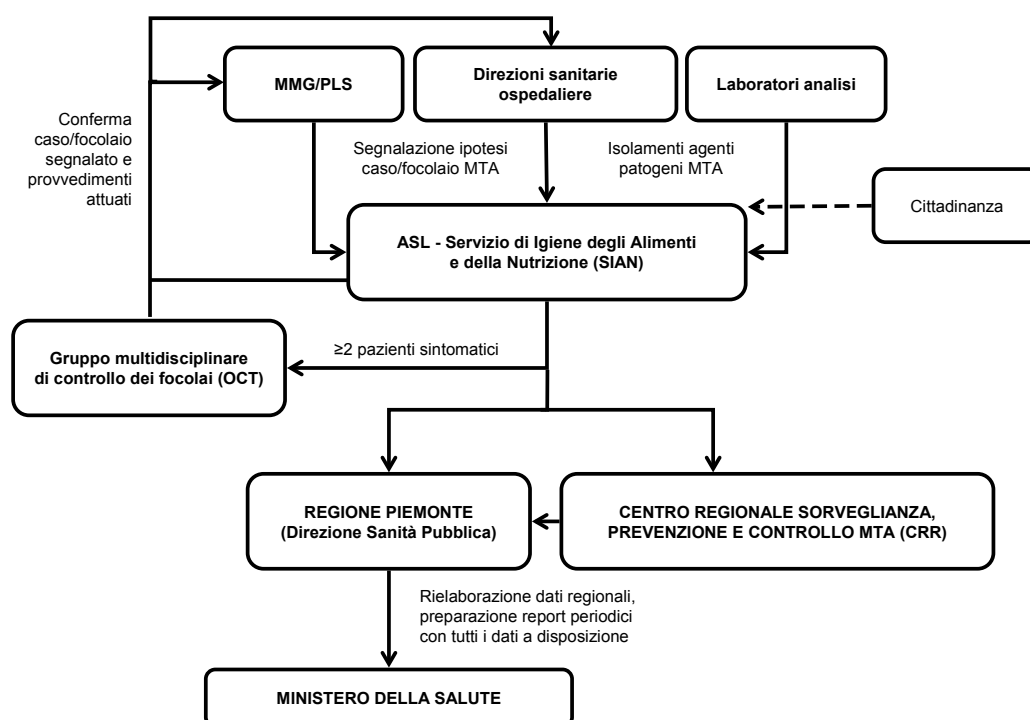


Figura 2. Flusso informativo del sistema di sorveglianza della regione Piemonte

Materiali e metodi

Per la valutazione dell'impatto dei sistemi di sorveglianza di Lombardia e Piemonte sulla notifica delle GA, sono stati considerati i dati delle notifiche ufficiali del SIMI. Le notifiche ufficiali di SNT, DINS e FTA ottenute dal Ministero della Salute per gli anni 1996-2009 (SNT, DINS e FTA) e dall'Istituto nazionale di statistica (ISTAT) per gli anni 1992-1995 (SNT e DINS) sono state utilizzate come *proxy* di GA. Sempre dall'ISTAT sono stati ottenuti i dati relativi alla popolazione residente.

Sono stati calcolati i tassi standardizzati di incidenza (numero di casi/eventi notificati per 100.000 abitanti, standardizzati per età e sesso al 2001) di SNT, DINS e FTA, per anno (1992-2009, 1996-2009), regione (20 regioni), fascia d'età (0-14 anni, 15-24 anni, 25-64 anni, 65 anni e oltre) e sesso. I dati sono stati presentati per Piemonte e Lombardia in comparazione con la media nazionale. Il test di Cuzick (7) è stato utilizzato per l'evidenziazione di trend temporali e spaziali, il test di Kruskal-Wallis per i confronti tra fasce d'età e il test U di Mann-Whitney per i confronti tra maschi e femmine (8).

Per la valutazione dell'impatto dei due sistemi di sorveglianza regionale sulla notifica di SNT, DINS e FTA sono stati dapprima condotti dei confronti intra-regione tra il periodo precedente (Piemonte: 1992-2001, 1996-2001; Lombardia: 1992-2003, 1996-2003) e quello successivo (Piemonte: 2002-2009; Lombardia: 2004-2009) all'attivazione dei due sistemi di sorveglianza utilizzando le incidenze regionali centrate sull'incidenza media nazionale. Questi confronti sono stati effettuati con il test U di Mann-Whitney. Sono stati poi costruiti tre modelli di Poisson (uno per i casi di SNT, uno per quelli di DINS e un altro ancora per i FTA) con

effetto casuale a livello di regione per stimare i rapporti dei tassi di incidenza (incidence rate ratios, IRR) dei due sistemi di sorveglianza (interazione tra regione e anno: Piemonte e 2002-2009; Lombardia e 2004-2009) sulla notifica di SNT, DINS e FTA, aggiustati per anno, effetto fisso di Piemonte e Lombardia e indice di invecchiamento (persone ≤ 14 anni su ≥ 65 anni). La popolazione è stata inclusa come variabile *offset* nei modelli per SNT e DINS, mentre il numero di casi coinvolti nei FTA è stato inserito, sempre come variabile *offset*, nel modello per FTA, assumendo, pertanto, che un FTA abbia una maggiore probabilità di essere rilevato e notificato se ha coinvolto un numero maggiore di casi.

L'analisi statistica è stata eseguita con STATA 10.1 (9). La significatività statistica è stata fissata a $p < 0,05$.

Risultati

Nel periodo di studio (1992-2009 per SNT e DINS; 1996-2009 per FTA) sono stati notificati in Italia un totale di 222.277 casi di SNT, 46.903 casi di DINS e 7.937 FTA. In Piemonte, sono stati notificati 16.431 casi di SNT (7,4% del totale), 4.012 casi di DINS (8,6%) e 570 FTA (7,2%). In Lombardia, sono stati notificati 43.040 casi di SNT (19,4%), 14.797 casi di DINS (31,5%) e 1.663 FTA (21,0%).

L'incidenza media nazionale di SNT (Figura 3) mostra un trend significativamente decrescente ($p < 0,001$), passando dai 47,3 casi per 100.000 abitanti del 1992 ai 6,7 casi per 100.000 abitanti del 2009. Sempre per SNT, si registra un trend significativamente decrescente in Piemonte e Lombardia ($p < 0,01$) (Figura 3), con un'incidenza superiore alla media nazionale dal 2000 in Lombardia e dal 2003 in Piemonte. L'incidenza media nazionale di DINS mostra un trend significativamente crescente ($p < 0,05$), passando dai 2,7 casi per 100.000 abitanti del 1992 ai 5,8 casi per 100.000 abitanti del 2009. Anche in Piemonte e Lombardia si registra un trend significativamente crescente per le DINS ($p < 0,01$). In entrambe le regioni, le notifiche di DINS si attestano sopra la media nazionale dal 2000 in poi.

L'incidenza nazionale di FTA mostra un trend significativamente decrescente ($p < 0,01$), passando dai 1,5 casi per 100.000 abitanti del 1996 ai 0,4 casi per 100.000 abitanti del 2009. Non si registra, tuttavia, alcun trend statisticamente significativo per FTA in Piemonte e Lombardia ($p > 0,05$).

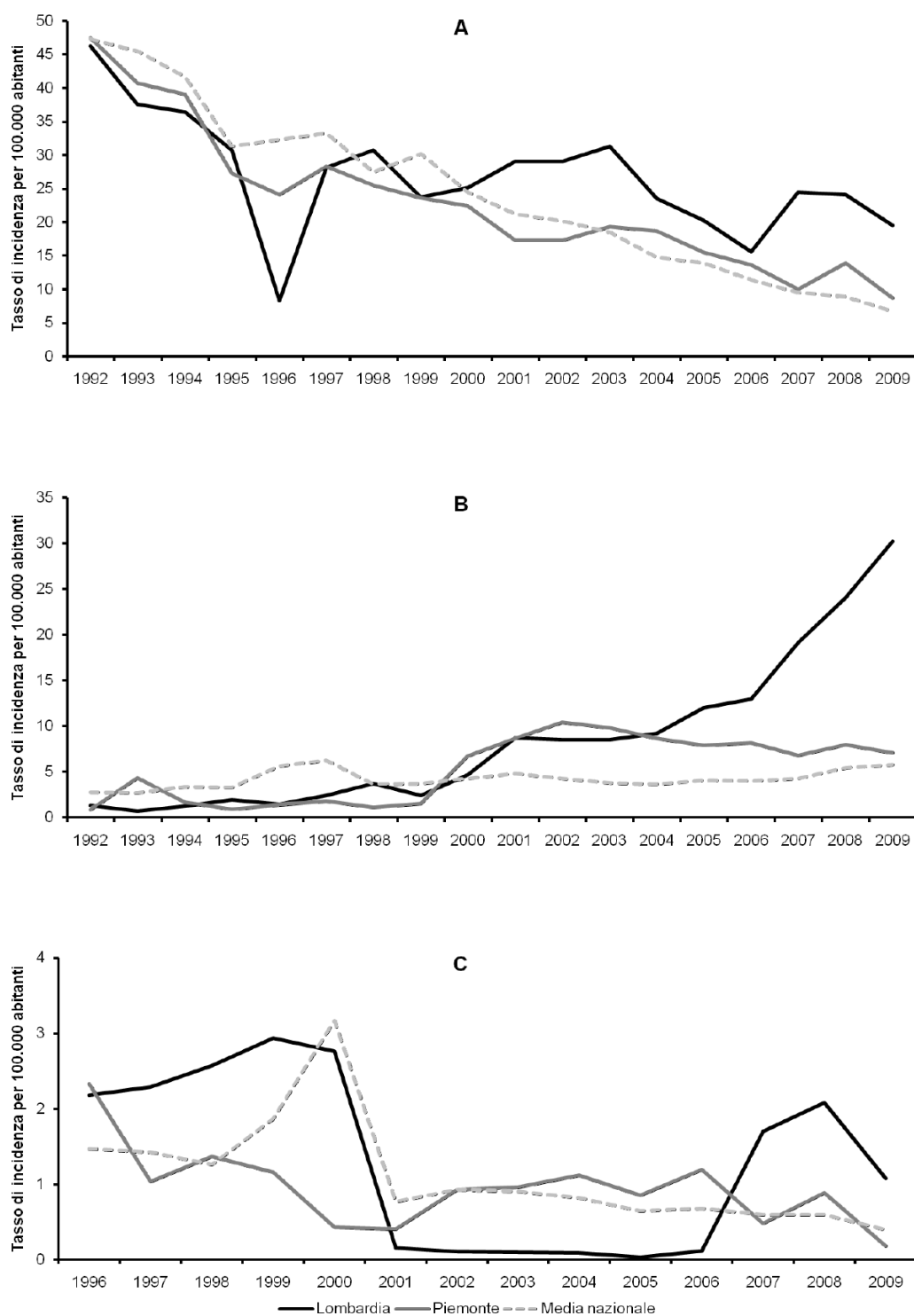


Figura 3. Andamenti temporali dei tassi di incidenza per 100.000 abitanti di salmonellosi non tifoidea (A), diarrea infettiva non da Salmonella (B) e focolai di tossinfezione alimentare (C) in Italia (media nazionale), Piemonte e Lombardia

A livello nazionale, l'incidenza di SNT per fasce d'età (Tabella 1) risulta essere maggiore nella fascia d'età pediatrica (0-14 anni; 98,2 casi per 100.000 abitanti), mentre nelle altre fasce d'età la distribuzione dei casi è nettamente inferiore (tra 17,3 e 44,4 casi per 100.000 abitanti).

Anche per le DINS, l'incidenza maggiore si osserva nella fascia 0-14 anni (media nazionale: 19,8 casi per 100.000 abitanti), subito seguita dalla fascia d'età ≥ 65 anni (2,8 casi per 100.000 abitanti). Piemonte e Lombardia rispecchiano fondamentalmente l'andamento nazionale (Tabella 1). Le differenze osservate tra le fasce di età sono risultate statisticamente significative ($p < 0,001$), mentre non sono significative quelle tra i sessi ($p > 0,05$).

Tabella 1. Incidenza annuale per 100.000 abitanti (media $\pm$ errore standard) di salmonellosi non tifoidea, diarrea infettiva non da *Salmonella* per fasce d'età e sesso in Italia (media nazionale), in Piemonte e Lombardia, 1992-2009

Evento sotto sorveglianza	Fascia d'età				Sesso	
	0-14 anni	15-24 anni	25-64 anni	≥ 65 anni	Maschi	Femmine
<i>Salmonellosi non tifoidea</i>						
Piemonte	99,7 $\pm$ 6,0	24,0 $\pm$ 8,0	21,7 $\pm$ 9,0	14,9 $\pm$ 2,1	41,9 $\pm$ 6,5	38,2 $\pm$ 6,1
Lombardia	127,5 $\pm$ 5,9	19,4 $\pm$ 6,1	19,1 $\pm$ 7,3	18,1 $\pm$ 1,7	48,0 $\pm$ 7,1	44,1 $\pm$ 6,6
Media nazionale	98,2 $\pm$ 6,8	32,6 $\pm$ 12,4	24,7 $\pm$ 9,9	17,3 $\pm$ 2,6	44,4 $\pm$ 7,2	42,0 $\pm$ 7,2
<i>Diarrea infettiva non da Salmonella</i>						
Piemonte	25,8 $\pm$ 3,1	1,3 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,3	4,3 $\pm$ 0,6	8,8 $\pm$ 1,7	7,6 $\pm$ 1,5
Lombardia	32,4 $\pm$ 4,1	2,8 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,3	14,1 $\pm$ 3,7	14,0 $\pm$ 2,6	11,6 $\pm$ 2,2
Media nazionale	19,8 $\pm$ 1,0	1,9 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1	2,8 $\pm$ 0,5	7,0 $\pm$ 1,0	5,8 $\pm$ 0,8

Come mostrato in Tabella 2, l'attivazione dei due sistemi di sorveglianza regionale è significativamente associata ad un incremento (dalla media nazionale) dell'incidenza di SNT (+1,58 e +10,27 casi per 100.000 abitanti, rispettivamente in Piemonte e Lombardia) e DINS (+3,90 e +13,34 casi per 100.000 abitanti, rispettivamente per Piemonte e Lombardia), ma non di FTA ($p > 0,05$).

