

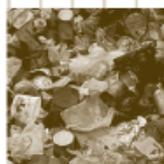


Rapporti ISTISAN

10/34



**Seminari del Dipartimento di Ambiente
e Connessa Prevenzione Primaria
2008-2009**



ISSN 1123-3117

A cura di S. Cacioli

www.iss.it

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Seminari del Dipartimento di Ambiente
e Connessa Prevenzione Primaria
2008-2009**

A cura di Silvana Cacioli

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

10/34

Istituto Superiore di Sanità

Seminari del Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria 2008-2009.

A cura di Silvana Caciolli

2010, 100 p. Rapporti ISTISAN 10/34

Il Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria dell'Istituto Superiore di Sanità, in un'ottica di promozione e informazione delle attività svolte in ambito dipartimentale e di sviluppo delle risorse umane, ha organizzato, tra la fine del 2008 e il 2009, un ciclo di seminari a cadenza mensile in cui sono state illustrate numerose attività svolte dai Reparti che costituiscono il Dipartimento. In ogni seminario sono state presentate due relazioni, ciascuna seguita da ampi spazi dedicati alla discussione e allo scambio di idee. In questo rapporto sono stati raccolti alcuni degli interventi che testimoniano la competenza, la professionalità e l'impegno del personale che, partecipando in modo entusiasta e propositivo, ha reso possibile la realizzazione di un'interessante iniziativa. Un particolare riconoscimento deve essere infine espresso ai collaboratori più giovani che hanno il merito di aver presentato le relazioni e i contributi che compongono questo volume.

Parole chiave: Qualità ambientale; Epidemiologia; Tutela della salute

Istituto Superiore di Sanità

Seminars of the Department of Environment and Primary Prevention 2008-2009.

Edited by Silvana Caciolli

2010, 100 p. Rapporti ISTISAN 10/34 (in Italian)

The Department of the Environment and Primary Prevention of the Italian National Institute of Health, with a view to promote and inform on its activities and to develop its human resources, has organized, between 2008 and 2009, a series of monthly seminars which have illustrated the numerous activities performed by its units. Each workshop presented two lectures and ample discussion sessions dedicated to the exchange of ideas and experiences. This report collects some of the contributions which testify the capability, professionalism and the commitment shown by the staff that, participating in an enthusiastic and active way, has made possible the realization of an interesting project. Special acknowledgment must be expressed to the younger collaborators who have the merit to have presented the reports and contributions which constitute this volume.

Key words: Environmental quality; Epidemiology; Health protection

Per informazioni su questo documento scrivere a: silvana.caciolli@iss.it.

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Caciolli S. (Ed.). *Seminari del Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria 2008-2009*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2010. (Rapporti ISTISAN 10/34).

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2010

INDICE

Relazioni struttura-attività nello studio della cancerogenesi chimica <i>Cecilia Bossa</i>	1
La predittività del modello cellulare Caco-2/tc7 per stimare l'assorbimento intestinale nell'uomo dopo esposizione orale <i>Laura Turco, Tiziana Catone, Emma Di Consiglio</i>	7
L'epidemiologia molecolare come strumento di studio dei meccanismi molecolari di cancerogenesi: l'esempio del cancro gastrico <i>Valeria Simonelli</i>	14
Interazione genotipo-ambiente: esposizione, variabilità individuale e instabilità cromosomica <i>Francesca Marcon</i>	18
L'impatto sulla salute del ciclo dei rifiuti in Campania: l'indagine epidemiologica <i>Lucia Fazzo</i>	22
Migrazione di plastificanti in alimenti omogeneizzati per prima infanzia <i>Cinzia Gesumundo, Silvia Giamberardini</i>	30
Valutazione del rischio cronico e acuto per i residui dei prodotti fitosanitari in matrici vegetali <i>Angela Santilio</i>	38
Uova e diossine: un problema ambientale? <i>Stefania Paola De Filippis</i>	46
Ecologia dei corsi d'acqua in ambiente urbano: il caso di Roma <i>Simone Ciadamidaro</i>	52
Valutazione dell'esposizione alimentare a contaminanti organici alogenati: PFOS e PFOA <i>Elena Dellatte</i>	61
La formazione di metaboliti tossici dei pesticidi organofosforotoniati nell'uomo e implicazione per la suscettibilità individuale <i>Franca Maria Buratti</i>	69
Antibiotico resistenza e peptidi antimicrobici <i>Stefania Marcheggiani</i>	80
Esposizione a metalli pesanti derivanti dal contatto di acque destinate al consumo umano con le reti nazionali di distribuzione <i>Enrico Veschetti</i>	88
Identificazione del rischio associato all'insorgenza dei tumori di tipo familiare: ruolo dei modelli sperimentali <i>Maria Teresa Russo</i>	95

RELAZIONI STRUTTURA-ATTIVITÀ NELLO STUDIO DELLA CANCEROGENESI CHIMICA

Cecilia Bossa
Reparto di Cancerogenesi Sperimentale e Computazionale

Riassunto

Il campo della cancerogenesi chimica ha visto una lunga serie di tentativi di creare modelli alternativi a quelli animali, dai saggi a breve termine di mutagenesi ai modelli teorici. Un posto particolare tra quelli teorici hanno i modelli basati sulle relazioni struttura-attività. Nella sua versione qualitativa, tale approccio ha portato alla identificazione di una varietà di sottostrutture, o gruppi funzionali legati all'induzione di mutazioni e/o cancro. Approcci più sofisticati sono le relazioni quantitative struttura-attività, che legano le proprietà tossicologiche delle molecole alle loro proprietà chimico fisiche o strutturali. Sia l'approccio qualitativo che quello quantitativo forniscono un valido contributo alla stima del rischio delle sostanze chimiche, soprattutto nella fase dell'identificazione di priorità.

Introduzione

Sotto l'acronimo (Q)SAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*), si annoverano quei metodi che studiano le relazioni, qualitative o quantitative, tra le proprietà chimiche di una sostanza e la sua attività biologica. Il concetto e l'uso delle relazioni struttura-attività è diffuso nel campo della tossicologia già negli anni '80. Il riconoscimento che effetti tossici possono essere generati dall'interazione di un agente chimico con una o più biomolecole, ha portato la conoscenza della struttura o delle proprietà chimico-fisiche di una sostanza ad assumere un ruolo determinante nella comprensione della sua attività biologica.

In quest'ottica i metodi SAR, sia nel loro approccio qualitativo che quantitativo, forniscono un valido contributo per la valutazione del rischio posto da sostanze chimiche esistenti o di nuova produzione, assicurando una maggior convenienza in termini di risparmio di tempo e di costi e di benessere animale.

Negli ultimi anni, l'uso di modelli predittivi alternativi ai test sperimentali sugli animali, ha avuto un grande incremento in ambito regolatorio. Per esempio, nel nuovo sistema REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemical substances*) per la registrazione, valutazione e autorizzazione delle sostanze chimiche nell'Unione Europea, viene promosso l'uso di questi metodi, tra cui QSAR, per la predizione di proprietà chimico-fisiche e tossicologiche delle sostanze chimiche. La cancerogenesi chimica è tra le proprietà tossicologiche che richiedono la più alta attenzione. Per questo motivo è stata bersaglio di numerosi tentativi per creare modelli predittivi, che vanno dai saggi biologici a breve termine (es. i test di mutagenesi) ai modelli teorici.

La Figura 2 mostra i risultati dell'applicazione delle SA di Ashby a tre banche di dati non commerciali: i) un database contenente i dati di mutagenesi in Salmonella (4337 sostanze) collezionati da Kazius (Kazius *et al.*, 2005) a partire dal database Toxnet (<http://toxnet.nlm.nih.gov/>); ii) il database ISSCAN (1153 sostanze), disponibile sul sito web dell'Istituto Superiore di Sanità (<http://www.iss.it/ampp/dati/cont.php?id=233&lang=1&tipo=7>); iii) il *Carcinogenic Potency database* (CPDB, 1547 sostanze), reperibile gratuitamente dal sito web DSSTox (<http://www.epa.gov/ncct/dsstox/index.html>). I database CPDB e ISSCAN riportano dati di mutagenesi in Salmonella e dati di cancerogenesi sui roditori, con un'ampia sovrapposizione delle sostanze in essi contenute. Nel grafico ROC (*Receiver Operating Characteristics*) viene riportata la percentuale dei veri positivi (sensibilità) sull'asse delle y, e la percentuale dei falsi positivi (1-specificità) sull'asse delle x. In un grafico ROC il risultato perfetto si colloca nell'angolo in alto a sinistra, mentre la diagonale rappresenta risultati casuali (Provost & Fawcett, 2001).

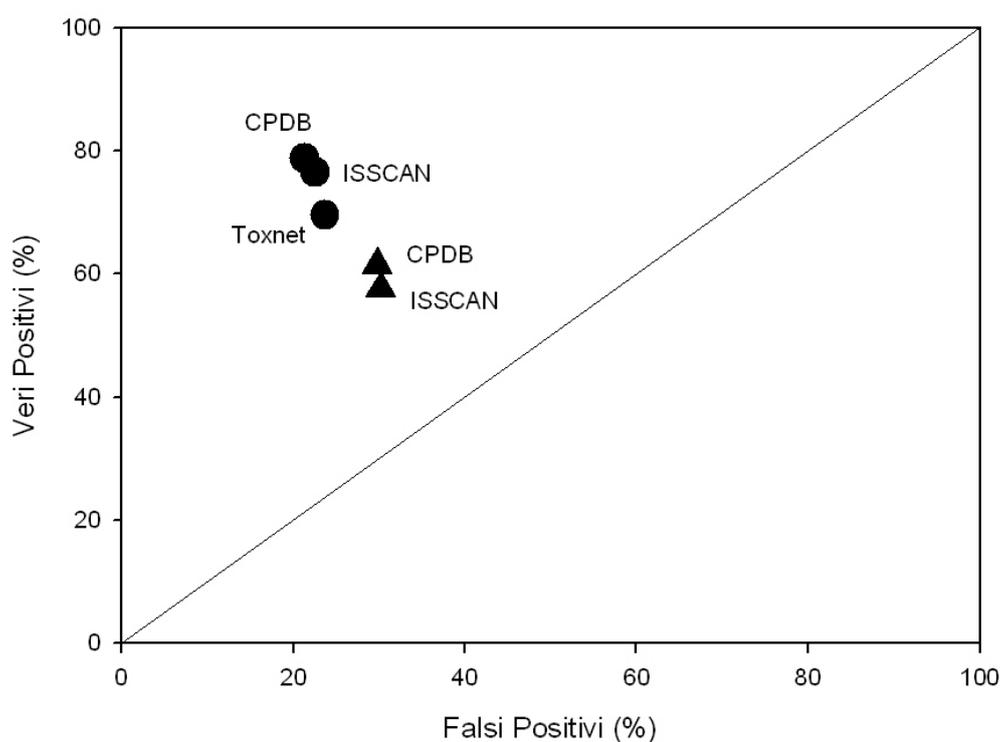


Figura 2. Accordo tra le Allerte Strutturali di Ashby e i dati di mutagenesi e cancerogenesi in vari database. Cerchi: mutagenesi; triangoli: cancerogenesi

Complessivamente l'accuratezza tra le SA di Ashby e la mutagenesi in Salmonella è tra il 73% e il 79%, mentre con la cancerogenesi nei roditori è inferiore di circa il 10%.

L'identificazione delle SA ha rappresentato un importante avanzamento scientifico, ed ha permesso, tra le altre cose, di progettare composti chimici più sicuri che non contengano SA conosciute.

L'uso delle SA è oggi molto sfruttato per la caratterizzazione "grana grossa" delle sostanze chimiche, e in particolare:

- nella identificazione di classi di sostanze;

- nella caratterizzazione preliminare del rischio;
- nella formazione di categorie (in ambito regolativo o per studi QSAR);
- nella definizione di priorità.

Modelli QSAR

Come abbiamo visto, le SA definiscono la potenzialità cancerogena o mutagena di una sostanza chimica che contenga una particolare sottostruttura reattiva.

L'approccio qualitativo delle SA ha, però, delle limitazioni, per esempio, non è possibile predire l'attività di sostanze con sottostrutture che non siano presenti nella lista di SA note. Inoltre, le SA permettono solo una limitata discriminazione all'interno di una stessa classe chimica.

Un approccio più raffinato che permette di ovviare a questi inconvenienti è dato dai metodi quantitativi QSAR. Le analisi QSAR si basano su un numero limitato di proprietà chimico-fisiche, che siano rilevanti per il processo studiato, e generano un modello matematico dei determinanti chimici dell'attività biologica. Le proprietà chimico-fisiche di interesse per l'attività biologica sono gli effetti idrofobici, elettronici e sterici (Hansch, 1991; Hansch, 1995).

Modelli QSAR sono stati generati per una serie di classi chimiche individuali (tra cui: ammine aromatiche, nitro aromatici, idrocarburi policiclici aromatici, ecc.). La maggior parte sono relativi alla mutagenesi in vitro, ma esistono anche alcuni QSAR per la cancerogenesi negli animali. I modelli QSAR per classi congeneriche di sostanze, derivati secondo l'approccio di Hansch (Hansch, 1995), forniscono i fattori chimico-fisici che determinano l'attività biologica di un composto, ed hanno dato un contributo notevole alla comprensione del meccanismo di cancerogenesi e mutagenesi.

Un importante campo di applicazione dei modelli QSAR è quello della valutazione del rischio delle sostanze chimiche. Una volta formulato, lo QSAR può essere infatti utilizzato per stimare l'attività incognita di altre sostanze, che non siano state impiegate nella derivazione del modello.

È importante notare che prima di usare un modello QSAR a scopi predittivi, la sua validità deve essere attentamente controllata.

L'Istituto Superiore di Sanità in collaborazione con il gruppo di Tossicologia Computazionale dell'*European Chemicals Bureau* ha effettuato una valutazione dei modelli QSAR non commerciali per la mutagenesi e la cancerogenesi (http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/QSAR/EUR_22772_EN.pdf). Quello che è emerso dall'analisi di modelli QSAR di "buona qualità" (OECD, 2004) è che, anche a partire da una buona statistica interna, il rendimento per quanto riguarda la predittività esterna può variare grandemente (Benigni, Bossa, 2008a). In particolare, modelli QSAR per la discriminazione tra sostanze attive e inattive, danno predizioni corrette per il 70%-100%, mentre modelli per la potenza di sostanze attive mostrano un'attendibilità molto inferiore.

Un sistema esperto per la predizione della tossicità

Recentemente l'Istituto Superiore di Sanità in collaborazione con l'*European Chemicals Bureau* di Ispra ha sviluppato un nuovo modello per la predizione dei mutageni e dei cancerogeni chimici, consistente di una lista aggiornata e migliorata di SA e di QSAR per alcune classi chimiche (Benigni & Bossa, 2008b). Questo modello è stato trasformato in un

modulo del sistema esperto Toxtree. Toxtree è disponibile liberamente sul sito: <http://ecb.jrc.it/qsar/qsartools/index.php?c=TOXTREE>. La base scientifica del nuovo modello è consultabile all'indirizzo: http://ecb.jrc.it/documents/QSAR/EUR_23241_EN.pdf.

Il funzionamento di Toxtree è volutamente semplice e richiede solo la conoscenza della struttura chimica della sostanza da studiare. Può essere applicato sia a una sostanza singola, sia a un gruppo di sostanze. Sono possibili varie risposte: a) non sono stati rilevati SA; b) la sostanza presenta SA per la cancerogenesi genotossica o non genotossica, e quindi è potenzialmente pericolosa; c) se la sostanza è una ammina aromatica o una aldeide $\alpha\beta$ -insatura, verrà applicato anche un modello QSAR per rendere più precisa la stima (Figura 3).

The screenshot shows the Toxtree v1.60 interface. The SMILES input field contains C1=CC=C(C=C1)C2=CC=C(C=C2)N. The 'Available structure attributes' table lists various parameters and their values. The 'Structure diagram' shows the chemical structure of 4-aminobiphenyl. The 'Toxic Hazard' panel displays the following alerts:

- Structural Alert for genotoxic carcinogenicity
- Structural Alert for nongenotoxic carcinogenicity
- No alerts for carcinogenic activity
- Potential *S. typhimurium* TA100 mutagen based on QSAR
- Unlikely to be a *S. typhimurium* TA100 mutagen based on QSAR
- Potential carcinogen based on QSAR
- Unlikely to be a carcinogen based on QSAR

The 'Verbose explanation' section lists the following results:

- Acyl halides: No
- Alkyl (C<5) or benzyl ester of sulphonic o...: No
- N-methylol derivatives: No
- Monohaloalkene: No
- S or N mustard: No
- Propiolactones and propiosultones: No

Figura 3. Risultato dell'applicazione del sistema esperto Toxtree (versione 1.60) per predire la mutagenicità e la cancerogenicità di una sostanza chimica (4-amminobifenile): il sistema mette in guardia sulla presenza di una Allerta Strutturale per la cancerogenesi, per la potenziale mutagenicità in *Salmonella typhimurium* e per la potenziale cancerogenicità

Ovviamente le stime fornite da Toxtree sono indicative di potenziale tossicità e l'utente dovrà deciderne l'uso nell'ambito del particolare problema che sta affrontando, tenendo conto di ogni altra informazione disponibile. Gli usi e gli scopi possono quindi essere diversissimi.

Conclusioni

Attività a molti livelli convergono verso un maggiore uso dei metodi e concetti (Q)SAR per la prevenzione e regolamentazione del rischio chimico. In tal senso il REACH rappresenta un'innovazione notevole per l'UE, che dà conto di un atteggiamento mutato in tutto il mondo.

Al livello di grandi numeri di sostanze (es. definizione di priorità), l'uso attento di modelli (Q)SAR fornisce un supporto molto utile, contribuendo inoltre alla conoscenza dei meccanismi di interazione tra sostanze chimiche e organismi viventi. In questo contesto vi è spazio per ulteriore ricerca e miglioramenti. Ciononostante è bene ricordare che i modelli (Q)SAR non sostituiscono la sperimentazione animale ma forniscono un potente supporto scientifico. Citando le parole di Rainer Franke riguardo al ruolo di (Q)SAR nella ricerca farmaceutica, possiamo dire:

“... Essendo il processo di progettazione di un farmaco di natura molto complessa, esso richiede un'intera gamma di tecniche tra le quali i metodi QSAR giocano un ruolo importante. ... I metodi teorici hanno la capacità di *estrarre e sintetizzare informazioni dai dati per ottenere ipotesi che possono essere verificate sperimentalmente*. Nessuna scoperta improvvisa di un farmaco miracoloso, ma una *aumentata possibilità di successo dovuto a una serie di indicazioni* è un'aspettativa realistica...” (Franke, 2003).

Bibliografia

- Arcos JC, Argus MF. *Chemical induction of cancer*. New York: Academic Press; 1974.
- Ashby J, Tennant RW. Chemical structure, Salmonella mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested by the U.S.NCI/NTP. *Mutat Res* 1988;204:17-115.
- Benigni R, Bossa C. Predictivity of QSAR. *J Chem Inf Model* 2008a;48:971-80.
- Benigni R, Bossa C. Structure Alerts for carcinogenicity, and the Salmonella assay system: a novel insight through the chemical relational databases technology. *Mutat Res Revs* 2008b;659:248-261.
- Franke R, Gruska A. General introduction to QSAR. In: Benigni R (Ed.). *Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) models of mutagens and carcinogens*. Boca Raton: CRC Press; 2003. p. 1-40.
- Hansch C, Leo A. *Exploring QSAR. 1. Fundamentals and applications in chemistry and biology*. Washington, D.C.: American Chemical Society; 1995.
- Hansch C. Structure-activity relationships of chemical mutagens and carcinogens. *Scie Tot Environ* 1991;109/110:17-29.
- Kazius J, McGuire R, Bursi R. Derivation and Validation of Toxicophores for Mutagenicity Prediction. *J Med Chem* 2005;48:312-320.
- Miller EC, Miller JA. Mechanisms of chemical carcinogenesis. *Cancer* 1981;47:1055-1064.
- OECD. *The Report from the Expert Group on (Quantitative) Structure Activity Relationship ([Q]SARs) on the Principles for the Validation of (Q)SARs*. Paris: OECD; 2004. (OECD Series on Testing and Assessment 49).
- Provost F, Fawcett T. Robust classification for imprecise environment. *Machine Learn J* 2001;42:5-11.
- Woo YT. Mechanisms of action of chemical carcinogens, and their role in Structure-Activity Relationships (SAR) analysis and risk assessment. In: Benigni R (Ed.). *Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) models of mutagens and carcinogens*. Boca Raton: CRC Press; 2003. p 41-80.

LA PREDITTIVITÀ DEL MODELLO CELLULARE CACO-2/TC7 PER STIMARE L'ASSORBIMENTO INTESTINALE NELL'UOMO DOPO ESPOSIZIONE ORALE

Laura Turco, Tiziana Catone, Emma Di Consiglio
Reparto Meccanismi di Tossicità

Le cinetiche di assorbimento attraverso le barriere biologiche ai siti di esposizione (epitelio intestinale, cute e barriera emato-encefalica) sono uno dei fattori di maggior rilevanza negli studi quantitativi di biodisponibilità dei composti chimici. L'effettiva dose interna che raggiunge l'organo bersaglio è, infatti, un parametro essenziale da derivare sia nelle fasi preliminari della ricerca di nuovi farmaci che negli studi tossicologici nell'ambito della valutazione quantitativa del rischio associato alla esposizione a xenobiotici.

Le discrepanze spesso presenti nei dati ottenuti negli studi di tossicologia in vitro rispetto ai dati in vivo per gli effetti sistemici sono generalmente attribuite ai processi di ADME (Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo ed Escrezione). L'impossibilità di riprodurre in vitro la complessità dell'organismo in toto attraverso un unico modello sperimentale costituisce il limite principale della tossicologia in vitro; il superamento di tale limite rappresenta quindi obiettivo principale in questo campo della ricerca. Un approccio sperimentale ampiamente adottato è quello tipo diagramma di flusso o di procedura per step successivi: si cerca cioè di mettere a punto una batteria di test in vitro integrati tra loro che permetta di collegare mediante algoritmi matematici le diverse informazioni dei singoli test per avere una valutazione tossicologica globale. Diversi progetti di ricerca in corso, sostenuti e finanziati dalla Commissione Europea, hanno questo obiettivo generale nei confronti di diversi end-point tossicologici e sono strutturati in Unità Operative tra loro interconnesse.

Il progetto ACuteTox (*An in vitro test strategy for predicting human acute toxicity*), nell'ambito del 6° Programma Quadro, ha come obiettivo la formulazione di una batteria di test in vitro che possa essere utilizzata per studi di tossicità acuta, in sostituzione del classico test sull'animale che identifica la DL50, che includa quelli che sono considerati i fattori chiave di cui tenere conto: la tossicità organo-specifica, la biotrasformazione e l'assorbimento attraverso le barriere biologiche. Il nostro gruppo di lavoro collabora in questo progetto fornendo informazioni sull'assorbimento intestinale di vari composti chimici selezionati dal progetto, usando come sistema sperimentale la linea cellulare Caco-2, clone TC7. Questa linea deriva da un carcinoma epiteliale di colon umano e, in colture a lungo termine, differenzia come epitelio enterocitico. Il differenziamento avviene sia a livello strutturale (Figura 1) che funzionale: le cellule Caco-2 differenziate formano un epitelio continuo con giunzioni strette funzionali e microvilli con molti enzimi ad esso associati (sucrasi-isomaltasi, lattasi, aminopeptidasi-N, fosfatasi alcalina, P-gp, solo per citarne alcuni) (Delie and Rubas, 1997).

La linea Caco-2 è stata ampiamente usata come modello di epitelio intestinale in vitro per studi di tossicità di barriera e per screening qualitativo di assorbimento intestinale, soprattutto dall'industria farmaceutica durante le fasi di ricerca e sviluppo per l'identificazione e l'ottimizzazione del *lead compound*. Uno dei principali problemi riscontrati nell'uso di questo modello è la variabilità intra- e inter-laboratorio dei risultati, dovuta alla natura eterogenea della popolazione cellulare. Questa caratteristica rende il modello estremamente suscettibile a variazioni di condizioni di coltura e sperimentali. Per limitare la scarsa ripetibilità dei dati

sono stati isolati diversi cloni dalla linea parentale: tra questi il clone TC7 sembra quello più affidabile in termini di riproducibilità dei risultati e in grado di formare un epitelio con caratteristiche fisiologiche più simili a quello in vivo (Zucco, 2005).

L'assorbimento intestinale è un processo complesso che può avvenire attraverso meccanismi diversi: trasporto passivo transcellulare e paracellulare, trasporto attivo, diffusione facilitata, trasporto recettore- mediato. Il processo può essere influenzato dal metabolismo intestinale, dall'azione dei trasportatori di efflusso nonché da alcune caratteristiche del composto chimico che deve essere assorbito, tra cui il peso molecolare, la grandezza e la conformazione della molecola, il grado di ionizzazione, la lipofilità, la solubilità e la dissoluzione nel contenuto gastrico. L'assorbimento intestinale di qualsiasi sostanza può essere il risultato di uno o più di questi processi e il modello sperimentale utilizzato deve essere caratterizzato per la sua funzionalità di assorbimento in tutti gli aspetti.

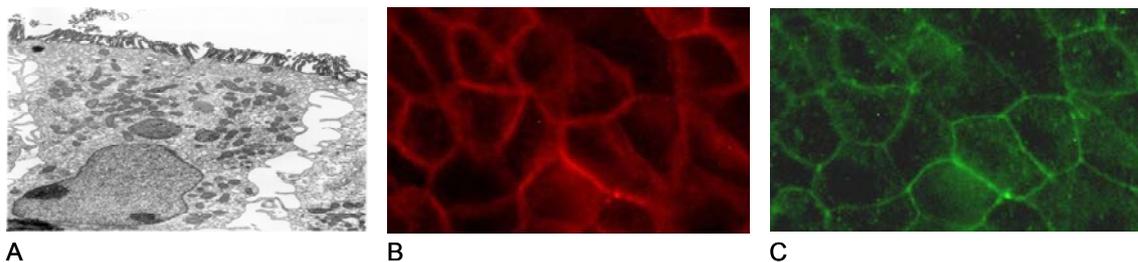


Figura 1. Differenziamento enterocitico della linea cellulare Caco-2.
A: sezione longitudinale dell'epitelio; B-C: immunofluorescenza di proteine strutturali delle giunzioni strette, Occludina (B) e ZO-1 (C)

Nell'ambito del progetto europeo ACuteTox abbiamo usato il clone Caco-2/TC7 per studiarne le potenzialità come modello sperimentale di epitelio intestinale in vitro e verificarne le capacità predittive per l'assorbimento dei vari composti chimici nell'intestino umano.

Le cellule sono state coltivate su specifici supporti porosi alloggiati in pozzetti per colture cellulari che consentono di avere due compartimenti ben distinti (uno apicale, corrispondente al lume intestinale in vivo e uno basolaterale che corrisponde al comparto della circolazione sanguigna e linfatica dell'organismo) (Figura 2).

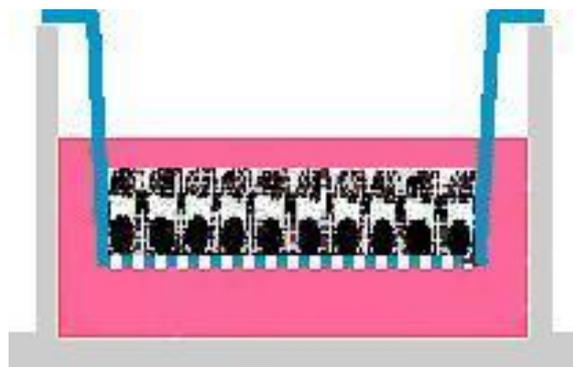


Figura 2. Modello sperimentale utilizzato. Il comparto apicale e quello basolaterale sono separati dall'epitelio continuo delle cellule Caco-2/TC7 differenziato

Sono stati testati 27 composti con diverse caratteristiche chimico-fisiche, indicati dal progetto come *outliers* nelle correlazioni di dati di tossicità acuta in vivo/in vitro. Sono state usate concentrazioni non tossiche, in modo tale da escludere danni fisiologici e strutturali all'epitelio assorbente e allo stesso tempo avere concentrazioni sufficientemente alte per la sensibilità del metodo analitico usato per quantificare il composto nei campioni sperimentali. Le concentrazioni non tossiche da utilizzare sono state identificate attraverso test di integrità di barriera, attraverso la misura del coefficiente di permeabilità del ^{14}C -Mannitolo, utilizzato come marcatore di assorbimento paracellulare.

I composti testati sono stati applicati al comparto apicale e ad intervalli regolari di tempo (15, 30, 45 e 60 minuti) sono stati prelevati dei campioni dal comparto basolaterale. La determinazione analitica (attraverso HPLC o gas-cromatografia) delle concentrazioni dei composti nei campioni ai diversi prelievi ha consentito di studiare la cinetica del passaggio del composto da un comparto all'altro attraverso l'epitelio che li separa.

I risultati sono espressi in termini di velocità, come coefficienti di Permeabilità Apparente (P_{app}) secondo l'equazione:

$$P_{app} = (dQ/dt) \times 1/(A \times C_0)$$

dove (dQ/dt) è la variazione nel tempo della concentrazione nel comparto basolaterale, A è la superficie assorbente dell'epitelio e C_0 è la concentrazione iniziale del composto nel comparto apicale.

I risultati, riportati in Figura 3, mostrano che l'ampiezza dei valori di P_{app} con i composti usati va dal valore più alto di $\sim 60 \times 10^{-6}$ cm/sec per il composto maggiormente assorbito, al più basso di $0,05 \times 10^{-6}$ cm/sec per il composto meno assorbito.

Per ciascuno dei composti è stato anche misurato il bilancio di massa (*Mass balance*, MB), vale a dire la percentuale del composto test recuperata al termine dell'esperimento e che per convenzione all'interno del Progetto è stata definita come la somma dell'ammontare del composto recuperato nei due comparti apicale e basolaterale, trascurando la possibile frazione associata alla componente cellulare. È stato considerato che per avere una misura attendibile del valore di assorbimento, la MB dovesse risultare $\geq 70\%$.

Le caratteristiche fisico-chimiche delle sostanze testate sono molto diverse tra loro e questo ci ha permesso di mettere in luce alcune delle problematiche, insite nel modello sperimentale utilizzato. Uno dei maggiori problemi è l'adsorbimento dei composti più liposolubili alla plastica dei supporti utilizzati nonché il suo accumulo all'interno delle cellule: ciò porta inevitabilmente a valori di bilancio di massa troppo bassi, che compromettono l'attendibilità del risultato. Questo problema può essere superato, o quantomeno limitato, adottando alcune precauzioni quali la misura della effettiva concentrazione iniziale applicata, che dopo l'adsorbimento sarà diversa da quella nominale e la determinazione analitica del composto nel lisato cellulare. Considerando anche la frazione trattenuta nella componente cellulare, può essere accettato un valore di bilancio di massa $\geq 85\%$. Un altro aspetto problematico per i composti liposolubili (e non solo) è legato alla bassa solubilità nel tampone acquoso in cui vengono disciolti; analogamente una tossicità troppo alta per le Caco-2/TC7 consente la conduzione dell'esperimento di cinetica solo con concentrazioni molto basse. Entrambe queste caratteristiche potrebbero inficiare la riuscita dello studio, qualora non fossero disponibili metodi analitici sufficientemente sensibili da permettere la quantificazione analitica nei campioni prelevati.

Per verificare la rilevanza dei nostri risultati abbiamo effettuato analisi di correlazione confrontando i dati ottenuti sia con quelli della linea parentale che con dati in vivo disponibili in letteratura (*Therapeutics Drugs* 2nd ed. Dolley editor. Churchill, Livingstone, Edimburgh, 1999; Balimane *et al.* 2006; Zhao *et al.* 2001). Il clone TC7 ha una buona correlazione ($R^2 = 0.79$) con i dati ottenuti con la linea parentale riportati in letteratura (Lazorova *et al.* 1998; Verwei *et al.* 2005; Yee *et al.* 1997; Liang *et al.* 2000; Matsson *et al.* 2005; Pontier *et al.* 2001; Yamashita *et al.* 2000).

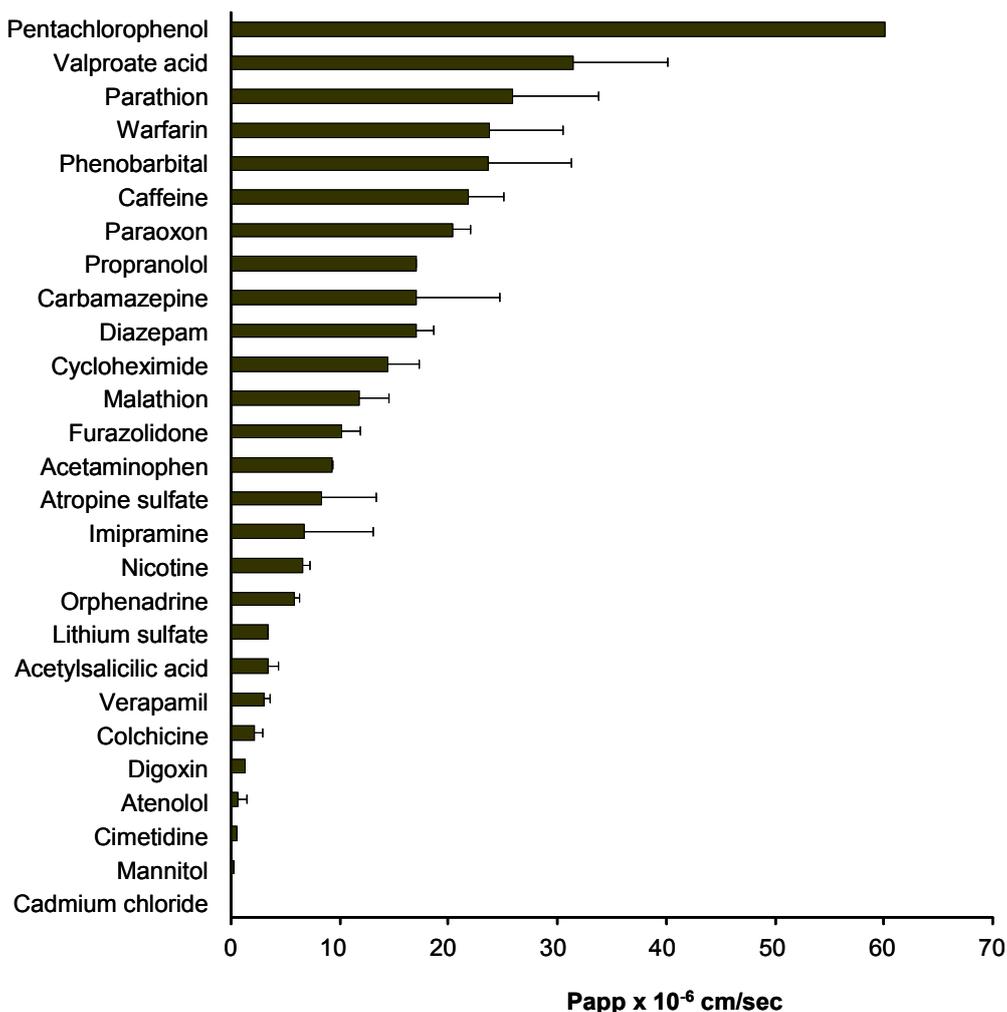


Figura 3. Risultati delle cinetiche di assorbimento dei 27 composti testati espressi come Papp x 10⁻⁶ cm/sec

La Figura 4 mostra i risultati di correlazione dei nostri dati ottenuti in vitro con i dati in vivo di Frazione Assorbita (FA) nell'uomo, espressi come percentuale di composto assorbito rispetto a quello somministrato. L'andamento della relazione tra i dati di assorbimento in vitro rispetto a dati di FA%, in questo caso è descritto da una curva non lineare, come riportato da Matsson *et al.* (2005). Per questo tipo di analisi è stato possibile utilizzare solo 18 dei composti testati, quelli per i quali sono disponibili dati in vivo nell'uomo.

Sulla base di questo tipo di analisi è possibile costruire modelli matematici predittivi per l'estrapolazione delle percentuali di assorbimento nell'uomo di composti per i quali non sono disponibili dati in vivo. La qualità dei modelli predittivi però è assicurata da un numero elevato di dati con i quali il modello stesso viene costruito e nel caso di questo studio il numero di dati non è sufficientemente alto da consentire l'estrapolazione di valori di *cut-off*, che suddividano i composti nelle categorie di basso, medio e alto assorbimento.

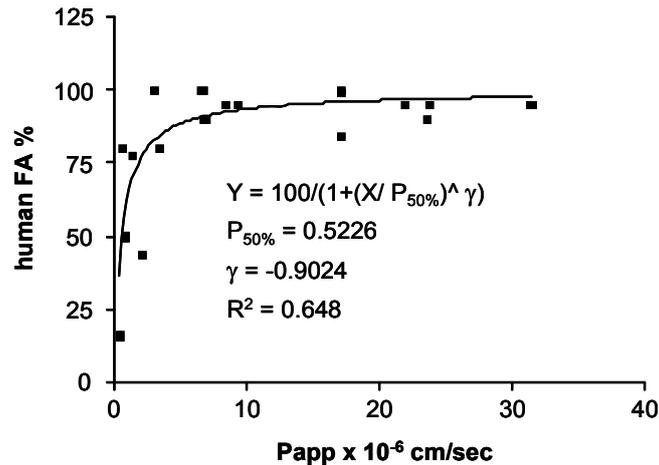


Figura 4. Correlazione tra i valori di Papp ottenuti in vitro con i dati di FA% nell'uomo

Alcune ulteriori considerazioni sulle analisi di correlazioni effettuate hanno permesso di evidenziare alcuni aspetti fondamentali nella rilevanza delle performance di questo modello sperimentale rispetto ai meccanismi fisiologici che è chiamato a rappresentare in vitro. La correlazione in vitro/in vivo infatti migliora in modo significativo ($R^2 = 0.96$) (Figura 5) se vengono eliminati dall'analisi tre composti (cimetidina, colchicina e carbamazepina).

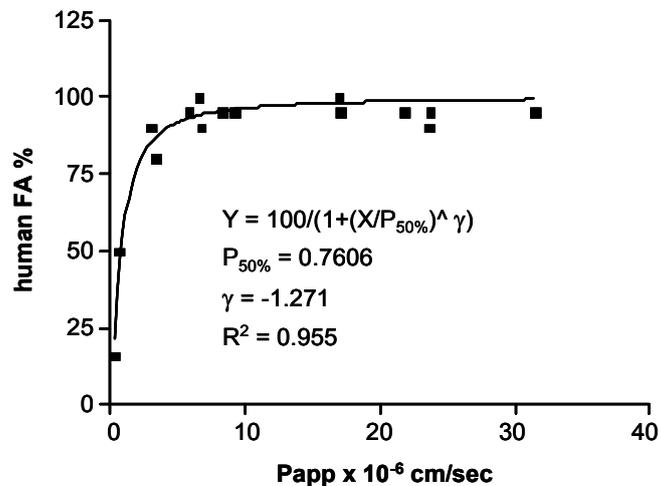


Figura 5. Correlazione in vitro/in vivo escludendo cimetidina, colchicina e carbamazepina

È noto che la cimetidina è assorbita a livello intestinale mediante trasporto attivo (Taur, 2008) e che colchicina e carbamazepina sono buoni substrati dell'enzima CYP3A4 (Niel and Schermann, 2006; Eyer, 2007), che le biotrasforma efficientemente, essendo l'isoforma di P450 maggiormente espressa nell'intestino. L'assorbimento di questi composti è quindi influenzato dall'attività di proteine specifiche (trasportatori e/o enzimi del metabolismo) che devono essere

presenti ed espresse nel modello sperimentale in vitro affinché questo sia in grado di mimarne l'assorbimento. Il peso che i risultati avuti per questi tre composti ha nella correlazione con i dati in vivo suggerisce una carenza nel nostro modello cellulare nella attività delle proteine funzionali implicate.