Tabella 2. Numero medio ($\pm$ errore standard) di notifiche per 100.000 abitanti di SNT, DINS e FTA rilevate in più o meno in Piemonte e Lombardia rispetto alla media nazionale nei periodi pre e post attivazione dei rispettivi sistemi di sorveglianza regionale

Evento sotto sorveglianza	Piemonte			Lombardia		
	Prima	Dopo	p	Prima	Dopo	p
	1992-2001	2002-2009		1992-2003	2004-2009	
Salmonellosi non tifoidea (§)	-4,0 $\pm$ 0,8	+1,58 $\pm$ 0,83	<0,01	-1,5 $\pm$ 2,8	+10,3 $\pm$ 1,9	<0,05
Diarrea infettiva non da Salmonella (§)	-1,1 $\pm$ 0,9	+3,90 $\pm$ 0,61	<0,01	-0,2 $\pm$ 0,9	+13,3 $\pm$ 2,9	<0,01
	1996-2001	2002-2009		1996-2003	2004-2009	
Focolai di tossinfezione alimentare	-0,5 $\pm$ 0,5	+0,13 $\pm$ 0,08	>0,05	+0,2 $\pm$ 0,3	+0,2 $\pm$ 0,4	>0,05

I risultati dei tre modelli Poisson (Tabella 3) rivelano che l'attivazione di entrambi i sistemi di sorveglianza è significativamente associata ad un incremento delle notifiche di SNT (+77% in Lombardia e +19% in Piemonte) e DINS (+280% in Lombardia e +121% in Piemonte). Di

contro, le notifiche di FTA sono aumentate significativamente solo in seguito all'attivazione del sistema di sorveglianza del Piemonte (+49%). Si conferma, inoltre, il trend temporale decrescente per le SNT e crescente per le DINS e i FTA.

Tabella 3. Rapporti dei tassi di incidenza (incidence rate ratios, IRR) stimati dai due modelli di Poisson ad effetti casuali (a livello di regione) modellanti i casi di salmonellosi non tifoidea, diarrea infettiva non da *Salmonella* e focolai di tossinfezione alimentare

Eventi sotto sorveglianza	IRR	IC 95%	p
<i>Salmonellosi non tifoidea</i>			
Anno (1992-2009)	0,90	0,90-0,91	<0,001
Piemonte	0,83	0,35-2,01	>0,05
Lombardia	1,08	0,45-2,61	>0,05
Sistema di sorveglianza del Piemonte	1,19	1,15-1,23	<0,001
Sistema di sorveglianza della Lombardia	1,77	1,73-1,81	<0,001
Indice di invecchiamento	0,45	0,43-0,49	<0,001
<i>Diarrea infettiva non da <i>Salmonella</i></i>			
Anno (1992-2009)	1,04	1,03-1,04	<0,001
Piemonte	1,31	0,25-6,67	>0,05
Lombardia	1,53	0,30-7,81	>0,05
Sistema di sorveglianza del Piemonte	2,21	2,06-2,38	<0,001
Sistema di sorveglianza della Lombardia	3,80	3,65-3,97	<0,001
Indice di invecchiamento	1,94	1,72-2,19	<0,001
<i>Focolai di tossinfezione alimentare</i>			
Anno (1996-2009)	1,02	1,01-1,03	<0,001
Piemonte	0,86	0,53-1,37	>0,05
Lombardia	1,30	0,82-2,04	>0,05
Sistema di sorveglianza del Piemonte	1,49	1,25-1,76	<0,001
Sistema di sorveglianza della Lombardia	1,05	0,92-1,19	>0,05
Indice di invecchiamento	0,71	0,50-0,99	<0,05

Discussione e conclusioni

In Italia si osserva un trend significativamente decrescente per le SNT. Questo decremento, osservato anche in altri paesi industrializzati, può essere spiegato con il miglioramento delle misure di controllo lungo la filiera alimentare, in particolare nel settore avicolo (10, 11). L'incremento delle DINS, invece, sottolinea il ruolo sempre più prominente di patogeni diversi da *Salmonella*, come ad esempio *Campylobacter jejuni*, che è in assoluto l'agente zoonotico causa di GA maggiormente notificato nell'Unione Europea (10, 11).

L'implementazione dei due sistemi di sorveglianza regionale è significativamente associata ad un incremento del numero di notifiche di SNT e DINS in Piemonte e Lombardia rispetto alle altre regioni. Questo incremento è significativo sia nell'analisi univariata che in quella multivariata. Per i FTA, invece, questo incremento è significativo solo in Piemonte, il cui sistema di sorveglianza è, infatti, particolarmente focalizzato nel rilevamento di FTA. L'incremento delle notifiche di SNT e DINS è, tuttavia, decisamente più marcato in Lombardia che in Piemonte. Infatti, il sistema lombardo è particolarmente focalizzato sulla qualità e completezza dei dati di notifica.

Le GA soffrono di una sottonotifica "sistemica", con notevoli variazioni tra le diverse regioni italiane. Tale problema è condiviso, in proporzioni variabili, con molti altri Paesi industrializzati (12-15). L'incremento delle notifiche osservato in Piemonte e Lombardia in

associazione all'implementazione dei rispettivi sistemi di sorveglianza è probabilmente la conseguenza di una maggiore motivazione degli operatori del settore, nonché della struttura procedurale creata nel contesto dei sistemi, che ha facilitato le attività degli operatori stessi e la diffusione delle informazioni generate nell'ambito della sorveglianza. Inoltre, in seguito all'implementazione di entrambi i sistemi, le capacità diagnostiche dei laboratori di Lombardia e Piemonte sono state migliorate ed estese a patogeni diversi da *Salmonella*, un fattore questo che potrebbe spiegare il marcato aumento delle DINS in queste due regioni.

In generale, risulta difficile paragonare tra loro i sistemi di sorveglianza delle due regioni a causa dei diversi flussi informativi e obiettivi che li caratterizzano. Tuttavia, i due sistemi si sono dimostrati particolarmente sensibili verso le GA, descrivendone, pertanto, un'epidemiologia più completa e veritiera, seppur con differenti capacità di cogliere il fenomeno.

Nell'ottica di migliorare la sorveglianza delle GA e ottenere dati più omogenei e comparabili a livello nazionale, oltre alla sensibilità si dovrebbe anche considerare la sostenibilità del sistema di sorveglianza. Per quanto riguarda i sistemi di Lombardia e Piemonte, non è stato possibile valutarne dettagliatamente la sostenibilità e le risorse necessarie.

In conclusione, il miglioramento della sorveglianza delle GA a livello nazionale richiede sforzi che devono essere definiti sulla base degli obiettivi che si vogliono raggiungere, sia in termini di impatto sulla sottonotifica delle GA, sia di definizione delle strategie di intervento e prevenzione da porre in essere. Questi sforzi possono essere guidati dalle varie esperienze locali maturate sul territorio, quali ad esempio quelle delle regioni Piemonte e Lombardia, focalizzandosi sull'armonizzazione delle attività di sorveglianza sull'intero territorio nazionale.

Bibliografia

1. Bern C, Martinez J, de Zoysa I, Glass RI. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. *Bull World Health Organ* 1992;70:705-14.
2. Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull World Health Organ* 2003;81:197-204.
3. Guerrant RL, Hughes JM, Lima NL, Crane J. Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special settings and etiologies. *Rev Infect Dis* 1990;12:S41-50.
4. Scavia G, Baldinelli F, Busani L, Caprioli A. The burden of self-reported acute gastrointestinal illness in Italy: a retrospective survey, 2008-2009. *Epidemiol Infect* 2012;140:1193-206.
5. Busani L, Scavia G, Luzzi I, Caprioli A. Laboratory surveillance for prevention and control of foodborne zoonoses. *Ann Ist Super Sanita* 2006;42:401-4.
6. Graziani C, Serra R, Busani L (Ed.). *Sorveglianza e diagnostica delle gastroenteriti acute in Italia*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2012. (Rapporti ISTISAN 12/38).
7. Cuzick J. A Wilcoxon-Type Test for Trend. *Statistics in Medicine* 1985;4:87-9.
8. Hollander M, Wolfe DA. *Nonparametric statistical methods*. Wiley 2nd ed. 1999.
9. StataCorp. *Stata Statistical Software: Release 10*. College Station, TX: StataCorp LP. 2007.
10. ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). *Annual epidemiological report 2011. Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data*. Stockholm: ECDC; 2011.
11. EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *EFSA Journal* 2011;9(3):2090(378 p).

12. Edge VL, Odoi A, Fyfe M, MacDougall L, Majowicz SE, Doré K, Flint JA, Boom N, Muchaal PK, Sockett PN. Physician diagnostic and reporting practices for gastrointestinal illnesses in three health regions of British Columbia. *Can J Public Health* 2007;98:306-10.
13. Herikstad H, Yang S, Van Gilder TJ, Vugia D, Hadler J, Blake P, Deneen V, Shiferaw B, Angulo FJ. A population-based estimate of the burden of diarrhoeal illness in the United States: FoodNet, 1996-7. *Epidemiol Infect* 2002;129:9-17.
14. Huhulescu S, Kiss R, Brettlecker M, Cerny RJ, Hess C, Wewalka G, Allerberger F. Etiology of acute gastroenteritis in three sentinel general practices, Austria 2007. *Infection* 2009;37:103-8.
15. Majowicz SE, Edge VL, Fazil A, McNab WB, Doré KA, Sockett PN, Flint JA, Middleton D, McEwen SA, Wilson JB. Estimating the under-reporting rate for infectious gastrointestinal illness in Ontario. *Can J Public Health* 2005;96:178-81.

CENTRO NAZIONALE DI RIFERIMENTO PER IL BOTULISMO: SORVEGLIANZA E RICERCA

Fabrizio Anniballi (a), Bruna Auricchio (b), Alfonsina Fiore (b), Lucia Fenicia (a), Luciana Croci (a)

(a) *Reparto Adempimenti comunitari e sanità pubblica*

(b) *Reparto Pericoli microbiologici connessi agli alimenti*

Introduzione

Il botulismo è una sindrome neuromuscolare conseguente all'azione delle tossine botuliniche che agiscono bloccando il rilascio dell'acetilcolina a livello delle giunzioni neuro-muscolari dei muscoli volontari e involontari. Nell'uomo la malattia si manifesta con paralisi flaccida simmetrica, discendente. Negli animali la paralisi flaccida simmetrica può risultare ascendente (1).

Il botulismo umano viene classificato, da un punto di vista patogenetico, in cinque diverse forme che hanno in comune le stesse manifestazioni cliniche (2):

- botulismo alimentare dovuto all'assunzione di alimenti contaminati con le tossine botuliniche;
- botulismo da ferita dovuto all'assorbimento di tossine prodotte in una ferita infetta;
- botulismo infantile conseguente la germinazione e tossinogenesi dei clostridi produttori di tossine botuliniche nel lume intestinale di lattanti con età inferiore ad un anno;
- botulismo intestinale dell'adulto che consiste nella germinazione e tossinogenesi dei clostridi produttori di tossine botuliniche nel lume intestinale di ragazzi e adulti;
- botulismo iatrogeno conseguente l'uso non corretto della tossine botuliniche per scopi terapeutici o cosmetici.

Il botulismo animale viene classificato in tre diverse forme: animale, da ferita e intestinale (3).

Attualmente sono state identificate sette varianti antigeniche di tossine botuliniche denominate con le lettere dell'alfabeto dalla A alla G. Le tossine tipo A, B, E, F sono responsabili della patologia umana; le tossine tipo C e D sono principalmente responsabili della patologia animale; la tossina tipo G non è stata ancora associata a casi di botulismo (4). Le tossine botuliniche sono sintetizzate come una singola catena polipeptidica di circa 150 kDa, che mediante attivazione enzimatica si trasforma in due catene (una leggera e una pesante) legate da un ponte di solfuro.

Dopo l'ingresso nella circolazione generale, le tossine si legano in modo specifico e irreversibile alle membrane presinaptiche dei neuroni delle terminazioni nervose. La catena pesante è responsabile del legame alle membrane presinaptiche, mentre la catena leggera è responsabile della modificazione enzimatica della proteina bersaglio. L'intossicazione procede con un meccanismo a quattro step: 1) legame; 2) internalizzazione; 3) traslocazione di membrana; 4) modificazione enzimatica del bersaglio (proteine delle vescicole sinaptiche VAMP2, syntaxina, SNAP-25) (5).

Le tossine botuliniche sono prodotte da microrganismi anaerobi, sporigeni, positivi alla colorazione di Gram, appartenenti al genere *Clostridium*.

Al momento sono stati caratterizzati come produttori di tossine botuliniche le seguenti specie:

- *Clostridium botulinum* (produttore delle tossine tipo A, B, C, D, E, F);
- *Clostridium baratii* (produttore di tossina tipo F);
- *Clostridium butyricum* (produttore di tossina tipo E);
- *Clostridium argentinense* (produttore di tossina tipo G) già classificato come *C. botulinum* tipo G.

Questi microrganismi presentano caratteristiche fenotipiche e genotipiche molto diverse e sono classificati in 6 gruppi metabolici (Tabella 1) (4,6).

Tabella 1. Caratteristiche fenotipiche dei clostridi produttori di tossine botuliniche

Caratteristiche	Gruppo I	Gruppo II	Gruppo III	Gruppo IV	Gruppo V	Gruppo VI
Microrganismo	C. botulinum	C. botulinum	C. botulinum	C. botulinum	C. butyricum	C. baratii
Tossine prodotte	A, B, F	B, E, F	C, D	G	E	F
Proteolisi	+	-	-	+	-	-
Lipasi	+	+	+	-	-	-
Lecitinasi	-	-	±	-	-	+
Fermentazione:						
- glucosio	+	+	+	-	+	+
- lattosio	-	-	-	-	+	+
- saccarosio	-	+	-	-	+	+
- mannosio	-	+	+	-	+	+
T di crescita:						
- ottimale	35-40°C	18-25°C	40°C	37°C	30-37°C	30-45°C
- minima	10°C	3,3°C	15°C	20°C	12°C	20°C
- D ^a	2,5 min ^b	< 0,1 min ^b	2,5 min ^c	n.d.	n.d.	n.d.
pH inibente	4,6	5,0	5,0	n.d.	4,8	n.d.
Acqua libera inibente	< 0,935	< 0,97	n.d.	n.d.	<0,98	n.d.
NaCl conc. inibente	10%	5%	n.d.	n.d.	3,25%	n.d.

^a = tempo di morte termica (tempo richiesto per l'inattivazione del 90% della popolazione microbica)

^b = tempo di morte termica alla temperatura di 100 °C

^c = tempo di morte termica alla temperatura di 76,6 °C

Attività di sorveglianza

Il Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo (CNRB), che opera all'interno del reparto Adempimenti comunitari e sanità pubblica del dipartimento SPVSA, è stato formalizzato dal Ministero della Sanità con lettera del 1988 e successiva Circolare Ministeriale n. 9 del 01.07.1996 "Misure di prevenzione e controllo delle intossicazioni da botulismo".

L'attività di sorveglianza del CNRB consiste principalmente nella:

- diagnosi di laboratorio dei sospetti casi clinici;
- collaborazione con tutte le strutture del Sistema Sanitario Nazionale deputate ad effettuare le indagini epidemiologiche volte ad una tempestiva individuazione del veicolo alimentare;
- raccolta ed elaborazione dei dati epidemiologici, clinici e di laboratorio acquisiti durante l'attività di sorveglianza dei casi di botulismo.

Nei compiti istituzionali del CNRB sono inoltre compresi:

- la messa a punto e validazione di metodiche analitiche per la determinazione dei clostridi produttori di tossine botuliniche e delle tossine botuliniche in campioni clinici, alimentari e ambientali;
- l'organizzazione di stage formativi destinati agli operatori di laboratorio degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IIZZSS) e di altre strutture deputate alle indagini di laboratorio;

- la produzione e distribuzione ai laboratori periferici di materiale di riferimento;
- l'organizzazione di circuiti interlaboratorio.

L'attività di diagnostica di laboratorio riveste un carattere di particolare urgenza sia per la necessità di un tempestivo intervento sul paziente sia ai fini di una rapida individuazione dell'alimento tossico. Particolare tempestività è richiesta in caso di attivazione del sistema rapido di allerta (*Rapid Alert System for Food and Feed*, RASFF) allorquando siano coinvolti alimenti di produzione industriale. A tale scopo il personale del CNRB è organizzato per ricevere i campioni 24 ore al giorno tutti i giorni dell'anno dando tempestivamente inizio all'iter analitico. Ultimate le analisi, il CNRB fornisce sia telefonicamente sia mediante certificazione ufficiale i risultati analitici agli ospedali coinvolti e al Ministero della salute (Dipartimento della sanità pubblica veterinaria, della sicurezza alimentare e degli organi collegiali per la tutela della salute e Dipartimento della sanità pubblica e dell'innovazione).

La raccolta delle informazioni di natura clinica ed epidemiologica si attua mediante la compilazione della scheda "Segnalazione Caso di Botulismo" (Allegato 1 della Circolare del Ministero della Sanità n. 9 del 01 luglio 1996). Tali informazioni sono sempre integrate con ulteriori dati provenienti dai contatti telefonici diretti sia con i clinici che, ove possibile, con i pazienti o i loro familiari. Il personale del CNRB fornisce, su richiesta e a scopo divulgativo, informazioni utili alla corretta preparazione di conserve alimentari in ambito domestico.

La messa a punto e validazione di metodiche analitiche, per una rapida determinazione sia dei clostridi produttori di tossine botuliniche sia delle tossine botuliniche, è un'attività di primaria importanza e che presenta importanti ricadute per il Servizio Sanitario Nazionale (SSN). I metodi classici prevedono lunghi tempi di esecuzione e richiedono step analitici *in vivo* su animali da laboratorio. In ottemperanza alla normativa nazionale e comunitaria sulla limitazione dell'uso di animali da laboratorio a scopo diagnostico, presso il CNRB sono in uso metodiche di PCR (*Polimerase Chain Reaction*) e real-time PCR validate e recentemente accreditate in conformità alla norma ISO 17025. Per quanto riguarda l'applicazione di tali metodiche analitiche, il CNRB effettua, su richiesta, stages formativi per il personale dei laboratori pubblici e organizza ring trial a livello nazionale, su matrici alimentari, coinvolgendo tutti gli IIZZSS.

Attività di ricerca

Le attività di ricerca promosse, coordinate ed effettuate dal CNRB sono principalmente a supporto dell'attività istituzionale e della *mission* del centro stesso.

Gli aspetti metodologici da diversi anni hanno assunto un ruolo determinante nell'attività di ricerca. Nell'ambito di due diversi progetti di ricerca europei sono stati sviluppati protocolli per la determinazione dei clostridi produttori di tossine botuliniche responsabili della patologia umana e animale, basati su metodiche di PCR e real-time PCR simplex e multiplex. Tali attività di ricerca hanno avuto un'importante ricaduta nell'ambito delle attività CEN (Comitato Europeo di Normazione) a cui partecipa anche il personale del CNRB. In particolare, le metodiche di PCR e real-time PCR sviluppate e utilizzate presso il CNRB sono state proposte e discusse in sede CEN quale organismo incaricato dall'ISO della redazione di una norma standard internazionale per la determinazione dei clostridi produttori di tossine botuliniche.

A livello metodologico, si sta lavorando alla messa a punto di tecniche rapide e innovative per la sub-tipizzazione molecolare dei ceppi di clostridi produttori di tossine botuliniche. Le tecniche correntemente utilizzate per la sub-tipizzazione molecolare dei ceppi di clostridi produttori di tossine botuliniche, possono essere applicate soltanto su microrganismi in coltura pura, richiedono un alto grado di qualità del materiale genetico, lunghi tempi di esecuzione,

personale altamente qualificato e laboratori opportunamente attrezzati. Sono in corso, presso il CNRB, studi basati su tecniche altamente specifiche in grado di fornire risultati attendibili anche da colture miste, al fine di rendere più veloce e di facile realizzazione tale processo di sub-tipizzazione, con evidenti ricadute per il SSN e per l'industria alimentare.

Il CNRB effettua inoltre studi sulla prevalenza delle spore dei clostridi produttori di tossine botuliniche in matrici alimentari, ambienti e indicatori di contaminazione diversi (sale marino e miele). Questi studi sono finalizzati anche alla valutazione del rischio associato alle diverse forme di botulismo.

Infine, per l'individuazione di nuovi fattori di rischio associati al botulismo infantile e intestinale dell'adulto, sono in corso studi di epidemiologia e biologia molecolare basati sulle tecniche di sequenziamento completo del genoma batterico. Tale attività di sequenziamento è possibile grazie all'isolamento e al mantenimento di una ceppoteca che al momento conta più di 500 clostridi produttori di tossine botuliniche.

Bibliografia

1. Critchley EM. A comparison of human and animal botulism: a review. *J R Soc Med* 1991;84(5):295-8.
2. Fenicia L, Anniballi F, Aureli P. Intestinal toxemia botulism in Italy, 1984-2005. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007;26(6):385-94.
3. Liguori V, De Luliis P, Fenicia L, Anniballi F, and Aureli P. A case of wound botulism in a foal affected by gastric ulcers in Italy. *J Equine Vet Sci* 2008;28(8):476-8.
4. Lund BM, and Peck MW. *Clostridium botulinum*. In: The Microbiological safety and quality of food. Ed Lund BM, Baird-Parker TC, and Gould GW. pp 1057-109. Gaithersburg: Aspen. 2000.
5. Grumelli C, Verderio C, Pozzi D, Rossetto O, Montecucco C, Matteoli M. Internalization and mechanism of action of Clostridial toxins in neurons. *NeuroToxicology* 2005;25:761-7.
6. Hatheway CL. Toxigenic Clostridia. *Clin Microbiol Rev* 1990;3(1):66-98.

VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIBATTERICA DELLE BATTERIOCINE NEI CONFRONTI DI PATOGENI ALIMENTARI

Alfonsina Fiore (a), Alessandra Vilmercati (a), Fabrizio Anniballi (b), Dario De Medici (a)

(a) *Reparto Pericoli microbiologici connessi agli alimenti*

(b) *Reparto Adempimenti comunitari e sanità pubblica*

L'antagonismo batterico rappresenta uno dei molteplici sistemi difensivi di cui sono dotati i microrganismi. Particolarmente interessante è quello messo in atto dai batteri lattici, abituali componenti della flora batterica intestinale, che viene esercitato non solo attraverso la competizione per i nutrienti e per siti di attacco all'epitelio intestinale dell'organismo ospite, ma anche mediante l'azione di sostanze ad attività antimicrobica come acidi organici, perossido d'idrogeno e batteriocine, tossine di natura proteica che agiscono inibendo la crescita di numerose specie batteriche comprese quelle patogene.

Il termine batteriocine venne coniato da Jacob nel 1953, per indicare molecole proteiche generate indifferentemente da batteri Gram positivi e Gram negativi e dotate di attività inibitoria nei confronti della crescita di numerose specie batteriche.

Le batteriocine prodotte dai Gram negativi sono proteine ad elevato peso molecolare, che presentano un caratteristico dominio specifico per l'adesione, la traslocazione o l'attività di killing della batteriocina stessa; i geni che le codificano sono localizzati a livello plasmidico.

Esse agiscono mediante formazione di canali ionici a livello di membrana citoplasmatica e aderiscono alle cellule bersaglio, grazie alla presenza di specifici recettori.

Quelle prodotte dai Gram positivi, invece, sono peptidi cationici di piccole dimensioni termostabili, sintetizzati come pre-peptidi che in seguito alla scissione si trasformano in molecole biologicamente attive. I geni che le codificano possono essere presenti sia a livello plasmidico che cromosomico.

Le batteriocine sono normalmente sintetizzate a livello ribosomiale sottoforma di pre-peptidi inattivi, che per giungere alla forma matura vengono tagliati a livello della sequenza leader N-terminale e traslocati fuori dalla cellula da un sistema di trasporto ABC (ATP Binding Casette) oppure, meno frequentemente, da un sistema Sec-dipendente (*secretory signal peptid*) (1).

I batteri lattici hanno la capacità di produrre un'ampia gamma di batteriocine, che in base alla struttura e alle proprietà chimico-fisiche possono essere suddivise in 4 classi:

Classe I. Lantibiotici: piccoli peptidi che subiscono modificazioni post-traduzionali.

Classe II. Non lantibiotici: piccoli peptidi, termo-stabili che contengono amminoacidi non modificati.

Classe III. Batteriolisine: proteine termolabili caratterizzate da un dominio catalitico e un dominio di riconoscimento per il target. I diversi domini hanno funzione di traslocazione, legame al recettore e attività battericida.

Classe IV. Batteriocine miste: proteine complesse, associate a componenti di natura lipidica e/o proteica, indispensabili per la loro attività.

La produzione di batteriocine è un meccanismo molto complesso che generalmente viene regolato da un meccanismo di *quorum sensing* basato sulla concentrazione cellulare e che

avviene per autoinduzione: la batteriocina funziona da ferormone e induce la sua stessa sintesi al raggiungimento di una concentrazione cellulare soglia (2).

Le batteriocine agiscono direttamente a livello della membrana citoplasmatica sia dei batteri Gram positivi che Gram negativi (3), con un meccanismo d'azione che varia a seconda della classe di appartenenza. In particolare, le batteriocine di Classe I si legano al lipide II inibendo la sintesi della parete cellulare e formando dei pori sulla membrana della cellula target con conseguente alterazione del potenziale di membrana ed efflusso di metaboliti; quelle di Classe II si inseriscono nella membrana della cellula bersaglio rendendola permeabile con conseguente fuoriuscita di molecole. Le batteriocine di Classe III agiscono direttamente sulla parete cellulare della cellula bersaglio, provocandone la lisi e la morte. Il meccanismo d'azione delle batteriocine di Classe IV non è ancora ben noto, ma si ipotizza un meccanismo simile a quello delle altre batteriocine.

Grazie alla loro attività antimicrobica, le batteriocine possono essere utilizzate sia in campo clinico, come alternativa agli antibiotici, sia in campo alimentare, come bio-conservanti naturali, per controllare e contenere la popolazione batterica indesiderata, responsabile di intossicazioni e deterioramento della matrice alimentare (3).

Esse inoltre, possono consentire lo sviluppo di trattamenti di bio decontaminazione alternativi, al fine di produrre alimenti con elevati standard di sicurezza. Infatti, non sempre le strategie classiche utilizzate per garantire la sicurezza alimentare permettono di ottenere un prodotto *pathogen-free*. Alcune tecniche di produzione degli alimenti tipici italiani (DOP e IGP), basate su metodi tradizionali, non garantiscono, ad esempio, adeguati livelli di sicurezza a causa di fattori ambientali che interagiscono con la crescita dei patogeni: fasi peculiari nella preparazione dei prodotti tipici spesso implicano la manipolazione in ambienti a rischio quali cantine, grotte, ecc.