Il modello Caco-2/TC7 utilizzato in questo studio è perciò altamente performante, limitatamente a tutte quelle sostanze che siano assorbite attraverso trasporto passivo, con una lipofilità non troppo elevata, e che non siano buoni substrati degli enzimi del metabolismo espressi a livello intestinale. Al tempo stesso, però, questo studio mette in luce le limitazioni del modello Caco-2/TC7 e dei modelli in vitro di bio-barriere in genere come strumento per lo studio dell'assorbimento di qualsiasi sostanza. Le linee cellulari rispetto al tessuto di origine, o rispetto al tessuto cui più si avvicinano per differenziamento, possono avere una espressione genica alterata, per cui per alcune proteine l'attività risulta essere maggiore mentre per altre minore. I modelli cellulari in vitro devono quindi essere ben caratterizzati dal punto di vista dell'attività di proteine funzionalmente importanti per il processo che il modello deve rappresentare. La conoscenza delle attività specifiche di tali proteine infatti consente di calcolare i fattori di correzione necessari per l'estrapolazione dei risultati all'uomo. Per la costruzione di modelli predittivi le differenze nell'espressione genica rispetto alla situazione fisiologica umana sono di estrema importanza per lo studio dei processi fisiologici ed è quindi necessario tenerne conto non solo nei modelli in vitro ma anche quando si ottengano risultati con modelli animali.

Finché la caratterizzazione dei modelli in vitro non risulta completa la loro valenza rimarrà circoscritta al livello di screening preliminare, prevalentemente di tipo qualitativo. L'identificazione e il conseguente superamento delle varie limitazioni dei modelli evidenziate in studi come quello da noi condotto sul modello Caco-2/TC7, potrà avvenire sia con miglioramenti sperimentali, inclusa la completa caratterizzazione del modello che mediante l'aiuto di modelli in silico che consentano di prevedere le proteine coinvolte nell'assorbimento dei diversi composti in base alle loro specifiche caratteristiche fisico-chimiche, che dovranno essere integrate con opportuni algoritmi.

Bibliografia

- Balimane PV, Han YH and Chong S. Current industrial practices of assessing permeability and P-glycoprotein interaction. *AAPS Journal* 2006;13,8(1):E1-E13.
- Delie F, Rubas W. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* 1997;14(3):221-86.
- Eyer F, Jung N, Neuberger H, Witte A, Poethko T, Henke J and Zilker T. Seromucosal transport of intravenously administered carbamazepine is not enhanced by oral doses of activated charcoal in rats. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 2007;102:337-46.
- Lazorova L, Grasjo J, Bergstrom M, Wu F, Petterman-Bergstrom E, Ogren M and Langstrom B. Quantification and imaging of mannitol transport through Caco-2 cell monolayers using a positron-emitting tracer. *Pharmaceutical Research* 1998;15(7):1141-4.
- Liang E, Chessic K and Yazdanian M. Evaluation of an accelerated Caco-2 cell permeability model. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2000;89(3):336-45.
- Niel E, Schermann JM. Colchicine today. *Joint Bone Spine* 2006;73:672-8.
- Pontier C, Pachot J, Botham R, Lenfant B, Arnaud P. HT29-MTX and Caco-2/TC7 monolayers as predictive models for human intestinal absorption: role of the mucus layer. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001;90(10):1608-19.

- Taur JS and Rodriguez-Proteau R. Effects of dietary flavonoids on the transport of cimetidine via P-glycoprotein and cationic transporters in Caco-2 and LLC-PK1 cell models. *Xenobiotica* 2008;38(12):1536-50.
- Verwei M, van de Berg H, Havenaar R. and Groten JP. Effect of folate-binding protein on intestinal transport of folic acid and 5-methyltetrahydrofolate across Caco-2 cells. *European Journal of Nutrition* 2005;44(4):242-9.
- Yamashita S, Furubayashi T, Kataoka M, Sakane T, Sezaki H, Tokuda H. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2000;10:195-204.
- Yee S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man-fact or myth. *Pharmaceutical Research* 1997;14(6):763-6.
- Zhao YH, Le J, Abraham MH, Hersey A, Eddershaw PJ, Luscombe CN, Boutina D, Beck G, Sherborne B, Cooper I, Platts JA. Evaluation of human intestinal absorption data and subsequent derivation of a Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) with the Abraham descriptors. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001;90(6):749-84.
- Zucco F, Batto AF, Bises G, Chambaz J, Chiusolo A, Consalvo R, *et al.* An inter-laboratory study to evaluate the effects of medium composition on the differentiation and barrier function of Caco-2 cell lines. *Alternatives to Laboratory Animals* 2005;33(6):603-18.

L'EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE COME STRUMENTO DI STUDIO DEI MECCANISMI MOLECOLARI DI CANCEROGENESI: L'ESEMPIO DEL CANCRO GASTRICO

Valeria Simonelli
Reparto di Epidemiologia Molecolare

Introduzione

L'epidemiologia molecolare è la disciplina che studia la variabilità inter-individuale attraverso un approccio multidisciplinare (epidemiologia, genetica, biologia molecolare, biologia cellulare, biochimica, statistica, bioetica). Per valutare se esiste un'associazione causale tra esposizione ad agenti ambientali e rischio di sviluppo di una patologia, come ad esempio il cancro, in una popolazione, non basta conoscere l'entità dell'esposizione esterna, cioè il livello di cancerogeno presente nell'ambiente. Infatti, occorre tenere conto del fatto che l'effetto fenotipico di una esposizione è variabile all'interno della popolazione dal momento che i geni che modulano la risposta agli agenti ambientali (geni della riparazione del DNA, del metabolismo cellulare, del ciclo cellulare e dell'apoptosi) presentano delle varianti (mutazioni, alterazione dell'espressione genica) tra individuo e individuo (1). È stato, perciò, introdotto nel processo di valutazione del rischio, l'utilizzo di parametri, noti come biomarcatori, che fossero in grado di fornire informazioni sui livelli di esposizione interna (biomarcatori di esposizione), sugli effetti precoci dell'esposizione (biomarcatori di effetto) e sulla suscettibilità individuale (biomarcatori di suscettibilità) (2).

I biomarcatori di esposizione costituiscono una sorta di dosimetro interno che dà informazioni sulla quantità di cancerogeno (o di un suo metabolita) che è stato metabolizzato dall'organismo (dose efficace). Gli addotti covalenti al DNA o alle proteine rientrano in questa categoria e vengono rilevati nei tessuti e nei fluidi biologici (saliva, siero, urine, latte materno) contribuendo alla valutazione quantitativa del rischio.

I biomarcatori di effetto sono parametri che riflettono il danno irreversibile causato dall'interazione del cancerogeno con il sito bersaglio evidenziando eventi correlati al processo neoplastico, come mutazioni in geni che controllano la stabilità del genoma, alterazioni nell'espressione genica e aberrazioni cromosomiche. Pur avendo in alcuni casi un importante ruolo predittivo, in quanto possono essere rilevati anni prima che si sviluppi la neoplasia, questi marcatori sono per lo più non informativi sull'agente causale.

Infine, nella valutazione del rischio, è importante identificare, mediante i biomarcatori di suscettibilità, quei sottogruppi di individui, all'interno della popolazione in studio, che presentano un aumentato rischio di sviluppare patologie associate a una determinata esposizione. I biomarcatori di suscettibilità sono i più difficili da determinare e valutare. Infatti, non tutte le variazioni di sequenza (polimorfismi) influenzano l'attività (effetto fenotipico) di uno specifico gene e possono, quindi, costituire dei potenziali fattori di rischio.

Epidemiologia molecolare e cancro gastrico

Un esempio di come i concetti che finora sono stati introdotti diventino dei veri e propri strumenti di indagine, è lo studio del tumore gastrico che è in corso da alcuni anni nel nostro laboratorio.

Il cancro gastrico (CG) è una delle forme più frequenti di cancro e una delle maggiori cause di morte a livello mondiale (3). Tra i paesi europei, l'Italia è uno dei paesi con il più alto tasso di morti per tumore allo stomaco, con picchi di incidenza e mortalità nelle regioni del centro-Nord (Toscana, Marche, Umbria, Emilia-Romagna, Lombardia) (4).

Il CG presenta una eziologia complessa, ancora parzialmente sconosciuta, che vede coinvolti numerosi fattori di tipo alimentare (elevato consumo di carni, soprattutto conservate, unito a un basso consumo di frutta e verdura), genetico (storia familiare) e infettivo (*Helicobacter pylori*) (5-7).

Negli ultimi anni, la ricerca ha evidenziato come il danno ossidativo indotto dalle specie radicaliche dell'ossigeno (ROS) assume un ruolo cruciale nella tumorigenesi (8-10). Diversi studi epidemiologici hanno permesso di stabilire una relazione causale tra l'infezione da *H. pylori* e l'aumentato rischio di cancro gastrico (11-14). L'infezione da parte di questo batterio induce, infatti, danno ossidativo nella mucosa gastrica, in quanto innesca la risposta immunitaria a carico dei neutrofilo, con conseguente produzione di ROS e danno alle membrane cellulari, al DNA, all'RNA e alle proteine.

Nel nostro progetto di ricerca ci siamo proposti di indagare, prima di tutto, se polimorfismi in geni del metabolismo, della riparazione del DNA e della risposta immunitaria fossero in grado di modulare il rischio di CG nella popolazione italiana. In collaborazione con il Dr. Domenico Palli del CSPO di Firenze, abbiamo allestito una banca di campioni biologici (sangue, tessuti biotipici di mucosa normale e tumorale) prelevati da pazienti affetti da adenocarcinoma gastrico, residenti a Firenze e nell'area rurale circostante. L'analisi del DNA ha mostrato come polimorfismi in geni della riparazione del DNA (XPC), del metabolismo cellulare (GSTM1, GSTT1) e della risposta immunitaria (IL-1B, IL-1RN) siano coinvolti nell'aumento del rischio di CG (15-17).

Successivamente, abbiamo preso in esame l'instabilità dei microsatelliti (MSI), che consiste nell'accumulo di mutazioni in sequenze del DNA altamente ripetute (DNA microsatellite) che attiva/inattiva geni coinvolti nella proliferazione e nella sopravvivenza cellulare. Questo tipo di instabilità è solitamente associato a un difetto nel sistema di riparazione degli appaiamenti erranei (mismatch repair, MMR) ed è stata osservata nel 15% dei tumori al colon, allo stomaco e all'endometrio. Inoltre, la MSI caratterizza i tumori associati alla sindrome di Lynch (*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancers*, HNPCC). Nel 2003 è stata identificata una MSI non associata a un difetto nel MMR ma a un difetto in un altro sistema di riparazione del DNA: il base excision repair (BER) (18). Questo è il principale meccanismo in grado di rimuovere il danno da ossidazione sul DNA. Ciò che è stato dimostrato è che il processo di infiammazione cronica che caratterizza la colite ulcerosa, porta all'alterazione dell'espressione di alcuni geni coinvolti nel BER con conseguente induzione di MSI.

In collaborazione con la Dr.ssa L. Ottini dell'Università di Roma La Sapienza, 131 dei 188 casi arruolati nello studio sono stati caratterizzati per la MSI e il 15% di questi tumori è risultato "instabile" (19).

Al fine di identificare se questi tumori "instabili" presentassero delle particolari caratteristiche molecolari, e quindi una sorta di "firma", in collaborazione con il Dr. F. Palombo dell'IRBM di Pomezia, abbiamo condotto un'analisi dell'espressione di un ampio numero di geni, confrontando tumori privi di instabilità dei microsatelliti con i tumori con MSI. L'analisi statistica condotta dal Dr. A. Giuliani dell'ISS e dal Dr. E. Rinaldis dell'IRBM, ha mostrato come i geni della risposta immunitaria e dell'apoptosi siano i principali discriminanti tra tumori stabili e instabili. Andando a stratificare l'analisi e incentrandola sui geni della riparazione del DNA, l'espressione del gene

MLH1 del MMR e del gene della DNA polimerasi β (Pol β) del BER è risultata alterata nei tumori instabili. In particolare, l'analisi ha evidenziato una down-regolazione di MLH1 e un'up-regolazione di Pol β nei tumori con MSI.

Mentre il ruolo di MLH1, e quindi del MMR, nella MSI è ormai noto, l'up-regolazione di Pol β risulta essere un dato del tutto nuovo. Per capire il contributo relativo della de-regolazione dei due geni alla MSI, stiamo costruendo un sistema in vitro per riprodurre lo stesso disequilibrio osservato in vivo a carico dei due geni e poterne studiare gli effetti fenotipici. In particolare, testeremo la resistenza/sensibilità di queste cellule a vari agenti danneggianti, tra i quali anche quelli usati in chemioterapia. È infatti noto che un difetto in un sistema di riparazione, unitamente all'up-regolazione di un sistema di riparazione alternativo sono in grado di alterare la risposta citotossica delle cellule e, quindi, compromettere l'efficacia della chemioterapia. Si crea, cioè, una sorta di paradosso per il quale gli enzimi della riparazione non rivestono più il ruolo di "guardiani del genoma", ma diventano la causa della resistenza del tumore alla terapia ed hanno, perciò, un effetto negativo (20). I risultati di questo studio potrebbero portare all'individuazione di nuove sostanze in grado di uccidere selettivamente quelle cellule che sono difettive nel MMR e che presentano una up-regolazione di Pol β , lasciando vitali le cellule normali (Figura 1).

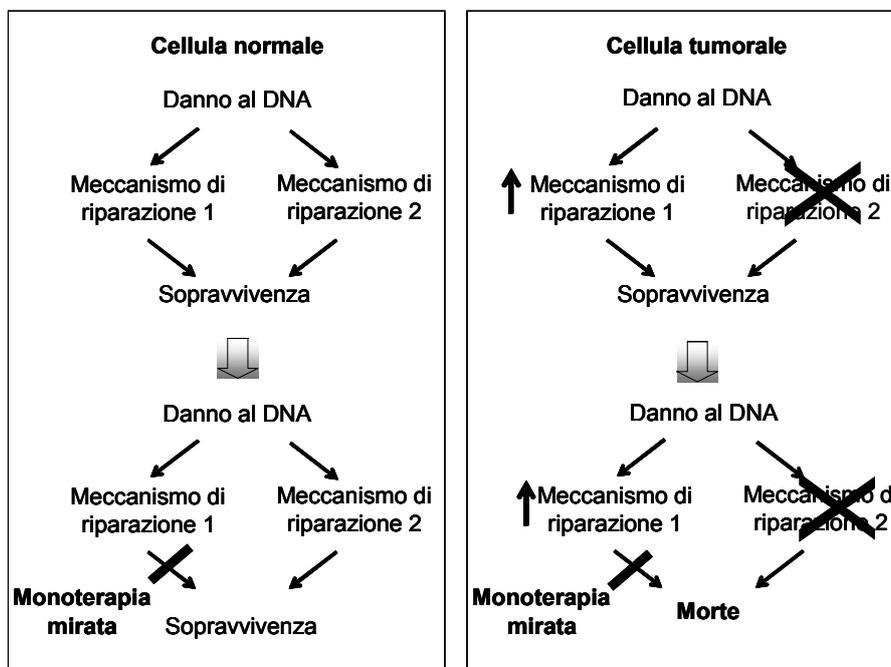


Figura 1. Il difetto in uno dei sistemi di riparazione nella cellula tumorale (meccanismo di riparazione 2) è compensato dall'up-regolazione di un secondo sistema di riparazione (meccanismo di riparazione 1). La sopravvivenza cellulare nel tumore è, perciò, strettamente dipendente da questo secondo sistema di riparazione. (Modificata da Kennedy RD, 2006) (20)

Questo studio, come altri, costituisce un esempio di come la ricerca applicata e la ricerca di base non siano mutuamente esclusive, bensì entrambe necessarie per la tutela della salute pubblica.

Bibliografia

1. Shields PG, Harris CC. Cancer risk and low-penetrance susceptibility genes in gene-environment interactions. *J Clin Oncol* 2000;18(11):2309-15.
2. Perera FP, Weinstein IB. Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis* 2000;21(3):517-24.
3. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 2001;37(Suppl 8):S4-S66.
4. Parkin DM, Muir CS. Cancer Incidence in Five Continents. Comparability and quality of data. *IARC Sci Publ* 1992;(120):45-173.
5. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992;52(24):6735-40.
6. González CA, Sala N, Capellá G. Genetic susceptibility and gastric cancer risk. *Int J Cancer* 2002;100(3):249-60.
7. Huang JQ, Zheng GF, Sumanac K, Irvine EJ, Hunt RH. Meta-analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology* 2003;125(6):1636-44.
8. Roberts RA, Laskin DL, Smith CV, Robertson FM, Allen EM, Doorn JA, Slikker W. Nitrate and oxidative stress in toxicology and disease. *Toxicol Sci* 2009;112(1):4-16.
9. Weinberg F, Chandel NS. Reactive oxygen species-dependent signaling regulates cancer. *Cell Mol Life Sci* 2009 Dec;66(23):3663-73.
10. Gonda TA, Tu S, Wang TC. Chronic inflammation, the tumor microenvironment and carcinogenesis. *Cell Cycle* 2009 Jul 1;8(13):2005-13.
11. Palli D. Epidemiology of gastric cancer: an evaluation of available evidence. *J Gastroenterol* 2000;35(Suppl 12):84-9.
12. Ming SC. Cellular and molecular pathology of gastric carcinoma and precursor lesions: A critical review. *Gastric Cancer* 1998;1(1):31-50.
13. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. Helicobacter pylori. *Clin Microbiol Rev.* 1997 Oct;10(4):720-41.
14. Blaser MJ, Berg DE. Helicobacter pylori genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Invest* 2001;107(7):767-73.
15. Palli D *et al.* Interleukin-1 gene polymorphisms and gastric cancer risk in a high-risk Italian population. *Am J Gastroenterol* 2005;100(9):1941-8.
16. Palli D *et al.* GSTT1 and GSTM1 gene polymorphisms and gastric cancer in a high-risk Italian population. *Int J Cancer* 2005;115(2):284-9.
17. Palli D, *et al.* Polymorphic DNA repair and metabolic genes: a multigenic study on gastric cancer. *Mutagenesis*. 2010. Disponibile all'indirizzo: <http://mutage.oxfordjournals.org/content/early/2010/09/03/mutage.geq042.full.pdf+html>; ultima consultazione 5/10/2010.
18. Hofseth LJ *et al.* The adaptive imbalance in base excision-repair enzymes generates microsatellite instability in chronic inflammation. *J Clin Invest* 2003;112(12):1887-94.
19. D'Errico M *et al.* Genome-wide expression profile of sporadic gastric cancers with microsatellite instability. *Eur J Cancer* 2009;45(3):461-9.
20. Kennedy RD, D'Andrea AD. DNA repair pathways in clinical practice: lessons from pediatric cancer susceptibility syndromes. *J Clin Oncol* 2006;24(23):3799-808.

INTERAZIONE GENOTIPO-AMBIENTE: ESPOSIZIONE, VARIABILITÀ INDIVIDUALE E INSTABILITÀ CROMOSOMICA

Francesca Marcon
Reparto di Tossicologia Genetica

Gli obiettivi del reparto di Tossicologia Genetica comprendono la valutazione dell'attività genotossica delle sostanze chimiche presenti nell'ambiente, come pesticidi o contaminanti alimentari, verificando se una sostanza è in grado di modificare la struttura dei cromosomi, la loro segregazione, il contenuto dell'informazione (la sequenza del DNA) e, anche se temporaneamente, la replicazione del DNA. I metodi applicati si basano prevalentemente su tecniche di citogenetica classica e molecolare che permettono di seguire i cambiamenti della forma dei cromosomi o analizzare variazioni del numero dei cromosomi. Si possono anche seguire cromosomi specifici, coinvolti ad esempio in particolari patologie, o visualizzare scambi tra cromosomi (traslocazioni) applicando l'ibridazione in situ a fluorescenza, un metodo che permette di identificare i cromosomi anche quando sono "invisibili", come nelle cellule in interfase. Si può valutare così l'effetto genotossico di una sostanza ricavando anche informazioni sul meccanismo d'azione dell'agente studiato, dati molto utili nel processo di valutazione e gestione del rischio mutageno associato all'esposizione ad una particolare sostanza.

A volte l'esposizione non causa un danno genotossico diretto, ma determina alterazioni di funzioni cellulari di per sé non sufficienti a causare cambiamenti visibili della stabilità dei cromosomi; queste, però, aumentano la suscettibilità dell'individuo all'azione di un secondo agente genotossico e rendono sufficiente l'effetto di una successiva esposizione (Tomatis, 2004). Questi lievi cambiamenti si possono evidenziare caratterizzando gli individui per la risposta ad un agente mutageno in seguito ad un trattamento *ex vivo* (il quale rappresenta la seconda esposizione). Il fenotipo "sensibilità ai mutageni" è una misura indiretta della capacità individuale di riparare il DNA e rappresenta un marcatore molto utilizzato negli studi di suscettibilità individuale ai cancerogeni, in quanto studi prospettici (Wu *et al.*, 2007) ne hanno evidenziato l'associazione con un aumentato rischio di cancro.

Nel nostro reparto questo metodo è stato applicato su una popolazione caratterizzata per le abitudini al fumo e classificata in fumatori, ex fumatori e non fumatori, ed ha dimostrato che i fumatori e i non fumatori hanno risposte diverse dopo trattamento con i raggi gamma, differenza che non era stata osservata esaminando semplicemente i valori spontanei delle aberrazioni cromosomiche (Tabella 1) (Marcon *et al.*, 2003). Questo dato inatteso sottolinea la cautela con cui bisogna interpretare i risultati e dimostra che sia un aumento di aberrazioni cromosomiche che una loro riduzione significativa sottendono differenze nella capacità di riparare il DNA (alterazioni rispetto alla norma).

Quali sono i fattori che influenzano il fenotipo "sensibilità ai mutageni"? Come insegna la genetica, ogni fenotipo è il risultato dell'interazione tra fattori genetici e fattori ambientali. In uno studio recente condotto da un gruppo americano è stato osservato che i fattori genetici spiegano circa il 50% della variabilità inter-individuale nella risposta ai mutageni (Wu *et al.*, 2006). Per quanto riguarda la componente genetica, è importante cercare di capire quali sono i geni specifici e i processi responsabili di questo fenotipo, al fine di ottenere informazioni utili per migliorare la comprensione dei meccanismi alla base del fenotipo e per trovare nuovi marcatori genetici da applicare nella valutazione del rischio di cancro, nella prevenzione clinica e nel trattamento.

Tabella 1. Frequenza delle aberrazioni cromosomiche spontanee (0 Gy) e indotte da raggi gamma (2 Gy) osservate in un gruppo di soggetti classificati in base alle abitudini al fumo

Abitudini al fumo	Aberrazioni cromosomiche per 100 cellule			
	No. soggetti	0Gy	2 Gy	P
NF	19	1,9 ± 1,6	32,7 ± 8,8	
DF	6	1,6 ± 0,7	32,0 ± 8,9	
FF	6	1,7 ± 1,5	24,3 ± 6,8	0,05

NF: non fumatori; DF: deboli fumatori (<15 sigarette al giorno); FF: forti fumatori (>15 sigarette al giorno).

Con questo scopo, nel nostro laboratorio è stato condotto uno studio per valutare cambiamenti dell'espressione genica dopo irraggiamento di linfociti umani applicando la tecnica dei microarray (Marcon *et al.*, 2006). Sono state osservate variazioni significative di un gran numero di geni coinvolti nella risposta iniziale delle cellule al danno da radiazioni, geni coinvolti quindi nella proliferazione cellulare, apoptosi, o nel controllo del ciclo cellulare. Non sono stati evidenziati, invece, geni o processi che avessero un'espressione significativamente diversa nei soggetti sensibili rispetto a quelli insensibili alle radiazioni. Questo risultato si può spiegare ipotizzando che non ci sia un solo gene o un gruppo di pochi geni molto forti che influenzano il fenotipo "sensibilità ai mutageni", ma piuttosto che intervengano molti geni che modulano questo carattere complesso. La componente genetica ha quindi un peso significativo nel modulare la suscettibilità individuale ai mutageni, ma anche la componente ambientale ha la sua rilevanza spiegando il restante 40-60% della variabilità inter-individuale (Wu *et al.* 2006). Per valutare quali sono i fattori ambientali che influenzano questo fenotipo e studiare il peso relativo di ciascuno di essi, abbiamo avviato uno studio su una popolazione di gemelli che rappresenta il classico modello sperimentale in cui valutare il ruolo dei fattori ambientali per spiegare le differenze fenotipiche che si osservano tra i soggetti. I gemelli, infatti, sono individui geneticamente identici per cui le differenze fenotipiche si possono attribuire direttamente all'ambiente.

Da un nostro studio recente è apparso che anche l'età può influenzare la sensibilità ai mutageni (Marcon *et al.*, 2009) probabilmente a causa della nota riduzione della capacità di riparare il danno al DNA che si osserva con l'invecchiamento e a causa di modificazioni epigenetiche che si accumulano con l'età (Fraga *et al.*, 2005) (Figura 1).

I cambiamenti epigenetici sono modificazioni ereditabili dell'espressione genica o dell'organizzazione della cromatina non associati a cambiamenti della sequenza del DNA, ma riguardanti gli istoni o la metilazione del DNA. Gli istoni sono proteine che formano il nucleosoma attorno al quale si avvolge in DNA. I residui amminoacidici all'N-terminale di ciascun istone si estendono al di fuori della superficie del nucleo soma e queste regioni possono essere reversibilmente modificate mediante acetilazione, fosforilazione o metilazione. I cambiamenti epigenetici degli istoni sono modificazioni dinamiche che seguono la progressione del ciclo cellulare oppure il metabolismo del DNA (replicazione, trascrizione, riparazione); la fosforilazione dell'istone H3, ad esempio, segna la progressione del ciclo cellulare attraverso la fase G2/M, mentre la fosforilazione dell'istone H2AX segnala la presenza di un danno sul DNA. In linea di massima sono cambiamenti che rendono più o meno accessibile il DNA agli enzimi che devono intervenire per il suo metabolismo.

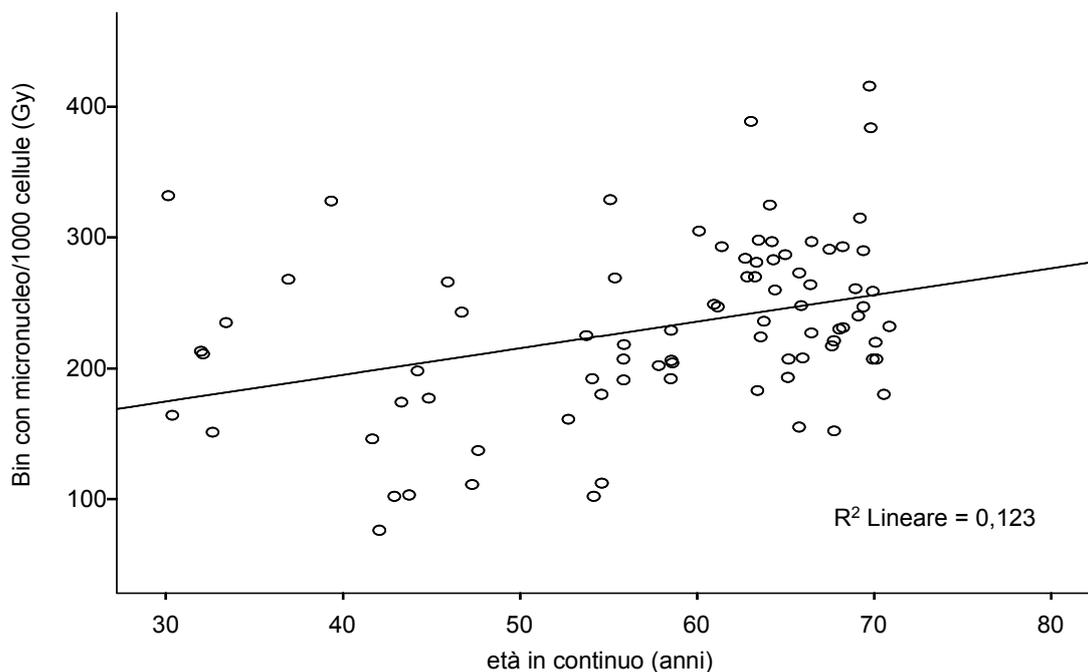


Figura 1. Frequenza delle cellule binucleate con micronuclei indotte dal trattamento con 2 Gy di raggi gamma osservata nei linfociti di sangue periferico di individui di età diverse (Modificata da Marcon *et al.*, 2009)

Per quanto riguarda, invece, la metilazione del DNA ci sono diversi livelli a cui si possono valutare questi cambiamenti; si può seguire il grado di metilazione globale del DNA, di regioni cromosomiche specifiche, come i promotori di geni particolari (meccanismo usato per regolare la trascrizione dei geni) o cambiamenti a livello di regioni cromosomiche specifiche, come i centromeri o i telomeri. Alterazioni del livello di metilazione dei centromeri, ad esempio, portano a disfunzioni funzionali di queste strutture che possono determinare un'alterata segregazione dei cromosomi. Cambiamenti epigenetici, quindi, possono essere associati ad instabilità cromosomica. Nel caso dei telomeri, strutture nucleoproteiche localizzate all'estremità dei cromosomi, alterati livelli di metilazione possono essere messi in relazione con cambiamenti della loro lunghezza e quindi causare la perdita della funzione di proteggere i cromosomi dall'erosione. Se si accorciano i telomeri, le estremità dei cromosomi diventano "reattive" e interagiscono tra loro formando complessi cromosomici aberranti (associazioni telomeriche) che alla divisione della cellula rimangono tra i due nuclei figli come un ponte; questo rompendosi determina la formazione di due cellule figlie con il contenuto di DNA anormale e altera così la stabilità del genoma. Considerando l'associazione tra i cambiamenti epigenetici e l'instabilità cromosomica è importante valutare anche il ruolo della componente epigenetica nel modulare la sensibilità ai mutageni, oltre al ruolo dei fattori genetici e di quelli ambientali. I cambiamenti epigenetici, a loro volta, possono essere indotti da cause ambientali; li possiamo considerare, quindi, sia come fattori di suscettibilità che influenzano la sensibilità ai mutageni che come bersaglio degli agenti ambientali, aumentando in questo modo i punti di osservazione per valutare la risposta cellulare ad un insulto tossico. Tutto ciò al fine di ottenere informazioni integrate sul meccanismo d'azione di una sostanza e sui suoi effetti tossici,

adottando un approccio che rappresenta una stimolante opportunità per migliorare le conoscenze sulla relazione tra cambiamenti genetici (o epigenetici) ed effetti tossici, per identificare nuovi biomarcatori, per definire le cause ambientali di patologie umane e permettere così una corretta e affidabile identificazione e valutazione del rischio.

Bibliografia

- Jin JH, Clark AB, Slebos RJ, *et al.* Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nature Genetics* 2003;34(3):326-9.
- Marcon F, Andreoli C, Rossi S, Verdina A, Galati R, Crebelli R. Assessment of individual sensitivity to ionizing radiation and DNA repair efficiency in a healthy population. *Mutat Res* 2003;541:1-8.
- Marcon F, Palli D, Zufferli A, Mazzoli E, Siniscalchi E, Sera F, Saieva C and Crebelli R. Evaluation of radiation-induced chromosome instability in subjects with a family history of gastric cancer. *Biomarkers* 2009;14:226-34.
- Marcon F, Siniscalchi E, Silvestrini F, Giuliani A, Palli D, Crebelli R. Variazioni individuali dell'espressione genica e delle capacità di riparo del DNA valutate dopo trattamento con le radiazioni ionizzanti. In: Cometa MF, Di Consiglio E, Gemma S, Parisi L, Volpe MT (Ed.). *XIV Congresso Nazionale della Società Italiana di Tossicologia. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 6-9 febbraio 2006. Riassunti.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2006. (ISTISAN Congressi 06/C1) p. 201.
- Wu X, Gu J, Spitz M. Mutagen sensitivity: a genetic predisposition factor for cancer. *Cancer Res* 2007;67:3493-5.
- Wu X, Spitz M, Amos CI, Lin J, Shao L, Gu J, de Andrade M, Benowitz NL, Shields PG and Swan GE. Mutagen sensitivity has high heritability: evidence from a twin study. *Cancer Res* 2006;66:5993-6.

L'IMPATTO SULLA SALUTE DEL CICLO DEI RIFIUTI IN CAMPANIA: L'INDAGINE EPIDEMIOLOGICA

Lucia Fazzo

Reparto di Epidemiologia Ambientale

Introduzione

Il possibile impatto sulla salute degli impianti del ciclo dei rifiuti è stato oggetto di diversi studi epidemiologici nell'ultimo ventennio: eccessi di rischio di tumore e malformazioni congenite in popolazioni residenti in prossimità di tali impianti sono stati riportati da alcuni autori, ma il nesso causale non è al momento accertato.

Nel 2007 l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha pubblicato gli atti del Workshop dal titolo *Population health and waste management: scientific data and policy options* (1) durante il quale è stato fatto il punto sullo stato delle conoscenze. Le conclusioni:

"... la letteratura scientifica sugli effetti sanitari delle discariche fornisce alcune indicazioni sull'associazione tra la residenza vicino ad un sito di discarica ed effetti avversi sulla salute.

L'evidenza, in un certo modo più forte per gli effetti riproduttivi che per le patologie tumorali, non è sufficiente a stabilire la causalità dell'associazione. Comunque una risposta di sanità pubblica è necessaria a causa del piccolo ma significativo eccesso di rischio di diversi effetti avversi riproduttivi e dell'ampia proporzione di popolazione potenzialmente esposta a discariche; il livello dell'evidenza disponibile suggerisce che le implicazioni sanitarie potenziali non possono essere negate.

Riguardo agli inceneritori, un maggior numero di questioni sollevate è valido, rispetto alle discariche. Deve essere sottolineato che il più delle volte il confondimento rende gli studi difficili da interpretare e, come per le discariche, gli eccessi del rischio relativo sono difficili da rilevare poiché sono in generale causati da esposizioni a basse concentrazioni e a lungo termine. Diversi studi puntualizzano che un incremento di Sarcomi dei Tessuti Molli (STS) e di Linfomi non Hodgkin (NHL) supportano un possibile ruolo eziologico della 2,3,7,8TCDD. L'evidenza è inadeguata per trarre delle conclusioni che siano valutabili per guidare scelte di politica corrente sull'incenerimento: relativamente pochi studi di buona qualità esistono e si riferiscono per la maggior parte a impianti di incenerimento di vecchia generazione..."

Una revisione pubblicata successivamente conferma il grado di incertezza nella stima del nesso causale, soprattutto per quanto riguarda l'esposizione a discariche (2).

Obiettivi

In questo contesto di conoscenze, nel 2004 il Dipartimento della Protezione Civile ha commissionato all'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) un'indagine sui possibili effetti sanitari del ciclo dei rifiuti nelle province di Napoli e Caserta. La Regione Campania dal 1994 è commissariata dal governo nazionale per la gestione del ciclo dei rifiuti e 77 comuni delle province di Napoli e Caserta sono inseriti nel sito di interesse nazionale per le

bonifiche *Agro aversano e litorale domizio-flegreo*, a causa dei siti di smaltimento illegale di rifiuti urbani e industriali, presenti sul territorio fin dalla metà degli anni '80 (3).

Hanno partecipato allo studio, oltre all'Ufficio Ambiente e Salute della Regione Europea dell'OMS, i reparti Suolo e Rifiuti ed Epidemiologia ambientale del Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria dell'Istituto Superiore di Sanità, il Dipartimento di Fisiologia Clinica del CNR di Pisa, l'Osservatorio Epidemiologico e l'Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Campania e le ASL territorialmente competenti.

L'indagine ha avuto come obiettivo l'analisi della mortalità per cause tumorali e della prevalenza alla nascita di malformazioni congenite nei 196 comuni delle province di Napoli e Caserta e la valutazione della eventuale loro relazione con l'esposizione ambientale a rifiuti.

Il presente contributo illustra la metodologia e i risultati dei diversi studi svolti all'interno di questo progetto, già oggetto di specifiche pubblicazioni.

Materiali e metodi

Nella fase iniziale dell'indagine è stata eseguita un'analisi geografica della mortalità per cancro e della prevalenza alla nascita delle malformazioni congenite nei 196 comuni delle due province.

Per l'analisi di mortalità sono stati utilizzati i dati comunali ISTAT (anni 1994-2001), considerando 20 cause tumorali.

Per l'analisi della prevalenza delle malformazioni congenite alla nascita è stata utilizzata la banca dati del Registro dei difetti congeniti della regione Campania, che include i nati residenti nelle due province, nel periodo dal 1996 al 2002. I casi sono quelli accertati alla nascita e nel periodo postnatale, i feti nati morti dopo la ventesima settimana di gestazione e gli aborti terapeutici avvenuti prima della ventiquattresima settimana.

Sia per la mortalità che per le malformazioni congenite sono stati calcolati i Rapporti Standardizzati di Mortalità/Incidenza (SMR, con intervalli di confidenza al 95%) e gli stimatori bayesiani (BMR, con intervalli di credibilità al 95%), rispetto ai corrispondenti tassi regionali. Le analisi di mortalità sono state eseguite separatamente per i due generi (standardizzando per classe di età e periodo di calendario) e quelle di prevalenza delle malformazioni congenite per la popolazione totale (standardizzando per genere). Gli stimatori bayesiani, calcolati secondo Besag (4) e Mollié (5), rimuovono parte della variabilità casuale dovuta alla scarsa numerosità dei dati e al confondimento per la localizzazione di determinanti spazialmente strutturati non conosciuti.

I valori comunali di entrambe le stime, SMR e BMR, sia della mortalità che della prevalenza delle malformazioni congenite sono stati mappati.

Successivamente, è stata effettuata sulle stesse banche dati, un'analisi dei cluster, con l'obiettivo di evidenziare eventuali gruppi di comuni contigui con eccessi di mortalità e malformazioni congenite rispetto al resto dell'intera area delle due province in studio. Visto il ben noto effetto dello stato socioeconomico su molte delle patologie considerate, è stato considerato nell'analisi l'indicatore di deprivazione socioeconomica a livello comunale, così da avere i risultati al netto del suo possibile effetto. È stato quindi utilizzato l'indice di deprivazione (ID) costruito da Cadum e collaboratori (6) già utilizzato in molti studi di epidemiologia ambientale in Italia. L'ID è basato su cinque variabili socioeconomiche misurate al censimento '91. Nel presente studio, le cinque variabili sono state standardizzate rispetto al valore medio e alla deviazione standard della loro distribuzione nelle due

province. La somma algebrica delle cinque variabili standardizzate dà un valore di ID continuo; per l'utilizzo nell'analisi l'indice è stato poi categorizzato in quintili.

L'analisi dei cluster è stata eseguita per le 11 tipologie di malformazioni congenite precedentemente considerate, mentre per la mortalità sono state considerate solo quelle cause tumorali per le quali è presente in letteratura un'ipotesi a priori di associazione con la residenza in prossimità di siti di smaltimento dei rifiuti: trachea-bronchi e polmoni, fegato, stomaco, rene, vescica, sarcomi dei tessuti molli, linfomi non Hodgkin. L'analisi di mortalità è stata eseguita per la popolazione generale (standardizzando per genere) e per i due generi separatamente.

Il comune di Napoli, la cui popolazione rappresenta circa il 33% dell'intera provincia, è stato escluso dall'analisi al fine di prevenire una perdita di informazioni degli altri comuni.

L'analisi, quindi, è stata eseguita secondo le procedure *Spatial Scan Statistics* (7), assumendo che il numero di casi in ogni comune segua una distribuzione Poissoniana. La procedura identifica per ogni comune l'area circolare (il raggio massimo è stato fissato a 10 km) con il maggiore eccesso di casi e seleziona quelle che mostrano una differenza significativa con i valori attesi, in base al test della verosomiglianza (LRT). Il livello di significatività è stato fissato a $p < 0,05$ ($LRT > 7,16$). Le analisi sono state standardizzate per ID.