Fino ad oggi, comunque, solo le batteriocine nisina e pediocina PA-1, sono disponibili in commercio e impiegate nell'industria alimentare (4), nonostante molti lavori dimostrino non solo l'efficacia, ma anche la sicurezza d'uso di molte altre batteriocine e che l'utilizzo dei batteri lattici come colture protettive per aumentare la sicurezza degli alimenti sia stato ampiamente studiato.

Al fine di ampliare le conoscenze sulle interazioni batteriche, il reparto Pericoli Microbiologici Connessi agli Alimenti (PM) del dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare (SPVSA), nell'ambito del progetto di ricerca: "*Setting up of biocompetition and decontamination methods to improve technological processes and food safety*", studia l'attività antibatterica dei batteri lattici (*Lactic Acid Bacteria*, LAB) e in particolare, delle batteriocine da essi prodotte, nei confronti di batteri patogeni alimentari.

Lo studio è finalizzato alla possibilità di selezionare e impiegare come bio-conservanti naturali ceppi di batteri lattici (e/o le batteriocine da essi prodotte), già largamente utilizzati nella tecnologia alimentare, allo scopo di controllare la flora batterica contaminante degli alimenti, per arrivare ad un miglioramento della sicurezza degli alimenti.

La prima parte del lavoro è stata articolata in 3 fasi:

- A) Selezione dei ceppi batterici produttori di batteriocine e dei ceppi batterici target.
- B) Determinazione *in vitro* dell'attività antibatterica delle batteriocine mediante tecnica dello *spot on the lawn*.
- C) Determinazione della presenza dei geni codificanti le batteriocine, mediante real-time PCR.

Selezione dei ceppi batterici produttori di batteriocine e dei ceppi batterici target

I ceppi batterici, produttori di batteriocine, utilizzati nello studio provenivano da:

- *American Type Culture Collection*, ATCC (Rockville, Md USA);
- Monitoraggio di campioni di integratori alimentari.

Tutti i ceppi, caratterizzati genotipicamente e fenotipicamente, erano così divisi:

- 9 ceppi di *Bacillus coagulans* produttori di Coagulina;
- 6 ceppi di *Lactococcus lactis* subsp *lactis* produttori di Nisina;
- 9 ceppi di *Streptococcus thermophilus* produttori di Termofilina.

I ceppi batterici target (potenzialmente sensibili all'azione delle batteriocine) utilizzati nello studio erano così divisi:

- 10 ceppi di *Cronobacter* spp (più comunemente conosciuto come *Enterobacter sakazakii*), provenienti da:
 - *American Type Culture Collection*, ATCC (Rockville, Md USA);
 - Ceppoteca del reparto PM dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS);
 - *Quality and Safety Assurance Department Nestlé Research Center*.
- 35 ceppi di Clostridi produttori di tossine botuliniche provenienti dalla Ceppoteca del Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo (CNRB) dell'ISS.

Entrambe le categorie di patogeni prese in considerazione rappresentano potenziali agenti di colonizzazione intestinale, nonché agenti causali di severe patologie, anche ad esito letale, nei bambini e negli adulti.

Determinazione *in vitro* dell'attività antibatterica delle batteriocine mediante tecnica dello *spot on the lawn*

Com'è noto i batteri lattici oltre alle batteriocine, producono altri composti ad azione antibatterica come acidi organici (ad esempio acido lattico) e perossido di idrogeno.

A tale proposito, nella ricerca di una metodica per la valutazione della produzione delle batteriocine è risultato fondamentale scegliere quella con la più alta specificità, in grado di ridurre al minimo l'interferenza dell'effetto battericida dovuto ad altri prodotti del metabolismo batterico.

È stata scelta, pertanto, la tecnica dello *spot on the lawn* (5), che oltre ad essere di facile esecuzione e altamente riproducibile, permettendo un'agevole lettura dei risultati, consente di eliminare l'effetto battericida dovuto ad altri composti; in particolare prevede:

- condizioni di incubazione in anaerobiosi per eliminare l'effetto battericida dovuto alla produzione di perossido di idrogeno*;
- l'utilizzo del Tryptone Soya Agar + Yeast Extract (TSA+YE), terreno di crescita senza glucosio per impedire la produzione di acido lattico da glucosio.

Di seguito viene riportato il diagramma semplificato relativo alla tecnica dello *spot on the lawn* (Figura 1).

* I batteri lattici sono microrganismi privi di citocromi e catalasi per cui consumano tutto l'ossigeno possibile per azione di flavoproteine (NADH-ossidasi e NADH perossidasi) producendo anioni superossido e perossido di idrogeno. Per escludere l'azione battericida di quest'ultimo, tutte le fasi del metodo per spot sono state eseguite in anaerobiosi per impedire la seguente reazione: $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow 2H_2O_2 + O_2$.

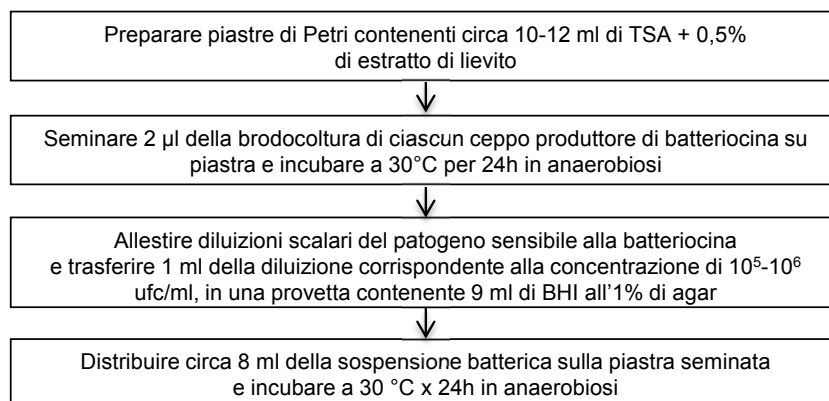


Figura 1. Diagramma semplificato relativo alla tecnica dello *spot on the lawn*

La produzione di batteriocina si evidenzia attraverso la formazione di un alone di inibizione (>3mm) misurabile attorno al ceppo in esame. L'effetto inibente delle batteriocine prodotte da *Lc.lactis*, *S.thermophilus* e *B.coagulans* nei confronti di Clostridi è mostrato nelle [Figure 2-4](#) mentre l'effetto nei confronti di *Cronobacter* spp 632 è mostrato nelle [Figure 5-7](#).

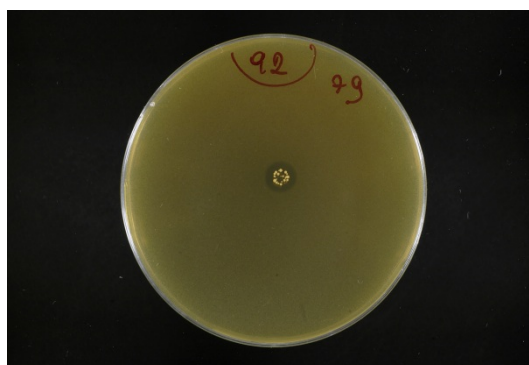


Figura 2. Ceppo n. 79 di *Lc.lactis* produttore di nisina vs *Clostridium botulinum* Ab n. 92



Figura 3. Ceppo n. 83 di *S.thermophilus* produttore di termofilina vs *Clostridium botulinum* B n. 389

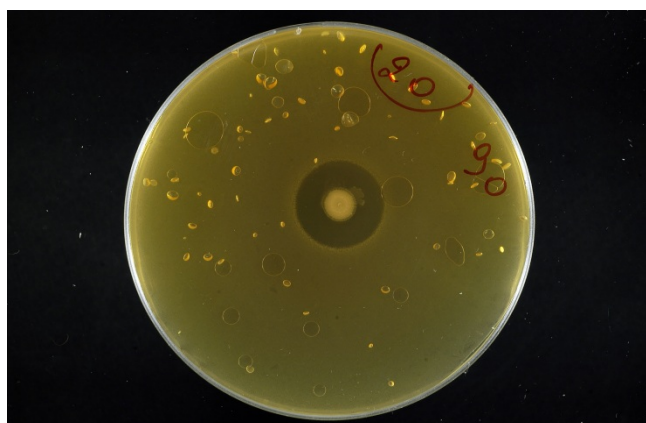


Figura 4. Ceppo n. 90 di *B.coagulans* produttore di coagulina vs *Clostridium butyricum* E n. 20

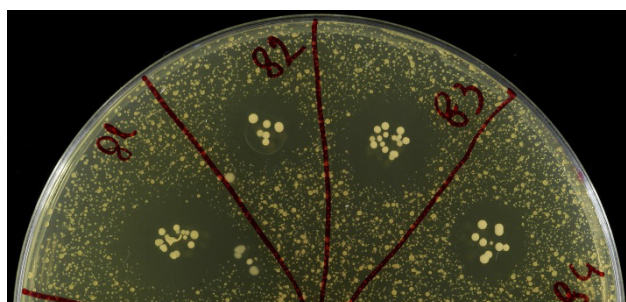


Figura 5. Ceppi n. 81, 82, 83, 84 di *S.thermophilus* produttori di termofilina vs *Cronobacter* spp 632

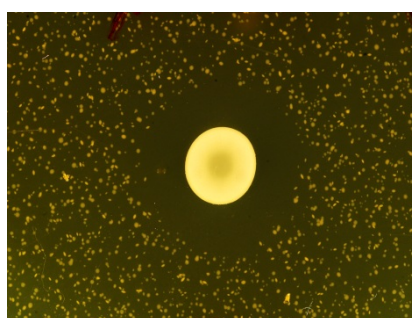


Figura 6. Ceppo n. 78 di *Lc. lactis* produttore di nisina vs *Cronobacter* spp 632

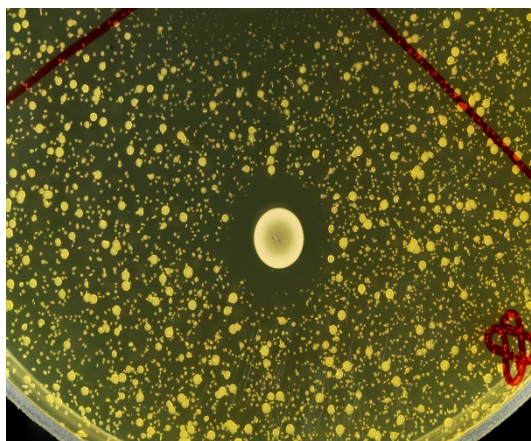


Figura 7. Ceppo n. 88 di *B.coagulans* produttore di coagulina vs *Cronobacter* spp 632

Determinazione della presenza dei geni codificanti le batteriocine mediante real-time PCR

Per dimostrare che l'inibizione ottenuta mediante il metodo *spot on the lawn* fosse dovuta realmente alle batteriocine coagulina, nisina e termofilina è stata effettuata anche la ricerca dei rispettivi geni, *Coa*, *Nis*, e *Tep*, mediante real-time PCR, utilizzando la metodica **SYBR green** (6).

Nello specifico il protocollo sperimentale prevedeva le seguenti fasi:

- **Estrazione del DNA dei batteri lattici** - effettuata mediante l'utilizzo del chelex (l'estrazione del DNA con questa tecnica viene effettuata utilizzando la resina Chelex 100, in grado di intrappolare tutte le molecole diverse dal DNA una volta lisata la parete batterica) (6).
- **Preparazione della miscela di reazione** - la miscela di reazione utilizzata nella fase di amplificazione era formata da:
 - 25 µL di Master Mix acquistata "pronta all'uso" e composta dai seguenti reagenti: dNTP mix, MgCl₂, HotStart Taq, DNA Polimerasi, Sybr Green PCR buffer, Sybr Green I, ROX;
 - 0,5 µL di primer Reverse, 0,5 µL di primer Forward (specifici per ogni specie batterica (7-9));
 - 19 µL di H₂O;
 - 5 µL di DNA;
 - Volume finale 50 µL.
- **Amplificazione del DNA** - La reazione di amplificazione, prevedeva un numero di cicli, tempi e temperature ottimali identici per ogni specie di batterio lattico testato e qui di seguito riportati (**Tabella 1**) o (**Figura 8**).

Ciclo iniziale	Amplificazione			Cicli totali	Ciclo finale
	Denaturazione	Annealing	Extension		
95 °C x 15'	94 °C x 15"	55 °C x 30"	72 °C x 30"	40	95 °C x 1' 55 °C x 30" 95 °C x 30"

- **Visualizzazione dei risultati** - mediante analisi della curva di melting

Risultati

I risultati ottenuti dal nostro studio dimostrano che le batteriocine coagulina, nisina e termofilina, inibiscono la crescita sia dei Clostridi produttori di tossine botuliniche che di *Cronobacter* spp. In particolare, il 100% dei ceppi di Clostridi testati sono risultati sensibili alla Nisina e Coagulina; circa l'86% alla Termofilina; solo uno dei ceppi di *Cronobacter* spp è risultato sensibile a tutte le batteriocine testate.

Attualmente, dai dati contenuti nel “*Bactibase*”, database delle batteriocine (10), risulta che coagulina, nisina e termofilina sono attive contro i batteri Gram positivi, ma non sono disponibili dati relativi ai Clostridi produttori di tossine botuliniche. Risulta inoltre, che esse agiscono nei confronti dei batteri Gram negativi, ma contro *Cronobacter* spp solo con aggiunta di adiuvanti.