Per la valutazione dell'eventuale relazione degli eccessi sanitari con l'esposizione a rifiuti è stata eseguita un'analisi di regressione di Poisson, utilizzando il package STATA, tra l'indicatore di esposizione ambientale a rifiuti costruito a livello comunale e 9 cause tumorali di mortalità e la prevalenza delle 11 malformazioni congenite indagate negli studi precedenti. L'indicatore di rischio ambientale ai rifiuti è stato costruito da un gruppo di esperti in base al numero, tipologia e localizzazione delle discariche e dei siti illegali di smaltimento, così come risultano dal censimento dell'ARPA 2004, e la percentuale di popolazione comunale residente nei pressi di uno o più di questi siti: per la metodologia utilizzata si rimanda al capitolo di Beccaloni, nel presente Rapporto. Da tener presente che il censimento riporta i siti sul territorio al 2004, molti dei quali presenti fin dagli anni '80 (3). Per l'analisi di correlazione ad ogni comune è stata attribuita una classe di esposizione ambientale a rifiuti (in ordine crescente da 1 a 5) costruita con il metodo dei natural breaks, che minimizza la variabilità intraclasse e massimizza quella interclasse, sulla base del valore assoluto dell'indicatore di esposizione a rifiuti.

La classe 1, a minore esposizione, è stata presa di riferimento: il Rischio Relativo (RR) quindi rappresenta l'eccesso osservato in una specifica classe rispetto alla classe 1, e il trend esprime la variazione di rischio di una classe rispetto a quella precedente.

L'analisi ha incluso come covariata l'Indice di Deprivazione comunale, così come nell'analisi dei cluster. I risultati sono quindi al netto dell'effetto della deprivazione socioeconomica.

Risultati

Dalla prima analisi descrittiva è emersa una fascia di comuni a cavallo delle due province con un maggiore numero di eccessi statisticamente significativi (SMR e BMR) di mortalità e prevalenza di malformazioni congenite. Le cause in eccesso più ricorrenti sono risultate la mortalità per tumore dello stomaco, del fegato, della vescica, dei polmoni e del rene; le malformazioni congenite totali, dell'apparato urogenitale e del sistema cardiovascolare. Tale area coincide con il territorio maggiormente interessato da siti di smaltimento illegale di rifiuti e da discariche (Figura 1) (8).

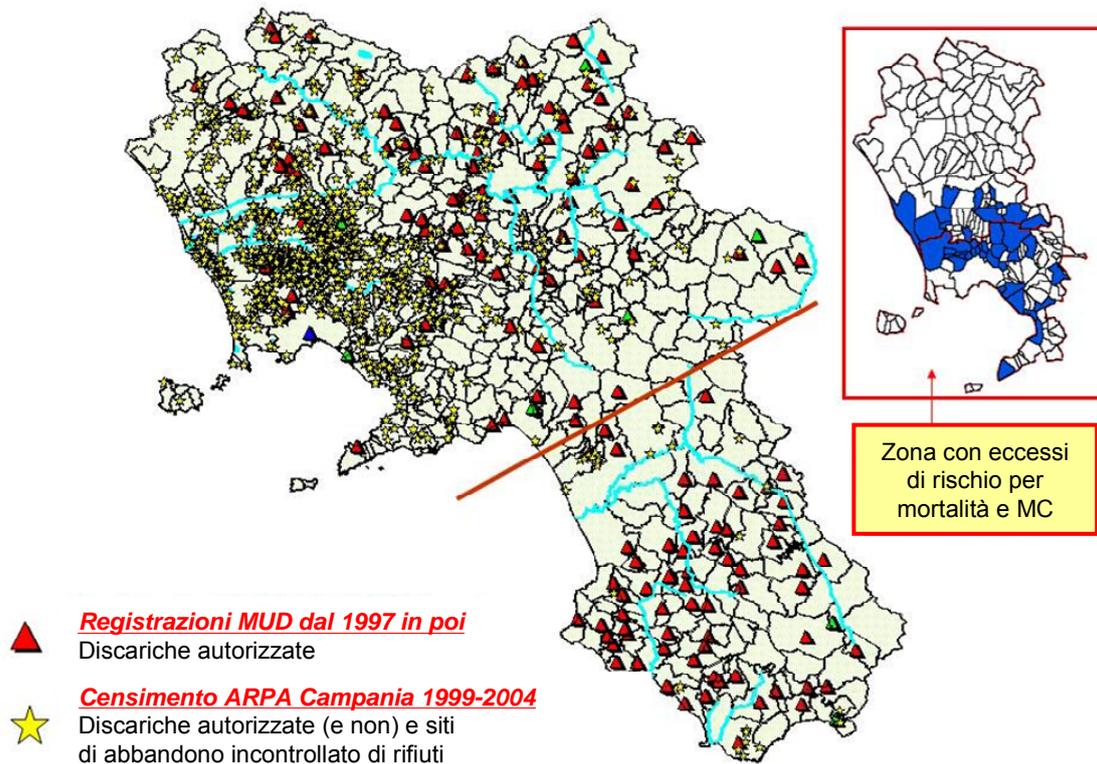
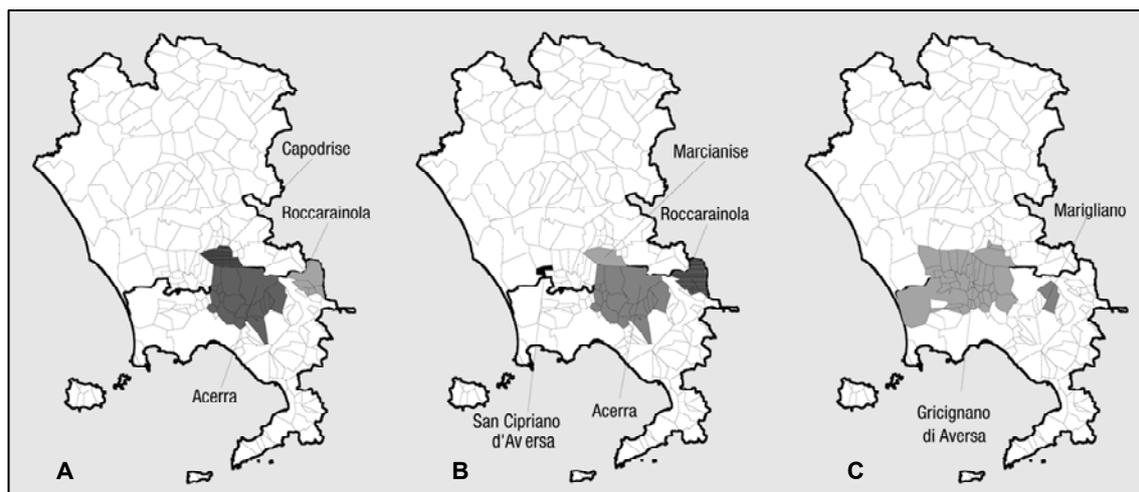


Figura 1. Mappa della distribuzione dei siti di smaltimento dei rifiuti in Campania e mappa dei comuni delle province di Napoli e Caserta con almeno 5 eccessi significativi di mortalità e di prevalenza di Malformazioni Congenite (SMR e BMR)

L'analisi dei cluster ha evidenziato cluster con eccessi significativi della mortalità per tumore del fegato, stomaco, vescica, rene e polmone. Per quanto riguarda la prevalenza di malformazioni congenite, sono risultati cluster significativi per le malformazioni totali, del sistema cardio-vascolare, del tratto urogenitale e degli arti. Quasi tutti i cluster risultano localizzati nell'area a cavallo delle due province, già emersa nell'analisi precedente (9). A titolo esemplificativo sono riportati i cluster significativi per la mortalità del fegato e dei dotti biliari nella popolazione generale e nei due generi (Figura 2).

I risultati dell'analisi di regressione sono riportati nelle Tabelle 1-3. Rischi relativi statisticamente in eccesso nella classe a più alta esposizione rispetto alla classe 1 sono stati trovati sia negli uomini che nelle donne per la mortalità totale (del 9 e 12% rispettivamente) e per la mortalità per tumore del fegato (19% negli uomini e 29% nelle donne). Trend in eccesso significativo di rischio sono stati trovati in entrambi i generi per la mortalità generale (2%), la mortalità per tutti i tumori (1%) e per tumore del fegato (4% negli uomini e 7% nelle donne); nei soli uomini trend significativi si sono riscontrati per la mortalità per tumore di trachea-bronchi e polmoni (2%) e tumore dello stomaco (5%).

Tra le malformazioni congenite, quelle del sistema nervoso e dell'apparato urogenitale hanno fatto registrare rischi relativi in eccesso significativo dell'83% nella classe 5 vs la classe 1; trend in eccesso significativo del 14% è stato trovato per le malformazioni dell'apparato urogenitale (10).



cluster n.	centroide	n, comuni	raggio (km)	casi osservati	casi attesi	RR	p-value
A							
1	Acerra	18	9,37	665	505,3	1,40	0,0003
2	Capodrise	2	1,03	91	45,3	2,04	0,0003
3	Roccarainola	5	3,22	58	30,4	1,93	0,0090
B							
1	Acerra	18	9,37	417	285,7	1,61	0,0003
2	Marcianise	1	-	53	22,0	2,46	0,0003
3	S. Cipriano d'Aversa	1	-	18	5,4	3,34	0,0160
4	Roccarainola	5	3,22	35	16,7	2,12	0,0463
C							
1	Marigliano	1	-	35	15,9	2,23	0,0123
2	Gricignano di Aversa	36	9,23	351	295,0	1,26	0,0880

Figura 2. Cluster statisticamente significativi di mortalità per tumore del fegato e dei dotti biliari (A: popolazione generale; B: uomini; C: donne)

Tabella 1. Regressione di Poisson - mortalità (1994-2001). Uomini. Rischi Relativi per i gruppi di Comuni classificati in base all'indice di pressione ambientale da smaltimento rifiuti (IR)

Cause di morte	Classe di IR					Trend
	I	II	III	IV	V	
Mortalità generale	1	1,05	1,08	1,04	1,09	1,02
Tutti i tumori	1	1,04	1,06	1,05	1,04	1,01
Tumore della trachea bronchi e polmoni	1	1,05	1,06	1,06	1,07	1,02
Tumore del fegato e dotti biliari	1	0,91	1,21	1,01	1,19	1,04
Tumore dello stomaco	1	1,03	1,03	1,19	1,16	1,05
Tumore della vescica	1	1,12	0,94	1,07	0,96	0,99
Tumore del rene	1	0,97	0,99	0,85	0,83	0,96
Sarcomi dei tessuti molli	1	0,90	0,80	0,69	1,25	0,96
Linfomi non Hodgkin	1	1,09	1,25	1,07	0,96	1,01

In grassetto i rischi statisticamente significativi con un livello di probabilità pari al 95%

Tabella 2. Regressione di Poisson - mortalità (1994-2001). Donne.
Rischi Relativi per i gruppi di Comuni classificati in base all'indice di pressione ambientale da smaltimento rifiuti (IR)

Cause di morte	Classe di IR					Trend
	I	II	III	IV	V	
Mortalità generale	1	1,02	1,08	1,05	1,12	1,02
Tutti i tumori	1	1,05	1,02	1,04	1,07	1,01
Tumore della trachea bronchi e polmoni	1	1,45	1,14	1,06	1,09	0,98
Tumore del fegato e dotti biliari	1	0,91	1,09	1,10	1,29	1,07
Tumore dello stomaco	1	0,92	0,94	1,02	1,17	1,03
Tumore della vescica	1	1,08	0,87	0,97	0,83	0,97
Tumore del rene	1	1,07	1,11	1,03	1,09	1,02
Sarcomi dei tessuti molli	1	1,08	1,84	1,34	1,00	1,08
Linfomi non Hodgkin	1	1,10	1,04	1,20	1,00	1,02

In grassetto i rischi statisticamente significativi con un livello di probabilità pari al 95%

Tabella 3. Regressione di Poisson - malformazioni congenite (1996-2002).
Rischi Relativi per i gruppi di comuni classificati in base all'indice di pressione ambientale da smaltimento rifiuti (IR)

Malformazioni congenite (MC)	Classe di IR					Trend
	I	II	III	IV	V	
MC totali	1	1,09	1,14	0,93	1,05	0,99
MC del sistema nervoso	1	1,22	1,45	0,97	1,83	1,08
Difetti del tubo neurale	1	1,09	1,22	0,90	1,45	1,02
MC cardiovascolari	1	1,04	1,16	0,83	0,86	0,95
MC palatolabbro	1	1,18	0,97	1,19	0,98	1,02
MC dell'apparato digerente	1	0,91	0,77	0,86	0,58	0,93
MC dei genitali esterni	1	1,04	1,40	0,83	0,91	0,97
Ipospadi	1	1,16	1,37	0,94	0,94	0,97
MC dell'apparato urogenitale	1	1,23	1,26	1,54	1,83	1,14
MC muscolo-scheletriche	1	1,25	0,90	1,00	1,42	1,01
MC degli arti	1	0,92	0,99	0,90	0,89	0,98
MC cromosomiche	1	1,52	1,39	0,89	0,97	0,94

In grassetto i rischi statisticamente significativi con un livello di probabilità pari al 95%

Discussione e conclusioni

Prima di un commento dei risultati alcune osservazioni sono necessarie.

Le patologie considerate sono ad eziologia complessa e il territorio presenta molteplici cause potenziali. Quindi, il possibile ruolo di uno di questi fattori, come l'esposizione ambientale a rifiuti, va letto all'interno di un processo eziologico multifattoriale della patologia in esame.

Inoltre, il disegno di studio geografico a livello comunale può suggerire un'ipotesi di relazione tra patologie ed esposizione, ma l'accertamento del nesso causale richiede studi di tipo analitico. Il confondimento da deprivazione socioeconomica, essendo stato preso in considerazione attraverso un indicatore a scala comunale, potrebbe non essere stato

completamente azzerato. Così come la stima dell'esposizione costruita a livello comunale, utilizzata nell'analisi di correlazione, è un'approssimazione di quella individuale, seppure sia riconosciuta avere un valore intrinseco negli studi su fattori che agiscono a livello di popolazione (11). Inoltre, l'indicatore utilizzato è stato costruito in base alle informazioni disponibili che però non sono esaustive né di tutti i siti presenti sul territorio (per quanto riguarda quelli illegali) né degli inquinanti presenti in ciascun sito e delle vie di contaminazione da essi seguite nelle diverse matrici ambientali. Tali limiti sono presenti in diverse indagini di epidemiologia ambientale in contesti di questo tipo (12).

D'altra parte gli esiti studiati, mortalità per cause tumorali e prevalenza di malformazioni congenite, la prima a più lunga latenza e la seconda a latenza breve, paiono essere idonei ad indagare i possibili effetti sanitari dell'esposizione a sorgenti presenti fin dai primi anni '80.

Nonostante i limiti, l'insieme dei risultati delle diverse analisi avvalorano l'ipotesi di una relazione tra la mortalità per cause tumorali specifiche e la prevalenza di alcune malformazioni congenite con esposizioni ambientali legate alla presenza di siti di smaltimento incontrollato di rifiuti. La correlazione misurata, in particolare, è compatibile con l'osservazione di un fenomeno reale legato alla compromissione ambientale dovuta alla presenza di siti illegali di smaltimento dei rifiuti urbani e industriali.

L'indagine ha evidenziato alcune subaree a maggior rischio dove concentrare prioritariamente gli interventi di risanamento ambientale e di prevenzione, oltre a studi di monitoraggio ambientale e di epidemiologia ambientale di tipo analitico per una migliore comprensione del fenomeno.

I risultati di questo studio avvalorano l'urgenza della bonifica delle aree contaminate e dell'interruzione immediata delle attività illegali nella gestione e smaltimento dei rifiuti, con il ripristino della legalità e di un circuito virtuoso a partire dalla riduzione dei rifiuti e dalla raccolta differenziata, così come richiesto dalle normative europee e dalle indicazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità.

In questo percorso, le indagini qui presentate forniscono elementi conoscitivi per un'adeguata informazione agli amministratori e alle popolazioni per un coinvolgimento della popolazione nei processi decisionali, garantendo le istanze di trasparenza e partecipazione.

Attualmente il Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria dell'ISS è impegnato in due ulteriori indagini.

La prima riguarda l'analisi dell'incidenza della patologia oncologica, che vede la collaborazione del Reparto di Epidemiologia Ambientale e del Registro Tumori della Regione Campania, che opera presso la ASL Napoli 4. Il registro comprende i casi incidenti residenti al momento della diagnosi in uno dei 35 comuni dell'area nord della provincia di Napoli, territorio di competenza della ASL Napoli 4. Non è stato possibile considerare l'intera area delle due province precedentemente indagate non essendoci al momento un registro tumori che copra l'intero territorio regionale; la subarea dei 35 comuni riveste comunque un particolare interesse, essendovi stato attivato recentemente il primo inceneritore di rifiuti della Campania.

Inoltre, è in corso un progetto di ricerca sui contaminanti organici persistenti nell'ambiente, che prevede uno studio di coorte sullo stato sanitario e sui livelli di accumulo nel latte materno in gruppi di popolazione a differente rischio di esposizione nella regione Campania (Convenzione. ISS-Regione Campania; in collaborazione con l'Istituto di Fisiologia Clinica del CNR di Pisa, l'osservatorio epidemiologico della regione Campania, le ASL territorialmente competenti e il registro tumori della ASL Napoli 4), il cui responsabile scientifico è il direttore del Dipartimento Ambiente.

Ringraziamenti

Si ringrazia Massimo Corbo, del Reparto di Epidemiologia Ambientale, che ha curato gli aspetti grafici.

Bibliografia

1. World Health Organization. Regional Office for Europe. *Population health and waste management: scientific data and policy options*. Report on WHO workshop. Rome, Italy, 29-30 March 2007. Copenhagen: WHO; 2007.
2. Porta D, Milani S, Lazzarino AI, Perucci CA, Forastiere F. Systematic review of epidemiological studies on health effects associated with management of municipal solid waste. *Environ Health* 2009;8:60. doi:10.1186/1476-069X-8-60.
3. Legambiente - Osservatorio Ambiente e legalità. *Rapporto Ecomafia 2009. Le storie e i numeri della criminalità ambientale*. Milano: Edizioni Ambiente; 2009
4. Besag J, York J, Mollié A. Bayesian image restoration, with two applications in spatial statistics. *Annals of the Institute of Statistical Mathematics* 1991;43:1-59.
5. Mollié A. Bayesian mapping of Hodgkin's disease in France. Spatial epidemiology. In: Elliott P, Wakefield JC, Best NG, Briggs DJ (Ed.). *Methods and Applications*. Oxford: Oxford University Press; 2000. pag. 267-85.
6. Cadum E, Costa G, Biggeri A, Martuzzi M. Deprivation and mortality: e deprivation index suitable for geographical analysis of inequalities. *Epidemiol Prev* 1999;23:175-87.
7. Kulldorff M. A spatial scan Statistic. *Communications in Statistics: Theory and Methods* 1997;26:481-96.
8. Comba P, Bianchi F, Fazzo L, Martina L, Menegozzo M, Minichilli F, Mitis F, Musmeci L, Pizzuti R, Santoro M, Trinca S, Martuzzi M. and "Health Impact of waste management Campania" Working Group. Cancer mortality in an area of Campania (Italy) characterized by multiple toxic dumping sites. *Ann NY Acad Sci* 2006;1076:449-61.
9. Fazzo L, Belli S, Minichilli F, Mitis F, Santoro M, Martina L, Pizzuti R, Comba P. Cluster analysis of mortality and malformations in the provinces of Naples and Caserta (Campania Region). *Ann Ist Super Sanità* 2008;44:99-111.
10. Martuzzi M, Mitis F, Bianchi F, Minichilli F, Comba P, Fazzo L. Cancer mortality and congenital anomalies in a region of Italy with intense environmental pressure due to waste. *Occup Environ Med* 2009;66:725-32.
11. Pearce N. Traditional epidemiology, modern epidemiology and public health. *Am J Public Health* 1996;6:678-83.
12. Elliott P, Richardson S, Abellan JJ *et al*. Geographic density of landfill sites and risk of congenital anomalies in England: authors' response. [Letter] *Occup Environ Med* 2009;66(2):140.

MIGRAZIONE DI PLASTIFICANTI IN ALIMENTI OMOGENEIZZATI PER PRIMA INFANZIA

Cinzia Gesumundo, Silvia Giamberardini
Reparto di Esposizione e rischio da materiali

Introduzione

L'olio di soia epossidato (ESBO) (Figura 1) è impiegato come plastificante e stabilizzante per guarnizioni in PVC di coperchi metallici per vasi e bottiglie di vetro nel settore dei contenitori per alimenti. Anche nel settore degli omogeneizzati per l'infanzia l'ESBO trova largo impiego in quanto garantisce ottima ermeticità al prodotto alimentare confezionato, destinato ad essere conservato per lungo periodo (1).

È stato dimostrato che l'ESBO può migrare dalle guarnizioni agli alimenti, specialmente, ma non esclusivamente, durante i trattamenti a caldo (es. sterilizzazione), ed essere infine assimilato (1)

I prodotti maggiormente toccati da questo problema sono i prodotti alimentari grassi e oleosi, in quanto l'ESBO ha elevata alta solubilità in ambiente lipofilo.

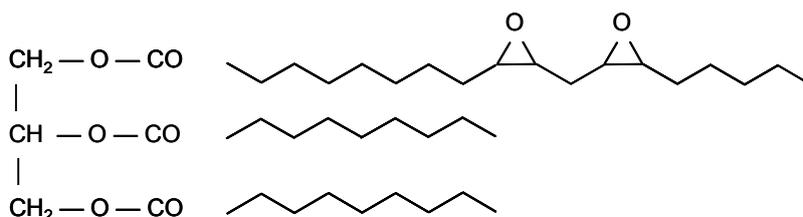


Figura 1. Formula di struttura dell'Olio di Soia Epossidato (ESBO); miscela di trigliceridi a composizione media di acidi grassi

Scopo del lavoro

È stato effettuato uno studio sulla migrazione di ESBO in omogeneizzati per prima infanzia, contenuti in vasetti di vetro con chiusure metalliche. La migrazione è stata correlata con alcuni parametri degli alimenti e delle chiusure a scopo predittivo. Viene discussa la correlazione fra migrazione di ESBO e:

- a) tipologia di alimento
- b) contenuto in lipidi
- c) natura dei componenti dell'alimento
- d) geometria della guarnizione.

Parte sperimentale

È stato utilizzato il metodo di Castle *et al.* 1988 (2) modificato ad hoc per l'analisi di ESBO in omogeneizzati per l'infanzia in quanto non esistevano metodi specifici già standardizzati. Essenzialmente il metodo analitico si compone di tre parti (Figura 2):

1. *Estrazione*: L'ESBO viene estratto da una porzione nota di alimento mediante ripartizione con acetone/esano (1:4) una miscela altamente lipofila. In questa fase viene aggiunto uno standard interno (metil cis, cis-11,12,14-diepossieicosanoato metil estere per garantire accuratezza e precisione
2. *Purificazione*: La frazione lipofila estratta viene sottoposta a trans-esterificazione con sodio metossido per convertire in metilesteri la miscela di trigliceridi degli acidi grassi presenti.
3. *Derivatizzazione e analisi GC/MS*: Viene effettuata la derivatizzazione con borotrifluoro eterato in presenza di ciclopentanone. Gli anelli ossiranicici dell'ESBO, così derivatizzati vengono pertanto protetti dallo stress termico dell'iniezione in GC, e nello stesso tempo viene aumentato il peso delle molecole e conseguentemente la risoluzione cromatografica. Viene applicata la standardizzazione esterna, con soluzioni di calibrazione in olio di oliva.

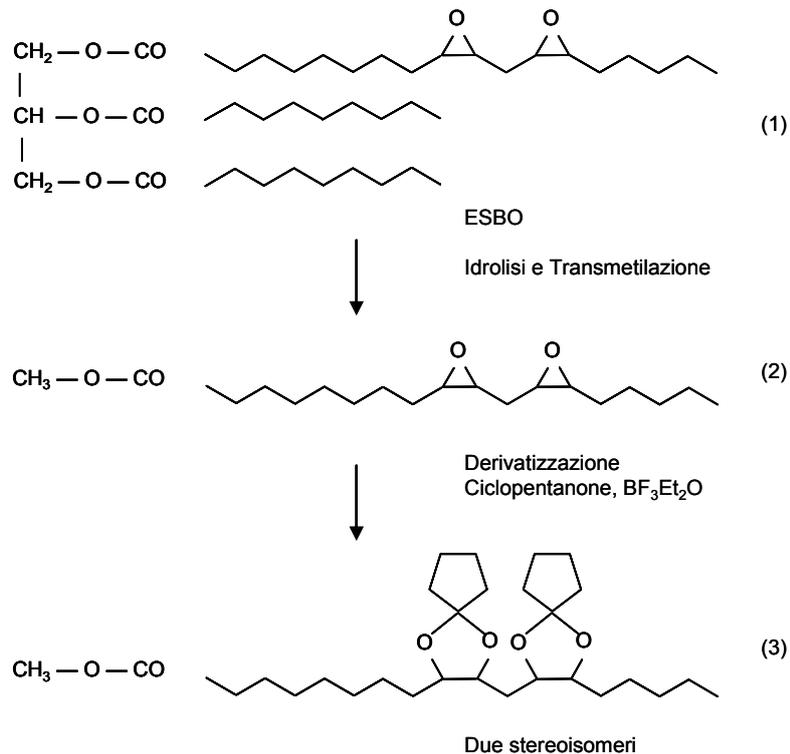


Figura 2. Reazioni di idrolisi, transesterificazione e derivatizzazione dell'ESBO

La ricerca dell'ESBO migrato è stata effettuata su 19 tipi di omogeneizzati per l'infanzia presenti nel mercato comunitario (4 differenti marche) (Tabella 1).

Porzioni note di omogeneizzato (ca. 30 g) sono state addizionate con lo standard interno e sottoposte al procedimento di estrazione e di analisi sopra descritto, includendo anche un bianco reattivi. L'analisi GC/MS-SIM ha fornito cromatogrammi tipici (Figure 3 e 4) dove si osservano la risoluzione dei picchi di ESBO e dello standard interno nelle condizioni di prova, relativamente a una soluzione standard e un campione di alimento.

Tabella 1. Elenco campioni analizzati

	Tipo	Ditta
1	Vitello	A
2	Agnello	A
3	Pollo	A
4	Salmone	A
5	4 Frutti	A
6	Formaggino	A
7	Coniglio	A
8	Tacchino	A
9	Prosciutto	A
10	Pollo	B
11	Coniglio	B
12	Prosciutto	B
13	Frutta Mista	B
14	Orata	B
15	Vitello	B
16	Agnello	B
17	Tacchino	C
18	Manzo	C
19	Pollo	D

La retta di calibrazione (Figura 5) è risultata lineare ($r_{xy} = 0,9970$) anche per gli ampi intervalli (1- 2800 mg/kg olio) necessari per questo tipo di indagine. Il range di calibrazione infatti è stato tenuto molto ampio poiché non erano noto in precedenza i possibili livelli di ESBO negli alimenti.

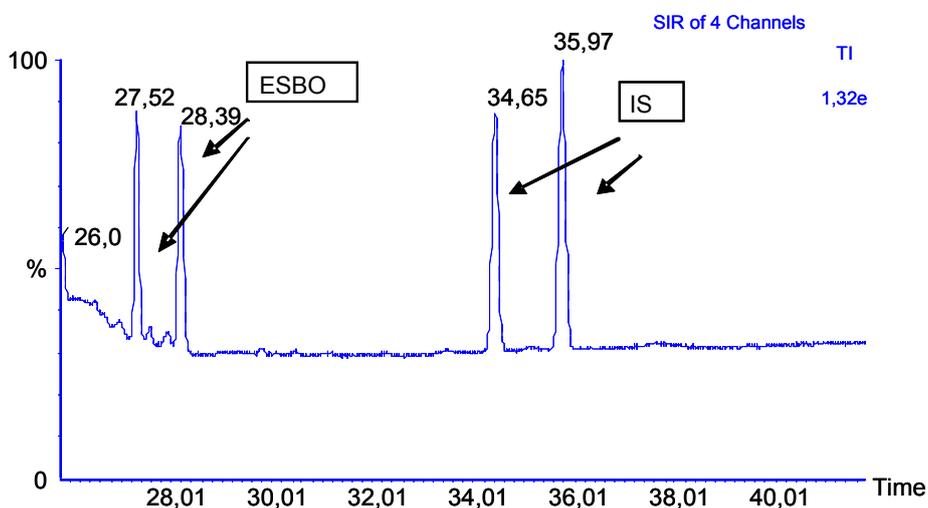


Figura 3. Standard ESBO ca 90 mg/kg e standard interno

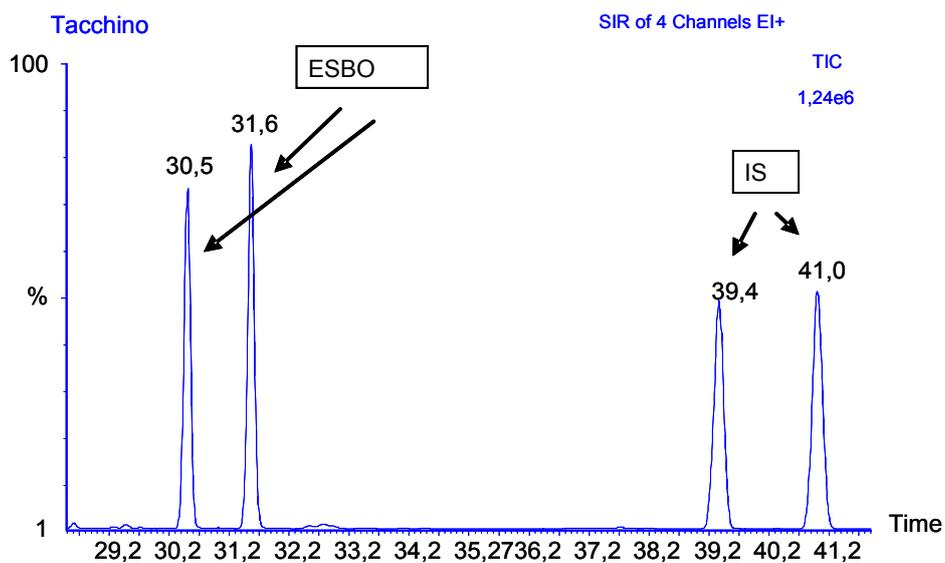


Figura 4. Campione di tacchino della ditta C, presenza di ESBO (1,2 mg/kg)

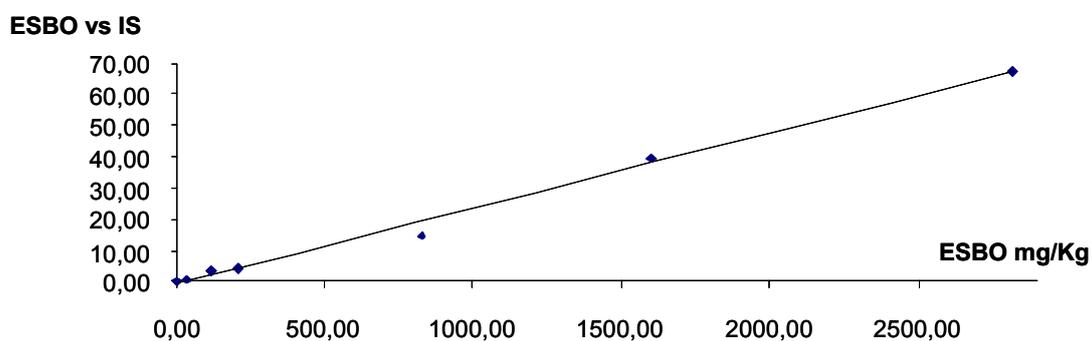


Figura 5. Retta di calibrazione ESBO in olio

Risultati e discussione

La Tabella 2 riporta i risultati ottenuti, distinti per ogni singolo campione analizzato. L'ESBO è stato riscontrato in quasi tutti gli omogeneizzati testati e conferma l'uso di questo plastificante nelle guarnizioni di capsule metalliche.

L'89,5% dei campioni analizzati è risultato al di sotto del limite di 30 mg/kg e il 95% dei campioni al di sotto del limite di 60 mg/kg alimento (DM 21 marzo 1973 e agg.) (3).

In alcuni campioni di frutta e un tipo di coniglio sono stati riscontrati livelli di ESBO minori del LOQ (0,1 mg/kg) mentre in altri campioni quali agnello (campione A), orata con verdure (campione B) e prosciutto (campione A), sono stati riscontrati valori superiori a 30 mg/kg.

Tabella 2. Risultati analisi ESBO migrato in omogeneizzati (mg/kg)

Ditta	Denominazione	ESBO mg/kg	
A	Agnello	vasetto 1	13,6
		vasetto 2	71,9
		vasetto 3	25,1
		vasetto 4	19,0
B	Agnello	3,9	
A	Coniglio	1,8	
B	Coniglio	vasetto 1	< 0,1
		vasetto 2	< 0,1
A	4 Frutti	0,1	
B	Frutta Mista	vasetto 1	< 0,1
		vasetto 2	<0,1
A	Formaggino	vasetto 1	0,2
		vasetto 2	0,3
		vasetto 3	0,3
C	Manzo	2,3	
A	Orata	vasetto 1	17,2
		vasetto 2	86,5
		vasetto 3	20,4
		vasetto 4	38,4
A	Pollo	1,4	
B	Pollo	1,3	
D	Pollo	5,3	
A	Prosciutto	vasetto 1	28,4
		vasetto 2	54,4
		vasetto 3	42,8
		vasetto 4	55,9
		vasetto 5	52,1
		vasetto 6	62,1
		vasetto 7	88,1
A	Prosciutto	vasetto 1	19,8
		vasetto 2	13,9
		vasetto 3	12,2
A	Salmone	15,3	
A	Tacchino	4,4	
C	Tacchino	1,2	
A	Vitello	2,3	
B	Vitello	14,3	

Poiché l'ESBO è una sostanza lipofila e come tale la sua migrazione può essere influenzata dal contenuto grasso dell'alimento, si è approfondita la correlazione tra la quantità di ESBO migrato e il contenuto lipidico dichiarato in etichetta. I risultati sono mostrati in Figura 6. Come si osserva non è stata riscontrata correlazione immediata tra contenuto di lipidi dichiarato in etichetta e quantità di ESBO migrata. Infatti, in alimenti con quantità di grasso analoghe (3-5%) la migrazione di ESBO è risultata diversa. Il caso più evidente è il formaggino (grasso ca 7%) nel quale la migrazione di ESBO è risultata simile a quella della frutta (grasso < 0,5%).

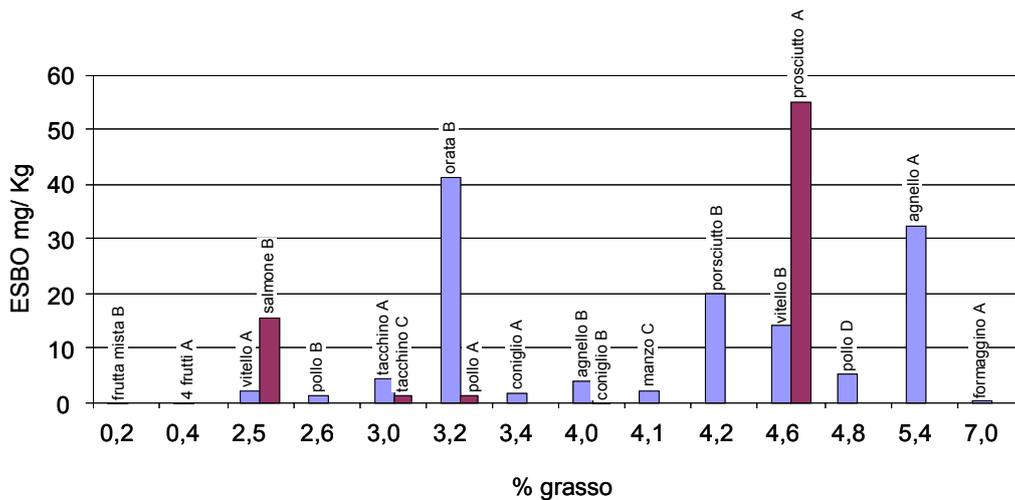


Figura 6. Correlazione tra ESBO migrato e quantità di grasso: tutti gli alimenti

Se si considera la tendenza della migrazione di ESBO in alcuni sottogruppi, si possono però proporre alcune osservazioni. Si consideri la correlazione fra ESBO migrato contenuto lipidico nel gruppo degli omogeneizzati a base di carne (Figura 7).

Innanzitutto si osserva una tendenza generale, nel gruppo, all'aumento di migrazione con l'aumento della percentuale di grasso. Però, si osserva contemporaneamente che la carne di maiale si stabilizza a livelli più alti di quella del vitello, pur nello stesso ordine di grandezza di contenuto di grasso; questo andamento può essere attribuito non solamente alla quantità di grasso contenuto nell'alimento, ma anche alla natura del grasso. Infatti la composizione del grasso della carne di maiale è significativamente differente da quella di coniglio. Per coniglio, tacchino, pollo, vitello e manzo il livello di migrazione rimane basso (0-15 mg/kg) e non c'è correlazione tra ESBO migrato e % di grasso dichiarato. Nel caso dell'agnello i due livelli misurati (4 e 32 mg/kg) sono stati ottenuti su campioni di due differenti produttori.

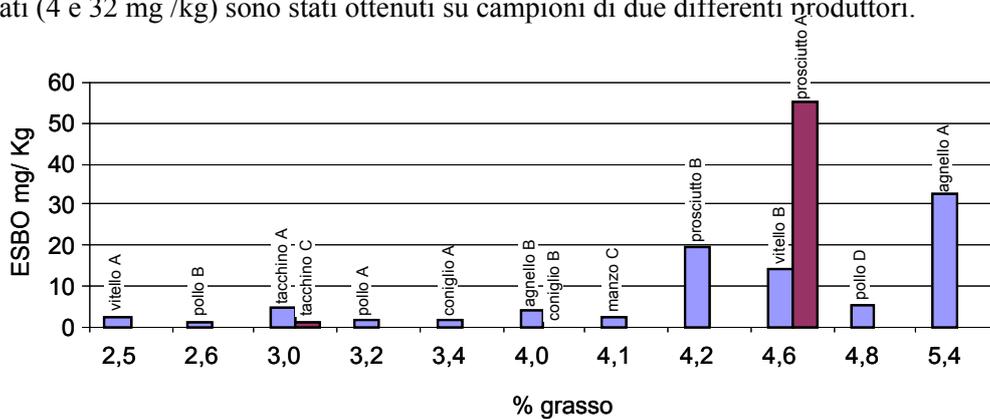


Figura 7. ESBO migrato vs quantità di grasso: carne

Si può quindi ipotizzare che la migrazione di ESBO sia correlata non solo alla quantità di grasso ma anche al tipo di grasso. Si considerino infatti i livelli di migrazione in campioni di pesce. Se si paragonano i livelli di migrazione di ESBO riscontrati nel pesce, con i livelli di migrazione riscontrati in campioni di carne con stesso livello di grasso (Figura 6 e Figura 8), si notano nel pesce

livelli di ESBO più elevati. Ciò, in prima ipotesi può essere attribuito alla maggior quantità acidi grassi polinsaturi che sono caratteristici dei pesci. Quindi la mobilità del grasso può essere un altro parametro cruciale, infatti è noto che la migrazione dell'ESBO è veicolata dall'effetto solubilizzante della frazione lipofila dell'alimento che si adsorbe nella struttura porosa della chiusura durante la sterilizzazione. In altre parole, l'interazione fra guarnizione e alimento si instaura durante tutte le occasioni di contatto, ma viene facilitata durante la sterilizzazione a causa dell'aumento di temperatura che facilita la mobilitazione delle sostanze.

Questa ipotesi può essere confermata dai dati del formaggio, che ha la più alta percentuale di grasso rispetto a tutti gli alimenti campionati (circa 7%), mentre si riscontra in tale alimento la minima migrazione. L'ipotesi è suggestiva della scarsa mobilità di frazioni lipoproteiche, abbondanti nei derivati del latte.

Infine è stata studiata la correlazione tra ESBO migrato e design della capsula, in considerazione del fatto che è noto che maggiore è la superficie di contatto fra contenitore e alimento, maggiore può essere la migrazione dell'ESBO.

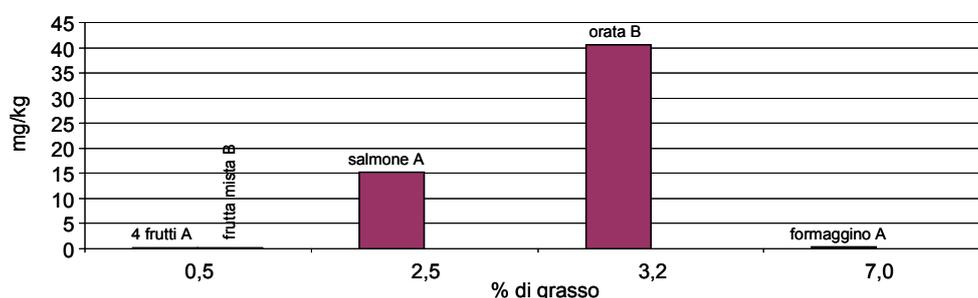


Figura 8. ESBO migrato vs quantità di grasso: altri alimenti

A questo scopo è stato misurato il rapporto Superficie di contatto delle capsule /Volume di alimento ed è stata studiata la possibile correlazione con l'ESBO migrato (Figura 9).

Anche in questo caso non si è osservata correlazione tra ESBO migrato e design della capsula. Si è notato, senza però disporre della base di dettaglio sufficiente ad avanzare alcuna spiegazione, che le capsule i A e B hanno valori di migrazione più alti rispetto a C e D. All'interno dello stesso produttore, si è osservato infine che la migrazione è estremamente variabile.

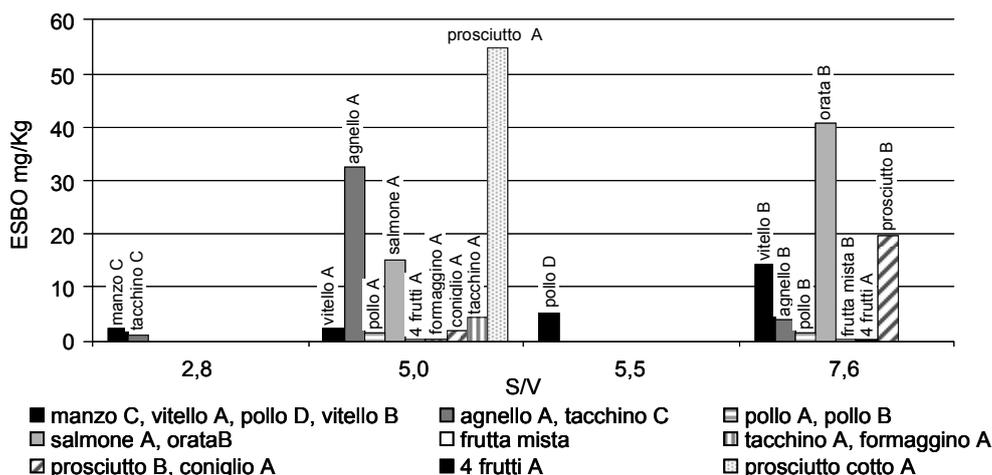


Figura 9. Correlazione tra ESBO e design della capsula

Conclusioni

I risultati ottenuti confermano l'uso di ESBO nelle guarnizioni delle chiusure metalliche per i contenitori in vetro per omogeneizzati per infanzia e la differente migrazione di questo plastificante nei differenti tipi di alimento. Il 95% dei campioni è risultato al disotto dei limiti di legge applicabili.

Sono stati ottenuti risultati utili per predire il comportamento migrazionale di alcuni tipi di omogeneizzati, e in particolare è stata osservata:

- la maggior migrabilità di ESBO in agnello, pesce e maiale;
- la minor migrabilità di ESBO in carni avicunicole e bovine;
- migrazione di ESBO trascurabile in frutta e formaggino.

Non è stata osservata correlazione fra migrazione di ESBO contenuto lipidico dichiarato nell'alimento e design della capsula.

I dati ottenuti e le osservazioni effettuate costituiscono comunque un patrimonio di miglior conoscenza del fenomeno di migrazione dell'ESBO e quindi permettono una miglior finalizzazione di monitoraggi per la sicurezza alimentare dei piccoli consumatori.

La ricerca prosegue con la caratterizzazione del grasso per correlazioni più puntuali.

Bibliografia

1. Simoneau C. *Exposure assessment of epoxidised soybean oil in baby foods for infant: review of data and assessment*. EUR 21372 EN: European Community; 2004.
2. Castle L, Sharman M, Gilbert J. Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Determination of Epoxidized Soybean Oil Contamination of Foods by Migration from Plastic Packaging. *J Assoc Off Anal Chem* 1988;71(6):1183-6 .
3. Hammarliijng L, Gustavsson H, Svensson K, Karlsson S, Oskarsson A. Migration of epoxidized soya bean oil from plasticized PVC gaskets into baby food. *Food Additives and Contaminants* 1998;15(2):203-8.
4. Italia. Decreto Ministeriale 21 Marzo 1973. Disciplina igienica degli imballaggi, recipienti, utensili, destinati a venire in contatto con le sostanze alimentari o con sostanze d'uso personale. *Gazzetta Ufficiale - Supplemento Ordinario* n. 104, 20 aprile 1973 e successivi aggiornamenti.

VALUTAZIONE DEL RISCHIO CRONICO E ACUTO PER I RESIDUI DEI PRODOTTI FITOSANITARI IN MATRICI VEGETALI

Angela Santilio
Reparto di Antiparassitari

Introduzione

L'impiego dei prodotti fitosanitari per uso agricolo può comportare rischi derivanti dalla possibilità che l'uomo, attraverso gli alimenti, ingerisca residui di sostanze attive con le quali i prodotti vegetali sono stati trattati in campo o dopo la raccolta.

A tutela della salute del consumatore l'Unione Europea (UE) fissa limiti massimi di residui (LMR), compatibilmente con le pratiche agricole, per ciascuna combinazione sostanza attiva/prodotto allo scopo di proteggere tutti i consumatori comprese le fasce più vulnerabili quali i bambini e gli anziani.

Gli LMR sono fissati sulla base di studi sperimentali controllati e mediante metodi di calcolo applicati in sede comunitaria e riconosciuti in sede internazionale da organismi come il *Codex Alimentarius* e il *Joint Meeting Pesticide Residue* (JMPR).

Ogni valore di LMR fissato per le varie combinazioni sostanza attiva/prodotto viene valutato per determinare l'eventuale rischio cronico e acuto a cui l'individuo può essere esposto attraverso la dieta.

La valutazione del rischio viene effettuata usando modelli di calcolo che permettono il confronto tra l'entità dell'esposizione e la tossicità intrinseca della sostanza attiva, quest'ultima definita dalla dose giornaliera accettabile e dalla dose acuta di riferimento.

I limiti massimi di residui

Per residuo di un prodotto fitosanitario o semplicemente residuo si intende una o più sostanze, inclusi i metaboliti e i prodotti derivanti dalla degradazione o dalla reazione, presenti in o su vegetali o prodotti di origine vegetale e animale destinati al consumo umano e costituenti residui dell'impiego di prodotto fitosanitario.

I residui di una sostanza attiva vengono determinati e identificati sulla base di considerazioni derivanti da studi di metabolismo vegetale e animale, che forniscono informazioni sul destino della sostanza attiva nel vegetale o nell'animale. Tali studi permettono di identificare il residuo come composto genitore e/o come metabolita nelle differenti parti della piante, nei differenti organi e/o tessuti dell'animale.

A tutela della salute del consumatore l'UE fissa Limiti Massimi di Residui (LMR) per ciascuna combinazione sostanza attiva/prodotto di origine vegetale e animale.

Per Limite Massimo di Residui si intende la massima concentrazione del residuo di sostanza attiva presente sulle derrate agricole, dopo trattamento con un prodotto fitosanitario in accordo alle Buone Pratiche Agricole (BPA), ossia sulla base del rispetto delle condizioni di impiego (dosi, numero di trattamenti, intervallo di sicurezza). La BPA prevede le quantità di prodotto

fitosanitario, il numero di trattamenti e l'intervallo di sicurezza necessari per ottenere l'effetto desiderato, ossia il contrasto del patogeno.

Gli LMR vengono definiti sulla base di studi sperimentali condotti in condizioni controllate, ossia rispettando le condizioni di BPA e conducendo gli studi sperimentali in regime di Buona Pratica di Laboratorio (BPL). Lo studio sperimentale mi permette di ottenere i valori dei residui ad un tempo t che intercorre tra l'ultimo trattamento e la raccolta del prodotto. Tali valori di residuo sono utilizzati per calcolare un valore di residuo massimo che potrebbe diventare un LMR solo dopo la valutazione del rischio.

Per il calcolo del residuo massimo esistono due metodi di calcolo statistico uno basato su una distribuzione normale e l'altro su una distribuzione statistica al 75% quantile.(1)

Il primo metodo denominato metodo I si basa sull'assunzione che i valori dei residui ottenuti da prove sperimentali si distribuiscono secondo una distribuzione normale. Il calcolo prevede la determinazione della media, della deviazione standard e dei valori dei residui massimi ad un tempo t . Questo permette di calcolare l'LMR ad un certo intervallo di raccolta o viceversa un intervallo di raccolta per un valore di residuo massimo fissato. Il metodo I permette il calcolo degli *Outliers* ma essendo il numero dei dati sperimentali disponibili, massimo 8, non idoneo ad una corretta identificazione statistica degli outliers nessun valore di residuo viene scartato come outliers. Unica eccezione si presenta quando si evidenziano valori critici di residui a seguito di metodi di analisi, campionamenti o analisi non valide.

Il secondo metodo denominato metodo II parte dal presupposto che non sempre i risultati provenienti dagli studi sui residui seguono una distribuzione normale. Il metodo II considera una distribuzione libera da parametri (quantile) ed è destinato a produrre livelli massimi dei residui da studi disponibili (circa 8 studi). Il metodo di calcolo non considera outliers e quindi tutti i valori vengono presi in considerazione.

Nella pratica comune il calcolo dei limiti massimi dei residui, con entrambi i metodi, viene eseguito con l'ausilio di un foglio di calcolo in excel dal quale si determinano i valori di Rmax (metodo I) ed Rber (metodo II).

L'uso del foglio di calcolo mi permette di ottenere parametri che vengono usati nel calcolo del rischio cronico e acuto. Tali parametri sono rispettivamente il valore del residuo mediano da trial supervisionati (*Supervised Trials Median Residue* - STMR) e il valore del residuo più alto (*High Residue* - HR).

In Tabella 1 si riporta un esempio di calcolo eseguito mediante il foglio excel. Si osservano i valori di STMR pari a 0,6 mg/kg e di HR pari a 2,92 mg/kg che verranno usati rispettivamente per la valutazione del rischio cronico e acuto. I valori di LMR ottenuti mediante i due metodi permettono di proporre un valore di LMR pari a 5 mg/kg il quale dovrà essere valutato per l'esposizione cronica e acuta.

Tabella 1. Calcolo LMR per pesche (regione: SEU)

Numero dati	Valori residuo mg/kg	STMR = 0.6 HR = 2.92	Metodo 1 (Rmax)	Metodo 2 (Rber)
1	0,11		n = 8	n = 8
2	0,25		K = 3,188	P = 0,75
3	0,34		Media = 1,100	J = 6
4	0,59		SD = 1,075	G = 0,75
5	0,61			R(J) = 1,54
6	1,54		LMR 1 = 4,526	R (J+1) = 2,44
7	2,44			R (0,75) = 2,215
8	2,92			LMR 2 = 4,430

La valutazione del rischio cronico e acuto

I limiti massimi di residui proposti per ciascuna combinazione sostanza attiva/prodotto sono sottoposti ad un processo di valutazione del rischio cronico e acuto per l'uomo (2) e il risultato della valutazione è decisivo per la fissazione del limite massimo del residuo definito come valore di legge.

Il processo di valutazione del rischio richiede la conoscenza sia della tossicità intrinseca della sostanza attiva sia dell'entità dell'esposizione.

Per quanto riguarda il primo fattore, è necessario conoscere il profilo tossicologico della sostanza attiva e in particolare la tossicità a lungo e a breve termine. I parametri tossicologici ottenuti da studi sperimentali mi permettono di definire l'assunzione giornaliera accettabile (*Daily Acceptable Intake* - ADI) e la dose acuta di riferimento (*Acute Reference Dose* - ARfD).

L'assunzione giornaliera accettabile (ADI) espressa in milligrammo di sostanza per chilogrammo peso corporeo, rappresenta la stima della quantità di sostanza, presente in un alimento che può essere ingerita giornalmente, per tutta la durata della vita di un individuo, senza apprezzabile rischio per la salute umana.

La dose acuta di riferimento (ARfD) è definita come la stima della quantità di sostanza, presente in un alimento, che può essere ingerita in un periodo di 24 ore o meno senza apprezzabile rischio per la salute umana. La ARfD è espressa in milligrammo di sostanza per chilogrammo di peso corporeo.

L'entità dell'esposizione, è correlata alle abitudini alimentari degli individui, all'età e alla particolare vulnerabilità di alcuni gruppi di popolazione come bambini e anziani. È necessario avere a disposizione dati relativi ai consumi per ogni gruppo di popolazione che verranno poi utilizzati nel calcolo dell'esposizione.

Come regola generale, se le stime dell'esposizione a breve e a lungo termine sono minori rispettivamente dell'ADI e dell'ARfD, allora i rischi per l'uomo sono considerati accettabili.

Il rischio cronico o rischio a lungo termine viene determinato assumendo che per stimare la massima ingestione possibile di una sostanza attiva con la dieta occorre prendere in considerazione tutti i possibili contributi di ogni alimento in cui tale sostanza attiva potrebbe essere presente al massimo livello possibile (il valore del LMR). Il parametro universalmente accettato per quantificare tale stima è l'assunzione massima giornaliera teorica (*Theoretical Maximum Daily Intake* - TMDI), definita nel modo seguente:

$$TMDI = \sum LMR_i \times C_i$$

in cui LMR_i è il limite massimo di residuo fissato per la sostanza attiva nell'alimento *i* e C_i è il dato di consumo medio, espresso in g/persona/giorno, dell'alimento.

Il valore della TMDI viene pertanto confrontato con il valore dell'ADI, calcolato per una persona di peso medio di circa 70 kg, ed espresso come percentuale dell'ADI.

Se il valore della TMDI, è maggiore dell'ADI (TMDI >100% ADI), l'esposizione non è accettabile e in linea di principio l'impiego della sostanza attiva su quei determinati alimenti non è autorizzabile alle condizioni di impiego proposte.

Il valore della TMDI costituisce una sovrastima, in quanto ci si pone nell'ipotesi in cui tutti gli alimenti siano contaminati al massimo del livello possibile e ipotizzando che tutto l'intero alimento contenga la stessa distribuzione del residuo. In realtà, è possibile che l'alimento contenga livelli di residuo minori dell'LMR e inoltre è possibile che solo una porzione dell'alimento contenga residui, e che tali residui siano ridotti da processi di conservazione, preparazione e cottura. Per questo motivo sono stati elaborati parametri più raffinati, che

consentono il calcolo di una stima più realistica, come l'assunzione giornaliera internazionale prevedibile (International Estimated Daily Intake - IEDI), che perfeziona il calcolo tenendo conto del valore della mediana (STMR) ricavata dalle prove residui, dei residui presenti nella sola porzione edibile (E_i) e degli effetti di processo e di cottura nei livelli di residui (P_i = fattore di processo). È definita dalla formula seguente:

$$IEDI = \sum STMR_i \times C_i \times E_i \times P_i$$

Nella maggior parte dei casi, tuttavia, viene utilizzata la TMDI per la stima del rischio, e solo quando tale parametro indica un'esposizione inaccettabile, si passa ai livelli più raffinati di stima.

La valutazione del rischio acuto risale al 2000 quando il JMPR (3) elaborò una metodologia atta ad effettuare il calcolo dell'esposizione. La metodologia viene applicata a tutt'oggi per la stima del rischio acuto. Il presupposto di base di tale metodologia è che l'esposizione ai residui di prodotti fitosanitari durante le 24 ore o meno può essere maggiore della media, in quanto il consumo di un particolare cibo in una singola occasione può essere molto più elevato rispetto al consumo medio. Inoltre, è possibile che una particolare porzione di alimento contenga un residuo più alto di quello medio, a questo si aggiunge che il livello di residuo in una singola unità di un frutto o ortaggio può essere più alto rispetto al residuo medio del lotto cui quella unità appartiene. La differenza di residuo tra una singola unità e un lotto viene espressa come variabilità del residuo (4-7) e calcolata come il fattore di variabilità (v).

Il metodo di calcolo (metodo deterministico) usato per la valutazione del rischio si basa sull'assunto che venga consumata una grande porzione di alimento contaminato al più alto livello possibile. Si parte dal presupposto che la sostanza attiva sia stata utilizzata alla più alta dose raccomandata, che l'alimento sia stato raccolto al più basso intervallo di sicurezza consentito dopo il trattamento, e che il residuo nella porzione commestibile coincida con il valore più alto tra quelli trovati nelle sperimentazioni.

Il parametro che viene adottato per la misura dell'esposizione acuta è l'IESTI e caso per caso si definiscono tre equazioni caratterizzate dai seguenti parametri:

LP (*Large Portion*): è il dato che proviene dalla dieta di riferimento, riferito come grande porzione relativa ai consumatori al 97,5° percentile del consumo. È misurata in kg di cibo/giorno.

HR (*High Residue*): è il valore di residuo nella porzione edibile più alto trovato nelle sperimentazioni sui residui. HR-P, è lo stesso valore riferito al prodotto processato, e calcolato da HR moltiplicandolo per il fattore di processo. È misurato in mg/kg.

bw (*Body Weight*): peso del consumatore espresso in kg.

U: unità di peso della porzione edibile espressa in kg.

v: fattore di variabilità

STMR: mediana calcolata dai risultati delle prove residui, in mg/kg. (STRM-P: nel campione processato).

Le equazioni, utilizzate per il calcolo dell'esposizione, si differenziano sulla base dell'unità di peso dell'alimento

Caso n. 1: U dell'intera porzione < 25 g.

La concentrazione del residuo in un campione o in un campione composito (fresco o processato) riflette quello della porzione tipica consumata in un pasto. In tal caso:

$$\text{IESTI} = \frac{(\text{LP} \times \text{HR} \text{ o } \text{HR-P})}{\text{bw}}$$

Caso n. 2 - U dell'intera porzione > 25 g.

La porzione tipica consumata in un pasto (come un singolo frutto o una parte di un ortaggio) potrebbe avere una concentrazione più alta di un campione medio.

Caso n. 2a - U < LP: l'unità di peso dell'intera porzione è più bassa di quello dell'intera porzione.

$$\text{IESTI} = \frac{[(\text{U} \times \text{HR} \text{ o } \text{HR-P} \times v) + (\text{LP} - \text{U}) \times \text{HR} \text{ o } \text{HR-P}]}{\text{bw}}$$

Caso n. 2b - U > LP: l'unità di peso dell'intera porzione è più alto di quello dell'intera porzione.

$$\text{IESTI} = \frac{(\text{U} \times \text{HR} \text{ o } \text{HR-P} \times v)}{\text{bw}}$$

Caso n. 3 - Si applica a campioni processati. In tali casi:

$$\text{IESTI} = \frac{(\text{LP} \times \text{STMR-P})}{\text{bw}}$$

Il valore dell'IESTI calcolato con una delle formule descritte viene confrontato con la dose acuta di riferimento (ARfD) e se l'esposizione stimata è maggiore della dose acuta di riferimento (IESTI > 100% ARfD) non è possibile assicurare la sicurezza del consumatore in quelle condizioni d'uso del prodotto fitosanitario.

Nelle equazioni corrispondenti al caso 2a e 2b compare il fattore di variabilità. Il fattore di variabilità riflette la variabilità dei livelli di residui in una unità individuale di derrate ed è un importante parametro introdotto per tener conto della variabilità dei residui nella valutazione del rischio acuto. Il fattore di variabilità è stato definito dalla consultazione FAO/WHO (8) e la sua definizione è la seguente: "il rapporto del 97.5° percentile dei livelli di residui, trovati in una singola unità o in una singola porzione per le derrate grandi o piccole, diviso per la media dei residui trovati in una singola unità."

Questa definizione formulata a *International Conference on Pesticide Residues Variability and Acute Dietary Risk Assessment* (9, 10) è stata successivamente accettata dal JMPR che propose i fattori di variabilità per differenti tipi di colture (11). Secondo quanto proposto dal JMPR i fattori di variabilità si differenziano in base al tipo di derrata e dal peso dell'unità individuale come riportato in Tabella 2.

Tabella 2. Fattori di Variabilità di default

Caratteristica della coltura	Fattore di Variabilità v
Unità di peso dell'intera porzione è > 250 g	5
Unità di peso dell'intera porzione è 25 - 250 g	7
Unità di peso dell'intera porzione è 25 - 250 g (trattamenti al suolo)	10
Unità di peso dell'intera porzione è < 25 g	non applicabile

In ambito comunitario, l'applicazione del fattore di variabilità si avvale di due possibilità. Quando non si hanno dati sperimentali che dimostrino il valore del fattore di variabilità si applica il valore di default che descrive lo scenario più drastico.

Nel caso in cui vengono effettuati studi sperimentali su singole unità di derrate che dimostrano un valore del fattore di variabilità diverso dal valore di default, per ogni specifica combinazione prodotto/sostanza attiva, si ricorre al suo uso nel processo di valutazione del rischio acuto.

Modelli di calcolo

Il calcolo dell'esposizione cronica e acuta viene effettuato mediante l'uso di modelli di calcolo che permettono l'elaborazione rapida dei dati e la valutazione dell'esposizione.

Prima dell'applicazione del Regolamento Comunitario 396/2005, ogni Stato Membro elaborava la valutazione del rischio usando i dati delle proprie diete nazionali insieme ai dati di consumo della dieta europea elaborata dal WHO (12). La dieta del WHO copre differenti aree geografiche (Europa, Medio Oriente, Estremo Oriente, America, Sud Africa, Australia e Giappone), si riferisce alla popolazione generale e ai bambini.

Storicamente, gli Stati Membri che per primi hanno elaborato le diete per poter effettuare una valutazione dell'esposizione furono il Regno Unito, la Germania e la Francia. In particolare il Regno Unito è stato il primo Stato Membro a disporre di dati di consumo per l'esposizione cronica e acuta per differenti categorie di consumatori (13). Il modello di calcolo del Regno Unito (UK) si riferisce ai dati di consumo al 97,5° percentile per più categorie di consumatori che vanno dai neonati agli adulti comprese categorie di consumatori come i vegetariani. Solo a scopo informativo in Tabella 3 si riportano le categorie di consumatori usate nel modello del Regno Unito con le rispettive fasce di età e pesi corporei relativi a ciascun gruppo di individui.

Tabella 3. Categorie di consumatori nel modello del Regno Unito

Categoria	Età	Peso corporeo (kg)
Neonati	6-12 mesi	8,7
Bambini	18 mesi	14,5
Bambini	4-6 anni	20,5
Bambini	7-10 anni	30,9
Ragazzi	11-14 anni	48,0
Ragazzi	15-18 anni	63,8
Adulti	19-80 anni	76,0
Vegetariani	16- 64 anni	66,7
Anziani (residenti propria abitazione)	> 65 anni	70,8
Anziani (residenti casa riposo)	> 65 anni	61,6

L'Italia disponeva di dati di consumo, per la popolazione generale, elaborati nel periodo 1994-1996 dall'Istituto Nazionale della Nutrizione (14).

L'elaborazione della stima del rischio condotta dagli Stati Membri usando i propri dati di consumo portava ad ottenere risultati differenti che animavano discussioni tra gli Stati in sede comunitaria. Per questo motivo si è sentita la necessità di dover elaborare un sistema di calcolo che raccogliendo tutte le diete europee fornisse un risultato immediato e di facile interpretazione. A tale scopo durante la preparazione degli allegati tecnici al Regolamento

Comunitario n. 396/2005, (15) la Commissione Europea incaricò l’Agenzia Europea per la Sicurezza Alimentare (*European Food Safety Authority* - EFSA) di elaborare un sistema di valutazione dell’esposizione comprendente tutte le diete disponibili in Europa.

Il sistema elaborato dall’EFSA (16) raccoglie tutti i dati relativi alle diete europee. Sulla base dei dati forniti dagli Stati Membri, l’EFSA ha elaborato un modello di calcolo comprendente 26 diete per la valutazione dell’esposizione cronica per la popolazione generale e per le diverse categorie di consumatori dai neonati agli anziani e ai vegetariani. Per quanto riguarda la valutazione dell’esposizione acuta sono disponibili 18 diete europee, per la popolazione generale e per le diverse sottoclassi di consumatori. Inoltre, il sistema comprende la dieta Regionale Europea del WHO e i 4 cluster (B, D, E, F) della dieta elaborata dal WHO. Il modello così predisposto permette di ottenere un risultato immediato e completo per tutte le diete europee, in questo modo è possibile valutare il rischio cronico e acuto per tutte le categorie di consumatori europei. Il modello di valutazione consente di effettuare il calcolo contemporaneo del rischio cronico e acuto inserendo i parametri necessari alla valutazione dell’esposizione quali l’ADI, l’ARfD, il valore di LMR, di STMR e di HR.

Nel caso in cui si osservi un problema di assunzione acuta, il sistema calcola in automatico un parametro definito come “valor soglia”. Tale valore rappresenta il valore di residuo che non deve essere superato per garantire la sicurezza della/e classi di consumatori interessate.

Inoltre, il modello permette di effettuare una valutazione dell’esposizione per i prodotti processati (succhi, puree, pane, farina e vino) sulla base dei dati di consumo forniti dagli Stati Membri.

Il modello dell’EFSA utilizza le equazioni dell’IESTI per i casi 2a e 2b, descritti nel paragrafo precedente, applicando fattori di variabilità differenti per una stessa tipologia di coltura.

L’applicazione di differenti fattori di variabilità è conseguenza di studi sperimentali che sono stati valutati in sede comunitaria e dall’EFSA (17) per armonizzarsi con i parametri aggiornati del *Codex Alimentarius*.

La Tabella 4 riporta i fattori di variabilità utilizzati dall’EFSA.

Tabella 4. Fattori di Variabilità nel modello EFSA

Caratteristica della coltura	Fattore di Variabilità	Fattore di Variabilità
	v_1	v_2
Unità di peso dell’intera porzione è > 250 g	5	5
Unità di peso dell’intera porzione è < 250 g	7	5
Vegetali a foglia ad esclusione della lattuga e del cavolo	10	5
Lattuga	5	3

L’esposizione calcolata utilizzando due fattori di variabilità differenti descrive due differenti scenari di esposizione uno più conservativo dell’altro. In particolare calcolando l’IESTI con i valori di v_1 nella tabella 4 valutiamo una situazione più conservativa nei riguardi del consumatore.

Nel caso in cui il calcolo dell’IESTI con entrambi i valori di v non evidenzia nessun rischio per le categorie di consumatori allora il valore di LMR proposto è considerato sicuro.

Nella situazione in cui si evidenzia un rischio per il consumatore con una o entrambe le equazioni ottenute usando i due valori di v , il valore di LMR proposto non è considerato sicuro per il consumatore.

Bibliografia

1. Commissione Europea 7039/VI/95 EN. Appendix I *Calculation of Maximum Residue Levels and Safety Intervals*; 1997.
2. World Health Organisation (WHO/FSF/FOS/97.7), (Revised) GEMS/Food, in Codex Committee on Pesticide Residues. *Guidelines for predicting dietary intake of pesticide residues*; 1997
3. FAO Plant Production and Protection Paper 163. Pesticide Residues in food. JMPR Report 2000. *Dietary Risk Assessment for Pesticide Residues in Food 2000*. pp 13-16.
4. Ambrus A. Within and between field variability of residue data and sampling implications. *Food additives and Contaminants* 2000;17(7):519-37.
5. Hill ARC, Reynolds SL. Unit-to unit variability of pesticide residues in fruit and vegetables. *Food Additives and Contaminants* 2002;19(8):733-47.
6. Harris CA. How the variability issue was uncovered - the history of the UK residue variability findings. *Food Additives and Contaminants* 2000;17(7):491-5.
7. Ambrus A. Variability of pesticide residues in crop units. *Pest Management Science* 2006;62:693-714.
8. World Health Organisation (WHO/FSF/FOS/97.5). *Food consumption and exposure assessment of chemicals*. Report of a FAO/WHO Consultation, Geneva, Switzerland, 10-14 Feb, 1997.
9. PSD, 1998. Report of the International Conference on Pesticide Residues variability and Acute Dietary Risk Assessment.. York, UK: The Pesticide Safety Directorate; 1998.
10. Harris CA, Mascall JM, Warren SFP, Crossley SJ. Summary report of the International Conference on Pesticide residues variability and acute dietary risk assessment. *Food Additives and Contaminants* 2000;17(7):481-5.
11. FAO. Pesticide residues in food. Report of Joint meeting of the FAO Panel of experts on Pesticide residues in Food and the Environment and the WHO expert Group on pesticide Residues. Chapter 3. FAO Plant Production and Protection paper 167, Food and Agriculture Organization. Rome; 2001.
12. GEMS/FOOD Regional Diets: Regional pro capita Consumption of raw and semi-processed Agricultural Commodities. Prepared by Global Environment Monitoring System/Food Contamination Monitoring and Assessment Programme (GEMS/Food) Revision Edition September 2003. WHO 2003.
13. Health and Safety Executive. UK Consumer *Intake* model (NEDI and NESTI). *New intake calculation models for consumer intake assessments*. Disponibile all'indirizzo: <http://www.pesticides.gov.uk/approvals.asp?id=1687>; ultima consultazione 06/10/2010.
14. Turrini A, Saba A, Perrone D, Cialda E, D'Amicis A. Food consumption patterns in Italy: the INN-CA Study 1994-1996. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:571-88.
15. Consiglio Europeo. Regolamento CE n.396/2005 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 23 febbraio 2005, concernente i livelli massimi di residui di antiparassitari nei prodotti alimentari e mangimi di origine vegetale e animale e che modifica la direttiva 91/414/CEE del Consiglio. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 70/1 del 16 marzo 2005*, modificato dal Regolamento (CE) n. 178/2006 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 1 febbraio 2006. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 29/3 del 2 febbraio 2006*.
16. EFSA European Food Safety Authority. *Model Risk Assessment* (foglio di calcolo MS Excel). Disponibile all'indirizzo http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/EFSA_acute_chronic_RA_model_rev1_0.xls; ultima consultazione 06/10/2010.
17. EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Plant health, Plant protection products and their Residues on a request from Commission related to the appropriate variability factor(s) to be used for acute dietary exposure assessment of pesticide residues in fruit and vegetables. (Question N. EFSA-Q-2004-124) *EFSA Journal* 2005;177:1-61.

UOVA E DIOSSINE: UN PROBLEMA AMBIENTALE?

Stefania Paola De Filippis
Reparto di Chimica Tossicologica

Introduzione

Se in campo alimentare esiste una legislazione specifica per quanto riguarda i requisiti che devono avere i materiali a contatto con gli alimenti (Regolamento 2004/1935/CE), dall'altro esiste un vuoto normativo per quanto riguarda la qualità dell'ambiente e i materiali non destinati propriamente al contatto con gli alimenti, ma che possono comunque rientrare nelle varie fasi dell'allevamento degli animali da reddito (quali ad esempio staccionate, recinzioni, ricoveri, mangiatoie, segatura e trucioli di legno come costituenti delle lettiere). Tale problema riveste una certa importanza soprattutto per quei contaminanti tossici e persistenti in grado di generare fenomeni di bioaccumulo con conseguente trasferimento della contaminazione agli alimenti di origine animale, quali ad esempio le policlorodibenzodiossine (PCDD), i policlorodibenzofurani (PCDF) e i policlorobifenili diossina simili (DL-PCB), comunemente noti come *diossine* (Brambilla *et al.*, 2006).

In questo lavoro si illustra un caso che è stato studiato presso il Reparto di Chimica Tossicologica, che può essere considerato paradigmatico per la problematica sopra riportata.

Descrizione del caso

Nel 2004, nel corso delle normali attività di monitoraggio del Piano Nazionale Residui per PCDD e PCDF in un allevamento di galline ovaiole in Lombardia, sono state rilevate nelle uova concentrazioni pari a 47 pgWHO-TEQ/g grasso, abbondantemente al di sopra dei livelli massimi di residui consentiti dal Regolamento 2006/1881/CE (3.0 pgWHO-TEQ/g grasso per PCDD e PCDF). Le indagini successive alla segnalazione della non conformità hanno fatto risalire la causa della contaminazione al truciolato di legno che veniva utilizzato come lettiera per le galline, il quale presentava concentrazioni di PCDD e PCDF pari a 48 pgWHO-TEQ/g e di pentaclorofenolo (PCP) pari a 5 µg/g. Per inciso, il PCP è una sostanza organo-clorurata ad attività antifungina che contiene PCDD (soprattutto i congeneri a più alta cloro sostituzione, epta- e otta-CDD) quali contaminanti in quantità variabile a seconda del grado di purezza del prodotto, e che è in grado di produrli in seguito a degradazione termica, o sotto l'effetto dell'irraggiamento solare (WHO, 1987). La lettiera in questione proveniva dalla bottega di un falegname locale che a sua volta lavorava del legno importato dal Camerun.

In seguito a questo episodio il legname trattato in importazione dal Camerun è stato bloccato alla frontiera, e su disposizione del Ministero della Salute sono stati intensificati i controlli sul legname per il contenuto di PCDD e PCDF ad opera delle Agenzie Regionali per la Protezione Ambientale (ARPA) (Figura 1).

Dall'attività di monitoraggio dell'ARPA risulta come l'importazione di legname trattato con PCP non sia stato un caso isolato. Per completezza di informazione, si riportano in Tabella 1, altri casi in cui, dal monitoraggio effettuato su matrici di origine animale, si è potuto risalire a sorgenti di esposizione tipicamente ambientali e non mangimistiche, in senso stretto.

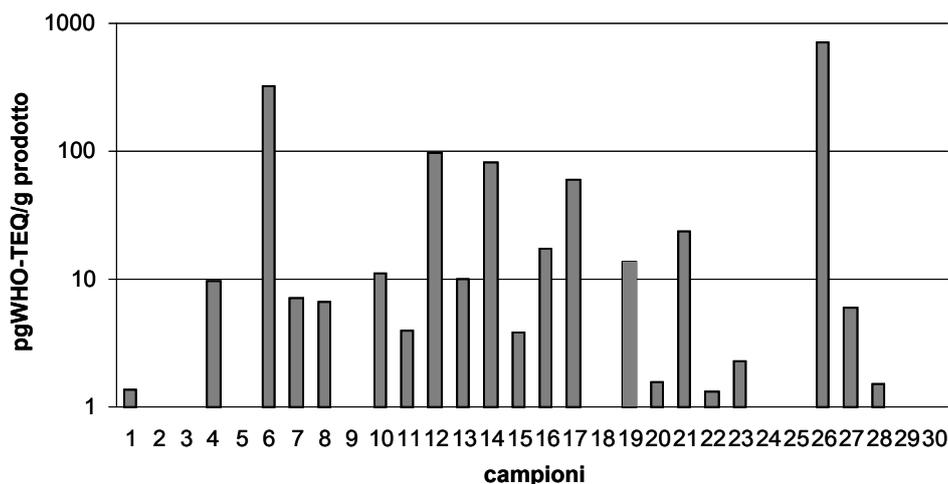


Figura 1. Livelli di PCDD e PCDF riscontrati nel legname importato (dati ARPA Toscana, 2007)

Tabella 1. Episodi rilevati in Italia in cui la qualità ambientale ha influenzato fortemente i livelli di PCDD, PCDF e DL-PCB negli alimenti di origine animale

Anno	Contesto ambientale	Animali coinvolti	Probabili cause
2001	Agriturismo biologico	Suinetti	Grufolamento nelle ceneri generate dal riscaldamento della broda; foraggi aziendali contaminati per l'utilizzo di dispositivi a fiamma libera nell'essiccatoio
2003-2008	Pascolo in vicinanza di Siti di Interesse Nazionale per le bonifiche	Pecore e bufale	Assunzione di particolato atmosferico e di terreno associato al foraggio e/o all'erba di pascolo
2006-2008	Allevamenti in vicinanza di attività industriali	Animali da latte	Utilizzo di foraggi aziendali raccolti in aree limitrofe agli insediamenti industriali
2005-2007	Aree ad alto valore naturale e paesaggistico	Suini allo stato brado e pecore	Presenza di aree di pascolo interessate da incendi; presenza di vecchi trasformatori sui pali elettrici
2008	Aziende agricole in vicinanza di impianto di recupero di alluminio	Polli, vitelli	Fall-out delle emissioni convogliate e diffuse

Descrizione delle metodologie di studio

Nel nostro studio ci si è occupati di approfondire le conoscenze sui contaminanti ambientali coinvolti nel caso delle uova contaminate, in particolare sono stati determinati:

- il fattore di trasferimento dei contaminanti dal truciolo alle uova;
- i profili analitici;
- lo studio delle cinetiche di deplezione per PCP e PCDD in un gruppo di galline (n. 6) spostate dalla situazione di campo in un ambiente non contaminato e in condizioni controllate per

quanto concerne l'alimentazione e i materiali a contatto;

- i parametri di stress ossidativo sul siero delle galline in questione al fine di poterli utilizzare come indicatori di esposizione.

Ogni due settimane sono stati effettuati prelievi di uova e di sangue dal gruppo di controllo per un periodo complessivo di otto settimane.

Ciascun *pool* di uova dei 5 giorni di prelievo è stato analizzato per PCDD e PCDF secondo la procedura analitica adattata e validata a partire dal metodo 1613 della *United States Environmental Protection Agency* (US EPA, 1994) con quantificazione in HRGC-HRMS, e per PCP secondo un protocollo analitico sviluppato e validato *in house*, che prevede una prima estrazione liquido-liquido con *di*-etil etere e *n*-esano in ambiente basico (pH > 10) e una seconda con *ter*-butil metil etere in ambiente acido (pH < 3) con quantificazione in HRGC-LRMS/MS.

Il siero del sangue prelevato a livello della vena brachiale di ciascun soggetto (n=6), è stato saggiato per il potere antiossidante (OXY), utilizzando un saggio colorimetrico commerciale.

Risultati dello studio sulle uova

Dopo aver quantificato gli analiti e osservato il profilo analitico dei congeneri di PCDD e PCDF sono stati elaborati i dati ottenuti.

Per quanto riguarda i congeneri di PCDD il fattore di trasferimento trucioli-uova, ossia il rapporto tra la contaminazione nelle uova (pgWHO-TEQ/g grasso) e quella nella lettiera (pgWHO-TEQ/g prodotto), calcolato in una fase di presunto equilibrio, è stato stimato essere pari a 0,9. Per il PCP tale rapporto, ottenuto da concentrazioni analitiche espresse su base intera rilevate nelle uova (ng/g prodotto) e nei trucioli (pg/g prodotto), ha dato come risultato 0,03. Il basso valore del fattore di trasferimento del PCP rispetto a quello delle diossine può essere legato alla presenza del contaminante in forma ionizzata nella lettiera, caratterizzata da un pH basico (7,4-8,0), proprio degli animali uricotelici, che ne riduce la bio-disponibilità e favorisce l'escrezione della quota assorbita. Da considerare, inoltre il fatto che la contaminazione da PCP sia espressa nelle uova su base intera e non su base grassa (il contenuto in grasso delle uova è di circa 8%), come avviene, invece, per le diossine. Dal profilo analitico nelle uova, ricavato dalla concentrazione dei singoli congeneri di PCDD al tempo 0, è stata evidenziato il contributo predominante dei congeneri *epta*- e *octa*-CDD.