Tutti i ceppi di batteri lattici analizzati, possiedono il gene codificante per la specifica batteriocina: il protocollo real-time PCR messo a punto può essere un utile strumento per investigare altri ceppi di batteri lattici, potenziali produttori di batteriocine.

Conclusioni

Le batteriocine potrebbero essere utilizzate in campo alimentare come bio –conservanti naturali (uso diretto come additivi o come prodotti di microrganismi starter) per aumentare la sicurezza degli alimenti, contrastando la presenza di eventuali patogeni per fornire un prodotto sicuro dal punto di vista microbiologico.

L'utilizzo di alimenti (ad esempio formule per l'infanzia) addizionati di batteri lattici, produttori di batteriocine, potrebbe permettere lo sviluppo della flora batterica benefica a sfavore dei patogeni.

Lo studio svolto può inoltre, contribuire ad ampliare le conoscenze sullo spettro d'azione delle batteriocine e sulle interazioni batteriche, soprattutto quelle che avvengono tra batteri lattici e Clostridi e tra batteri lattici e batteri Gram negativi, in particolare *Cronobacter* spp (tutti argomenti poco investigati in ambito scientifico).

Ringraziamenti

Questo lavoro è stato finanziato dal progetto di ricerca “*Setting up of biocompetition and decontamination methods to improve technological processes and food safety*” – Ministero della Salute Cod. RF – IZSL - 2008-1135259 - 2010-2013.

Bibliografia

1. Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol* 2001;71:1-20.
2. Cotter PD, Hill C, Ross PR. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature reviews* 2005;3:777-88.

3. Raffi V, Ossiprandi MC. Batteriocine: evoluzione, ecologia ed applicazioni pratiche. *Ann Fac Medic Vet di Parma* 2006;26:235-46. Disponibile all'indirizzo: http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/2006/235_246.pdf; ultima consultazione 19/12/2012.
4. EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to the use of nisin (E 234) as a food additive Question number EFSA-Q-2005-031 adopted on 26 January 2006. *The EFSA journal* 2006;314:1-16.
5. Lewus CB, Thomas JM. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *J Microbiol Methods* 1991;13:145-50.
6. Fenicia L, Anniballi F, De Medici D, Delibato E, Aureli P. SYBR green real-time PCR method to detect *Clostridium botulinum* type A. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:2891-6.
7. Hyronimus B, Le Marrec C, Urdaci MC. Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4". *J Appl Microbiol* 1998;85:42-50.
8. Kabuki T, Kawai Y, Uenishi H, Seto Y, Kok J, Nakajima H, Saito T. Gene cluster for biosynthesis of thermophilin 1277- a lantibiotic produced by *Streptococcus thermophilus* SBT1277, and heterologous expression of TepI, a novel immunity peptide. *J Appl Microbiol* 2011;110(3):641-9.
9. Moschetti G, Blaiotta G, Villani F, Coppola S. Nisin-producing organisms during traditional 'Fior di latte' cheese-making monitored by multiplex-PCR and PFGE analyses. *Int J Food Microbiol* 2001;63:109-16.
10. Institute of Applied Biological Sciences Tunis (ISSBAT), Tunisia and Nutraceuticals and Functional Foods Institute (INAF), Laval University, Canada. *Bactibase: database delle batteriocine*. Disponibile all'indirizzo: <http://bactibase.pfba-lab-tun.org> ; ultima consultazione 19/12/2012.

OGM IN ALIMENTI E MANGIMI: OVERVIEW SULLO STATO DELL'ARTE, VALUTAZIONE DEL RISCHIO, STRUMENTI DIAGNOSTICI DI CONTROLLO

Marzia De Giacomo, Roberta Onori, Carlo Brera

Reparto Organismi geneticamente modificati e xenobiotici di origine fungina

La presentazione ha preso in considerazione: la diffusione delle colture di Organismi Geneticamente Modificati (OGM) nel mondo, gli obiettivi della manipolazione genetica, la normativa, la valutazione della sicurezza d'uso e i metodi diagnostici.

La diffusione delle colture OGM nel mondo

Le biotecnologie applicate al mondo vegetale hanno come principale obiettivo lo sviluppo di piante geneticamente modificate (PGM) ottenute mediante l'inserzione, nel genoma della pianta nativa, di geni appartenenti ad altri organismi. Questi geni possono indurre o la produzione di proteine nei tessuti delle piante o il cambiamento del loro metabolismo in modo da acquisire nuove caratteristiche.

Negli ultimi anni il miglioramento delle caratteristiche agronomiche di PGM rispondenti alle più diverse necessità è stato considerevole.

La coltivazione di PGM è iniziata nel 1996 e da allora c'è stata una continua espansione passando da 1,7 milioni di ettari a 160 milioni di ettari nel 2011, con un tasso di crescita annuale dell'8%. I dati sulla diffusione delle colture OGM nel mondo sono raccolti e diffusi annualmente dall'*International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications* (ISAAA)(1).

Secondo questi dati, dei 29 paesi che nel 2011 hanno coltivato colture biotecnologiche, 19 sono paesi in via di sviluppo e 10 sono paesi industrializzati.

Sei paesi dell'Unione europea hanno piantato un totale di 114.490 ettari di mais Bt, pari al 26% in più rispetto al 2010 e altri due paesi hanno piantato la patata biotech "Amflora".

Le prospettive future fino al 2015 e quelle successive prevedono un aumento del numero di paesi coinvolti e in particolare: il rilascio del primo mais biotech tollerante alla siccità previsto per il 2013 in Nord America e in Africa attorno al 2017, il Golden Rice nelle Filippine nel 2013/14, il mais biotech in Cina, e successivamente il riso Bt.

Gli obiettivi della manipolazione genetica

I sostenitori delle piante transgeniche, in particolare le Società che hanno investito in questo settore, le considerano fonte di numerosi benefici per i consumatori, gli agricoltori e l'ambiente. L'interesse della politica industriale relativa all'agricoltura è quella di introdurre nelle piante delle caratteristiche utili agli agricoltori, come la resistenza agli insetti e ai virus o la tolleranza agli erbicidi. La costituzione di varietà transgeniche è diventata ormai una pratica consolidata per molte specie vegetali di interesse agrario, come il mais, la soia, la colza, il cotone, il tabacco e il pomodoro. Molti geni coinvolti nella risposta agli stress sono già stati identificati: si tratta di

sequenze di DNA che permettono la sintesi di antiossidanti, di enzimi che modificano i lipidi della membrana cellulare, di sostanze che proteggono le foglie dalla disidratazione, di proteine che mantengono l'equilibrio ionico, di proteine indotte da shock termico e di fattori di trascrizione che regolano vie metaboliche implicate nell'adattamento della pianta agli stress.

I caratteri che in anni recenti e in laboratori diversi sono stati trasferiti riguardano soprattutto le caratteristiche qualitative delle produzioni e il controllo del sistema riproduttivo della pianta, ovvero PGM di I generazione.

Le piante transgeniche di II generazione, che sono arrivate alla commercializzazione solo in alcuni paesi extraeuropei, prevedono colture con caratteristiche migliorate attraverso, ad esempio, la regolazione di intere vie metaboliche per aumentare l'efficienza nell'uso dell'azoto e dell'acqua, la resistenza agli stress fisici o l'inserimento di geni in grado di modificare il contenuto nutrizionale delle piante, e che vedono quindi più direttamente coinvolti anche l'industria alimentare e il consumatore. Il miglioramento delle qualità nutrizionali delle produzioni biotech ha riguardato prevalentemente la composizione in amminoacidi, lipidi e vitamine.

Si può individuare inoltre una categoria di piante transgeniche di III generazione non destinate all'alimentazione, che, anche cronologicamente, segue le due precedenti, e che prevede l'utilizzo di piante appositamente trasformate per sostituire forme tradizionali di produzione industriale, quali la produzione di composti di valore farmacologico (vaccini, componenti del sangue, vitamine, ormoni ed enzimi terapeutici), cosmetici, polimeri o loro precursori.

Recentemente l'organizzazione *The Institute for Prospective Technological Studies* (IPTS) del *Joint Research Center* (JRC) ha pubblicato uno studio che identifica gli elementi primari, i vantaggi, le prospettive e le sfide del *Plant Molecular Farming* focalizzando le considerazioni principalmente sulle attività intraprese in ambito europeo (2).

La normativa

Il rapido sviluppo delle biotecnologie nel settore agroalimentare è stato accompagnato da un altrettanto rapido adeguamento della normativa internazionale e comunitaria che regola la loro coltivazione e il loro uso in alimentazione umana e animale. Primaria attenzione è stata rivolta alla metodologia della valutazione della sicurezza d'uso nell'ottica sia di tutelare la sicurezza dell'ambiente che di garantire la salute del consumatore. Inoltre l'insieme delle normative emanate ha avuto anche l'obiettivo di regolamentare gli scambi commerciali e di fornire la corretta informazione al consumatore sull'eventuale presenza di OGM e derivati, al fine di garantire una scelta consapevole da parte dell'utente finale.

Nel nostro paese, la sicurezza delle attività che comportano l'utilizzo di materiale geneticamente modificato è garantita dall'operatività sia di Regolamenti Comunitari sia di Decreti Legislativi che recepiscono il contenuto di specifiche Direttive Europee. Queste direttive stabiliscono in particolare le misure e le norme procedurali da ottemperare per chiunque voglia manipolare, produrre in laboratorio, utilizzare o rilasciare nell'ambiente esterno microrganismi o organismi geneticamente modificati. Tutto ciò anche nella consapevolezza che le normative in questione rappresentano la base giuridica e la condizione essenziale attraverso la quale possa venire garantita e tutelata, tra le altre cose, la qualità del sistema agro-alimentare nazionale.

Uno degli aspetti più significativi della normativa è relativo all'obbligo di etichettatura degli OGM autorizzati all'immissione in commercio sancito dal Regolamento n. 1829/2003/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio. Tale obbligo non sussiste a percentuali di OGM < 0,9%

(relativo al singolo ingrediente alimentare o al singolo componente di un mangime) purché la sua presenza sia accidentale e/o tecnicamente inevitabile.

Il Regolamento n. 1830/2003/CE sancisce che gli OGM e i prodotti ottenuti da OGM devono poter essere rintracciati lungo tutte le fasi dell'immissione in commercio attraverso la catena di produzione e di distribuzione. Il Regolamento n. 1829/2003/CE prevede inoltre, fra numerose altre disposizioni, un'unica procedura centralizzata (principio *one-door-one-key*), che consiste in una singola autorizzazione per gli organismi geneticamente modificati e per gli alimenti geneticamente modificati destinati all'uomo e agli animali, basata su una valutazione complessiva del rischio (salute umana, animale, ambiente).

Le informazioni ufficiali aggiornate sullo stato delle notifiche sono disponibili all'indirizzo [//gmoinfo.jrc.ec.europa.eu/](http://gmoinfo.jrc.ec.europa.eu/) del JRC o, in una versione consultabile in italiano, sul sito [//bch.minambiente.it/IT/index.asp](http://bch.minambiente.it/IT/index.asp) della *Biosafety Clearing House* italiana (centro di scambio delle informazioni sulla biosicurezza istituito dal Protocollo di Cartagena).

Dal 1996, sono state concesse circa 670 approvazioni in 55 paesi per 144 eventi in 24 colture. Più di 90 nuovi eventi sono in fase avanzata di sviluppo, di autorizzazione o canale di commercializzazione e possono entrare nel mercato in un prossimo futuro (3).

Poiché le procedure di autorizzazione sono differenti nei diversi paesi, nuove colture GM non ottengono l'approvazione simultaneamente in tutti i paesi (approvazione asincrona). Poiché tracce di colture GM possono comparire in prodotti agricoli esportati in paesi dove queste varietà non sono ancora autorizzate, possono verificarsi dei respingimenti, con conseguenti notevoli perdite economiche e perturbazioni generali del commercio internazionale. Occasionalmente, eventi GM non autorizzati o sconosciuti (ad esempio derivanti da prove su campo) si possono inserire involontariamente nel cibo e nella catena alimentare, come successo per il mais Bt10 e il riso LLRice601 e Bt63.

La Commissione Europea, sulla base della valutazione scientifica – effetti sull'ambiente, sulla salute umana e animale – effettuata dall'autorità europea per la sicurezza alimentare (*European Food Safety Authority*, EFSA), proporrà quindi agli stati membri, nell'ambito di un comitato di regolamentazione, una decisione relativa all'autorizzazione all'immissione in commercio del prodotto. Tale decisione è adottata a maggioranza qualificata e le autorizzazioni sono valide per un periodo di dieci anni, eventualmente rinnovabili.

Un report su tutta la normativa europea a riguardo è stato pubblicato nel marzo del 2010 dal JRC (4).

La valutazione della sicurezza d'uso

I principi di base e le metodologie per la valutazione della sicurezza d'uso degli OGM sono stati, sin dagli anni '90, oggetto di studio da parte di organizzazioni internazionali e sopranazionali (OCSE, FAO, WHO) e di istituzioni scientifiche di molti paesi.

La valutazione si basa sul principio dell'equivalenza sostanziale. La prima fase di questo approccio è l'analisi delle caratteristiche molecolari, agronomiche morfologiche e relative alla composizione chimica dell'OGM basata sul confronto tra OGM e la sua controparte tradizionale coltivata nelle stesse condizioni agronomiche e ambientali.

L'analisi comparativa permette di identificare eventuali differenze tra la pianta OGM e non OGM, su cui basare la successiva valutazione. La valutazione può prevedere successive analisi nutrizionali e tossicologiche specifiche al fine di dimostrare che la pianta GM e i suoi prodotti derivati sono sicuri come la controparte tradizionale.