Le curve di deplezione di PCP e di PCDD e PCDF nelle uova sottoposte ad analisi, hanno rivelato un comportamento differente delle due categorie di analiti nel corso delle otto settimane dello studio (Figure 2 e 3) (Brambilla *et al.*, 2009).

Mentre le PCDD e i PCDF presentano un andamento lineare, con un tempo di dimezzamento di 3,8 settimane, il PCP presenta un comportamento di deplezione non lineare, caratterizzato da una fase di equilibrio fino alla seconda settimana e da un immediato decremento dalla seconda alla quarta settimana.

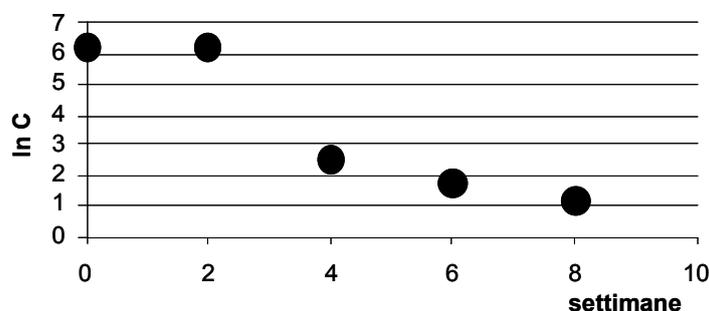


Figura 2. Curva di deplezione del PCP nelle uova nel periodo di osservazione. Valori espressi come logaritmo decimale della concentrazione (ng/g prodotto)

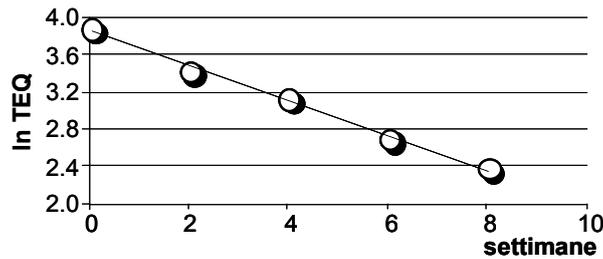


Figura 3. Curva di deplezione di PCDD e PCDF nelle uova nel periodo di osservazione. Valori espressi come logaritmo decimale della concentrazione (pgWHO-TEQ/g grasso)

Risultati dello studio sul siero delle galline

I valori del potere antiossidante (OXY) dei sieri delle galline in esame, espressi in μ moli di acido ipocloroso (HClO) neutralizzate/ml di siero, hanno rivelato una differenza significativa tra le differenti sessioni di prelievo ($p < 0,05$) (Figura 4), al contrario i valori di ROMs corrispondenti non hanno mostrato un andamento lineare ($p > 0,05$).

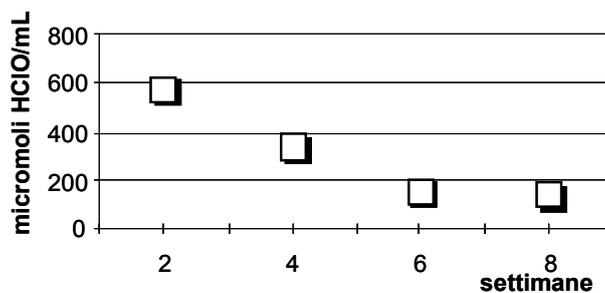


Figura 4. Valori medi del potere antiossidante (OXY) dei sieri delle galline nel corso dello studio

I valori di OXY registrati nel siero delle galline nei diversi tempi di prelievo correlano positivamente con le concentrazioni di PCDD e PCDF delle corrispondenti uova analizzate e tendono a diminuire con il passare delle settimane dallo spostamento delle galline su lettiera non contaminata; questo si spiega con la diminuita necessità di contrastare l'effetto pro-ossidante dei contaminanti clorurati, descritto in letteratura (Livingstone, 2001), progressivamente alla loro escrezione.

Descrizione delle competenze richieste per affrontare il problema

Da un punto di vista della gestione del rischio riferito al caso delle uova contaminate nell'affrontare la problematica si è avuta la necessità di raccogliere una serie di informazioni provenienti da differenti ambiti di competenza (ambientale, agricolo, industriale, sanitario).

Il nostro Reparto si è occupato di descrivere i profili chimico-tossicologici dei contaminanti rilevati e di definirne i processi naturali o industriali da cui possono originare, le vie di esposizione (suolo, acqua, aria, mangime, ecc.) e i fattori di trasferimento ambiente-animale-alimento. Contestualmente sono intervenuti diversi organismi istituzionali:

- azienda sanitaria locale (ASL), che ha provveduto ad effettuare i campionamenti per PCDD e PCDF nell'ambito della programmazione regionale e, una volta accertata la non conformità delle uova, ne ha inviato comunicazione alle autorità centrali e regionali e ha avviato gli approfondimenti epidemiologici del caso (campionamento mangimi e trucioli);
- ministero della Salute per il blocco delle importazioni del legname trattato dal Camerun;
- agenzia Regionale per la Protezione Ambientale (ARPA) per le analisi dei trucioli contaminati e del legname in importazione bloccato alla frontiera;
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) per le analisi delle matrici alimentari.

Queste collaborazioni hanno messo in rilievo una problematica sanitaria più ampia, considerando il contesto di partenza; inoltre hanno consentito di trarre le conclusioni più opportune per la gestione del caso e per lo sviluppo di misure preventive.

Conclusioni

Il caso trattato ha messo in luce come gli animali da reddito siano esposti ai contaminanti ambientali anche attraverso i materiali presenti in azienda agricola. Tale via di esposizione è attualmente di una certa rilevanza, da quando, per favorire un maggior benessere animale, la normativa comunitaria prevede la graduale sostituzione dei sistemi di allevamento in gabbia con quelli a terra (DL.vo 29 luglio 2003, n. 267). In base al fattore di trasferimento lettiera-uova riscontrato nel caso illustrato (0,9, riferito fondamentalmente alle PCDD, tipiche della contaminazione da PCP), il livello di contaminazione dei materiali utilizzati per la lettiera non dovrebbe superare i 2-3 pgWHO-TEQ/g prodotto, al fine di garantire un prodotto di origine animale rispondente ai requisiti di sicurezza secondo la normativa vigente.

Ai fini del monitoraggio della contaminazione, la più rapida deplezione del PCP dalle uova, rispetto a quella osservata per i congeneri PCDD, non rendono proponibile l'analisi del solo PCP quale eventuale tracciante della contaminazione da PCDD, per la possibilità di avere risultati falsamente negativi a partire dalla terza settimana di deplezione. Tuttavia, in presenza di un profilo di PCDD caratterizzato dal contributo analitico degli *epta*- e *otta*-congeneri, è possibile ricondurre l'origine della contaminazione al PCP anche a distanza di 2 mesi dalla cessata esposizione (Brambilla *et al.*, 2009).

In base all'attività pro-ossidante dei contaminanti organici clorurati, la misurazione del potere antiossidante del siero delle galline quale risposta adattativa a tale stress ossidativo, costituisce certamente un indicatore robusto e sensibile di esposizione, anche in assenza di livelli così elevati da indurre effetti tossici riscontrabili e clinicamente visibili.

Il caso specifico sottolinea lo stretto legame tra qualità dell'ambiente e sicurezza degli alimenti, e la necessità che, a scopo preventivo, vengano applicati adeguati sistemi HACCP nelle filiere zootecniche, supportati da specifiche indicazioni per quanto riguarda i livelli di contaminazione ambientale compatibili con le pratiche di allevamento a terra e in generale, con un uso non confinato delle risorse naturali.

Ringraziamenti

Si ringraziano il dott. Alessandro di Domenico, il dott. Gianfranco Brambilla e il dott. Igor Fochi per il prezioso contributo allo svolgimento dello studio.

Si ringrazia il dott. Giorgio Croce (ARPA Toscana) per aver gentilmente fornito i dati relativi alla Figura 1.

Bibliografia

Brambilla G, De Filippis SP, Di Domenico A. *Linee guida per la prevenzione della contaminazione da PCDD, PCDF e sostanze diossina-simili in azienda agricola*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2006. (Rapporti ISTISAN 06/5).

Brambilla G, Fochi I, De Filippis SP, Iacovella N, Di Domenico A. Pentachlorophenol, polychlorodibenzodioxin and polychlorodibenzofuran in eggs from hens exposed to contaminated wood shavings. *Food Additives and Contaminants* 2009;26:258-64.

Italia. Decreto Legislativo 29 luglio 2003, n.267. Attuazione delle direttive 1999/74/CE e 2002/4/CE, per la protezione delle galline ovaiole e la registrazione dei relativi stabilimenti di allevamento. *Gazzetta Ufficiale* n. 219, 20 settembre 2003.

Livingstone DR. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin* 2001;42:656-66.

Unione Europea. Regolamento del Parlamento Europeo e del Consiglio 27 ottobre 2004, n. 2004/1935/CE riguardante i materiali e gli oggetti destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari e che abroga le direttive 80/590/CEE e 89/109/CEE. *Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea* L 338, 13 novembre 2004.

Unione Europea. Regolamento della Commissione 19 dicembre 2006, n. 2006/1881/CE che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea* L 364, 20 dicembre 2006.

US EPA. United States Environmental Protection Agency. Method 1613 for Analysis of Dioxins and Furans in Wastewater. Disponibile all'indirizzo: <http://www.epa.gov/waterscience/methods/method/dioxins/>; ultima consultazione: 16/09/2009.

WHO. World Health Organization. *Pentachlorophenol.(Environmental Health Criteria 71)*. Geneva;1987. <http://www.inchem.org/International Programme on Chemical Safety>.

ECOLOGIA DEI CORSI D'ACQUA IN AMBIENTE URBANO: IL CASO DI ROMA

Simone Ciadamidaro.
Reparto di Qualità Ambientale e Ittiocoltura

Introduzione

Con il recepimento della Direttiva Europea 2000/60/CE (Consiglio della Comunità Europea, 2000), è stato sancito che negli Stati Membri della Comunità Europea i corpi idrici dovranno essere classificati in base a scale di qualità ecologica, e che essi dovranno raggiungere degli obiettivi di buono stato ecologico entro scadenze temporali definite. Per quanto riguarda le acque correnti, ciò non può prescindere dalla gestione del reticolo minore (fossi e canali di drenaggio). Infatti sebbene il reticolo minore non sia direttamente soggetto alle norme citate, il suo risanamento e la corretta gestione assumono prioritaria importanza: le aste principali non potranno raggiungere i prefissati obiettivi di qualità se gli apporti dalle aste secondarie del bacino idrografico non saranno, a loro volta, di buona qualità (Mancini & Munafò, 2003).

In particolare nelle aree urbane si è perso nel tempo il contatto percettivo con i piccoli corsi d'acqua, che per anni sono stati comunemente considerati, e trattati, come delle fogne a cielo aperto, e per lo più completamente ignorati nei piani di gestione. Numerose fonti di disturbo concorrono a provocare quella che gli esperti di ecologia urbana hanno chiamato *Sindrome del corso d'acqua urbano* (Paul & Meyer, 2001), i cui sintomi più evidenti sono: generale diminuzione della portata idrica di base; improvvisi e frequenti fenomeni di piena; inquinamento; aumento della temperatura dell'acqua; aumento della concentrazione di microrganismi patogeni; impoverimento e sproporzione verso taxa tolleranti nella composizione delle comunità di macroinvertebrati.

Queste considerazioni valgono certamente anche per il caso del reticolo minore della città di Roma: la realtà attuale consta, per buona parte, di corpi idrici del tutto compromessi, sebbene in alcune aree l'ecosistema *fosso*, pur alterato in talune componenti, mantiene una certa naturalità, che richiederebbe una maggiore tutela al fine di evitarne una compromissione totale e irreversibile.

L'area di studio di questo lavoro è compresa nel bacino idrografico del fiume Tevere, in cui sono stati studiati i fossi del territorio urbano di Roma. Sono state analizzate le acque e l'ecosistema fluviale dal punto di vista della sua funzionalità, con le diverse componenti fisico-chimiche, chimiche e biologiche, con particolare riguardo alle comunità di invertebrati bentonici.

Area di studio

La città di Roma si è sviluppata su un territorio corrispondente a sei sottobacini del bacino del Tevere, drenati da altrettanti fossi e dai loro piccoli affluenti. Nella Figura 1 sono indicati i fossi studiati e i relativi codici.

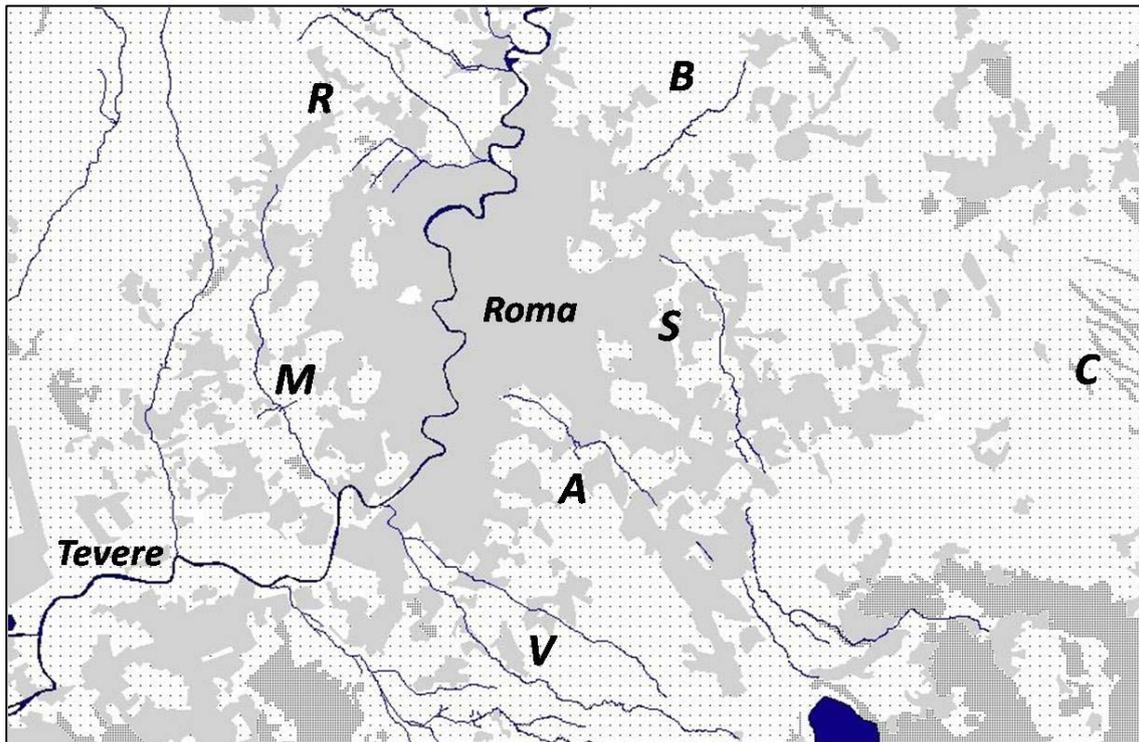


Figura 1. Area di studio (in grigio chiaro l'area urbana, in puntinato le aree agricole; R: fosso della Crescenza (7 siti); M: fosso della Magliana (8 siti); V : fosso di Vallerano (5 siti); A: fosso dell'Almone (5 siti); S: fosso di Tor Sapienza (4 siti); B: fosso di Casal de' Pazzi (3 siti); C: fosso di San Vittorino (3 siti)

Procedendo in senso antiorario, i primi due fossi da sinistra (Crescenza e Magliana) sono tributari diretti di destra del Tevere; i due fossi centrali (Vallerano e Almone) sono affluenti di sinistra del Tevere, gli ultimi due (Tor Sapienza e Casal de' Pazzi) sono affluenti dell'Aniene (Ventriglia, 1989).

Il fosso di S. Vittorino, affluente dell'Aniene che scorre nella campagna presso Tivoli, è stato invece adottato come controllo esterno. Nonostante queste presenti condizioni idrogeologiche simili a quelle degli altri fossi studiati, il suo sottobacino non è interessato dai fenomeni di urbanizzazione che sono causa di tante pressioni sui fossi dell'area urbana romana. Nell'area presa in esame sono state individuate 39 stazioni di campionamento, in modo da avere siti rappresentativi di tutto il territorio metropolitano. Di queste, 32 si trovano sui fossi del reticolo minore romano, 3 sul Tevere, una sul fiume Aniene e 3 sul fosso di S. Vittorino.

Materiale e metodi

L'indagine è stata condotta in due fasi, nella primavera e nell'autunno del 2005, ed ha previsto il rilevamento di una serie di parametri fisico-chimici e idromorfologici sul campo, la raccolta di campioni di acqua per le analisi chimiche e microbiologiche e di campioni di macroinvertebrati bentonici.

Parametri fisico-chimici

Alcuni parametri fisico-chimici sono stati rilevati sul campo: temperatura dell'acqua, conducibilità elettrica, pH e ossigeno disciolto. Tali parametri sono stati determinati con l'ausilio di sonde portatili.

Sui campioni d'acqua, raccolti in bottiglie di vetro da un litro e conservate prima in frigoriferi portatili e successivamente a +4° C circa, sono state svolte analisi chimiche con l'ausilio di kit pronti e di uno spettrofotometro. Le analisi hanno compreso la determinazione delle concentrazioni di: nitrati, ortofosfati, cloruri, ione ammonio, durezza totale, magnesio, azoto totale, solfati, domanda chimica di ossigeno e domanda biologica di ossigeno.

Analisi delle comunità di macroinvertebrati

La raccolta dei macroinvertebrati bentonici è stata condotta seguendo la metodologia standard della tecnica del *kick-sampling* per 3 minuti (Wright *et al.*, 1993). Il campionamento è stato effettuato usando un retino immanicato di dimensioni standard (25 × 40 cm e 20 maglie per centimetro). Il materiale raccolto è stato riversato in secchielli di plastica con etanolo al 75% e portato in laboratorio per lo smistamento e l'identificazione tassonomica.

La struttura della comunità macrobentonica è stata analizzata identificandone i componenti a diverso livello tassonomico e applicando l'Indice Biotico Esteso (IBE) (Ghetti, 1997), un metodo che fornisce una valutazione sintetica della qualità ambientale di un corso d'acqua basandosi sulla composizione della comunità di macroinvertebrati bentonici. Questo indice richiede una determinazione sistematica dei macroinvertebrati fino al livello tassonomico, stabilito sperimentalmente, di genere o famiglia che è diverso a seconda dei gruppi e che serve a definire le Unità Sistematiche (US). Il punteggio assegnato tramite l'IBE può essere tradotto in cinque classi di qualità (CQ). Altre analisi sono state svolte sui dati di comunità per individuare gruppi di campioni omogenei, riconducibili a diverse condizioni ecologiche.

Valutazione della funzionalità fluviale

Gli indici biotici, pur considerando la complessità biologica delle comunità delle specie indicatrici, tengono in considerazione, per la valutazione della qualità ambientale, un ristretto numero di variabili. Sono state quindi sviluppate metodologie di valutazione che prendano in esame il maggior numero possibile di fattori e che siano in grado di descrivere la situazione ecologica considerando le relazioni tra il sistema reico e l'intero bacino idrografico circostante, con un approccio quindi più ecosistemico. L'Indice di Funzionalità Fluviale (IFF) (Siligardi *et al.*, 2000; Siligardi *et al.*, 2007) è stato messo a punto applicando questo approccio alla realtà dei corsi d'acqua italiani. La scheda dell'IFF è composta da 14 domande che trattano argomenti relativi allo stato naturale del corso d'acqua e legati tra loro in modo tale da rendere bilanciata la scheda rispetto ai punteggi assegnati alle varie componenti. La compilazione della scheda (da effettuare per ciascun tratto omogeneo in cui il fiume può essere diviso, solitamente non superiore ai 2 chilometri di lunghezza) termina con il calcolo della somma dei pesi corrispondenti alle risposte fornite. Il punteggio finale è stato tradotto in cinque classi di funzionalità (da I a V), con possibili situazioni intermedie che garantiscono un passaggio graduale da una classe alla successiva.

Analisi statistica

L'Analisi delle Componenti Principali (PCA) è una procedura per trovare variabili ipotetiche (dette "componenti") che spieghino quanta più variabilità possibile in un set di dati multidimensionali. Queste nuove variabili sono combinazioni lineari delle precedenti. La PCA ha varie applicazioni, tra le quali:

- regressione semplice dei set di dati a sole due variabili (le due componenti principali), per scopi di ordinamento e classificazione;
- ipotesi di correlazione delle componenti principali con altre variabili soggiacenti.

Questa tecnica è stata applicata ai dati di composizione delle comunità macrobentoniche, con successiva correlazione delle componenti principali estratte con le principali variabili ambientali delle stazioni.

Risultati e discussioni

Un forte inquinamento organico dell'acqua è stato registrato nelle stazioni di campionamento prossime ai punti di immissione al Tevere o all'Aniene. Questo è dovuto sia al fatto che quasi tutti i fossi entrano in città prima di confluire al fiume, ricevendo i numerosi impatti legati all'urbanizzazione (Stepenuck *et al.*, 2002), sia alla presenza, nelle vicinanze, di aree fortemente degradate in cui non c'è sufficiente controllo sugli scarichi di attività industriali e domestiche. Sono soprattutto gli alti valori dell'inquinamento organico ad allontanare questi corsi d'acqua dalla condizione di riferimento.

I risultati dell'applicazione dell'indice IFF sul reticolo minore romano mostrano come la maggior parte dei fossi studiati presenti funzionalità mediocre o scadente (Figura 2).

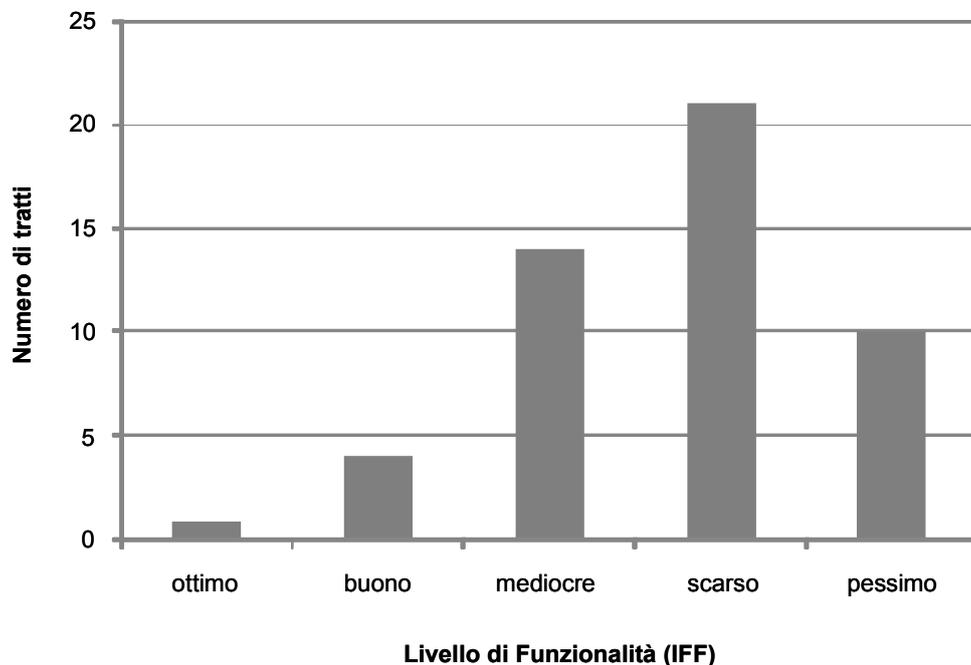


Figura 2. Schema riassuntivo dei risultati IFF

Uniche eccezioni a questa condizione generale sono i fossi che scorrono all'interno dei parchi urbani, che hanno una funzionalità buona o intermedia tra il buono e il mediocre. Dai risultati emerge così il ruolo delle aree protette nel mantenimento della funzionalità di questi corsi d'acqua. È questo un discorso che vale per il Parco dell'Insugherata, il Parco di Aguzzano, Il Parco dell'Appia Antica e il Parco dell'Acqua Acetosa Ostiense. Il caso dell'alto corso del fosso della Crescenza va considerato a parte perché, nonostante sia compreso nel parco di Veio, è soggetto ai numerosi impatti apportati dall'attraversamento dell'autostrada del Grande Raccordo Anulare di Roma.

L'IFF ha il pregio di considerare tutte le componenti dell'ecosistema fluviale, ma fra queste l'unico elemento di qualità biologico di cui era richiesta l'analisi nella normativa in vigore fino al 2006 (DL.vo 152/1999) era la comunità di macroinvertebrati bentonici, tramite l'applicazione dell'indice IBE (Tabella 1).

Tabella 1. Risultati IBE

Stazione *	US	Valore IBE	Classe di Qualità
A1	4	2	V
A2	8	6	III
A3	13	7	III
A4	10	5	IV
B1	10	6,4	III
B2	11	6,6	III
B3	12	7	III
C1	17	7	III
C2	14	7	III
C3	25	10,4	I
M1	5	4	IV
M2	4	1,6	V
M3	4	3	V
M4	5	3,4	V-IV
M5	4	2	V
M6	3	1,6	V
M7	3	1,4	V
M8	4	1,6	V
N1	5	4,6	IV
R1	4	2	V
R2	6	3,6	IV-V
R3	15	7	III
R4	6	4,6	IV-III
R5	2	1,4	V
R6	3	3,6	IV-V
R7	7	2,6	V
S1	8	5	IV
S2	6	4,6	IV
S3	6	4,6	IV
S4	6	4,4	IV
V2	10	5	IV
V3	2	1,6	V
V4	7	4,4	IV
V5	3	1,6	V
V6	5	2	V
T2	2	1,6	V
T3	13	7	III
T4	9	5	IV

* spiegazione dei codici nella Figura 1

Attualmente l'applicazione dell'IBE non viene più richiesta nel monitoraggio ufficiale e sono in fase di definitiva adozione a livello nazionale degli indici di valutazione dello stato ecologico dei corsi d'acqua, che siano conformi alle richieste della Direttiva 2000/60/CE, basati sulle diverse componenti biologiche, tra cui anche i macroinvertebrati (indice STAR_ICMi) (Buffagni & Erba, 2007). Per la maggior parte dei fossi romani il giudizio dell'IBE è mediocre, scadente o pessimo, senza possibilità di ulteriori distinzioni. Dall'analisi delle componenti principali (Figura 3) sui dati di presenza assenza dei taxa emerge invece la suddivisione dei siti in due grandi gruppi: il primo formato da tutte quelle stazioni in cui la composizione della comunità più si avvicina a quella del sito di riferimento; il secondo comprendente tutte le stazioni le cui comunità versano nelle condizioni peggiori. Tra i due sono presenti alcune stazioni con condizioni intermedie. La presenza di Gammaridi e Asellidi, nonché una maggiore diversità delle comunità, accomuna le stazioni in condizioni intermedie, mentre gruppi come i Tricotteri, i Coleotteri e gli Odonati sono presenti esclusivamente nei siti meno compromessi. Nei siti del secondo gruppo, caratterizzati da comunità molto povere, sono stati rinvenuti solo organismi appartenenti ai taxa più tolleranti, quali Chironomidi (*Chironomus plumosus*), Tubificidi e Ditteri a respirazione aerea (Syrphidae). La correlazione tramite il coefficiente di Pearson degli assi della PCA con le variabili ambientali indagate nello studio ha mostrato come siano principalmente la concentrazione d'ossigeno disciolto ($r=-0,63$ con la componente 1) e le concentrazioni dei nutrienti ($r=0,66$ e $r=0,57$, rispettivamente per nitrati e fosfati con la componente 1) a influenzare la composizione delle comunità di macroinvertebrati. Questo sembra indicare gli scarichi domestici e le attività agricole (principali fonti di fosfati e nitrati nelle acque correnti) come primi responsabili delle cattive condizioni del reticolo minore romano.

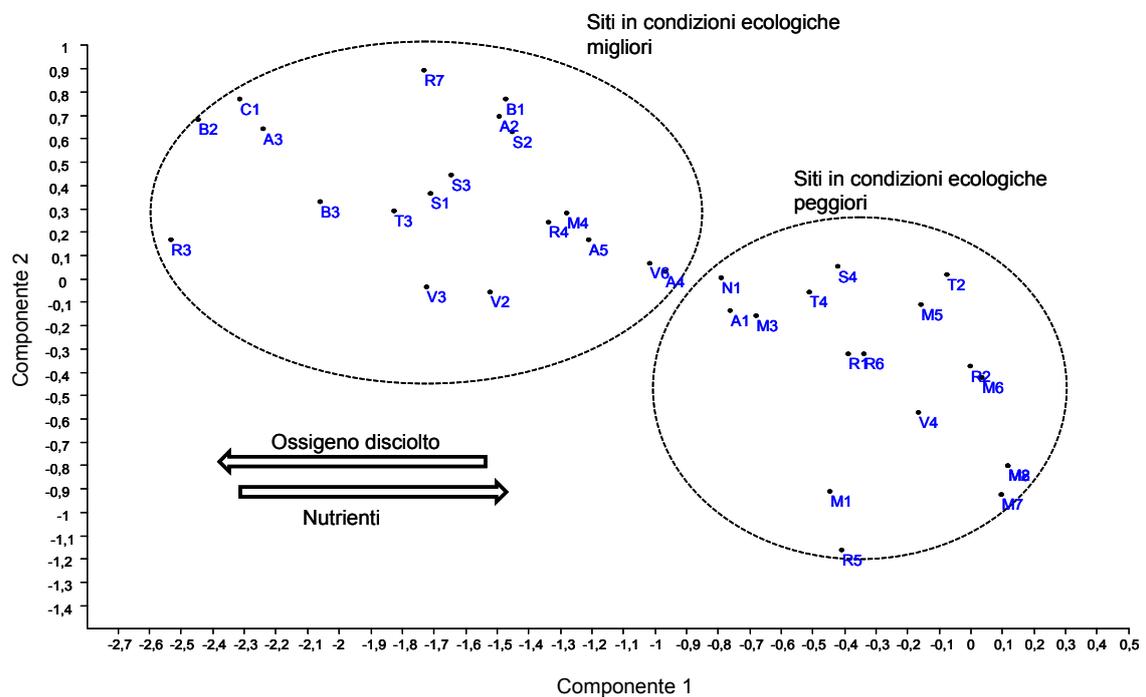


Figura 3. Analisi delle componenti principali sui dati di composizione delle comunità di macroinvertebrati (l'ordinamento spiega il 45% della varianza totale)

Alla luce del netto peggioramento delle condizioni del fiume Tevere nell'attraversamento della città di Roma, dovuto in gran parte all'apporto di inquinanti ricevuto dall'Aniene, un miglioramento della qualità del reticolo minore porterebbe certo giovamento alla salute dell'asta principale. Per ottenere questo sono necessari interventi mirati per ciascun sottobacino, e in particolare, va sottolineata l'importanza del recupero dei fossi non del tutto compromessi che scorrono nelle aree protette.

Attacco di *Simulium ornatum* agli esseri umani nell'area di Roma

A latere degli studi sullo stato ecologico dei corsi d'acqua, valutato sulla base delle comunità di macroinvertebrati bentonici, sono state portate avanti delle osservazioni sulla famiglia dei Ditteri Simuliidae, Newman 1834, con particolare riguardo alle loro caratteristiche di ectoparassiti entomofagi di vertebrati in generale, e dell'uomo in particolare. *Simulium reptans*, *S. erythrocephalum* e *S. ornatum* (complesso; prevalentemente della specie *S. intermedium*) sono le uniche specie che possano realmente rappresentare un pericolo, seppur minimo, per gli esseri umani in Italia (Rivosecchi, 1997). Nella provincia di Roma non sono più presenti focolai significativi di *S. reptans* e *S. erythrocephalum* (Rivosecchi, 1971; Rivosecchi *et al.*, 1988) soprattutto a causa dell'inquinamento delle acque. Pertanto il *S. ornatum* risulta essere l'unica specie che possa generare problemi per la popolazione.

Come riportato in letteratura (Rivosecchi *et al.*, 1988) le forti alterazioni in corso nell'area di studio, legate all'urbanizzazione del territorio, possono portare ad una modificazione nella distribuzione delle specie di Simulidi, comprese le specie che comportano rischi per la salute umana. Segnalazioni di punture d'insetti (non identificati come Culicidi) nella periferia romana sono state ricevute recentemente dall'Istituto Superiore di Sanità, aumentando l'interesse per un nuovo studio sulla presenza di Simulidi nell'area romana.

Il nostro studio ha mirato a indagare la presenza e distribuzione di specie di Simulidi che pungono l'uomo nella Provincia di Roma, per metterle in relazione alle recenti segnalazioni di attacchi. Dal marzo 2005 al gennaio 2008 sono state effettuate raccolte di 72 campioni di larve e pupe di Simulidi da 24 corsi d'acqua, in siti distribuiti in tutta la Provincia e posti lungo un gradiente di urbanizzazione crescente. Per standardizzare lo sforzo di cattura, sono state effettuate sessioni di raccolta di 10 minuti lungo il tratto di corso d'acqua prescelto, ricercando i Simulidi su pietre e vegetazione immersa nei tratti di maggiore velocità di corrente. In laboratorio gli organismi sono stati preparati e montati su vetrini porta-oggetto per l'osservazione al microscopio ottico e l'identificazione delle specie con apposite guide (Rivosecchi, 1978). Dalle pupe sono stati ottenuti, per sfarfallamento in contenitori ad umidità controllata, gli adulti, anch'essi preparati per l'osservazione al microscopio.

Durante lo studio sono state raccolte 18 specie di Simulidi, appartenenti ai generi *Simulium* (14 specie) e *Prosimulium* (4 specie). Le uniche due specie di Simulidi delle quali si abbia notizia di attacchi all'uomo che sono state ritrovate sono *S. erythrocephalum* e *S. ornatum*. Nonostante la limitatissima frequenza di rinvenimento, il *S. erythrocephalum* presenta spiccate caratteristiche di predilezione per gli esseri umani, che ne giustificerebbero una maggiore considerazione da parte delle autorità sanitarie lungo il litorale romano.

S. ornatum, al contrario, mostra una distribuzione ubiquitaria, essendo presente in ben 58 dei 72 siti studiati. Una situazione in cui sono state registrate punture di *S. ornatum* a danno degli esseri umani è quella dei lavoratori dei vivai con irrigazione continua; pertanto sono state svolte raccolte nei pressi di vivai localizzati nella periferia orientale di Roma (Grottaferrata), dove

sono state segnalate punture sulle gambe e sulle braccia dei lavoratori. L'identificazione delle larve e degli adulti campionati ha rivelato che il *S. ornatum* rappresenta l'unica specie di Simulidi presente nell'area, e reperti di organismi schiacciati dalle persone punte hanno confermato la diagnosi effettuata. Le cause dell'insorgere di questi problemi possono essere spiegate considerando i cambiamenti in atto nel territorio romano, con il forte inquinamento delle acque e l'alterazione della morfologia dei corsi d'acqua e del territorio circostante, che hanno favorito il *S. ornatum*, specie più tollerante verso questo genere di impatti. Contemporaneamente, la scomparsa degli allevamenti e degli animali selvatici dai territori in via di urbanizzazione ha favorito una modifica delle abitudini alimentari delle femmine del *S. ornatum*, che si sono rivolte agli uomini per il loro pasto di sangue (Romi *et al.*, 1998). Altrove nella Provincia di Roma, dove il paesaggio agrario non è ancora stato stravolto dall'avanzare dell'urbanizzazione, la presenza di *S. ornatum* non ha mai fatto registrare problemi per la popolazione.

L'assenza di un sistema di monitoraggio continuo non permette di quantificare con certezza la frequenza degli attacchi agli esseri umani da parte dei Simulidi, anche se gli innegabili squilibri ecologici in atto nell'area suggeriscono un aumento del rischio per le persone (Rivosecchi & Mancini, 1998). Pertanto, sebbene non sia ancora disponibile una sufficiente mole di dati per supportare le nostre osservazioni, si suppone che un certo numero di punture di insetti sull'uomo, finora imputate ai Culicidi, siano in verità riconducibili ai Simulidi, anche in considerazione delle scarse conoscenze tassonomiche delle persone colpite.

Bibliografia

- Buffagni A, Erba S. *Intercalibrazione e classificazione di qualità ecologica dei fiumi per la 2000/60/EC (WFD): l'indice STAR_ICMi*. Roma: IRSA-CNR; 2007
- Ghetti PF. *Manuale di applicazione: Indice Biotico Esteso (IBE). I macroinvertebrati nel controllo della qualità degli ambienti di acque correnti*. Trento: Provincia Autonoma di Trento. Agenzia Provinciale per la Protezione dell'Ambiente; 1997.
- Munafò M, Mancini L. Strumenti di valutazione e prevenzione nella gestione delle acque. *Not Ist Super Sanità* 2003;16(12):11-7.
- Paul M, Mejer JL. Streams in the urban landscape. *Ann Rev Ecol Systemat* 2005;32:333-65.
- Rivosecchi L. Osservazioni preliminari sulla scomparsa di focolai larvali di Simuliidae da acque inquinate. *Parassitologia* 1971;8(1-2):321-31.
- Rivosecchi L. *Fauna d'Italia. Simuliidae, Diptera Nematocera*. Bologna: Calderini; 1978.
- Rivosecchi L. Attacco massivo all'uomo di *Simulium intermedium* (=nitidifrons) in prov. di Ascoli Piceno. *Riv Parass* 1997;14(57):329-37.
- Rivosecchi L, Mancini L. Trasformazione del paesaggio agrario e attacco all'uomo di Simulidi del gruppo ornatum (Diptera Simuliidae). *Parassitologia* 1998;40(I):151.
- Rivosecchi L, Coluzzi M. Tre Simulidi (*S. aureum*, *S. erythrocephalum*, *S. reptans*) che in Italia pungono l'uomo. *Parassitologia* 1962;4:181-90.
- Rivosecchi L, Stella E, Turilazzi PG. *Ricerche ecologiche, flogistiche e faunistiche nel comprensorio Tolfetano-Cerite-Manziate*. Roma: Accademia Nazionale dei Lincei; 1977.
- Rivosecchi L, Mancini L, Di Girolamo I. Variazioni della fauna dei Simulidi (Diptera Nematocera) in corsi d'acqua dell'Italia centrale, 1960 ad oggi. *Boll Mus Sc nat Lunigiana* 1988;6:139-43.
- Romi R, Mancini L, Di Luca M, Rivosecchi L. *Guida per il riconoscimento e il controllo dei Simulidi che attaccano bestiame e uomo in Italia*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1998. (Rapporti ISTISAN 98/10).

- Siligardi M, Bernabei S, Cappelletti C, Chierici E, Ciutti F, Egaddi F, Franceschini A, Maiolini B, Mancini L, Minciardi MR, Monauni C, Rossi G, Sansoni G, Spaggiari R, Zanetti M. *IFF, Indice di Funzionalità Fluviale*. Trento: Manuale ANPA; 2000.
- Siligardi M, Avolio F, Baldaccini GB, Bernabei S, Bucci MS, Cappelletti C, Chierici E, Ciutti F, Floris B, Franceschini A, Mancini L, Minciardi MR, Monauni C, Negri P, Pineschi G, Pozzi S, Rossi GL, Spaggiari R, Tamburo C, Zanetti M. *IFF 2007, Indice di Funzionalità Fluviale*. Trento: Manuale APAT; 2007.
- Stepenuck KF, Crunkilton R, Wang L. Impacts of urban land use on macroinvertebrates communities in southeastern Wisconsin streams. *J Amer Wat Res Associat* 2002;38(4):1041-51.
- Unione Europea. Direttiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 23 Ottobre 2000 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque. Official Journal L327 del 22 dicembre 2000:1-72.
- Ventriglia U. *Idrogeologia della Provincia di Roma, Volume III. La Regione Vulcanica dei Colli Albani*. Roma: Provincia di Roma, Assessorato viabilità e trasporti; 1990.

VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE ALIMENTARE A CONTAMINANTI ORGANICI ALOGENATI: PFOS E PFOA

Elena Dellatte
Reparto di Chimica Tossicologica

Introduzione

L'inquinamento ambientale con la conseguente contaminazione degli ecosistemi, determina l'esposizione della popolazione generale a una pluralità di agenti potenzialmente tossici alcuni dei quali possono essere assunti attraverso l'alimentazione. Nell'ambito del *risk assessment*, per capire se una popolazione attraverso l'alimentazione possa essere esposta ad un rischio per la salute, bisogna valutare l'esposizione alimentare, cioè stimare la quantità di contaminante potenzialmente assunta attraverso la dieta (*intake* alimentare). Successivamente, dopo aver confrontato i risultati di tali stime con i livelli a cui non si attendono effetti tossici, si intraprendono le misure necessarie per la gestione del rischio.

In questo studio abbiamo stimato per la popolazione italiana l'*intake* alimentare di due sostanze annoverate tra i contaminanti emergenti che destano attenzione: il perfluoroottan solfonato (PFOS) e l'acido perfluoroottanoico (PFOA), appartenenti alla classe dei composti perfluorurati (PFAS). Questi contaminanti sono caratterizzati da elevata tossicità e diffusione ambientale (la *United States Environmental Protection Agency*, US EPA) ha classificato il PFOA come "probabile cancerogeno per l'uomo" (US EPA SAB, 2006) mentre il PFOS è stato di recente inserito nella Convenzione di Stoccolma), la loro via di esposizione principale sembra essere la via alimentare, malgrado ciò, i dati disponibili per una completa valutazione dell'esposizione umana alimentare sono piuttosto scarsi; inoltre non sono inseriti nelle normative comunitarie che limitano la presenza di inquinanti negli alimenti. Soltanto di recente sono stati stabiliti per PFOS e PFOA valori-guida tossicologici come i *Tolerable Daily Intake* (TDI) (EFSA, 2008). Di conseguenza, vi sono state difficoltà nel reperire i dati necessari per una adeguata valutazione dell'esposizione. La metodologia utilizzata prevede modelli basati su *database* di consumi alimentari nazionali e *database* di contaminazione degli alimenti da parte degli inquinanti in esame.

Metodologia

Valutazione dell'esposizione alimentare

Gli approcci principali per la stima dell'esposizione a contaminanti alimentari sono il metodo diretto o *duplicate diets* (che prevede l'analisi di diete duplicate e consente di ottenere direttamente il valore di *intake*) e i metodi indiretti che giungono all'*intake* in due fasi: dapprima si analizzano singoli alimenti (*individual food items*) o diete complete (*total diet studies*, TDS) opportunamente scelti per rappresentare i comportamenti alimentari della popolazione generale; si ottengono così i dati di contaminazione di tutti gli alimenti che costituiscono la dieta media. Successivamente, combinando i dati di contaminazione con i

consumi alimentari nazionali, si risale all'*intake* totale per giorno. Nel presente studio è stato utilizzato l'approccio degli *Individual Food Items*.

I consumi alimentari di una popolazione vengono stimati mediante indagini nutrizionali nazionali eseguite periodicamente dalle autorità scientifiche-sanitarie. Per quanto riguarda la contaminazione delle varie categorie alimentari, per alcune sostanze esistono *database* a livello nazionale e internazionale presso la Commissione Europea (es. lo *Scientific Committee on Food* e la DG SANCO) e presso l'EFSA (*Panel on Contaminants in the Food Chain*); questi organismi eseguono monitoraggi periodici raccogliendo i dati più aggiornati dalle autorità sanitarie nazionali o dai Piani Nazionali Residui, se i contaminanti in oggetto vi sono inseriti. Per i composti non soggetti a monitoraggi routinari, come PFOS e PFOA, le banche-dati di contaminazione alimentare non esistono. In questi casi i dati si possono raccogliere dalla letteratura scientifica disponibile e dai rapporti di autorità sanitarie e scientifiche nazionali e internazionali.

Per quanto riguarda l'aspetto quantitativo della valutazione dell'esposizione, è stato adottato il metodo semi-probabilistico (o delle distribuzioni semplici) che utilizzando distribuzioni di consumi alimentari insieme a valori fissi per le concentrazioni dei contaminanti, consente di ricavare la distribuzione dell'*intake* riuscendo così a rappresentare la reale variabilità nei comportamenti e nelle caratteristiche di consumo esistenti in una popolazione (Kroes *et al.*, 2002).

Consumi alimentari

Nell'ambito delle indagini nutrizionali nazionali per valutare i consumi alimentari di una popolazione, i diversi metodi possibili sono basati essenzialmente sulla registrazione dei consumi personali di ogni singolo individuo sottoposto allo studio (es. metodo del *Food diary*, del *Dietary recall*, del *Food frequency*) o sull'analisi degli acquisti di alimenti in una data regione o in una famiglia (es. *Food disappearance method*) (WHO, 1985). Nel presente studio, sono stati utilizzati i dati della Seconda Indagine Nazionale sui Consumi Alimentari degli Italiani eseguita dall'Istituto Nazionale Italiano per la Ricerca sugli Alimenti e sulla Nutrizione (INRAN) tra il 1994 e il 1996 (Turrini *et al.*, 2001; Turrini & Lombardi-Boccia, 2002), dati che riflettono i comportamenti alimentari tipici della popolazione italiana.

Questa indagine descrive i consumi quotidiani a livello individuale registrati durante il periodo di una settimana per 64 categorie di alimenti. Il *database* è del tipo *multiple-day* cioè relativo a un periodo che consente la stima per esposizioni croniche. I partecipanti allo studio, 1940 soggetti di età compresa tra sei mesi e 94 anni, sono stati selezionati in modo casuale per rappresentare le quattro principali aree geografiche italiane (nord-ovest, nord-est, centro e sud, comprese le isole). Ciascun individuo compilava un diario (per un periodo variabile da tre a sette giorni consecutivi) su cui veniva registrata la quantità (in grammi) di ogni alimento o bevanda consumati. Oltre ai consumi alimentari, per ogni individuo venivano riportate anche le principali caratteristiche fisiche, personali e familiari (stato civile, ruolo nella famiglia, livello di istruzione, professione, regione di residenza e grado di urbanizzazione del luogo di residenza) ed eventualmente, il particolare regime alimentare seguito.

Dati di contaminazione

Quando abbiamo iniziato questo studio non esisteva una banca-dati della contaminazione degli alimenti europei (né italiani) da PFOS e PFOA. Inoltre le analisi presentavano numerose problematiche evidenziate dall'ampia variabilità riscontrata nei primi circuiti di

intercalibrazione realizzati. Di conseguenza la valutazione dell'esposizione si è basata principalmente su dati di concentrazione ricavati dalla letteratura scientifica e da rapporti di autorità sanitarie e scientifiche nazionali e internazionali; sono state valutate più di quattrocento pubblicazioni, tra articoli e rapporti tecnici. Essendo basate su dati provenienti da laboratori diversi che li hanno prodotti mediante tecniche analitiche non precedentemente armonizzate, le nostre stime includono una considerevole incertezza. Abbiamo riscontrato che per la maggior parte delle categorie alimentari non esistono dati oppure ne esiste un numero esiguo, inadatto per una valutazione dell'esposizione. In particolare, gli studi della 3M (2001), della UK FSA (2006) e di Tittlemier *et al.* (2007) dimostrano che in alimenti del comparto terrestre l'accumulo è minimo. Al contrario, il pesce e i prodotti ittici e l'acqua destinata al consumo umano sono le uniche categorie alimentari per cui siano stati prodotti dati in quantità sufficiente per caratterizzarne la contaminazione. Infatti, essendo l'acqua un comparto ambientale a lento rilascio, la eventuale contaminazione permane nel tempo e il biota acquatico risulta continuamente esposto. Inoltre, essendo la numerosità dei dati riferiti alle sole acque potabili piuttosto scarsa, abbiamo incluso nello studio anche i dati di contaminazione di acque superficiali che vengono considerate precursori di acqua destinata al consumo umano poiché è stato evidenziato che i normali processi di potabilizzazione, prima che le acque vengano immesse nelle reti idriche, risultano inefficaci nei confronti di PFOS e PFOA (Boulanger *et al.*, 2005; Loos *et al.*, 2007). È stata pertanto realizzata una banca-dati della contaminazione per le seguenti macrocategorie alimentari: *Acqua destinata al consumo umano* cioè sia acqua della pubblica rete idrica che imbottigliata, *Acque superficiali* e *Prodotti ittici di mare, di acqua dolce e allevati*. Le prime due categorie sono poi state riunite nella macrocategoria denominata "Acqua".

I dati raccolti, provenienti da circa 25 paesi anche extra-europei, sono stati selezionati adottando criteri volti all'esclusione dei dati poco aggiornati (antecedenti al 2003), di scarsa qualità analitica (limiti di determinazione particolarmente elevati) o riferiti a campioni provenienti da aree dichiarate inquinate da PFOS e PFOA o a valle di scarichi industriali non depurati. Molti dei dati erano di questo tipo in quanto per le sostanze come PFOS e PFOA, non inserite in normative che ne richiedano periodici monitoraggi, spesso campionamenti e analisi si effettuano soltanto in seguito a episodi di gravi contaminazioni. Sono stati esclusi anche dati riferiti a campioni di acque di mare, salmastre, piovane e sotterranee, a specie ittiche non edibili o non commercializzate per scopi alimentari, a tessuti di prodotti ittici non edibili (plasma) o scarsamente presenti nella dieta media italiana (fegato). A seguito della selezione, il numero iniziale dei campioni si è ridotto complessivamente a circa 400. Nelle elaborazioni statistiche è stato adottato un approccio *medium bound*: i dati inferiori al limite di determinazione sono stati riportati come metà del limite. Le distribuzioni delle concentrazioni dei contaminanti nelle matrici alimentari considerate, risultate non-normali, sono state elaborate con statistica non-parametrica. Nella Tabella 1 si riportano i principali descrittori statistici ottenuti: N = numero dei dati originali, N_{ND} = percentuale di dati inferiori al limite di determinazione, Q_i = percentile i-esimo, $\langle X \rangle$ = media pesata, Range = intervallo minimo-massimo.

Per il calcolo del contributo all'*intake* dovuto al consumo di pesce e prodotti ittici, il valore medio di contaminazione dell'intera categoria è stato ottenuto utilizzando tutti i dati selezionati (sia di origine sia europea che internazionale); tale scelta è scaturita dalla considerazione che quasi il 70% dei prodotti ittici in vendita sul mercato italiano sono di provenienza estera (INDIS e Ministero delle Attività Produttive, 2006; ISMEA, 2007). Per la macrocategoria *Acqua* sono stati selezionati soltanto dati riferiti a campioni di origine europea pertanto la numerosità campionaria è ulteriormente diminuita.

Tabella 1. Descrittori statistici delle concentrazioni di PFOS e PFOA

	N	N _{ND} ^a	Q ₂₅	Q ₅₀	⟨X⟩	Q ₇₅	Range ^b
Acque potabili e superficiali di origine europea (ng/L)							
PFOS	76	20	1,00 ^b	5,00	7,14	8,00	0,010-56,0
PFOA	92	30	1,00	2,00	6,23	4,96	0,325-57,0
Prodotti ittici (muscolo o organismo intero) (ng/g di peso fresco)							
<i>pesce</i>							
PFOS	47	14	0,910	5,00	20,2	23,0	0,350-230
PFOA	48	83	0,125	0,800	1,91	1,10	0,023-18,7
<i>molluschi</i>							
PFOS	38	12	0,747	65,6	47,1	77,0	0,114-79,8
PFOA	28	22	0,290	0,480	4,71	7,50	0,014-22,9
<i>crostacei</i>							
PFOS	13	9	1,11	1,83	5,22	4,59	0,150-30,0
PFOA	13	39	0,233	0,420	1,33	0,870	0,125-9,50
<i>pesce e prodotti ittici</i>							
PFOS	100	12	0,860	23,0	35,8	67,1	0,114-230
PFOA	91	51	0,161	0,725	2,90	2,08	0,014-22,9

(a) N_{ND}, frazione (%) di non-determinati.

(b) In corsivo i valori "medium bound" ("0.5 × LD") derivati da limiti di determinazione.

Selezione dei dati di consumo e della popolazione

Per il calcolo del consumo individuale relativo alla macrocategoria *Acqua* sono stati sommati i consumi di diverse sottocategorie presenti nella banca-dati dei consumi dell'INRAN: acqua potabile, acqua minerale e bevande prodotte utilizzando acque potabili con contaminazione presumibilmente pari a quella dell'acqua destinata al consumo umano diretto (bevande analcoliche, succhi di frutta industriali, birra). Per il calcolo del consumo individuale relativo alla macrocategoria *Pesce e prodotti ittici* sono stati sommati i consumi di cinque sottocategorie di alimenti: pesce fresco, pesce surgelato, molluschi, crostacei, piatti pronti a base di pesce. Tali consumi sono stati usati anche singolarmente per calcolare i contributi all'*intake* relativi ad ogni sottocategoria alimentare.

Poiché tra i 1940 partecipanti allo studio INRAN molti soggetti non hanno consumato alcun alimento della macrocategoria *Pesce e prodotti ittici*, altri non hanno consumato alcuna bevanda della macrocategoria *Acqua* (soltanto un individuo non ha consumato alimenti appartenenti a nessuna delle due macrocategorie), per evitare di sottostimare l'*intake*, abbiamo escluso dalle elaborazioni i "non consumatori", il cui contributo avrebbe diluito l'*intake* della popolazione generale. Abbiamo quindi selezionato i 1613 soggetti che hanno consumato sia alimenti della categoria *Pesce e prodotti ittici* che bevande della macrocategoria *Acqua*. Tale sottopopolazione è definita *consumers only*. Per ciascuno di questi soggetti, abbiamo calcolato i consumi medi per giorno di ciascun alimento.

Stima dell'*intake*

L'*intake* individuale di PFOS (o PFOA) derivante dall'ingestione di un dato alimento (sottocategoria) è stato calcolato moltiplicando il consumo medio individuale dell'alimento per la corrispondente contaminazione. Sommando poi gli *intake* dovuti a tutte le sottocategorie, abbiamo ottenuto l'*intake* totale individuale dovuto all'assunzione di *Pesce e prodotti ittici* e *Acqua*. La stima dell'*intake* per ciascun soggetto dello studio è stata poi normalizzata per il corrispondente peso corporeo e la popolazione è stata suddivisa in tre gruppi per intervalli di età: bambini piccoli

(età 0,5-6 anni, esclusi i lattanti), bambini (età 7-12 anni) e adulti (età 13-94 anni). I tre set di dati di *intake* individuali giornalieri sono stati sottoposti ai test di normalità e log-normalità (Test di Shapiro-Wilks' W e di Kolmogorov-Smirnov $P = 0.05$) risultando in generale non-normali, di conseguenza nell'elaborazione è stata utilizzata statistica non-parametrica.

Riguardo alla categoria *Pesce e prodotti ittici* il calcolo dell'*intake* individuale è stato eseguito con due modalità. Dapprima è stata considerata una categoria unica quindi caratterizzata da un valore medio di contaminazione derivante da tutti i campioni inseriti nella macrocategoria e da un unico dato di consumo individuale ottenuto come somma dei consumi individuali delle tre sottocategorie *Pesce*, *Molluschi* e *Crostacei*. In seguito, osservando che tale macrocategoria apporta il contributo principale all'*intake* di PFOS e PFOA e che sia i consumi che le contaminazioni delle tre sottocategorie che la compongono sono molto diversi, abbiamo cercato di raffinare la stima dell'*intake* calcolando separatamente i contributi delle tre sottocategorie. Infatti, essendo la sottocategoria *Molluschi* molto più contaminata delle altre (Tabella 1) la stima del valor medio della contaminazione della macrocategoria *Pesce e prodotti ittici* potrebbe esser stata influenzata dalla sottocategoria *Molluschi* in modo eccessivo rispetto al reale contributo di tale alimento nei consumi provocando come conseguenza una sovrastima dell'*intake*. Abbiamo quindi ottenuto tre distribuzioni di *intake* e, sommandole, siamo giunti ad un dato relativo alla macrocategoria *Pesce e prodotti ittici* più aderente alla reale esposizione individuale.

Risultati

Dall'esame dei livelli di contaminazione (Tabella 1) emerge che una porzione non trascurabile dei dati deriva da risultati analitici inferiori ai limiti di determinazione, in misura maggiore per il PFOA rispetto al PFOS. Questo evidenzia le problematiche analitiche ancora presenti per queste sostanze e la limitata affidabilità del dato che si riflette sulla stima dell'*intake*.

In Tabella 2 riportiamo i descrittori statistici dell'*intake* alimentare dovuto alle due macrocategorie *Acqua* e *Pesce e prodotti ittici* stimati per le tre classi della popolazione. Vengono presentati i dati della prima elaborazione, della seconda elaborazione e i dati scorporati per sottocategoria.

Tabella 2. Descrittori statistici dell'*intake* alimentare di PFOS e PFOA della popolazione dei consumers only (n. 1613) espresso in ng/kg bw day

Macrocategorie	Fasce d'età					
	0,5-6 ^a		7-12		13-94	
	<X>	Range ^b	<X>	Range ^b	<X>	Range ^b
PFOS						
Totale I EI,	61,0	3,58-307	34,6	2,02-149	27,7	0,043-169
Totale II EI,	37,7	2,09-173	20,6	1,17-79,1	18,6	0,040-197
Acqua	0,206	0,007-0,544	0,123	0,007-0,332	0,085	0,002-0,398
Pesce	31,4	0,000-173	17,4	0,000-75,3	12,3	0,000-84,4
Molluschi	6,01	0,000-62,3	2,93	0,000-36,0	6,02	0,000-196
Crostacei	0,070	0,000-2,07	0,201	0,000-8,70	0,159	0,000-11,8
PFOA						
Totale I EI,	5,11	0,422-25,1	2,90	0,230-12,2	2,31	0,033-13,7
Totale II EI,	3,77	0,327-16,6	2,09	0,176-7,79	1,88	0,033-19,7
Acqua	0,206	0,007-0,544	0,123	0,007-0,332	0,085	0,002-0,398
Pesce	2,97	0,000-16,3	1,64	0,000-7,12	1,17	0,000-7,98
Molluschi	0,602	0,000-6,23	0,293	0,000-3,61	0,602	0,000-19,6
Crostacei	0,018	0,000-0,529	0,051	0,000-2,22	0,041	0,000-3,00

(a) Esclusi lattanti; (b) Intervallo minimo-massimo.

I risultati evidenziano che neonati e bambini piccoli (età 0,5-6 anni) mostrano i valori più elevati di *intake* individuali giornalieri, seguiti dai ragazzi dai 7 ai 12 anni e poi dagli adulti, con valori medi di *intake* (seconda elaborazione) per il PFOS rispettivamente pari a: 38, 21 e 19 ng/kg *bw day* e, per il PFOA, pari a: 3,8, 2,1 e 1,9 ng/kg *bw day*. Come atteso, l'*intake* diminuisce all'aumentare dell'età; in particolare, per i bambini piccoli è doppio rispetto agli adulti sia per il PFOS che per il PFOA. Questo dipende dal fatto che gli individui più giovani hanno consumi alimentari normalizzati sul peso corporeo maggiori rispetto ai soggetti adulti. I 95° percentili dell'*intake*, non riportati in Tabella 2, sono pari a: 90, 49 e 52 ng/kg *bw day* rispettivamente per bambini piccoli, pre-adolescenti e adulti nel caso del PFOS e 8,9, 4,9, 5,4 ng/kg *bw day* nel caso del PFOA. Gli individui più esposti (95° percentile) hanno *intake* pari a 2-3 volte gli *intake* medi. Pur ricordando la maggiore incidenza dei valori inferiori alla soglia di determinazione per il PFOA, si può osservare che, in tutte le fasce di età, l'*intake* di PFOA è circa 10 volte inferiore rispetto al PFOS. I valori medi di *intake* ottenuti con la prima elaborazione risultano maggiori rispetto ai risultati della seconda confermando che un maggior livello di dettaglio nella stima delle variabili iniziali limita la sovrastima dell'*intake*.

Dal confronto con il TDI stabilito dall'EFSA nel 2008 per il PFOS, pari a 0,15 µg/kg *bw day*, osserviamo che l'esposizione generale della popolazione italiana adulta a PFOS derivante dal consumo di *Pesce e prodotti ittici e acqua*, (19 ng/kg *bw day*), è circa otto volte inferiore. Mentre il livello di esposizione degli alti esposti (52 ng/kg *bw day* per gli adulti) è pari a circa un terzo del TDI. Resta da chiarire se questo margine di esposizione possa fornire sufficiente protezione contro eventuali esposizioni addizionali a PFOS dovute a precursori o a fonti non alimentari. Per il PFOA, il TDI è 1.5 µg/kg *bw day* dunque l'esposizione media della popolazione generale italiana a PFOA derivante dal consumo di *Pesce e prodotti ittici e acqua*, pari a circa 1.9 ng/kg *bw day*, si colloca quasi tre ordini di grandezza al di sotto. È stato stimato che il valore dell'esposizione a PFOA da fonti non-alimentari (come la polvere degli ambienti indoor e outdoor) potrebbe raggiungere circa il 50% dell'esposizione alimentare media, pertanto, pur considerando tutte le vie di esposizione, i livelli di *intake* sono molto inferiori al TDI. Inoltre, il TDI è circa 300 volte maggiore del livello di esposizione degli alti esposti (95° percentile, 5.4 ng/kg *bw day* per gli adulti). Dunque, anche per tale sottogruppo della popolazione, appare probabile che questo margine di esposizione possa fornire sufficiente protezione contro eventuali esposizioni addizionali a PFOA.

Riguardo ai contributi apportati all'*intake* totale dalle singole sottocategorie alimentari, la Figura 1 evidenzia che tra le categorie alimentari valutate, il contributo maggiore è fornito dal *Pesce*: dal 66 all'84% per il PFOS, nelle tre fasce di età, mentre per il PFOA, dal 62 al 79%. Anche i *Molluschi* contribuiscono in modo rilevante: dal 14 al 32% nelle tre fasce di età, sia per il PFOS che per il PFOA. Le categorie *Crostacei* e *Acqua*, invece, apportano contributi minori. In particolare, il consumo di acqua contribuisce all'*intake* totale di PFOS per circa lo 0,5%, mentre nel caso del PFOA, per il 4-5%. Il *Pesce* apporta il maggior contributo perché presenta una contaminazione media elevata e, soprattutto, i consumi medi maggiori. I *Molluschi* apportano il secondo contributo all'*intake* nonostante il loro basso consumo medio a causa dell'elevata contaminazione, maggiore di tutte le altre categorie alimentari. I *Crostacei*, infine, presentano sia bassi consumi che bassi livelli di contaminazione.

Il numero degli studi di esposizione umana a PFOS e PFOA condotti fino ad oggi, anche a livello internazionale, è molto limitato. In alcuni casi, come in Gran Bretagna (Mortimer *et al.*, 2006), in Canada (Tittlemier *et al.*, 2007) e in Germania (Fromme *et al.*, 2007), l'esposizione alimentare cumulativa è stata valutata attraverso studi di dieta totale, mentre in questo studio è stato valutato il contributo di due macrocategorie alimentari. Lo studio di Washburn (USA, 2005) riguarda l'esposizione conseguente all'utilizzo di prodotti di consumo come tappeti, abbigliamento e stoviglie trattati con sostanze contenenti PFOA.

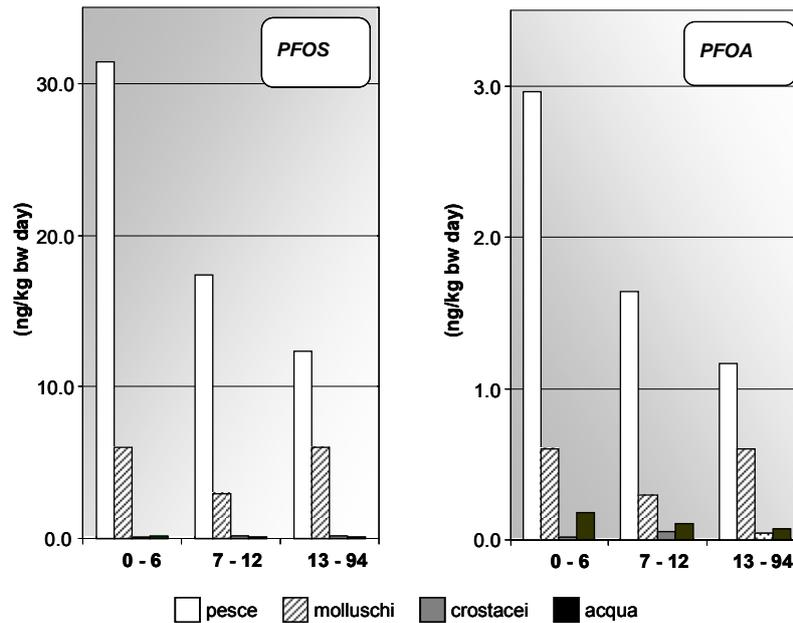


Figura 1. Contributi relativi delle diverse categorie alimentari all'intake stimato di PFOS e PFOA per i tre gruppi della popolazione italiana

Infine, la ricerca svizzera (Truedel *et al.*, 2007) considera tutte le possibili vie di esposizione. Escludendo il dato britannico, che riporta un intervallo di valori piuttosto ampio, l'esposizione alimentare media al PFOA varia per gli adulti tra 1.2 e 2.9 ng/kg bw day, mentre i bambini (esclusi i lattanti) risultano esposti a circa 4 ng/kg bw day. Nonostante le diverse metodologie e i diversi approcci utilizzati per la stima dell'intake, i valori da noi calcolati sono in buon accordo con quanto determinato attraverso studi sperimentali con campioni di alimenti che rappresentano la dieta media nazionale o diete duplicate (Fromme *et al.*, 2007; Tittlemier *et al.*, 2007) e con i risultati di Truedel *et al.* (2007). Quest'ultimo dato appare superiore al valore attorno a cui si assestano le altre valutazioni ma considera l'esposizione attraverso tutte le vie possibili. Riguardo al PFOS, il valore da noi calcolato per l'esposizione del gruppo degli adulti è circa un ordine di grandezza superiore rispetto ai dati di Germania (che riporta il valore mediano dell'intake) e Canada, tuttavia tale dato cade nell'intervallo *lower bound-upper bound* stimato in Gran Bretagna ed è confrontabile con il dato svizzero.

Conclusioni

È stato già evidenziato che una approfondita valutazione dell'esposizione alimentare dovrebbe coinvolgere tutti gli alimenti che compongono la dieta media nazionale; tuttavia, anche se questa elaborazione si presenta limitata a due sole categorie alimentari, si può concludere che la categoria del *Pesce e prodotti ittici* appare una importante fonte di esposizione, mentre il contributo dell'*Acqua* all'intake totale sembra trascurabile nel caso del PFOS e inferiore al 5% per il PFOA. I contributi delle altre categorie alimentari non sono noti, appare pertanto opportuno approfondire la materia dell'esposizione alimentare a PFAS non appena saranno disponibili ulteriori dati di contaminazione di tutte le matrici alimentari.

Bibliografia

- 3M Environmental Technology and Safety Services, EPA TSCA Good Laboratory Practice Standards. *Analysis of PFOS, FOSA and PFOA from various food matrices using hplc electrospray mass spectrometry*. State college, PA, USA: Analytical Report; 2001.
- Boulanger B, Vargo JD, Schnoor JL and Hornbuckle KC. Evaluation of Perfluorooctane Surfactants in a Wastewater Treatment System and in a Commercial Surface Protection Product. *Environmental Science and Technology* 2005;39:5524-30.
- EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts, *The EFSA Journal* 2008;653:1-131.
- Fromme H, Schlummer M, Möller A, Gruber L, Wolz G, Ungewiss J, Böhmer S, Dekant W, Mayer R, Liebl B, Twardella D. Exposure of an adult population to perfluorinated substances using duplicate diet portions and biomonitoring data. *Environmental Science and Technology* 2007;41:7928-33.
- INDIS e Ministero delle Attività Produttive, 2006. *La filiera del fresco ittico e delle carni bovine e suine*. Roma, 16 gennaio 2006. Disponibile all'indirizzo: <http://www.sviluppoeconomico.gov.it/osservatori/commercio/FilieraItticoCarni.pdf>; ultima consultazione 24/9/2010.
- ISMEA, 2007. *Il settore ittico in Italia e nel mondo: le tendenze recenti*. Novembre 2007. Disponibile all'indirizzo: <http://www.ismea.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/2756>; ultima consultazione 24/9/2010.
- Kroes R, Müller D, Lambe J, Löwik MRH, Ven Klaveren J, Kleiner J, Massey R, Mayer S, Urieta I, Verger P, and Visconti A. Assessment of intake from the diet. *Food and Chemical Toxicology* 2002;40:327-85.
- Loos R, Wollgast J, Huber T, Hanke G. Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2007;387:1469-78.
- Mortimer DN, Clarke DB, Gem M, Rose M. Perfluorinated compounds in the UK 2004 Total Diet. *Organohalogen Compounds* 2006;68:371-74.
- Tittlemier S A, Pepper K, Seymour C, Moisey J, Bronson R, Cao X-L, Dabeka RW. Dietary exposure of Canadians to perfluorinated carboxylates and perfluorooctane sulfonate via consumption of meat, fish, fast food, and food items prepared in their packing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007;55:3203-10.
- Truedel D, Horowitz L, Wormuth M, Scheringer M, Cousins I and Hungerbühler K. Estimating consumer exposure to PFOS and PFOA. *Risk Analysis* 2008;28:251-69.
- Turrini A and Lombardi-Boccia D. The formulation of the market basket of the Italian total diet 1994-1996. *Nutrition Research* 2002;22:1151-62.
- Turrini A, Saba A, Perrone D, Cialfa E, D'Amicis A. Food consumption pattern in Italy: The INN-CA study 1994-1996. *European Journal of Clinical Nutrition* 2001;55:571-788.
- UK FSA, 2006. *Fluorinated chemicals: UK dietary intakes*. 11/06 June 2006.
- US EPA SAB (Science Advisory Board), 2006. *SAB Review of EPA's Draft Risk Assessment of Potential Human Health Effects Associated with PFOA and Its Salts*. United States Environmental Protection Agency (Washington DC). EPA-SAB-06-006.
- Washburn ST, Bingman TS, Braithwaite SK, Buck RC, Buxton W, Clewell HJ, Haroun LA, Kester JE, Rickard RW and Shipp AM. Exposure assessment and risk characterization for perfluorooctanoate in selected consumer articles. *Environmental Science and Technology* 2005;39:3904-10.
- WHO. *Guidelines for the study of dietary intakes of chemical contaminants*. WHO offset publication No 87. Geneva: World Health Organization; 1985.

LA FORMAZIONE DI METABOLITI TOSSICI DEI PESTICIDI ORGANOFOSFOROTIONATI NELL'UOMO E IMPLICAZIONE PER LA SUSCETTIBILITÀ INDIVIDUALE

Franca Maria Buratti
 Reparto di Meccanismi di Tossicità

I pesticidi organofosforotionati (OPT) sono tra le sostanze più utilizzate in campo agricolo, domestico e veterinario per il controllo degli insetti e dei parassiti. Pur mostrando grande selettività d'azione e limitata persistenza ambientale, si contano ogni anno nel mondo, specialmente nei paesi in via di sviluppo, circa 3 milioni di intossicazioni acute e più di 200 mila morti (1) poiché sono potenti inibitori dell'Acetilcolinesterasi (AChE), enzima fondamentale nella trasmissione nervosa. L'esposizione non è solo occupazionale ma anche la maggioranza della popolazione può essere esposta poiché gli OPT sono presenti nel cibo e nell'acqua, come residui, e spesso sono utilizzati come insetticidi anche in ambiente residenziale.

Gli OPT sono composti organofosforici (OP) di seconda generazione. Rispetto ai primi OP, il gruppo P=O, responsabile dell'azione tossica, è stato sostituito da un gruppo P=S per cui gli OPT devono essere bioattivati attraverso una reazione di sulfossidazione, catalizzata dal citocromo P450 (P450), per essere trasformati nei corrispondenti metaboliti tossici detti genericamente oxon (triestere fosfati) (Figura 1). Gli OPT possono avere vari tipi di strutture: i gruppi uscenti (X) possono essere lineari e aromatici e può essere anche presente un secondo atomo di zolfo che può essere ulteriormente sulfossidato per dare altri metaboliti potenzialmente tossici (vedi fenthion Figura 1).

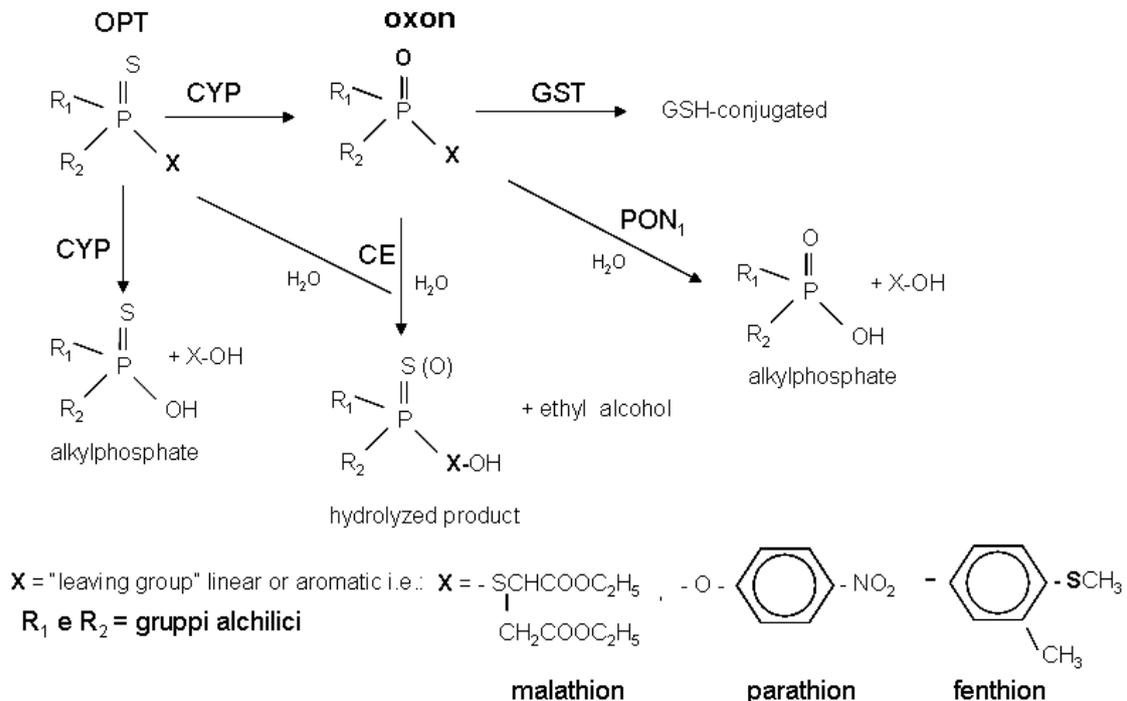


Figura 1. Pathway metabolico generico dei pesticidi OPT

L'azione tossica dell'oxon deriva dalla sua capacità di inibire l'AChE provocando crisi colinergiche ed effetti sul sistema nervoso centrale. L'inibizione deriva dalla fosforilazione dell'AChE che si riattiva spontaneamente solo dopo molte ore (fino a 17h); la velocità di riattivazione varia tra OPT a seconda della loro struttura. Per velocizzare tale reazione e contrastare gli effetti di intossicazioni acute, vengono utilizzati come antidoti le ossime (es. la pralidossima o 2-PAM) che si legano all'AChE, scalzando l'oxon (Figura 2). La somministrazione del 2-PAM deve essere repentina, poiché il complesso oxon-AChE, per una reazione detta di *ageing*, tende a perdere un gruppo alchilico (R_1 o R_2) rendendo il legame irreversibile, con la conseguenza di dover aspettare la sintesi di nuova AChE per ripristinare la corretta trasmissione nervosa (Figura 2) (2). La velocità di *ageing* è inversamente proporzionale alle dimensioni del gruppo alchilico: metilico>isopropilico>etilico.

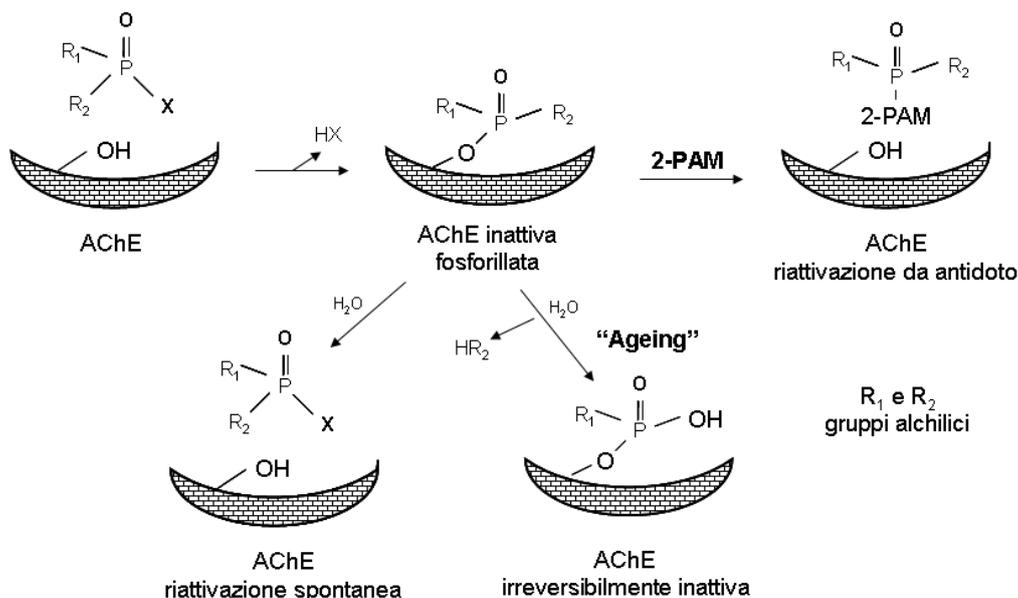


Figura 2. Meccanismo di inibizione dell'AChE da parte dell'oxon, *ageing*, riattivazione spontanea o provocata (2-PAM)

Il P450, che è il catalizzatore della bioattivazione degli OPT, in realtà è una famiglia di isoenzimi, identificati col termine CYP, presenti per lo più nel fegato che mostrano ampia e sovrapponibile specificità di substrato e sono coinvolti nella biotransformazione di molte sostanze endogene ed esogene (farmaci, pesticidi, contaminanti ambientali) (3). Nell'uomo esiste un'ampia variabilità interindividuale nel contenuto di CYP, dovuto sia a fattori genetici che allo stile di vita e a fattori fisiopatologici (età, sesso, stato di gravidanza, presenza di patologie). I primi caratterizzano stabilmente ciascun individuo, facendo parte del suo patrimonio genetico, mentre i secondi possono modificarsi nel tempo e quindi influenzano solo temporaneamente i livelli di espressione dell'enzima. I fattori genetici sono dovuti al polimorfismo degli enzimi del metabolismo, per il quale uno stesso gene può presentarsi in diverse forme alleliche che codificano per uno stesso enzima, con frequenza nella popolazione >1%. Le forme varianti di uno stesso gene, che determinano genotipi diversi, codificano proteine strutturalmente diverse; se la differenza strutturale si traduce in una diversa funzionalità si manifesteranno anche fenotipi diversi. Le forme varianti di un enzima possono presentare livelli di attività enzimatica maggiore, ridotta o nulla rispetto alla forma *wild type*, in modo tale

che all'interno di una popolazione possano essere identificati gruppi di individui con distinte caratteristiche metaboliche. Inoltre l'espressione di un CYP può essere indotta dall'esposizione a sostanze di uso comune come la caffeina e il fumo di sigaretta.