Particolare attenzione è posta nella valutazione della possibile allergenicità del prodotto. Sono attualmente in via di sviluppo approcci metodologici alternativi all'analisi dei singoli

costituenti dell'alimento basati su tecniche di genomica, proteomica e metabolomica utilizzate per effettuare il confronto tra l'OGM e la sua controparte tradizionale.

Il documento guida elaborato dall'EFSA, aggiornato al maggio del 2011, è disponibile all'indirizzo: www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2150.htm.

I metodi diagnostici

La necessità di monitorare e verificare la presenza e la quantità di OGM nelle colture agricole e nei prodotti derivati ha generato una richiesta di metodi di analisi in grado di rilevare, identificare e quantificare il DNA introdotto o la proteina espressa nelle piante transgeniche, poiché questi componenti sono in grado di permettere la caratterizzazione di un OGM nei prodotti destinati all'alimentazione umana e animale.

Le tecniche basate sul dosaggio delle proteine utilizzano generalmente tecniche immunologiche, in cui la rivelazione si basa sul principio immunologico di coniugazione tra un antigene (il target) e un anticorpo (la sonda specifica per l'antigene). Sono disponibili kit immunoenzimatici (ELISA) in micro piastra, *immuno-card* a sviluppo automatico o *lateral flow* e saggi *western blot*.

Il DNA può essere rilevato con diverse tecniche. La tecnica più comune è la reazione a catena della polimerasi (*Polymerase Chain Reaction*, PCR). La specificità di un metodo analitico basato sulla PCR dipende dal tipo di sequenza target individuata dai primer. In base alla specificità della sequenza si possono avere diverse tipologie di metodi (Figura 1).

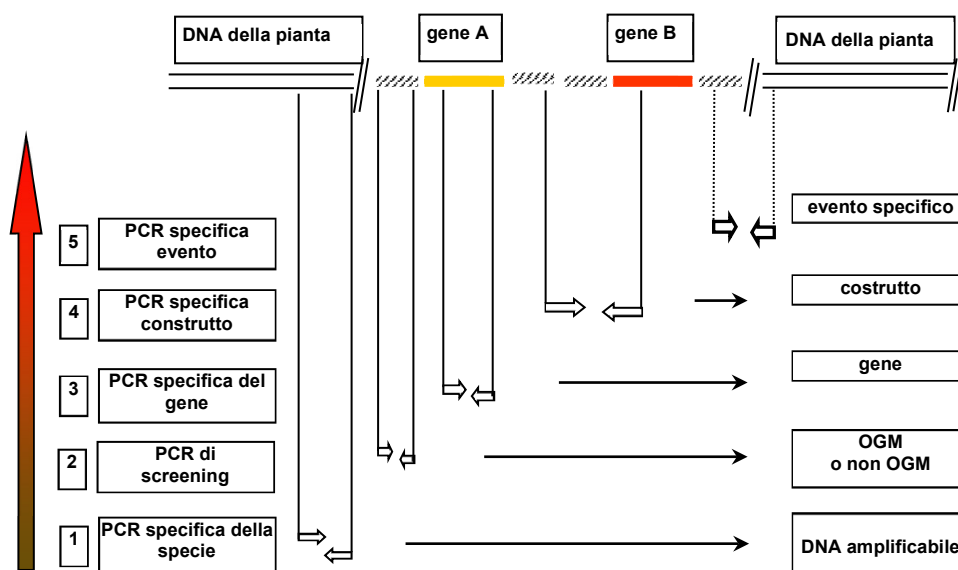


Figura 1. Livelli di specificità in base alle sequenze OGM

Accanto a queste tecniche diagnostiche più largamente utilizzate, molteplici sono gli studi condotti per la messa a punto di nuove applicazioni avanzate quali: elettroforesi 2-D, elettroforesi

capillare, separazioni multidimensionali in cromatografia di affinità, *protein chips*, *microarrays* a DNA e PNA, tecniche di spettrometria di massa MALDI-TOF-MS ed *electrospray*.

In Figura 2 è riportato lo schema delle fasi analitiche che seguono la fase di estrazione del DNA dal campione per la rivelazione e la quantificazione di un OGM ovvero:

- rilevazione: verifica se il campione presenta materiale GM;
- identificazione: determinazione dell'evento specifico presente (autorizzato/non autorizzato);
- quantificazione: determinazione in percentuale della concentrazione di ogni singolo evento GM (maggiore o minore della soglia di etichettatura prevista dal regolamento 1829/03).

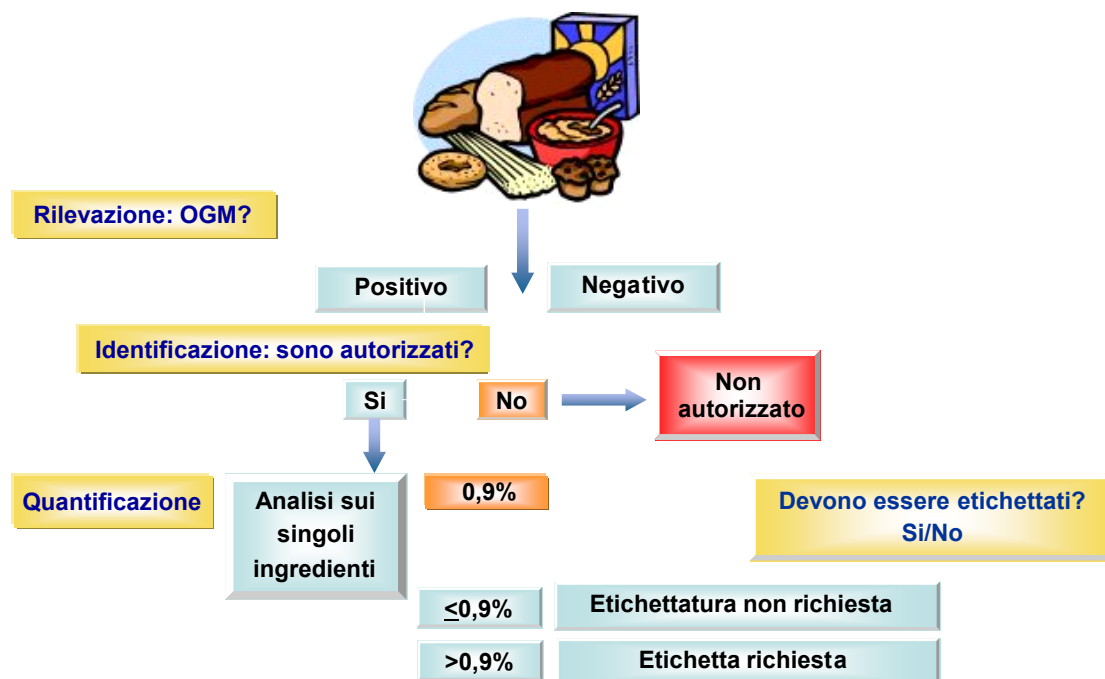


Figura 2. Fasi analitiche per l'analisi OGM: verifica autorizzazione evento e obbligo di etichettatura

Bibliografia

1. Clive J. *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011 – Executive Summary*. ISAAA Brief No. 43. ISAAA: Ithaca, NY, 2011. Disponibile all'indirizzo: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/43/executivesummary/default.asp>; ultima consultazione 28/12/2012
2. Spok A, Karner S. *Plant Molecular Farming – Opportunities and Challenges*. JRC Scientific and Technical Reports JRC 2008.
3. Stein AJ, Rodríguez-Cerezo E. International trade and the global pipeline of new GM crops. *Nat Biotechnol* 2010;28(1):23-5.
4. Plan D, Van den Eede G. *The EU Legislation on GMOs – An overview*. JRC Scientific and Technical Reports JRC 2010.

VALUTAZIONE DEL RISCHIO DEI NANOMATERIALI NEGLI ALIMENTI

Francesco Cubadda, Federica Aureli, Marilena D'Amato, Gabriele Moracci, Andrea Raggi
Reparto Tossicologia alimentare e veterinaria

Nanotecnologie e nanomateriali

Le nanotecnologie rappresentano una vasta area di ricerca e applicativa che coinvolge diversi ambiti disciplinari - fisica, chimica, biologia, ingegneria, elettronica - il cui tema comune risiede nella produzione e/o manipolazione di sostanze aventi dimensioni sulla nanoscala (nanomateriali). Come indicato dal prefisso “nano”, i nanomateriali appartengono all'ordine di grandezza del miliardesimo di metro (10^{-9} m), dimensioni che determinano la comparsa di nuove proprietà chimiche e fisiche, totalmente differenti da quelle presenti nella materia non nano-strutturata o convenzionale (*bulk materials*).

Il nanometro è usato nella misura di distanze su scala atomica e molecolare: l'atomo di carbonio ha un diametro $\sim 0,15$ nm, quello di oro ha un diametro $\sim 0,3$ nm, la lunghezza di un legame chimico covalente è tipicamente di $0,1\div 0,3$ nm, le celle elementari dei cristalli hanno lunghezze dell'ordine di 1 nm, la doppia elica del DNA ha un diametro ~ 2 nm. Le molecole di fullerene, un allotropo molecolare del carbonio scoperto nel 1985, assumono una forma simile a una sfera cava e il più piccolo e diffuso fullerene - un C60 - ha un diametro di circa 7 angstroms (0,7 nm), cioè circa 10 volte un atomo di C. Un nanotubo di carbonio *single-walled* polimerizzato (P-SWNT) è una sostanza composta di fullereni polimerizzati. I nanotubi di carbonio hanno elevata resistenza meccanica: un nanotubo ideale avrebbe una resistenza alla trazione 100 volte più grande di quella di una barretta d'acciaio ma con un peso 6 volte minore; si tratta del materiale organico più resistente. Le applicazioni di questi specifici nanomateriali risiedono nella produzione di materiali e resine speciali, ma si prevede molto altro anche in ragione della conducibilità termica e delle altre proprietà che possiedono.

Per meglio comprendere la scala dimensionale nanometrica è utile il confronto con altri materiali o organismi che appartengono al “molto piccolo”. Il particolato nei gas di scarico di un motore a gasolio dà luogo all'emissione di polveri fini (questa la dicitura usata, intendendo PM_{2,5}). L'identificativo formale delle dimensioni è il *Particulate Matter*, abbreviato in PM, seguito dal diametro aerodinamico massimo delle particelle. Ad esempio si parla di PM₁₀ per tutte le particelle con diametro inferiore a 10 μm (1 μm – micrometro o micron – è pari a 1000 nm), pertanto il PM_{2,5} è un sottoinsieme del PM₁₀. Il PM₁₀ è una polvere inalabile, ovvero in grado di penetrare nel tratto respiratorio superiore (naso e laringe), mentre il PM_{2,5} è una polvere toracica, cioè in grado di penetrare profondamente nei polmoni, specie durante la respirazione dalla bocca. Per dimensioni ancora inferiori (particolato ultrafine, UFP o UP) si parla di polvere respirabile, cioè in grado di penetrare profondamente nei polmoni fino agli alveoli; vi sono discordanze tra le fonti per quanto riguarda la loro definizione, per quanto sia più comune e accettata la definizione di UFP come PM_{0.1} (diametro aerodinamico massimo 100 nm). A dimensioni superiori troviamo le argille (allumino-silicati idrati appartenenti alla classe dei fillosilicati molto fini), le fibre di amianto, i virus, che vanno in genere da 20 a 450 nm (gli adenovirus sono ~ 80 nm); il diametro tipico di un batterio è di 1-10 μm .

È generalmente accettata nelle nanosienze la definizione di nanomateriale come un materiale con una o più dimensioni comprese nell'ordine dei 100 nm (1, 2). Quest'ultimo non rappresenta un

cut-off esatto per la comparsa di proprietà collegate alla nanoscala (tale valore non esiste), ma definisce con la flessibilità necessaria l'ambito dimensionale di interesse. Va precisato che si parla di materiali nanostrutturati solo se le parti funzionali del materiale, quali le particelle costituenti, sono presenti in scala nanometrica; ad esempio, tutti i materiali sono composti da atomi con dimensioni nanometriche ma quello che ne fa dei nanomateriali è l'organizzazione di questi in una struttura nanometrica (una nanoparticella, un nanofoglietto, una nanofibra, un nanotubo).

Oggi si tende a ricondurre sotto il nome di nanomateriale sia le nanoparticelle che altre forme di materia nanostrutturata, indipendentemente dal fatto che siano di origine naturale o che siano prodotte dall'uomo. I nanomateriali prodotti intenzionalmente (*manufactured nanomaterials*) sono comunemente denominati anche come nanomateriali ingegnerizzati (*engineered nanomaterials*, ENM): i due termini tendono ad essere usati come sinonimi. Recentemente la Commissione Europea ha proposto la seguente definizione univoca di nanomateriale, da impiegarsi a fini normativi (3): *“Con «nanomateriale» s'intende un materiale naturale, derivato (*) o fabbricato contenente particelle allo stato libero, aggregato o agglomerato, e in cui, per almeno il 50 % delle particelle nella distribuzione dimensionale numerica, una o più dimensioni esterne siano comprese fra 1 nm e 100 nm”*. La raccomandazione definisce inoltre: *“Ai sensi del punto 2, «particella», «agglomerato» e «aggregato» sono così definiti: a) con il termine «particella» si intende una parte minuscola di materia con limiti fisici definiti; b) con il termine «agglomerato» si intende un insieme di particelle o aggregati con legami deboli in cui la superficie esterna risultante è simile alla somma delle superfici dei singoli componenti; c) con il termine «aggregato» si intende una particella composta da particelle fuse o fortemente legate fra loro”*. e precisa che *“In casi specifici e laddove le preoccupazioni per l'ambiente, la salute, la sicurezza e la competitività lo giustifichino, la soglia del 50 % della distribuzione dimensionale numerica può essere sostituita da una soglia compresa fra l'1 % e il 50 %”*.