La conoscenza di quali isoenzimi siano coinvolti nella formazione degli oxon rappresenta lo stadio preliminare per l'individuazione di biomarcatori metabolici di suscettibilità per l'identificazione di gruppi a rischio nella popolazione esposta.

Nel corso di questi anni abbiamo studiato la bioattivazione umana di 7 OPT: 4 a struttura aromatica: diazinon (DIA), chlorpyrifos (CPF), azinphos-metile (AZIN) e parathion (PAR); 2 lineari: malathion (MAL) e dimetoato (DIM) e uno con un secondo atomo di zolfo: fenthion (FEN).

Dopo la scelta iniziale di studiare gli OPT maggiormente usati (CPF, DIA, PAR, AZIN, MAL), la nostra attenzione è stata catturata da alcuni dati clinici riportati in letteratura. Eddleston nel 2005 (4) riportava i casi di pazienti ospedalizzati dopo avvelenamento da CPF, DIM o FEN e notava che il DIM pur avendo una LD₅₀ maggiore del CPF, per cui è meno tossico nei roditori, dava una maggiore incidenza di decessi rispetto al CPF (8% vs 23,1%). Secondo gli autori questo dato poteva essere spiegato pensando alla struttura chimica diversa tra i due OPT che determinava per il DIM una reazione di *ageing* del complesso oxon-AChE più veloce rispetto a quella del CPF (gruppo metilico vs gruppo etilico) ma anche con possibili differenze nella cinetica di bioattivazione. Un altro dato interessante riguardava il fatto che le persone avvelenate da FEN e DIM rispondevano meno efficacemente all'antidoto 2-PAM nel riattivare AChE e quindi nel migliorare i sintomi rispetto a chi era intossicato con il CPF (4). Per questo motivo è stato studiato anche il metabolismo di DIM e FEN, permettendo anche di fare alcune considerazioni per la classe degli OPT, contenente molecole con strutture diverse.

Per studiare la biattivazione degli OPT è stato utilizzato un approccio integrato. In una prima fase sono state utilizzate forme ricombinanti (c-DNA espresse) delle singole isoforme umane del P450 per individuare quali CYP fossero coinvolti nella reazione e costruire le curve di attività per calcolare i parametri cinetici V_{max}, K_m (concentrazione di substrato alla quale si misura V_{max}/2) e Clearance intrinseca (CL_i) (pari al rapporto V_{max}/K_m), che danno indicazioni rispettivamente dell'attività, dell'affinità e dell'efficienza enzimatica nella bioattivazione (in Figura 3 è riportato l'esempio del MAL utilizzato come substrato).

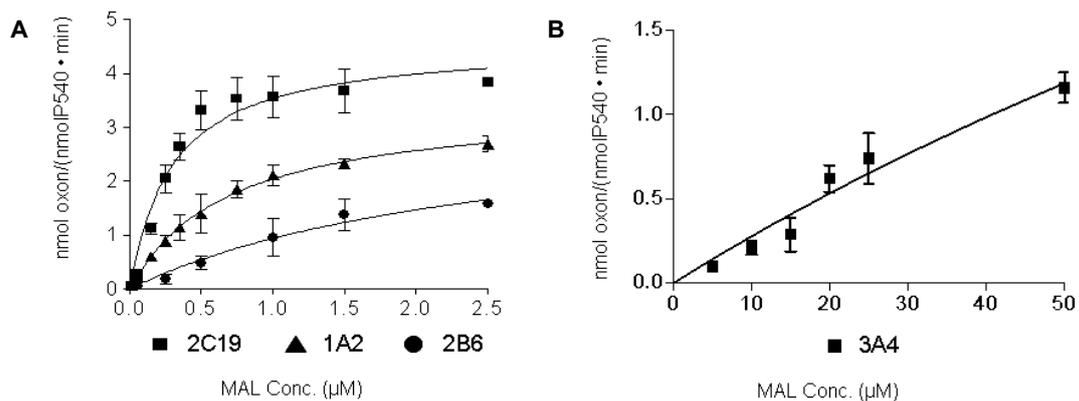


Figura 3. Esempi di curve cinetiche (A) saturate e (B) lineari con il MAL

Alcuni CYP raggiungono la saturazione nell'intervallo di concentrazioni testate, dando luogo alla costruzione di tipiche curve cinetiche di Michaelis-Menten (Figura 3A), mentre altri come il CYP3A4 (Figura 3B) mantengono andamento lineare anche alla massima concentrazione usata,

indicando che l'enzima non è stato saturato e non è stata raggiunta la velocità massima (Vmax). Il range di concentrazioni utilizzato è stato tenuto volutamente al di sotto dei 100µM per studiare l'efficienza enzimatica con concentrazioni rappresentative delle condizioni di esposizione reale della popolazione. Infatti sulla base di dati di biomonitoraggio e l'applicazione di modelli farmacocinetici si è ipotizzato che concentrazioni di OPT *in vitro* ≤10 µM sono le più appropriate per mimare le condizioni di esposizione reale in vivo (5-7).

Nella Tabella 1 sono riportati, sempre utilizzando il MAL come esempio, i CYP maggiormente efficienti (CLi più alte) nella formazione dell'oxon e, considerando il contenuto medio dei CYP nel fegato umano, è stato calcolato il contributo percentuale delle varie isoforme alla bioattivazione. A basse concentrazioni di pesticida il CYP1A2 è risultata l'isoforma maggiormente coinvolta (nel caso del MAL 81%) (Tabella 1). Ad alte concentrazioni di MAL (Tabella 1), la situazione risulta cambiata con il contributo dell'1A2 che si riduce e quello del 3A4 che aumenta (40% vs 43%). Il contributo del 3A4 è destinato a crescere con l'aumento della concentrazione di pesticida perché formerà sempre più oxon rispetto agli altri avendo ancora un'attività lineare quando gli altri hanno raggiunto l'attività massima (Vmax).

Tabella 1. Contributo (%) dei CYP alla formazione di oxon da MAL

CYP	CLi ^a	Vmax ^b (o V a 50 µM)	Contenuto medio nel fegato umano (%)	Contributo%
Basse Concentrazioni di MAL				
1A2	3,5 ± 0,2	/	12	81
2C19	7,8 ± 0,5	/	1,1	16
3A4	0,025 ± 0,001	/	40	2
2B6	0,92 ± 0,02	/	0,2	0,4
Alte Concentrazioni di MAL				
3A4	/	1,16 ± 0,05	40	43
1A2	/	3,67 ± 0,03	12	40
2C9	/	3,67 ± 0,03	9,4	8
2C19	/	3,67 ± 0,03	1,1	5

a = (nmol oxon · nmolCYP⁻¹ · min⁻¹ · µM⁻¹)

b = (nmol oxon · nmolCYP⁻¹ · min⁻¹)

In una seconda fase sono stati utilizzati microsomi ottenuti da biopsie di fegato umano (HLM), per studiare il comportamento enzimatico quando tutte le isoforme sono contemporaneamente presenti. La formazione dell'oxon è stata correlata con l'attività marker dei vari CYP (Tabella 2) evidenziando che a basse concentrazioni la correlazione migliore si evidenzia con il CYP1A2 mentre ad alte concentrazioni con CYP3A4 e 2B6.

Tabella 2. Correlazione tra formazione di oxon da MAL e attività marker dei CYP nei HLM

Attività marker CYP	Coefficiente di correlazione r ²	
	oxon (50 µM MAL)	oxon (400 µM MAL)
Caffeine N3-Demethylation (CYP1A2)	0.722*	0.081
Dextromethorphan N- Demethylation (CYP3A4)	0.042	0.828**
S-Mephenytoin N-Demethylation (CYP 2B6)	0.026	0.902**
S-Mephenytoin 4'- Hydroxylation (CYP 2C19)	0.125	0.329

* p< 0.01 ; ** p< 0.001

Inoltre le curve cinetiche costruite con alcuni HLM hanno evidenziato che le isoforme attive non partecipano in maniera uniforme alla bioattivazione nell'intervallo di concentrazioni testate. Infatti, linearizzando le curve cinetiche (linearizzazione di Eadie-Hofstee per calcolare V_{max} e K_m) non otteniamo una retta ma una spezzata (Figura 4B), evidenziando l'esistenza di due fasi enzimatiche una ad alta (Δ) e una a bassa affinità (\blacksquare). In altre parole, ci sono isoforme che mostrano maggiore efficienza nel bioattivare il substrato e iniziano a lavorare a concentrazioni basse, mentre altri CYP si attivano a concentrazioni più alte.

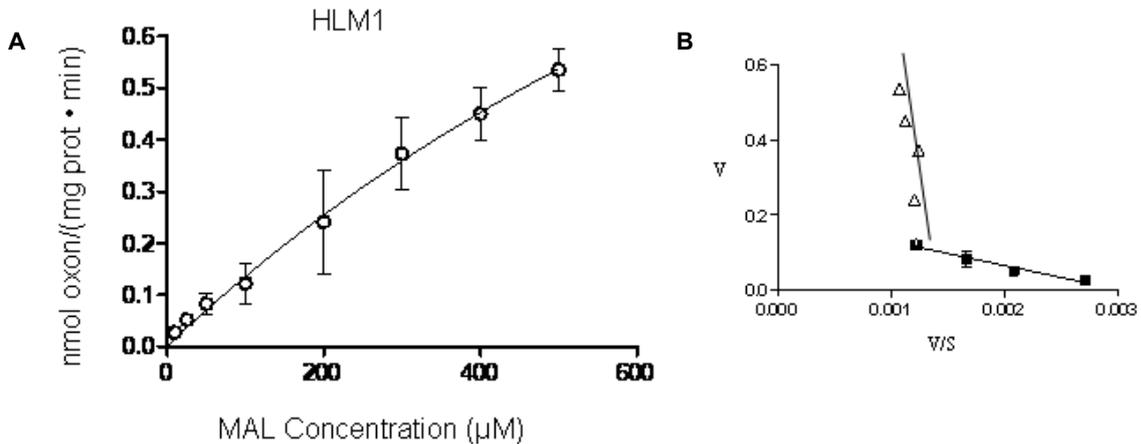


Figura 4. Curva cinetica tipica degli HLM (A) e corrispondente linearizzazione di Eadie-Hofstee (B) con la fase ad alta (Δ) e bassa (\blacksquare) affinità

Per individuare le isoforme coinvolte nelle due fasi sono stati utilizzati sia degli inibitori chimici sia anticorpi specifici. Usando gli inibitori chimici le curve cinetiche variavano andamento a seconda del contenuto epatico delle isoforme più attive (1A2, 3A4 e 2B6). Per esempio nel caso esemplificato in Figura 5, il campione HLM1 è caratterizzato da alti livelli di 1A2 e livelli medi di 3A4 e 2B6: in presenza di furafillina (\square), inibitore specifico del CYP1A2, la parte iniziale della curva scompare, evidenziando il coinvolgimento di questa isoforma nella fase ad alta affinità. Al contrario, usando l'orfenadrina (\bullet), inibitore del 2B6, si ottiene una curva sovrapponibile a quella senza inibitore alle basse concentrazioni di pesticida, ma che non raggiunge la stessa attività massima rispetto a quella senza inibitori (\diamond).

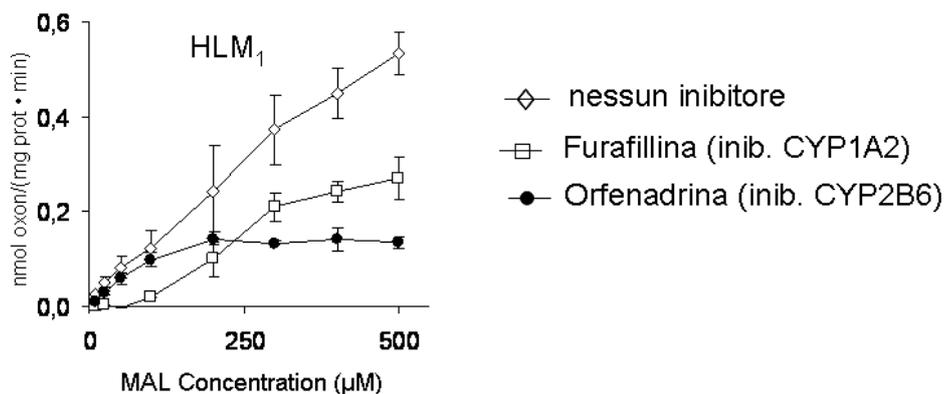


Figura 5 Curva cinetica di HLM con e senza inibitori

Come riportato in Tabella 3, usando gli anticorpi, che in seguito ad immuno-precipitazione inibiscono l'attività della isoforma corrispondente, a basse concentrazioni il maggiore e significativo calo dell'attività è data dall'uso dell'anticorpo antiCYP1A2 mentre ad alte concentrazioni sono quelli del 3A4 e del 2B6 che danno un effetto significativo. Nel caso dell'HLM₂ (Tabella 3) l'anticorpo anti-CYP2B6 dava un effetto anche a basse concentrazioni dovuto probabilmente alla sua elevata presenza nel fegato del donatore. L'inibizione è calcolata rispetto ad incubazioni di controllo senza anticorpi posti come 100% di attività. L'attività di controllo per ogni concentrazione di MAL nei singoli HLM è posta tra parentesi come media \pm SD ed è espressa come pmol oxon

Tabella 3. Inibizione dell'attività (%) mediante anticorpi (Abs) con gli HLM

	MAL	Anti CYP3A4	Anti CYP1A2	Anti CYP2B6	Anti CYP2D6	Anti CYP1A1	Multiple ^a Abs
HLM ₁	50 μ M (66 \pm 10)	11 \pm 2	72 \pm 5***	0 \pm 7	4 \pm 2	1 \pm 3	78 \pm 3***
	400 μ M (387 \pm 90)	58 \pm 8***	11 \pm 9	50 \pm 8**	6 \pm 8	4 \pm 7	88 \pm 6***
HLM ₂	50 μ M (662 \pm 10)	0 \pm 12	71 \pm 5***	71 \pm 1***	0 \pm 5	2 \pm 5	83 \pm 7***
	400 μ M (2904 \pm 50)	70 \pm 5***	15 \pm 9	57 \pm 1***	2 \pm 4	0 \pm 4	93 \pm 5***
HLM ₅	50 μ M (106 \pm 25)	6 \pm 3	69 \pm 7***	9 \pm 2	3 \pm 7	0 \pm 8	73 \pm 8***
	400 μ M (713 \pm 40)	59 \pm 6***	4 \pm 6	48 \pm 5**	0 \pm 3	2 \pm 9	92 \pm 7***

*(mg prot *min)⁻¹.

** p< 0.01 ; *** p< 0.001 a = Anti-CYP3A4 + Anti-CYP1A2 + Anti-CYP2B6

Dopo aver seguito questo approccio sperimentale per tutti e 7 gli OPT scelti, è stato possibile concludere che, indipendentemente dalla struttura chimica dei sostituenti (lineari e/o aromatici) a basse concentrazioni di OPT (intorno a 10 μ M), rappresentative dei livelli di esposizione reale di gran parte della popolazione, i CYP attivi erano 1A2>2B6>>3A4. Mentre ad alte concentrazioni (> 100 μ M), rappresentative dei casi di avvelenamento e di intossicazioni acute, i CYP maggiormente coinvolti erano 3A4>2B6>>1A2 (5-9).

Prima di poter trarre delle conclusioni nel caso del FEN, per il quale sono attive varie vie metaboliche di bioattivazione, abbiamo dovuto approfondire la situazione. Infatti avendo un secondo atomo di zolfo sulfossidabile (Figura 6) il FEN può dare altri metaboliti ossidati come il FEN-sulfossido e il FEN-sulfone che inibiscono l'AChE, anche se con forza diversa dall'oxon (oxon \approx sulfone > sulfossido). La formazione del sulfossido è catalizzata dai CYP ma anche da un altro gruppo di enzimi le monoossigenasi flaviniche (FMO), reazione questa che compete con quella dell'oxon e porterebbe alla formazione di un metabolita meno tossico (Figura 6). Visto il complesso *pathway* metabolico (Figura 6), è stata verificata sia la possibile formazione di FEN dal sulfossido tramite le aldeidi ossidasi citosoliche, che sposterebbero l'equilibrio metabolico verso la formazione dell'oxon, sia la possibile formazione di sulfone dal sulfossido. Entrambe le reazioni, che darebbero maggiori livelli di metaboliti tossici, hanno dato esito negativo.

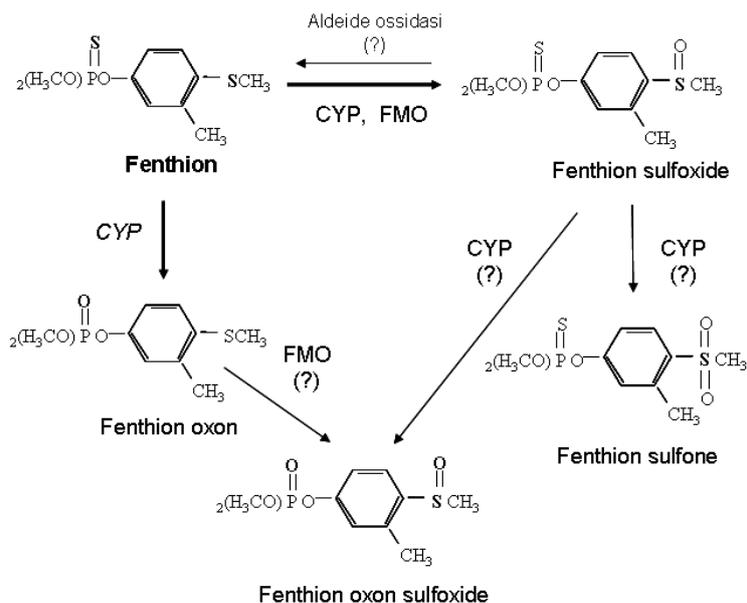


Figura 6. Generico pathway metabolico del FEN

Usando i singoli CYP c-DNA espressi alcune isoforme hanno mostrato capacità diverse di formare entrambi i metaboliti (Figura 7).

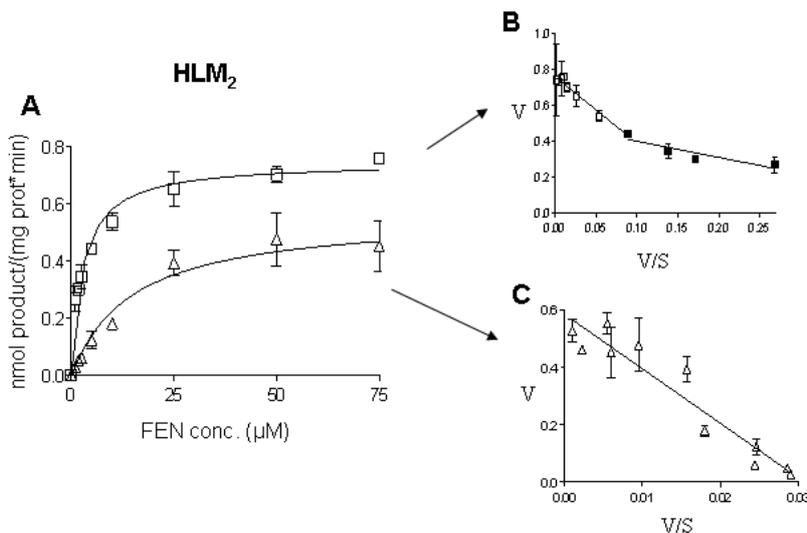


Figura 7. Formazione di oxon (□) e sulfossido (Δ) da FEN con i singoli CYP c-DNA espressi

Usando invece gli HLM si è evidenziato, con la linearizzazione di Eadie-Hofstee, che mentre la formazione dell'oxon mostra le due fasi con diversa affinità (Figura 8B) la formazione di sulfossido ha un'unica fase, senza una netta separazione dell'efficienza degli isoenzimi coinvolti tra alte e basse concentrazioni (Figura 8C).

Il contributo delle FMO epatiche alla formazione del sulfossido è risultato trascurabile alle basse concentrazioni, mentre era comparabile a quello dei CYP alle concentrazioni più alte. Conseguentemente a basse concentrazioni la via metabolica principale è risultata la formazione dell'oxon mentre alle alte il sulfossido riesce a competere più efficientemente (9).

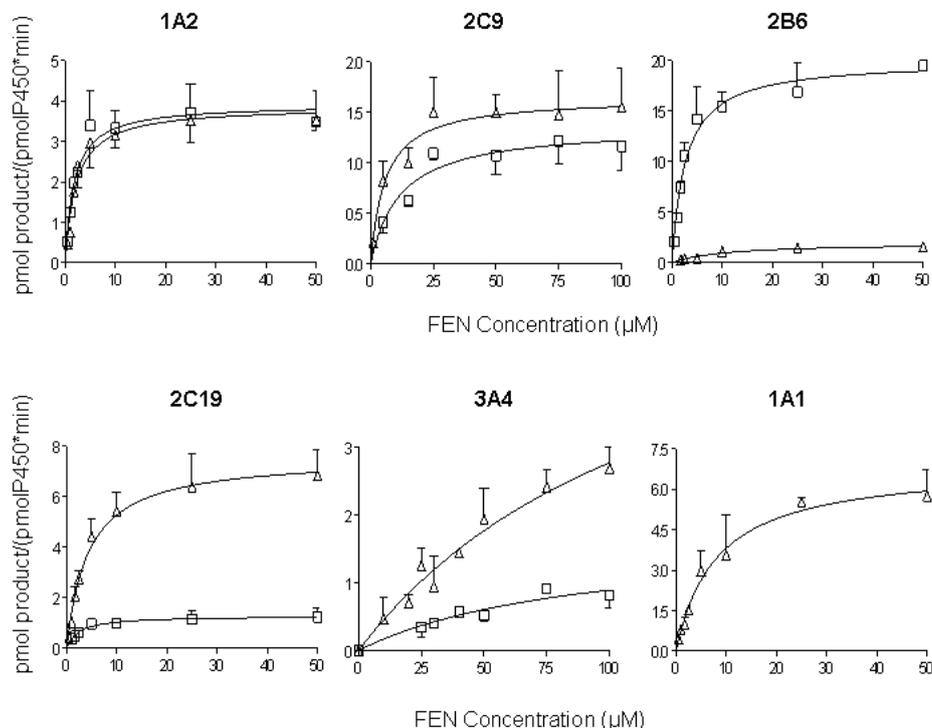


Figura 8. Formazione di oxon (□) e sulfossido (Δ) da FEN con HLM (A) e linearizzazione di Head-Hofstee per l'oxon (B) (con fase ad alta affinità (□) e fase a bassa affinità (■)) e per il sulfossido (C) (unica fase (Δ)).

Quindi alla luce dei risultati ottenuti con tutti gli OPT testati abbiamo potuto ipotizzare che indipendentemente dalla struttura chimica la classe dei pesticidi OPT è bioattivata dagli stessi CYP. A basse concentrazioni (intorno a 10 μM) rappresentative dei livelli di esposizione reale della popolazione generale il CYP1A2 è l'isoforma maggiormente coinvolta alla formazione dell'oxon. Essendo una isoforma polimorfica e facilmente inducibile da caffeina, IPA (fumo di sigaretta) e ammine aromatiche (carne troppo cotta), individui caratterizzati da maggiore attività 1A2-dipendente formeranno più metaboliti tossici e saranno più suscettibili agli effetti tossici da OPT. Conseguentemente il CYP1A2 può essere considerato un buon biomarcatore metabolico di suscettibilità individuale alla tossicità indotta dagli OPT.

Il ruolo del 2B6 è risultato controverso perché legato al suo contenuto epatico (normalmente molto basso 0,2%) mentre il ruolo del CYP3A4 è legato alle alte concentrazioni (>100 μM), rappresentative dei casi di intossicazioni acute e avvelenamento, e potrebbe suggerire terapie alternative per la cura dei pazienti che non rispondono in maniera ottimale all'antidoto 2-PAM (5-9). Durante questi studi abbiamo inoltre approfondito alcuni aspetti legati all'identificazione di gruppi più suscettibili. Per esempio, considerando che alcuni farmaci sono metabolizzati dagli stessi CYP coinvolti con gli OPT, Di Consiglio nel 2005 ha evidenziato l'inibizione fino all'80% della

formazione del metabolita farmacologicamente attivo dell'imipramina (un antidepressivo) con basse concentrazioni di OPT. Per questo motivo una co-esposizione durante il trattamento farmacologico potrebbe portare a un calo dell'efficacia terapeutica (10).

Un altro caso è quello del MAL che è considerato uno degli OPT più sicuri e meno tossici per i mammiferi perché è idrolizzato da una classe di enzimi, le carbossilesterasi (CE), la cui inibizione provoca l'aumento della tossicità del MAL. Questo effetto è riportato in letteratura per l'isomalathion, composto che si forma durante la produzione e lo stoccaggio non corretto e ad elevate temperature del MAL stesso. Abbiamo caratterizzato l'azione inibitoria, sulle CE umane di circa 20 donatori, non solo dell'isomalathion, ma anche di altri OPT: il CPF e il PAR che hanno mostrato di inibire le CE umane 10-100 volte in meno dell'isomalathion. L'inibizione quindi, pur essendo possibile, sembra risultare irrilevante in caso di esposizione contemporanea al MAL. D'altra parte però anche l'oxon del CPF (CPF-oxon) inibisce le CE, con potenza anche superiore all'isomalathion. Quindi in caso di co-esposizione MAL-CPF, quest'ultimo essendo bioattivato più efficientemente al suo oxon rispetto al MAL, provocherebbe l'aumento della tossicità di quest'ultimo per l'inibizione delle CE da parte del CPF-oxon (11).

Altro caso particolare è quello del DIM che, pur mostrando un comportamento simile agli altri OPT per quanto riguarda i CYP coinvolti nella sua bioattivazione, con gli HLM ha evidenziato una cinetica atipica. Infatti sono state ottenute curve sigmoidali più o meno evidenti (Figura 9) dovute all'autoattivazione di uno o più isoforme (operatività omotropica positiva, vale a dire che all'aumentare della concentrazione di substrato aumenta l'efficienza enzimatica dell'isoforma). Come riportato in Figura 9 la sigmoidicità, anche quando poco evidente, diventa chiara con la linearizzazione di Eadie-Hofstee, dove non si hanno una o due fasi ma una curva ad uncino detta "hockey stick" (Figura 9B) e con la linearizzazione di Hill che serve proprio a calcolare il grado di sigmoidicità n (che è >1 , se $=1$ si ha la classica curva cinetica di Michaelis-Menten e assenza di autoattivazione) (Figura 9C).

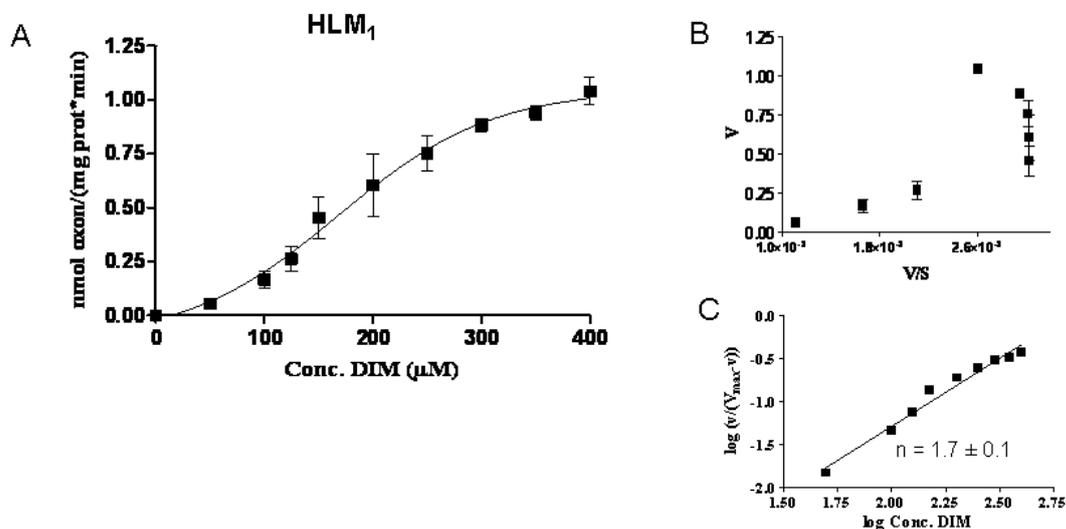


Figura 9. Curva cinetica della formazione dell'oxon (OME) da DIM (A) e linearizzazione di Eadie-Hofstee (B) e linearizzazione di Hill (C)

Usando degli inibitori specifici delle isoforme più attive (1A2, 2B6 e 3A4) si è notato l'aumento della sigmoidicità con l'inibitore del CYP1A2 mentre con quello del 2B6 la

situazione rimaneva invariata (Figura 10). Dato che con l'inibitore del 3A4 la sigmoidicità scompariva ($n \approx 1$) (Figura 10) ed n aumentava al crescere dei livelli epatici di 3A4 negli HLM, l'autoattivazione è stata attribuita a questo CYP (5). Questo potrebbe in parte spiegare la diversa mortalità tra gli intossicati con CPF e DIM (8% vs 23,1%), a cui si è accennato all'inizio, pur avendo quest'ultimo una tossicità inferiore (4).

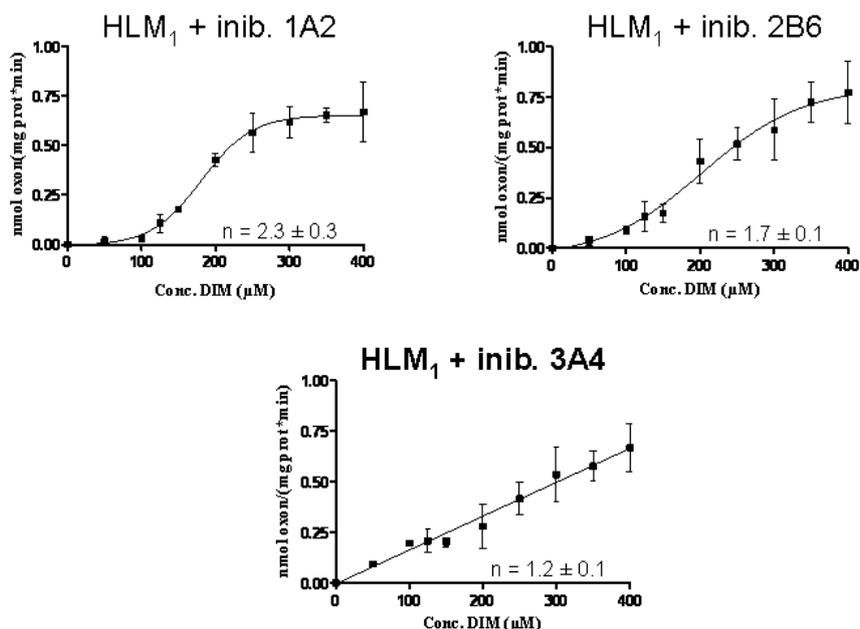


Figura 10. Curve cinetiche di formazione dell'oxon da DIM con inibitori specifici di alcuni CYP

Attualmente sono in corso altri studi sugli OPT, sia per la valutazione del metabolismo extraepatico degli OPT, sia relativamente ai possibili effetti del CPF in vivo in seguito ad esposizione perinatale su modello murino. Infatti gli OPT passano nella placenta come dimostrato dalla presenza dei loro metaboliti nel sangue del cordone ombelicale e nel meconio umano post-parto (12, 13, 14). Utilizzando però l'isoforma fetale della famiglia 3A4, il CYP3A7, abbiamo visto che anche il feto *in situ* è in grado di metabolizzare gli OPT (15), per cui gli effetti prenatali indotti da questi pesticidi, come basso peso alla nascita e ridotta circonferenza cranica (12, 16), potrebbero derivare dalla bioattivazione degli OPT da parte di tutto il complesso materno-feto-placentare. Inoltre, i bambini sono la popolazione attualmente considerata più suscettibile poichè possono avere un *intake* superiore a quello dovuto alla sola dieta per il fatto che toccano e mettono facilmente le mani e possibili oggetti contaminati in bocca (17, 18, 19).

Bibliografia

1. Yasmashita M, Tanaka J, Ando Y. Human mortality in organophosphate poisoning. *Vet Human Toxicol* 1997; 39:84-5.
2. Eyer P. The role of opime in the management of organophosphorus pesticide poisoning. *Toxicol Rev* 2003; 22:165-90

3. Parkinson A. Biotransformation of xenobiotics. In: Klaassen CD.,ed. Casarett & Doull's *Toxicology the basic science of poisons* 1996; 113-186
4. Eddleston M, Eyer P, Worek F, Mohamed F, Senarathna L, von Meyer L, Juszczyk E, Hittarage A, Azhar S, Dissanayake W, Rezvi Sheriff MH, Szinicz L, Dawson AH, and Buckley NA Differences between organophosphorus insecticides in human self-poisoning: a prospective cohort study. *Lancet* 2005; 366: 1452-59.
5. Buratti FM, Volpe MT, Fabrizi L, Meneguz A, Vittozzi L, Testai E. Kinetic parameters of OPTpesticide desulfuration by c-DNA expressed human CYPs. *Environ Toxicol Pharmacol* 2002; 11(3-4):181-90.
6. Buratti FM, Volpe MT, Meneguz A, Vittozzi L, Testai E. CYP-specific bioactivation of fourorganophosphorothionate pesticides by human liver microsomes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 186(3):143-54.
7. Buratti FM, D'Aniello A, Volpe MT, Meneguz A, Testai E. Malathion bioactivation in the human liver: the contribution of different P450 isoforms. *Drug Metab Disp* 2005; 33 (3): 1-8
8. Buratti FM, Testai E. Evidences for CYP3A4 autoactivation in the desulfuration of Dimethoate by the human liver. *Toxicol* 2007; 241: 33 - 46
9. Leoni C, Buratti FM, Testai E The participation of human hepatic P450 isoforms, flavin-containing monooxygenases and aldehyde oxidase in the biotransformation of the insecticide fenthion. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 233(2):343-52
10. Di Consiglio E, Meneguz A, and Testai E. Organophosphorothionate pesticides inhibit the bioactivation of imipramine by human hepatic cutochrome P450s. *Toxicol App. Pharmacol* 2005; 205: 237-46.
11. Buratti FM, Testai E. Malathion detoxification by human hepatic carboxylesterases and its inhibition by isomalathion and other pesticides. *J Biochem Mol Toxicol* 2005; 19(6): 406-14.
12. Whyatt RM, Rauh V, Barr DB, Camann DE, Andrews HF, Garfinkel R, Hoepner LA, Diaz D, Dietrich J, Reyes A, Tang D, Kinney PL, and Perera FP. Prenatal insecticide exposures and birth weight and length among an urban minority cohort. *Environ Health Perspect* 2004; 112(10): 1125-32.
13. Whyatt RM, Barr DB. Measurement of organophosphate metabolites in postpartum meconium as potential biomarker of prenatal exposure: a validation study. *Environ Health Perspect* 2001; 109(4): 417-20.
14. Berkowitz GS, Wetmure JG, Birman-Deych E, Obel J, Lapinsky RH, Godbold JH, Holzman IR, and Wolff MS. In utero pesticide exposure, maternal paraoxonase activity, and head circumference. *Environ. Health Perspect.* 2004; 112(3):388-91
15. Buratti FM, Leoni C, Testai E. Foetal and adult human CYP3A isoform in the bioactivation of organophosphorothionate insecticides. *Toxicol Lett* 2006;167: 245-55
16. Abdel-Rahman AA, Blumenthal GM, Abou-Donia SA, Ali FAF, Abdel-Monem AE, and Abou-Donia MB. Pharmacokinetic profile and placenta transfer of a single intravenous injection of [¹⁴C]chlorpyrifos in pregnant rats. *Arch Toxicol.* 2002; 76: 452-59.
17. Adgate JL, Barr DB, Clayton CA, Eberly LE, Freeman NCG, Lioy PJ, Needham LL, Pellizzari ED, Quackenboss JJ, RoyA, and Sexton K. Measurement of children's exposure to pesticides: analysis of urinary metabolite levels in a probability-based sample. *Environ Health Perspect* 2001;109(6): 583-89
18. Fenske RA, Kissel JC, Lu C, Kalman DA, Simcox NJ, Allen EH, and Keifer MC. Biologically based pesticide dose estimates for children in an agricultural community. *Environ Health Perspect* 2000; 108: 515-20.
19. Fenske RA, Kedan G, Lu C, Fisker-Andersen JA, and Curl CL. (2002a). Assessment of organophosphorus pesticide exposure in the diets of preschool children in Washington State. *J Expos Analysis Environ Epidemiol* 2002;12: 21-28.

ANTIBIOTICO RESISTENZA E PEPTIDI ANTIMICROBICI

Stefania Marcheggiani
Reparto di Qualità Ambientale e Ittiocoltura

Riassunto

Le infezioni del tratto urinario (*UTIs*) affliggono milioni di persone ogni anno in tutto il mondo e rappresentano la seconda causa di infezione dopo quelle respiratorie. Negli ambienti ospedalieri queste infezioni si diffondono molto rapidamente, inoltre gli agenti eziologici responsabili di queste infezioni, presentano spesso delle multi resistenze nei confronti dei farmaci utilizzati a scopo terapeutico e profilattico. Sin dagli inizi della scoperta degli antibiotici e di conseguenza dal loro utilizzo, fu osservato lo sviluppo di resistenze da parte dei microrganismi stessi, come meccanismo di difesa.

L'immissione massiccia in commercio di farmaci antibiotici ad uso terapeutico, in zootecnia e alimentare ha determinato la comparsa e la diffusione di microrganismi epidemiologicamente importanti, tanto da essere monitorati da programmi di sorveglianza nazionali e internazionali, come ad esempio lo *Staphylococcus aureus* meticillin (-oxicillin) resistente (MRSA).

Da qui la necessità negli ultimi anni di sperimentare terapie alternative a quelle antibiotiche per ridurre e/o tentare di arginare questo fenomeno. Imparare dalla natura è una pratica sempre più diffusa nella scienza in generale, ed ha recentemente dato luogo a una specifica branca della medicina.

Tra le varie sostanze alternative che hanno suscitato molto interesse per le loro capacità antimicrobiche ci sono molecole note come Peptidi Antimicrobici (*AMPs*). Queste molecole vengono costantemente prodotte da molti organismi sia del regno vegetale che animale. Gli *AMPs* hanno caratteristiche chimico e fisiche che li rendono particolarmente adatti all'interazione con le membrane delle cellule batteriche, provocando un danno irreversibile che facilmente conduce alla loro morte. In questo studio è stata valutata l'attività antimicrobica di *AMPs* estratti dalle pelle degli anfibi, su ceppi di *Staphylococci ssp* isolati dalle urine di pazienti ospedalizzati e ambulatoriali.

Introduzione

Le infezioni del tratto urinario (*urinary tract infectious- UTIs*) affliggono milioni di persone ogni anno e rappresentano la seconda causa più comune di infezioni dopo quelle respiratorie in ambiente ospedaliero (Barton, 2008; Stamm and Ragnar, 2001; Johnson and Stamm, 1987). A seconda della loro acquisizione sono classificate in comunitarie (*community-acquired*) o nosocomiali (*hospital-acquired*).