Un'importante caratteristica della materia sulla nanoscala è la grande area superficiale con la presenza di un'elevata proporzione di atomi superficiali non coordinati, la quale influenza la reattività con la materia circostante e può determinare una maggiore capacità di attraversare le membrane biologiche. La grande reattività fa sì che raramente le particelle conservino la natura di primarie ma tendano ad agglomerarsi, (con legami deboli e reversibilità verso la struttura primaria) o aggregarsi (con legami forti), dando luogo alla cosiddetta struttura secondaria, normalmente meno reattiva.

La crescita delle nanotecnologie e la nanotossicologia

Nanoscienze e nanotecnologie sono considerate l'emblema dell'innovazione del ventunesimo secolo; per alcuni, una rivoluzione tecnologica che trainerà molti settori produttivi. Le ricadute potenziali sono effettivamente in tutti i settori industriali, con un giro d'affari già oggi di centinaia di miliardi di euro all'anno. Le applicazioni che catturano maggiore attenzione sono lo sviluppo di farmaci innovativi (ad esempio per il *targeted drug delivery*) e di sistemi intelligenti per la diagnostica. Tuttavia non vi è solo la biomedicina: cresce l'impiego anche nei prodotti di consumo. Il PEN (*Project on Emerging Nanotechnologies*) (4), il primo inventario online ad accesso libero sui prodotti nei quali l'impiego di nanotecnologie è dichiarato in etichetta, ha stimato che in media 200 nuovi articoli sono stati immessi sul mercato ogni anno fra il 2005 e il 2010. Il settore principale è quello della salute, del benessere e dei prodotti per la cura della persona (dai cosmetici alle creme solari), seguito da quello dei prodotti per la casa e il giardinaggio, da quello automobilistico e dal settore degli alimenti e delle bevande.

(*) NdA: accidentale (nella versione originale in lingua inglese: incidental)

Gli Stati Uniti sono ancora il primo produttore di beni contenenti nanomateriali, ma il divario con l'Europa si è ridotto negli ultimi anni. Il materiale utilizzato nel maggiore numero di prodotti è il nanoargento, seguito dai nanotubi di carbonio, dal titanio biossido, dalla silice, dallo zinco (anche come ossido) e dall'oro (vedi figure 1, 2, 4, 5 nel sito http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/analysis_draft; ultima consultazione 29/12/2012).

Lo sviluppo delle nanotecnologie offre delle opportunità e contemporaneamente presenta rischi potenziali che devono essere ben caratterizzati. Se lo sviluppo della nanomedicina schiude orizzonti fino a tempi recenti impensabili per la diagnosi e la terapia delle malattie, allo stesso tempo pone problemi stringenti di sicurezza. Inoltre, come si è visto, i materiali sulla nanoscala sono già presenti nei prodotti di consumo e la loro dispersione nell'ambiente determinerà un aumento dell'esposizione umana nel caso in cui vi è persistenza nei comparti ambientali e mobilità nei cicli di trasferimento tra essi. A livello europeo, il fatto che non esistano inventari dei prodotti, regole per l'etichettatura e controlli ufficiali allarma i consumatori. Alcuni sondaggi hanno mostrato che non vi è contrarietà di principio a determinate applicazioni, mentre viene richiesta maggiore cautela per l'utilizzo in altri settori, *in primis* quello alimentare, specialmente se non vi è un chiaro obiettivo di tutela/miglioramento dello stato di salute. Dal punto di vista strettamente scientifico, il fatto che i nanomateriali siano caratterizzati da nuove proprietà chimiche e fisiche i cui effetti sulla salute umana sono ancora incerti pone l'esigenza di sviluppare la ricerca tossicologica in questo settore. Tuttavia la nanotossicologia è una scienza giovane che deve affrontare molti problemi nuovi. Per esempio, il fatto che una volta introdotta nell'organismo la materia nanostrutturata interagisca immediatamente con elementi chimici e biomolecole, interazione che è particolarmente importante nel caso delle proteine (effetto corona).

In altre parole, l'elevata reattività dell'oggetto di studio pone il problema di una continua trasformazione dello stesso, della sua struttura primaria e secondaria, delle modalità di trasferimento attraverso le membrane biologiche e di interazione con i potenziali target molecolari e quindi in ultima analisi dei suoi effetti biologici. La stessa dispersione di un nanomateriale in una sospensione da destinare al testing tossicologico (non si parla di soluzione, trattandosi di norma di materiali insolubili o limitatamente solubili) non è un fatto ovvio e richiede lo sviluppo di un protocollo adeguato e di un parallelo lavoro di caratterizzazione, che diffonda informazioni attendibili sulla forma in cui il materiale si presenta in sospensione (ad esempio diametro medio delle particelle, grado di agglomerazione/aggregazione, carica superficiale, ecc.).

Esposizione a nanomateriali attraverso la dieta

L'esposizione a nanomateriali attraverso la dieta può avvenire come risultato di scenari diversi. Particelle nel range dimensionale "nano", di origine sia antropogenica sia naturale, possono fare ingresso come contaminanti a vari livelli della catena alimentare. Ad esempio, processi di combustione sia naturali (vulcanismo) che antropici (inceneritori) possono generare grandi quantità di nanoparticelle. Inoltre, fra le applicazioni potenziali delle nanoscienze e delle nanotecnologie al settore agroalimentare vi è anche la sintesi di composti agrochimici (fertilizzanti, fitofarmaci) e farmaci veterinari, che potrebbero residuare nell'alimento. Uno scenario diverso è rappresentato dall'uso intenzionale di ENM per la fabbricazione di "contenitori intelligenti" e altri materiali a contatto con gli alimenti – in questo caso il problema è valutare se vi è migrazione nell'alimento – oppure direttamente incorporati nell'alimento per conseguire un determinato scopo tecnologico o per usi diversi

quale quello nutrizionale (ad esempio l'aumento della biodisponibilità di un nutriente). Esempi sono l'impiego del nano-Ag con funzione antimicrobica o della nano-SiO₂ per influenzare la consistenza dei prodotti alimentari. Infine, caso ancora diverso dai precedenti, vi può essere esposizione a nanomateriali perché alcuni additivi alimentari autorizzati (E551, E171) contengono una frazione in nano-forma in virtù del loro processo di produzione. Tutti questi diversi scenari si possono combinare dando luogo a scenari di esposizione complessi.

Una volta ingeriti, se sopravvivono alle trasformazioni indotte dal processo digestivo, i nanomateriali raggiungono la parete intestinale e vengono trasportati attraverso di essa mediante diffusione nel muco che ricopre il lume intestinale, contatto con enterociti e cellule M, trasporto transcellulare e paracellulare e i successivi eventi post-translocazione. Il trasporto paracellulare in normali condizioni fisiologiche è assai ridotto perché le giunzioni strette hanno diametro 0,3-1,0 nm, mentre la transcitosi negli enterociti appare essere il meccanismo normale e prevalente. Il trasporto attraverso l'epitelio intestinale dei nanomateriali dipende da una varietà di fattori quali dimensioni, carica superficiale, lipofilità/idrofilità del nanomateriale, e poi presenza/assenza di ligandi, fisiologia del tratto intestinale, ecc. Le particelle di dimensioni minori sono normalmente assorbite più velocemente (e le nano più delle micro). La distribuzione sistemica vede fegato e milza quali organi principali di bioaccumulo, tuttavia ENM somministrati per via orale in animali da laboratorio sono stati ritrovati in numerosi organi interni, a partire da rene e polmoni, e grande attenzione desta l'eventuale passaggio attraverso la barriera ematoencefalica e quella placentare.

L'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (*European Food Safety Authority*, EFSA) nel 2008 ha valutato i primi dossier relativi a ENM di impiego alimentare. In particolare, il panel CEF (*Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids*) ha espresso parere favorevole all'uso di nitrato di titanio quale additivo in bottiglie di PET in quanto non vi è migrazione del nanomateriale nella bevanda contenuta. Una successiva richiesta relativa al nano-Ag per impiego diretto negli alimenti è stata invece negata dal panel ANS (*Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food*) per l'assenza di informazioni che consentissero di valutare la biodisponibilità e la tossicità dell'ENM proposto. Subito dopo, nel marzo del 2009, l'EFSA ha prodotto la sua prima opinione scientifica sulle nanoscienze e nanotecnologie (5), mentre un gruppo congiunto FAO/OMS ha prodotto un analogo documento l'anno successivo (6). Successivamente l'EFSA ha costituito lo *Scientific Network for Risk Assessment of Nanotechnologies in Food and Feed*, riunitosi per la prima volta nel febbraio 2011 (7), quale forum di discussione e trasferimento di informazioni fra esperti EFSA e dei paesi membri. Nell'aprile 2011 l'EFSA ha infine prodotto le prime linee guida per la valutazione del rischio di ENM in alimenti e mangimi (8).

Un aspetto importante richiamato dall'EFSA in queste linee guida è l'effetto della digestione gastrointestinale (GI) sugli ENM. Una peculiarità dell'esposizione orale è infatti che il nanomateriale può subire complesse trasformazioni durante il transito GI e che la digestione GI può degradare/dissolvere il nanomateriale trasformandolo nella non-nano-forma corrispondente. Tale trasformazione può essere completa, parziale o nulla (l'ENM rimane intatto), così come è possibile che si formino nanoparticelle con nuove proprietà. In ogni caso vi è una forte perturbazione dello stato dell'ENM rispetto a quello nell'alimento (ad esempio in relazione alla formazione di aggregati, alla carica superficiale) con effetti imprevedibili sull'assorbimento e sulla potenziale tossicità. L'albero decisionale per il *toxicological testing* conseguente alle diverse evenienze è mostrato in Figura 5, dove sono

indicati anche i test *in vitro* e *in vivo* raccomandati nel caso in cui l'ENM permanga in nanoforma.

Come si desume da quanto sopra esposto, la valutazione del rischio dei nanomateriali negli alimenti ha appena mosso i suoi primi passi e ne consegue un ritardo nella gestione del rischio che è anche ritardo normativo. Oggi a livello europeo solo il Regolamento CE 1333/2008 prevede esplicitamente una distinzione rispetto ai *bulk materials* stabilendo una rivalutazione degli additivi autorizzati qualora siano utilizzate le nanotecnologie per la loro produzione.

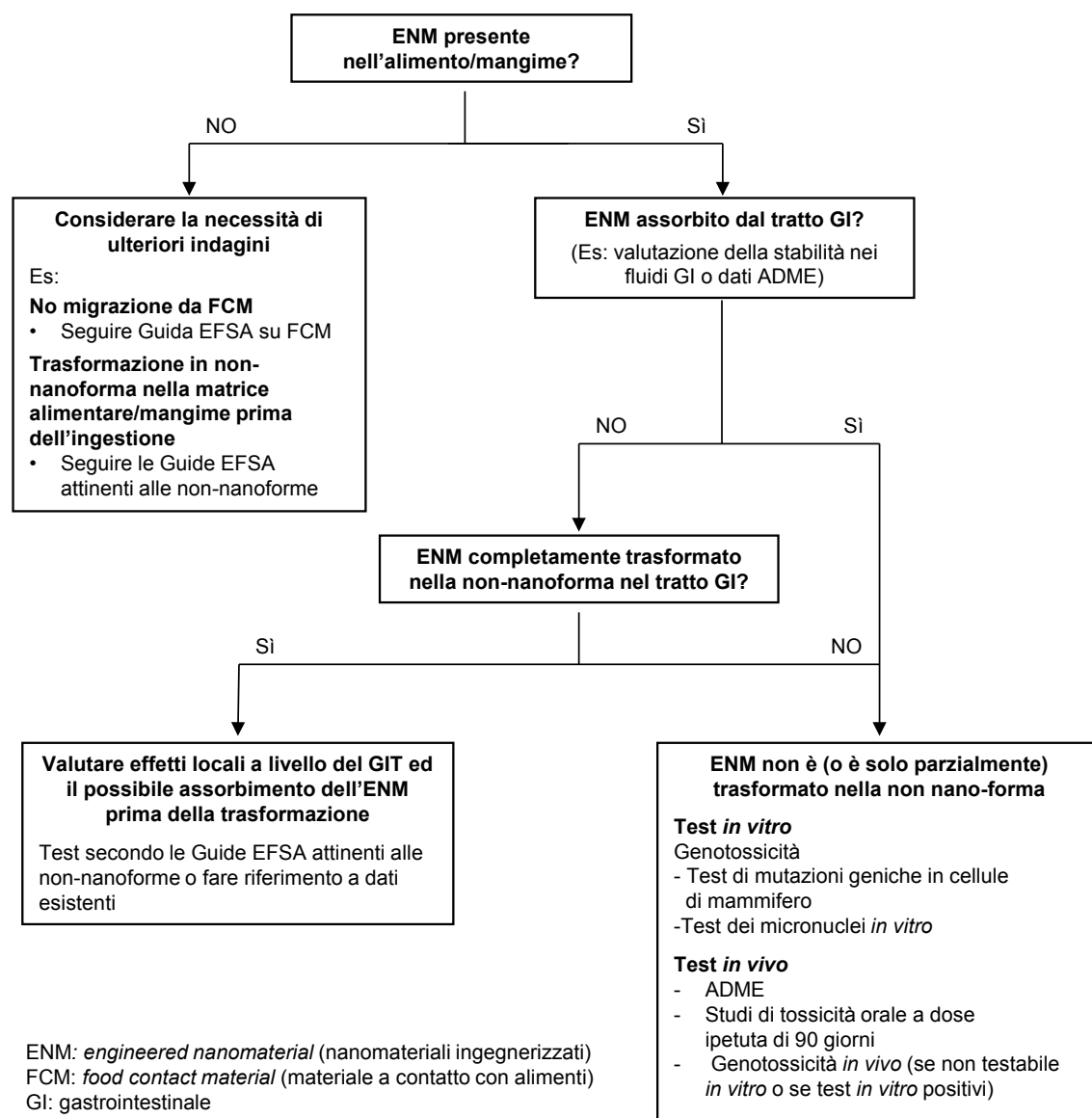


Figura 5. Albero decisionale per il *toxicological testing*

Evidenze circa gli effetti dell'esposizione orale e criticità degli studi esistenti

Gli studi *in vitro* e *in vivo* concernenti la tossicità orale non sono molto numerosi e riguardano prevalentemente ENM inorganici (iENM), quali metalli o loro ossidi (Cu, Zn, ZnO, TiO₂, Ag) e la nano-SiO₂. Questi studi hanno evidenziato una varietà di effetti potenziali, ad esempio tossicità a carico di diversi organi e sistemi nell'animale da esperimento, con processi degenerativi o infiammatori principalmente su reni e fegato, visibili sia a livello macroscopico che microscopico. Gli studi *in vitro* segnalano induzione di stress ossidativo e possibili effetti genotossici e infiammatori. Il quadro complessivo che ne emerge è che gli effetti sono particella-specifici e non appare esservi alcuna singola metrica (ad esempio concentrazione, numero di particelle, area superficiale) che possa consentire di derivare conclusioni sulla tossicità partendo dalle caratteristiche fisico-chimiche dell'ENM. L'aspetto più importante è tuttavia che la maggioranza degli studi disponibili presenta limitazioni importanti, quali:

- una caratterizzazione insufficiente degli ENM somministrati (raramente i parametri salienti sono misurati, si veda la Figura 6 per un elenco completo);
- l'uso di dosi irrealisticamente elevate, con potenziale diminuzione della biodisponibilità e tossicità a seguito di fenomeni di agglomerazione/aggregazione;
- la generale assenza di un riferimento interno alla sostanza bulk e a un materiale sulla micro-scala;
- il fatto che la predittività test *in vitro* non testata *vs. in vivo* (specialmente per la genotossicità).

Inoltre vi è una carenza di studi *in vivo* di dose ripetuta e in particolare di tossicità (sub)cronica.

Il progetto europeo NANOGENOTOX (*Joint Action on Safety evaluation of manufactured nanomaterials by characterisation of their potential genotoxic hazard*) (9), al quale l'Istituto Superiore di Sanità partecipa attraverso gli autori di questo contributo, ha affrontato alcune di queste criticità al fine di conseguire risultati trasferibili in termini di valutazione e gestione del rischio genotossico di ENM.

In breve, sono stati sottoposti ad indagine ENM impiegati in prodotti di largo consumo (SiO₂, TiO₂, CNT), forniti in contenitori monouso standardizzati dall'*Institute for Health and Consumer Protection* (IHCP) dell'*European Commission's Joint Research Centre* (EC JRC) di Ispra, e tali ENM sono stati oggetto di una caratterizzazione esaustiva. È stato sviluppato un protocollo di dispersione *ad hoc*, studiata la tossicocinetica per le vie endovenosa e orale e sulla base di tutti i dati raccolti, condotto lo studio di genotossicità, impiegando un approccio combinato *in vivo-in vitro*. Fra i suoi obiettivi il progetto ha lo scopo di verificare la possibilità di validare test alternativi (*in vitro*) per lo screening della genotossicità di ENM. Un altro aspetto importante è che lo studio della genotossicità *in vivo* include anche l'esposizione per via orale.

Parametro	Requisito	Descrizione
Composizione chimica/ identità	Essenziale	Informazioni sulla composizione chimica dell'ENM - inclusi purezza, natura delle impurezze, rivestimenti o gruppi superficiali, materiali incapsulanti, sostanze chimiche da processo, agenti disperdenti, e/o altri formulanti ad es. stabilizzanti
Dimensione delle particelle (primarie/ secondarie)	Essenziale (due metodi, uno dei quali microscopia elettronica)	Informazioni sulla dimensione delle particelle primarie, intervallo dimensionale e distribuzione dimensionale numerica (indicando le variazioni da lotto a lotto, se presenti). La stessa informazione sarebbe necessaria per le particelle secondarie (es. agglomerati ed aggregati), se presenti
Forma fisica e morfologia	Essenziale	Informazioni sulla forma fisica e sulla fase/forma cristallina. L'informazione dovrebbe indicare se l'ENM è presente in forma di particella, tubo, barra, se in forma amorfa o cristallina e se è in forma di particolato libero o in stato agglomerato/aggregato, così come se la preparazione è in forma di polvere, soluzione, sospensione o dispersione
Concentrazione di massa e particellare	Essenziale per dispersioni e polveri	Informazioni sulla concentrazione in termini di numero di particelle e massa delle particelle per volume, in dispersioni, e per massa, in polveri
Area superficiale specifica	Essenziale per polveri	Informazioni sull'area superficiale specifica dell'ENM
Chimica superficiale	Essenziale per ENM con modificazioni superficiali	Informazioni sulla superficie dell'ENM-comprese tutte le modificazioni chimiche/biochimiche che possono modificare la reattività di superficie o aggiungere una nuova funzionalità
Carica superficiale	Essenziale	Informazioni sul potenziale zeta dell'ENM
Potenziale redox	Essenziale per ENM inorganici	Informazioni sul potenziale redox. Le condizioni utilizzate per la misura del potenziale redox dovranno essere documentate
Solubilità e proprietà di ripartizione ^a	Essenziale	Informazioni sulla solubilità dell'ENM in solventi rilevanti e sulla ripartizione tra fase acquosa ed organica (es. come log Kow se appropriato)
pH	Essenziale per dispersioni liquide	pH di sospensioni liquide
Viscosità	Essenziale per dispersioni liquide	Informazioni sulla viscosità di dispersioni liquide
Densità e densità al versamento	Essenziale per materiali granulari	Informazioni sulla densità/porosità di un ENM non formulato e densità al versamento
Dustiness	Essenziale per polveri	Informazioni sulla polverosità di prodotti in polvere - come spezie, surrogati del latte e zuppe in polvere
Reattività chimica/attività catalitica ^b	Essenziale	Informazione sulla attività chimica e attività catalitica rilevanti dell'ENM e di ogni rivestimento superficiale dell'ENM
Attività fotocatalitica	Essenziale per materiali fotocatalitici	Informazioni sull'attività fotocatalitica di materiali rilevanti utilizzati come imballaggio di alimenti, rivestimenti, inchiostri per la stampa, reazioni interne

a) Dispersioni, soluzioni: un ENM insolubile introdotto in un liquido forma una dispersione dove il liquido e l'ENM coesistono. In una vera soluzione l'ENM è disciolto (e quindi non presente) (cfr. OECD ENV/JM/MONO(2010)25)

b) Se un nanomateriale ha proprietà catalitiche, può catalizzare reazioni redox ovvero ogni altra reazione che può propagarsi e risultare in una risposta biologica molto più accentuata, anche con quantità molto piccole dell'ENM attivo come catalizzatore. Quindi, in confronto a reazioni biochimiche che esauriscono tutto il substrato, i centri reattivi di ENM possono perpetuare reazioni catalitiche

Figura 6. Parametri per la caratterizzazione degli ENM

Determinazione di nanomateriali negli alimenti e in campioni biologici

L'impostazione del progetto NANOGENOTOX sopra descritta ha comportato, fra l'altro, lo sviluppo di approcci idonei all'identificazione e caratterizzazione degli ENM oggetto di indagine non solo allo stato primitivo, ma anche nelle condizioni e alle concentrazioni reali di impiego/presenza nei veicoli per la sperimentazione tossicologica e nei tessuti e fluidi biologici.

In questo contesto, il nostro gruppo di lavoro – coinvolto negli studi di tossicocinetica di due diversi ENM composti da nanosilice – ha individuato soluzioni originali che hanno consentito di superare le difficoltà analitiche poste dallo studio della nano-silice utilizzando l'ICP-MS quale *detector* atomico per la determinazione del silicio (Si) come elemento totale. Un primo problema nasce dal fatto che la biodistribuzione e l'accumulo degli ENM sono stati valutati determinando le concentrazioni di Si in tessuti e fluidi biologici. Tuttavia il Si è un elemento difficile da determinare e la misura diventa di difficoltà proibitiva se si usa la tecnica generalmente adottata negli studi di tossicocinetica di ENM per la sua alta produttività, l'ICP-MS quadrupolare.

I problemi analitici connessi all'uso dell'ICP-MS sono stati superati sviluppando un metodo *ad hoc* dove le interferenze spettrali sulla massa analitica del Si sono state rimosse mediante idonee reazioni ione-molecola nella cella di reazione dinamica (*Dynamic Reaction Cell*, DRC). Data l'assenza di materiali certificati, l'accuratezza nella determinazione del Si è stata verificata mediante la preparazione *in house* di un materiale QC (*Quality Control*), poi caratterizzato utilizzando il metodo analitico sviluppato e due altre tecniche analitiche indipendenti. Inoltre l'impiego dell'ICP-DRC-MS in *time resolved mode*, una particolare modalità di acquisizione del segnale, ha consentito di sviluppare un utile metodo per lo screening dell'agglomerazione degli ENM dopo la loro dispersione (10). I risultati ottenuti sono stati confrontati con l'analisi in microscopia elettronica (*Scanning Electron Microscopy*, SEM; *Transmission Electron Microscopy*, TEM), la tecnica di riferimento per la caratterizzazione dimensionale dei nanomateriali.

L'analisi in *time resolved mode* è di particolare interesse per la caratterizzazione di ENM inorganici; quando applicata a dispersioni estremamente diluite prende il nome di *single particle* ICP-MS (sp-ICP-MS). Questa modalità analitica ha la potenzialità di determinare la concentrazione numerica di un nanomateriale inorganico e quindi risulta idonea alla verifica della natura 'nano' di un materiale secondo la definizione della Commissione Europea discussa in precedenza, avendo in più il vantaggio (connesso alla tecnica ICP-MS) di dare informazioni sull'elemento caratterizzante il materiale (ad esempio Ag, Au, Cu, Si, Ti, Zn). Le potenzialità dell'ICP-MS vanno tuttavia perfino oltre, in quanto la combinazione *on-line* con la *Field-Flow Fractionation* (FFF) e detector quali il *Dynamic Light Scattering* (DLS) e il *Multi Angle Light Scattering* (MALS) consente lo sviluppo di piattaforme analitiche (ad esempio FFF-MALS-ICP-MS) in grado di separare i nanomateriali inorganici sulla base delle dimensioni e determinarne la composizione elementare su intervalli di concentrazione ampi.

Nonostante la disponibilità di queste tecniche estremamente avanzate per la caratterizzazione, va detto che la determinazione di un nanomateriale in alimenti o in campioni biologici rimane tuttavia assai problematica per le difficoltà analitiche connesse all'estrazione dello stesso dalla matrice e ai pericoli legati alla creazione di artefatti per l'elevata reattività della struttura primaria.

Sebbene molto rimanga da fare in questo campo, alcuni approcci emersi in tempi recenti fanno prevedere che l'identificazione e caratterizzazione di un nanomateriale in matrici biologiche non rimarrà un problema analitico di difficoltà insormontabile. Di questo beneficerà

la ricerca tossicologica da un lato (determinazione in organi, tessuti e fluidi biologici) e la valutazione dell'esposizione dall'altro (determinazione negli alimenti) e quindi globalmente la valutazione del rischio. Inoltre, la futura normativa sugli ENM disporrà degli strumenti necessari per il controllo ufficiale e quindi per una compiuta applicazione.

Bibliografia

1. ISO/TS 27687:2008. *Nanotechnologies - Terminology and definitions for nano-objects - Nanoparticle, nanofibre and nanoplate*. Geneva. International Organization for Standardization; 2008.
2. SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks). *Opinion on the Scientific Basis for the Definition of the Term "nanomaterial"*. EU Directorate General for Health & Consumers. 8 December 2010.
3. Europa. 2011/696/UE. *Raccomandazione della Commissione, del 18 ottobre 2011, sulla definizione di nanomateriale*. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L275/38 del 20 ottobre 2011.
4. PEN. *The Project on Emerging Nanotechnologies*. Disponibile all'indirizzo: www.nanotechproject.org/; ultima consultazione 29/12/2012.
5. EFSA. Scientific Opinion of the Scientific Committee on a request from the European Commission on the Potential Risks Arising from Nanoscience and Nanotechnologies on Food and Feed Safety. *The EFSA Journal* 2009;958:1-39.
6. FAO/WHO. *FAO/WHO Expert Meeting on the Application of Nanotechnologies in the Food and Agriculture Sectors: Potential Food Safety Implications: Meeting Report*. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Rome, 2010. Disponibile all'indirizzo: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241563932_eng.pdf; ultima consultazione 29/12/2012.
7. EFSA. Technical Report. EFSA Scientific Network for Risk Assessment of Nanotechnologies in Food and Feed. *Supporting Publications* 2012;EN-246:1-10.
8. EFSA Scientific Committee. Scientific Opinion on Guidance on risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain. *EFSA Journal* 2011;9(5):2140-76.
9. NANOGENOTOX Joint Action. *Safety evaluation of manufactured nanomaterials by characterisation of their potential genotoxic hazard*. Disponibile all'indirizzo: http://www.nanogenotox.eu/index.php?option=com_content&view=article&id=85&Itemid=54; ultima consultazione 29/12/2012.
10. Aureli F, D'Amato M, De Berardis B, Raggi A, Turco AC, Cubadda F. Investigating agglomeration and dissolution of silica nanoparticles in aqueous suspensions by dynamic reaction cell inductively coupled plasma-mass spectrometry in time resolved mode. *J Anal At Spectrom* 2012;27(9):1540-8.