Batteri, virus, lieviti e miceti sono gli agenti eziologici che causano le infezioni urinari. In circa l'85% dei casi l'infezione è causata dai batteri in particolar modo dai gram negativi ed *Escherichia coli* è il principale agente responsabile (Karlowsky *et al.*, 2002). Tra gli altri gram negativi responsabili *UTIs* ci sono *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e tra i gram positivi *Enterococcus sp.*, *Streptococcus agalactiae*, *S. aureus* e *S. saprophyticus* (Gradwohl, 2005). L'infezione può essere causata da un solo o più agenti

patogeno quando la concentrazione corrisponde 10^5 colonie per millilitro di coltura (Kass, 1961). Più raramente queste infezioni possono essere causate da *Candida albicans*, virus, batteri anaerobi e micoplasmi. I microrganismi patogeni possono invadere e diffondere nel tratto urinario attraverso tre differenti vie: ascendente, discendente o linfatica. *UTIs* possono essere distinte in complicate, quando l'apparato urinario presenta delle anomalie strutturali e/o neurologiche, e non complicate dove detto apparato risulta normale.

Un'ulteriore classificazione può essere fatta in relazione al sito corporeo coinvolto ossia: infezione dell'alto tratto quando riguardano ureteri, pelvi renali, calici e/o parenchima renale e danno origine a pielonefriti; del basso tratto urinario quando invece interessa l'uretra e/o la vescica e da origine a cistiti, prostatiti, epididimidis, uretriti; o entrambe i tratti e danno origine a patologie più complesse.

Il diffuso e spesso inappropriato uso di antibiotici in medicina umana e veterinaria ha determinato un progressivo sviluppo e diffusione delle resistenze agli antibiotici, da parte di molti microrganismi e conseguentemente la riduzione della loro efficacia terapeutica. Il risultato sono ceppi batterici che acquisiscono resistenza nei confronti degli antibiotici attualmente disponibili. Questo problema è particolarmente sentito negli ospedali, dove la terapia e l'uso profilattico di antibiotici ad ampio spettro ha determinato la comparsa di microrganismi multiresistenti. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e la Commissione Europea (EC) hanno da tempo evidenziato l'importanza di studiare questa emergenza delle resistenze agli antibiotici e la necessità di sviluppare delle strategie per il suo controllo (Oteo *et al.*, 2002).

A livello mondiale si è verificata la comparsa e la diffusione di microrganismi epidemiologicamente importanti, tanto da essere monitorati da programmi di sorveglianza nazionali e internazionali un esempio ne è lo *Staphylococcus aureus* *meritcillin* (*oxicillin*) *resistente* (MRSA). L'emergenza dei ceppi *meticillo-resistenti* di *S. aureus* (MRSA) è un esempio di "evoluzione accelerata" di batteri rapidamente evoluti e propagati a livello planetario grazie alla pressione selettiva di agenti antimicrobici (Oliveria *et al.* 2002). Numerosi sistemi internazionali di sorveglianza sono stati istituiti a livello mondiale, come *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (ERASS), *Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme* (DANMAP), *National Nosocomial Infection Surveillance System* (NNIS), *World Health Organization NET* (WHONET) *Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme* (DANMAP); al fine di collezionare informazioni epidemiologiche sul fenomeno della resistenza antimicrobica.

Da qui la necessità negli ultimi anni di sperimentare terapie alternative a quelle antibiotiche per ridurre e/o tentare di arginare questo fenomeno. Imparare dalla natura è una pratica sempre più diffusa nella scienza in generale, ed ha recentemente dato luogo a una specifica branca della medicina. Da molti anni tra le sostanze alternative con proprietà antibiotiche hanno suscitato molto interesse i peptidi antimicrobici (AMPs).

Gli AMPs sono prodotti da molti tessuti e tipi cellulari, in una grande varietà di specie vegetali e animali. Queste molecole sono prodotte nei siti di infezione da infiammazione ed hanno un ampio spettro di azione nei confronti di batteri, funghi, virus e protozoi. Essi agiscono direttamente con la cellula ospite modulando il processo infiammatorio e la difesa innata (Handcock and Diamond, 2000). Sono stati isolati per la prima volta da insetti, ma successivamente sono stati estratti da piante, crostacei, ascidia e vertebrati ed è chiaro che costituiscono un ruolo chiave nel sistema immune innato negli organismi multicellulari nella scala evolutiva (Zaslhoff, 2002; Boman, 1995; Ganz and Lehrer, 1998; Garcia *et al.*, 1998; Otvos, 2000). Da allora più di 800 peptidi antimicrobici sono stati isolati e descritti (Vizioli & Salzet, 2002).

La pelle degli anfibi si è rivelata una ricca sorgente di tali peptidi con funzioni sia fisiologiche che difensive. AMPs sono prodotti e secreti da ghiandole granulari controllate da

nervi simpatici che scaricano il loro contenuto sul dorso dell'animale in risposta ad una varietà di stimoli (Mangoni *et al.*, 2000). La caratteristica comune è che sono peptidi cationici di natura anfipatica, pur variando nel numero di residui da 10-50 aminoacidi, interagiscono con la membrana cellulare e ne distruggono le normali funzioni. La loro sintesi è di tipo ribosomiale ma a differenza di quella classica (procarioti, funghi) avviene in un unico passaggio, partendo da un precursore da 60-170 aminoacidi ad opera di una proteasi, viene prodotto il peptide maturo biologicamente attivo (10-50 aminoacidi).

Per composizione e struttura possono essere distinti in tre principali gruppi:

- contenenti cisteine che a loro volta si distinguono in: peptidi con più ponti disolfuro (defensine e tachiplesine) e con un solo ponte disolfuro (bactenecine, brevenine esculentine);
- alta percentuale di aminoacidi specifici prolina, arginina, triptofano, (PR-39, Bac 5 e Bac 7, indolicidina, ecc.);
- α - elica o struttura random (cecropine, melittina, magainine, dermaseptine, temporine, bombine).

La piccola taglia, la composizione aminoacidica, l'anfipaticità e la carica cationica fanno sì che gli AMPs si attacchino e inseriscano nella membrana cellulare attraverso due meccanismi, a *poro* quando l'inserzione è perpendicolare o *tappeto* quando il peptide si dispone parallelamente, danneggiando e uccidendo il microrganismo (Brogden, 2005). Il meccanismo di azione si può così riassumere:

- "attrazione" dovuta all'interazione elettrostatica tra il peptide (cationico) e le cariche negative esposte dalla parete batterica, e questo è alla base della selettività tra Gram negativi (lipopolisaccaridi) e Gram positivi (acidi teicoici e teicuronici) (Brogden, 2005);
- "attacco" la membrana cellulare è il principale bersaglio per i peptidi. L'alto potenziale trans membrana (-140 mV), facilita l'interazione del peptide che comporta una conseguente alterazione della permeabilità di membrana (Liu *et al.*, 1997; Zao, 1995).

Queste caratteristiche fanno degli AMPs una nuova e interessante classe di antimicrobici e/o agenti antiendotossici per uso terapeutico.

Lo scopo di questo studio è la valutazione dell'attività antimicrobica di sei AMPs in particolare Temporine (B, F, G ed L), Esculentina (ESC₁₋₁₈) e Bombinina (H₂), attraverso saggi microbiologici nei confronti di ceppi di *Staphylococci spp.* isolati da campioni urinari di pazienti ospedalizzati e ambulatoriali.

Materiali e metodi

Campionamento

I ceppi di *Staphylococci spp.* utilizzati in questo studio provengono da una collezione di campioni di urine di pazienti con infezioni delle tratto urinario (UTIs) dal Laboratorio di Batteriologia dell'Ospedale Villa San Pietro Fatebenefratelli di Roma, tra giugno e dicembre 2007. Il primo isolamento è stato eseguito seguendo le procedure standard utilizzate dall'unità di Batteriologia. La positività (batteriuria) della coltura viene assegnata facendo riferimento al valore di Kass (10^5 UFC/mL). L'identificati biochimica e la determinazione dell'antibiotico resistenza eseguita attraverso test di sensibilità di ogni isolato, è stata effettuata utilizzando il sistema automatizzato VITE® 2 (Biomereieux Instruments). Gli isolati sono stati successivamente ripassati in terreno nutritivo *Tryptone Soya Agar* (TSA, OXOID) incubato a $37\pm 1^\circ\text{C}$ per 24 h e conservati in microbank a 20°C fino al momento dei test.

I peptidi utilizzati in questo studio sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1. Struttura primaria degli AMPs utilizzati in questo studio

Peptide	Sequenza amminoacidica	Lunghezza (aa)
Esc (1-18) *	GIFSKLAGKKLKNLLISG -NH ₂	18
Temporina B **	LLPIVGNLLK SLL-NH ₂	13
Temporina F **	FLPLIGKVLG GIL-NH ₂	13
Temporina G **	FFPVIGRILN GIL-NH ₂	13
Temporina L **	FVQWFSKFLG RIL-NH ₂	13
Bombinina H ₂ ***	IIGPVLGLVGSALGGLLKI-NH ₂	20

* Simmaco M, *et al.* 1994; ** Simmaco M, *et al.* 1996; *** Mignogna G, *et al.* 1993

Minima Concentrazione Inibente (MIC)

Il test di suscettibilità è stato eseguito con il metodo delle microdiluizioni liquide seguendo le procedure del *Clinical and Laboratory Standard Institute (ex-NCCLS, 2001)*. Una singola pallina della *microbank* di ogni ceppo isolato, viene rigenerata strisciandola su TSA agar e incubata a 37±1°C per 24 ore. Una singola colonia ben isolata, viene inoculata in 10 mL di Muller Hinton brodo (MH 1X) (OXOID) e incubata a 37±1°C, in agitazione continua. 50 µL di coltura batterica (1,2 10⁸ cell/mL; λ₅₉₀=0,8 A) vengono risospesi in 10 mL di MH (1X). Ogni pozzetto della piastra da 96 (Sigma-Aldrich), ha un volume finale di 100µL così preparato: 50 µL di MH (2X), e diluizioni seriali (1:2) dei differenti AMPs (B, G, F, L, H₂, ESC₁₋₁₈), precedentemente diluiti in etanolo 20% , partendo da una concentrazione 128 a 1µM. Ad ogni pozzetto vengono aggiunti 50 µL di coltura batterica (concentrazione 10⁵ UFC/mL). Sulle piastre sono presenti 3 controlli positivi (50 µL sospensione batterica e 50 µL terreno) e tre controlli negativi (50 µL terreno e 50 µL di acqua sterile). Le piastre multi pozzetto vengono incubate a 37±1°C per 18-20 ore. MIC è definita come la più bassa concentrazione alla quale si osserva un'inibizione della crescita (torbidità), i risultati sono stati letti visivamente. Ogni prova è stata eseguita in triplicato.

Minima Concentrazione Battericida (MBC)

L'attività battericida dei peptidi nei confronti dei 5 ceppi di staphylococchi è stata valutata con saggi di microdiluizioni liquide in PBS (PBS; K₂HPO₄ 3 g/mL, KH₂PO₄ 1 g/mL, NaCl 8,5 g/mL; pH 7,2 ± 0,2) 10 mM (Maisetta *et al.*, 2006). Ogni ceppo viene rigenerato e messo a crescere come sopra descritto. 20 µL di ogni sospensione batterica (1,2 10⁸ cell/mL; λ₅₉₀=0,8 A) vengono addizionati 980 µL di PBS (concentrazione finale 105 UFC /mL). Per ogni peptide vengono preparati 3 tubi sterili (1,5 mL) ognuno con un volume finale di 100 µL e una differente concentrazioni di peptide 0,5X , 1X e 2X quella MIC. Ogni tubo contiene 50 µL di sospensione batterica (10⁵ UFC/mL) una delle tre concentrazioni di peptide e PBS.

I tubi vengono posti ad incubare a 37±1°C per 1,5 ore in agitazione. Dopo l'incubazione i campioni vengono diluiti e ciascuna aliquota seminata per inclusione in TSA. I risultati espressi UFC/mL sono stati determinati dopo 24 ore di incubazione a 37±1°C, gli esperimenti vengono eseguiti in triplicato. I controlli vengono preparati mettendo in tubi sterili, 50 µL di sospensione batterica e 50 µL di PBS. A differenti tempi vengono prelevate opportune aliquote, piastrate e incubate come sopra. L'attività battericida definita come la minima concentrazione battericida (MBC) alla quale la più bassa concentrazione di peptide uccide il 99,9% del inoculo batterico.

Risultati

Gli isolati clinici utilizzati in questo studio sono risultati essere appartenenti due a *S. aureus* (S_6 e S_42) e tre a *S. saprophyticus* (S_23, S_51 e S_80).

I risultati espressi come valori medi degli esperimenti effettuati in triplicato della determinazione minima concentrazione inibente (MIC), degli AMPs testati su tutti i ceppi di *Staphylococcus spp.* sono riportati in Tabella 2.

Tabella 2. Risultati della attività antimicrobica (MIC) espressi come micromolari (μM) dei sei AMPs

Ceppo	Codice	Temporine				Bombinine	Esculentina
		B	F	G	L	H ₂	ESC ¹⁻¹⁸
<i>S. aureus</i>	S_6	32	32	16	16	16	≥64
<i>S. saprophyticus</i>	S_23	16	16	8	2	8	32
<i>S. aureus</i>	S_42	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64
<i>S. saprophyticus</i>	S_51	≥64	≥64	32	16	16	≥64
<i>S. saprophyticus</i>	S_80	32	32	16	16	16	64

La temporina L, mostra un'alta attività antimicrobica nei confronti di tutti i ceppi testati: in particolare si ha avuto una concentrazione della MIC di 16 μM per i ceppi S_6, S_51 ed S_80 e una concentrazione di 64 μM per il ceppo S_42. Il ceppo S_23 è risultato essere estremamente sensibile all'azione di tutti e sei peptidi: in particolare la concentrazione della MIC di 2 μM per la temporina L; di 16 μM per la temporina B ed F; di 8 μM per la temporina G e di 32 μM per la bombinina H₂.

I risultati relativi agli esperimenti di determinazione dell'attività battericida (MBC) di ogni peptide, dopo 1,5 ore di incubazione, nei confronti dei ceppi di *Staphylococci spp.*, sono stati eseguiti in triplicato e riportati in Tabella 3.

Tabella 3. Risultati della minima concentrazione battericida (MBC) espressi come percentuale di mortalità, usando tre diverse concentrazioni dei peptidi uguale (1X), la metà(0,5X) e il doppio (2X) del valore della (MIC)

AMPs	Concentrazione (μM)	Percentuale (%) di mortalità				
		S_6	S_23	S_42	S_51	S_80
T_B	2X	92	92	-	-	93
	1X	-	-	-	-	-
	0,5X	-	-	-	-	-
T_F	2X	92	94	-	-	92,7
	1X	-	-	-	-	-
	0,5X	-	-	-	-	-
T_G	2X	92	93,8	-	97,5	92
	1X	-	92	-	-	-
	0,5X	-	-	-	-	-
T_L	2X	-	100	-	-	-
	1X	-	100	-	-	-
	0,5X	99,9	99,9	-	99,9	99,9
B_H ₂	2X	99,9	98,8	-	94,1	92
	1X	-	96,3	-	-	-
	0,5X	-	93,8	-	-	-
Esc ¹⁻¹⁸	2X	-	99,9	-	-	-
	1X	92	99,6	-	-	98,2
	0,5X	-	95,2	-	-	-

Come si osserva dai risultati tutti i peptidi hanno mostrato un'attività battericida (99% della mortalità) in un intervallo tra 1 e 64 μM . La temporina L è stata, tra tutti i peptidi testati, quella che ha mostrato una maggiore azione battericida contro 4 su 5 cinque ceppi Gram-positivi testati (S_80, S_6, S_51, S_23), ad un valore della concentrazione compreso tra 1 a 8 μM . L'esculentina (Esc 1-18) ha mostrato un'attività battericida nei confronti del ceppo S_23 (*S. saprophyticus*); la bombiniba H₂ nei confronti del ceppo S_6 (*S. aureus*). Quest'ultima ha anche mostrato alti livelli di attività antimicrobica (98,8%) nei confronti del S_23. Altri livelli di attività microbica (98,2%), sono stati, inoltre ottenuti per Esc (1-18) contro il ceppo S_80. In tutti i casi al doppio della concentrazione del valore della MIC, tutti peptidi hanno mostrato una attività antibatterica superiore al 92%.

Discussione e conclusioni

Tra tutti i microrganismi responsabili delle infezioni del tratto urinario (UTIs) questo studio si è concentrato sui ceppi di Staphylococchi per l'importanza epidemiologica di quest'ultimi in generale e di *S. aureus* MRSA in particolare, usando un approccio alternativo ovvero la valutazione dell'attività antimicrobica e battericida degli AMPs nei confronti di questi ceppi. I test di conferma sono stati effettuati per avere l'identificazione certa a livello di specie e quindi di poter affermare che si tratta di due ceppi di *S. aureus* e di tre *S. saprophyticus*. Quest'ultimo è un coagulasi-negativo spesso associato ad infezioni urinarie del basso tratto urinario nelle donne giovani e di mezza età (Widerström *et al.*, 2007; Hovelius, 1984). *S. saprophyticus* è resistente alla novobiocina e questa caratteristica è spesso utilizzata nei laboratori per distinguerlo da *S. epidermidis* anch'esso coagulasi negativo. I peptidi antimicrobici, prodotti da molti organismi sia del regno vegetale che animale rappresentano una classe emergente di antibiotici, che potrebbe rappresentare un'alternativa e/o supporto al trattamento di batteri multiresistenti. Studi progressivi hanno dimostrato l'attività antimicrobica nei confronti di un ampio spettro di batteri (Wade *et al.* 2000). Utilizzando saggi MIC e MBC in questo studio è stata testata l'attività di sei peptidi contro i 5 ceppi di Staphylococchi multi resistenti. I sei AMPs testati in questo studio sono stati isolati dal derma degli anfibi da un gruppo di ricerca dell'Università la Sapienza.

I risultati degli esperimenti relativi alla determinazione della minima concentrazione inibente (MIC), mostrano che la temporina L ha non solo una attività antimicrobica nei confronti di tutti i ceppi testati rispetto agli altri 5 AMPs, in concentrazioni comprese tra 2 e 16 μM , ma è stato anche l'unico AMP ad aver un'azione antimicrobica nei confronti del ceppo *S. aureus* (S_42), uno dei due ceppi meticillina resistente. Questi risultati sono in accordo con quanto già riportato in letteratura, dove si mostra che le temporine sono generalmente più attive nei confronti dei Gram positivi rispetto ai Gram negativi (Mangoni *et al.*, 2008). Gli esperimenti per la determinazione della minima concentrazione battericida (MBC) sono stati eseguiti utilizzando PBS per escludere ogni eventuali interazioni elettrostatiche tra il peptide (cationico) e i componenti del terreno, imitando inoltre le condizioni fisiologiche. Anche in questo caso la temporina L, ha mostrato una forte attività battericida rispetto agli altri AMPs. Interessante, è il fatto che al doppio del valore della MIC, altri due AMPs hanno mostrato attività battericida ovvero bombina H₂ (contro S_6) ed esculentina (ESC 1-18) (contro S_23). Molti degli AMPs mostrano un'attività simile nei confronti degli isolati nell'ambito della stessa specie, sebbene solo cinque ceppi siano stati testati. Un alto grado di variabilità è stato osservato nel caso delle temporine B,G, F, H₂ ed esculentine nei confronti sia dei *S. saprophyticus* che *S. aureus*. L'effetto battericida contro i batteri Gram positivi è stato osservato all'intervallo di concentrazione da 1 a 32 μM .

Questo studio contribuisce alle conoscenze di base relative all'attività antimicrobica degli AMPs nei confronti di isolati clinici provenienti da campioni urinari. Questa classe di molecole considerate alternative (AMPs) agli antibiotici classici, agisce a livello della membrana cellulare, e di conseguenza non innesca lo sviluppo di resistenze. Molti passaggi sono ancora necessari per la validazione e l'effettivo uso di queste sostanze antimicrobiche che vanno dalla valutazione dell'effetto tossico, ai test sugli animali e alla sperimentazione su umani volontari, ma sicuramente rappresentano una classe di molecole sulle quali investire e che potrebbero contribuire alla riduzione del globale fenomeno dell'antibiotico resistenza. Lo studio del fenomeno delle antibiotico resistenze rappresenta uno degli argomenti prioritari di ricerca sia a livello Europeo (VII Programma Quadro) che nei progetti nazionali del CCN (Ministero della Salute). La sperimentazione di soluzioni innovative che derivano da un approccio integrato sembra essere l'unico modo per contenere l'epidemia di multiresistenza e di sviluppare una cura per uno dei principali problemi di sanità pubblica oggi.

Bibliografia

- Barton MJ. *UTI Report*. Brandon, SD, USA: Barton Publishing; 2008.
- Boman H. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Ann Rev Immunol* 1995;13:61-92.
- Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 2005;3:238-50.
- Ganz T, Lehrer RI. Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr Opin Immunol* 1998;10:41-4.
- Olmedo G, Molina F, Alamillo JM. Plant defense peptides *Biopoly* 1998;47:479-91.
- Gradwohl SE, Chenoweth CHE, Fonde KR, Van Harrison R, Zoschnick LB. Urinary Tract Infection. University of Michigan Health System; 2005.
- Hancock REW, Chapple DS. Peptide antibiotics (Minireview). *Antimicrob Agents Chemot* 1999;43(6):1317-23.
- Hancock REW, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbio* 2000;8(9):402-10.
- Hovelius B, Mardh PA. Staphylococcus saprophyticus as a common cause of urinary tract infections. *Rev Infect Dis* 1984;6:328-37.
- Johnson JR, Stamm WE. Diagnosis and treatment of acute urinary tract infections. *Infect Dis Clin North Am* 1987;1(4):773-91.
- Karlowitsky JA, Kelly JL, Thornsberry C, Jones ME, Sahm DF. Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolates of Escherichia coli from female outpatients in the United States. *Antimicrob Agents Chemotherapy* 2002;46:2540-5.
- Kass E. Pyelonephritis and bacteriuria. *Ann Intern Med* 1961;56:46-53.
- Liu L, Zhao C, Heng H, Ganz, T. The human b-defensin-1 and a-defensins are encoded by adjacent genes: two peptide families with differing disulfide topology share a common ancestry. *Genom* 1997;43:316-20.
- Maisetta G, Batoni G, Esin S, Florio W, Bottai D, Favilli F and Campa M. In vitro bactericidal activity of human beta-defensin 3 against multidrug-resistant nosocomial strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:806-9.
- Mangoni ML, Rinaldi AC, Di Giulio A, Mignogna G, Bozzi A, Barra D and Simmaco M. Structure function relationships of temporins, small antimicrobial peptides from amphibian skin. *Eur J Biochem* 2000;267:1447-54.

- Mangoni ML, Maisetta G, Di Luca M, Marcellini L, Gaddi H, Esin S, Florio W, Brancatisano F L, Barra D, Campa M, Batoni G. Comparative analysis of the bactericidal activities of amphibian peptide analogues against multidrug-resistant nosocomial bacterial strains. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 2008;52(1):85-91.
- Mignogna G, Simmaco M, Kreil G and Barra D. Antibacterial and haemolytic peptides containing D-alloisoleucine from the skin of *Bombina variegata*. *EMBO J* 1993;12:4829-32.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. International Supplement (11th edition). Wayne, Pa and Nimes, France: NCCLS; 2001.
- Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis* 2002;2(3):180-9
- Oteo J, Aracil B, Hoyo JF. Do the quinolones still constitute valid empirical therapy for community-acquired urinary tract infections in Spain? *Clin Microbiol Infect* 1999;5:654-6.
- Otvos L Jr. Antibacterial peptides isolated from insects. *J Pept Sci* 2000;6(10):497-11.
- Pantosti A, Sanchini A, Monaco M. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Fut Microbiol* 2007;2:323-34.
- Simmaco M, Mignogna G, Barra D and Bossa F. Antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana esculenta*. Molecular cloning of cDNAs encoding esculentin and brevinins and isolation of new active peptides. *J Biol Chem* 1994;269:11956-961.
- Simmaco M, Mignogna G, Canofeni S, Miele R, Mangoni ML, and Barra D. Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. *Eur J Biochem* 1996;242:788-92.
- Stamm W and Ragnar Norrby S. Urinary Tract Infections: Disease Panorama and Challenges. *J Infect Dis* 2001;183:S1-S4.
- Vizioli J and Salzet M. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:494-6.
- Wade D, Silberring J, Soliymani R, Heikkinen S, Kilpelainen I, Lankinen H and Kuusela P. Antibacterial activities of temporin A analogs. *FEBS Lett* 2000;479:6-9.
- Widerström M, Wiström J, Ferry S, Karlsson C and Mønsen T. Molecular Epidemiology of *Staphylococcus saprophyticus* Isolated from Women with Uncomplicated Community-Acquired Urinary Tract Infection. *J Clin Microbiol* 2007;45(5):1561-4.
- Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002;415:389-95.
- Zhao C, Ganz T, Lehrer RI. Structures of genes for two cathelin-associated antimicrobial peptides: prophenin-2 and PR-39. *FEBS Lett* 1995;376:130-4.

ESPOSIZIONE A METALLI PESANTI DERIVANTI DAL CONTATTO DI ACQUE DESTINATE AL CONSUMO UMANO CON LE RETI NAZIONALI DI DISTRIBUZIONE

Enrico Veschetti
Reparto di Igiene delle Acque Interne

Introduzione

L'approvvigionamento d'acqua potabile riveste un'importanza fondamentale ai fini della tutela della salute umana. Oltre alla qualità all'origine della risorsa idrica sfruttata e degli eventuali trattamenti successivi, è di particolare rilevanza, dal punto di vista sanitario, il mantenimento delle caratteristiche di qualità durante il trasporto nella rete acquedottistica. Garantire il rispetto dei parametri all'uscita degli impianti di potabilizzazione è condizione necessaria ma tuttavia non sufficiente per garantire che detti parametri siano altrettanto rispettati presso l'utilizzatore finale. La qualità dell'acqua viene infatti alterata a seguito del transito nella rete di distribuzione e nell'impianto interno dell'utente del servizio.

Il passaggio dell'acqua in una tubazione, di qualsivoglia tipologia, non è esente da modifiche o alterazioni delle sue caratteristiche. La tubazione si comporta come un vasto reattore distribuito sul territorio all'interno del quale si svolgono processi chimici, fisici e biologici.

La Direttiva Europea 98/83/CE sulla qualità delle acque destinate al consumo umano (DWD), recepita in Italia con il DL.vo 31/2001 (1), fissa le condizioni per assicurare un elevato livello di protezione della salute del consumatore; al contempo impone agli Stati Membri l'obbligo di garantire la qualità dei materiali e dei prodotti impiegati nella preparazione e nella distribuzione dell'acqua potabile al fine di non compromettere tale livello di protezione. Nel caso di acque erogate attraverso una rete di distribuzione, il rispetto della conformità deve essere assicurato al punto di consegna; ciò implica la necessità di verificare il comportamento chimico di tutti i materiali da costruzione (CPDW) posti a contatto con l'acqua potabile, inclusi quelli impiegati in condutture, raccordi e dispositivi installati all'interno delle abitazioni private.

I problemi più rilevanti derivanti dal passaggio dell'acqua all'interno delle tubazioni riguardano principalmente cessione di materiali metallici a seguito della corrosione, incrostazioni, sedimentazioni, reazioni diverse fra le sostanze contenute nell'acqua e i materiali usati in acquedottistica; fra questi il fenomeno della corrosione dei sistemi di distribuzione è uno dei più rilevanti sia in termini di relativi costi economici per i conseguenti deterioramenti strutturali sia per i possibili riflessi sulla sicurezza per il consumatore (2).

Diversi fattori possono influenzare l'interazione tra acqua e materiali metallici: la composizione e le proprietà superficiali del materiale; il numero delle connessioni e delle installazioni per unità di lunghezza della tubazione; il rapporto superficie/volume dei materiali impiegati; la loro disposizione nel sistema di distribuzione; il tempo intercorso dalla loro installazione; le caratteristiche chimico-fisiche dell'acqua; la velocità di flusso di quest'ultima. Il rilascio di metalli nell'acqua è influenzato in modo differente da ciascuno di questi fattori (2).

Indipendentemente dagli effetti provocati da ogni singolo fattore sopra riportato, la presenza di ioni metallici in acqua è sempre correlato al suo tempo di residenza nelle tubazioni (3). Per quanto riguarda in modo specifico le abitazioni private il tempo di residenza dell'acqua è funzione sia della capacità delle tubature che delle abitudini del consumatore; ciò implica delle

forti variazioni nel tempo di migrazione e di conseguenza nella concentrazione dei metalli. In generale il tempo medio di migrazione in una abitazione varia tra 15 min (nel migliore dei casi) e diverse ore (nel peggiore dei casi). Diventa pertanto rilevante, prima di effettuare un campionamento, stabilire appropriati tempi di migrazione e ritmi di flussaggio.

L'attività di monitoraggio condotta sul territorio europeo ha spesso evidenziato un incremento della concentrazione di metalli nelle acque destinate al consumo umano a seguito dell'impiego di condutture e raccordi metallici. Tale variazione di concentrazione può presentarsi come un fenomeno transiente legato ai processi di stabilizzazione/passivazione dei nuovi materiali installati nella rete di distribuzione o, in alcuni casi, come un fenomeno persistente di rilascio che accompagna tutta la vita utile del materiale utilizzato. È, pertanto, evidente la necessità di un attento riesame del comportamento chimico dei materiali metallici attualmente impiegati nelle reti di distribuzione, alla luce dei limiti particolarmente stringenti imposti dalla DWD.

È in questo ambito che il Reparto Igiene delle Acque Interne dell'Istituto Superiore di Sanità ha ritenuto opportuno sviluppare un progetto di ricerca nazionale, interamente finanziato dal Ministero della Salute, finalizzato all'approfondimento del livello di conoscenza sull'impatto delle principali reti di distribuzione sulla qualità delle acque potabili italiane, in relazione alla tipologia dei materiali metallici attualmente installati e ai metodi di campionamento. Il progetto ha avuto come obiettivo lo studio di eventuali modifiche della qualità dell'acqua in relazione alla tipologia di materiali impiegati per il suo trasporto, anche in considerazione delle norme di settore di recente entrate in vigore.

Lo studio, condotto a livello nazionale, è stato caratterizzato da una particolare estensione e capillarità, coinvolgendo n. 29 Unità Operative, di cui n. 15 Gestori e n. 14 Laboratori Pubblici adeguatamente selezionati al fine di assicurare un'opportuna distribuzione geografica dei dati e un'efficiente interazione gestore-laboratorio per le diverse aree. Nell'ambito del progetto è stato elaborato e realizzato un database relazionale operante in ambienti informatici di diffusione generale che ha consentito la costituzione presso l'ISS della prima banca dati nazionale sulla cessione di metalli in reti di adduzione e distribuzione di acque destinate a consumo umano. Nel corso dello studio sono state effettuate circa 6.000 analisi per ciascuno dei diversi metalli esaminati, Ferro, Cromo, Nichel, Piombo, Rame, Zinco, in campioni prelevati con differenti modalità, quali RDT (prelievo casuale senza scorrimento), 30 MS (flusso per 5 min e prelievo dopo 30 min di stagnazione) e 240 MS (flusso per 5 min e prelievo dopo 30 min di stagnazione).

Materiali e metodi

Elaborazione di procedure operative per l'armonizzazione delle attività di campionamento, determinazioni analitiche e raccolta dati

Si è stabilito di coinvolgere nel progetto, in qualità di Unità Operative, un numero rappresentativo, sia per potenzialità che per distribuzione geografica, di Gestori acquedottistici e di Laboratori pubblici di controllo (ARPA). I primi rappresentano, per propria finalità statutaria, i responsabili della gestione dell'approvvigionamento idrico e dei relativi impianti di distribuzione, mentre i laboratori, responsabili del controllo della qualità dell'acqua potabile, sono, tra l'altro, incaricati del campionamento e delle indagini analitiche, lungo tutta la filiera distributiva. In Figura 1 è riportata la loro distribuzione geografica.

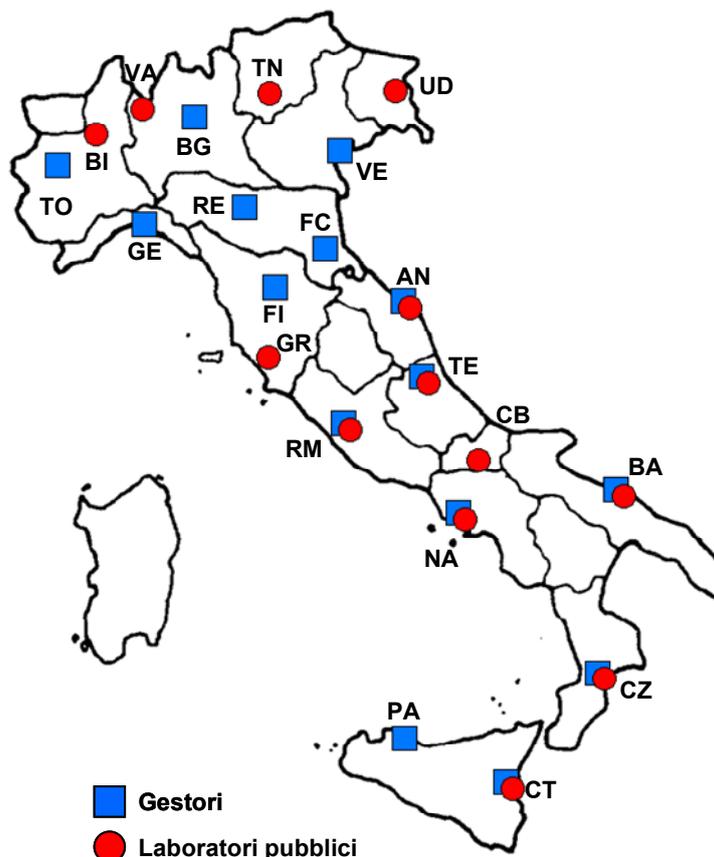


Figura 1. Distribuzione delle Unità Operative sul territorio nazionale

Attraverso una serie di incontri di studio tra le Unità Operative e con il coordinamento degli enti organizzatori, sono state definite e condivise le variabili strategiche da considerare quali parametri critici oggetto di indagine ai fini degli obiettivi del progetto. In particolare si è ritenuto opportuno acquisire dati su:

- i parametri da indagare e che risultano essere in relazione con i fenomeni di cessione delle reti idriche, quali in particolare, piombo, cromo, nichel, ferro, rame e zinco;
- i dati storici, da acquisire nel corso delle indagini, che risultano rilevanti ai fini della caratterizzazione della qualità dell'acqua nelle reti di distribuzione;
- i metodi di analisi e i relativi limiti di quantificazione;
- le modalità e il punto di prelievo, tenendo in considerazione le linee guida, in fase avanzata di predisposizione da parte della Commissione Europea *Drinking Water Directive*, in materia di controllo di metalli nelle acque destinate a consumo umano.

Al fine di valutare a livello nazionale quale modalità di prelievo fosse maggiormente rappresentativa dell'*intake* settimanale degli elementi considerati si è stabilito di confrontare un certo numero di campionamenti effettuati a seguito di differenti tempi di stagnazione e precisamente con modalità *random day time* (RDT), e dopo 30 e 240 minuti di stagnazione.

Archiviazione ed elaborazione dei risultati prodotti

I dati acquisiti da ciascuna Unità Operativa sono stati trascritti in un opportuno database, realizzato utilizzando un software di ampia diffusione, Microsoft Access 2000, incluso nel pacchetto Microsoft Office 2000 Professional in lingua italiana. Le operazioni di trascrizione sono state automatizzate impiegando apposite routine scritte in linguaggio Visual Basic. Il database è stato inviato a ciascuna Unità Operativa assieme ad un manuale di istruzione redatto mediante programmi convenzionali di editing, quali Microsoft Word 2000 e Microsoft Photo Editor 3.0. Per consentire l'interscambio universale del file, i documenti elettronici prodotti sono stati convertiti nel formato compatto e consultabile Adobe PDF (*Portable Document Format*), utilizzando il software Adobe Acrobat 5.0.

Analisi dei risultati

Nel corso degli studi del progetto sono stati eseguiti più di 6.000 prelievi in ca. 3.800 utenze, distribuite tra pubbliche e private. Per ogni campione sono state acquisite informazioni mediante analisi di dati storici relativi alle strutture delle reti e alla qualità dell'acqua e determinazioni analitiche in laboratorio, relativamente a numerosi parametri tra i quali parametri indicatori (pH, temperatura, durezza, solfato) e parametri chimici (concentrazione di Cr, Ni, Pb, Fe, Cu, Zn). Per quanto riguarda gli elementi target l'analisi dei dati relativi alle concentrazioni di questi, acquisiti con la modalità di prelievo random, è stata effettuata con i metodi dell'analisi statistica descrittiva. Nell'ambito di tale fase sono stati calcolati alcuni parametri descrittivi quali numero di dati, somma, minimo, massimo, intervallo, media aritmetica, media geometrica, media armonica, devianza, varianza, deviazione standard, errore standard, curtosi, asimmetria, 25° percentile e 75° percentile. Ai fini della valutazione del significato sanitario dei risultati riscontrati, i valori risultanti dalle analisi statistiche sono stati anche confrontati con i valori di parametro stabiliti dalla normativa vigente (DL.vo 31/2001) e, limitatamente al caso dello Zn, con la concentrazione massima ammissibile prevista dal precedente DPR 236/1988.

Oggetto di studio è stato anche il confronto tra i risultati acquisiti con le diverse modalità di campionamento. A tal fine, tutti i dati relativi ai valori di concentrazione dei diversi elementi target sono stati raggruppati per modalità di campionamento (RDT, 30MS e 240MS) e sono stati identificati i casi per i quali il prelievo è stato ripetuto con differenti modalità. Il confronto tra i diversi gruppi è stato quindi indirizzato alla verifica dell'esistenza di differenze e di eventuali correlazioni di tipo lineare.

Risultati e discussione

Struttura del database relazionale per la gestione dei dati

Al fine di standardizzare i dati, consentire analisi aggregate e garantire un'agevole leggibilità in fase di divulgazione delle informazioni, è stato elaborato e realizzato un database operante in ambiente informatico di larga diffusione. Il database prodotto nell'ambito del progetto risulta particolarmente versatile e, grazie alla sua struttura modulare, potrà essere impiegato, quale strumento di archiviazione ed elaborazione di dati, in molteplici attività di ricerca e controllo riguardanti la presenza di contaminanti nelle reti idriche. La progettazione del database relazionale è stata effettuata sulla base delle informazioni critiche, dei parametri e dei dati oggetto di studio identificati di concerto tra le diverse Unità Operative e sotto il coordinamento degli Enti Organizzatori.

Risultati dell'attività di monitoraggio

I metodi dell'analisi statistica descrittiva sono stati applicati all'intero set di dati relativi alle concentrazioni degli elementi metallici di interesse (Cr, Ni, Pb, Fe, Cu, Zn). In Tabella 1 sono riportate le elaborazioni statistiche descrittive per gli elementi oggetto di indagine, rilevati nei campioni prelevati con modalità RDT. Ci si riferisce a quest'ultima modalità di prelievo in quanto essa rappresenta attualmente la modalità applicata per i campionamenti nei controlli di routine eseguite dalle autorità sanitarie.

Tabella 1. Analisi statistica descrittiva degli elementi target determinati in 3568 campioni raccolti al rubinetto con la procedura RDT^a

	Cr	Cu	Fe	Ni	Pb	Zn
Minimo	< 1	< 1	< 2	< 1	< 1	< 5
Massimo	36	1250	6670	845	128	5000
25° percentile	< 1	< 1	< 2	< 1	< 1	26
75° percentile	< 1	31	37	< 1	< 1	236
Mediana	< 1	12	10	< 1	< 1	82
Media aritmetica	< 1	35	40	8	3	231
Dev. Standard	2	79	138	31	4	444
Curtosi	139	56	1510	284	447	32
Asimmetria	11	6	33	14	18	5

^a Valori in $\mu\text{g l}^{-1}$.

La Tabella 2 mostra, per le tre diverse modalità di campionamento esaminate, la percentuale di dati che supera i limiti stabiliti dal DL.vo 31/2001 e, limitatamente allo zinco, dal D.P.R. 236/1988. Gli elementi ferro, nichel e piombo sono stati ritrovati in concentrazione superiore al limite di legge nel 2-6% dei casi esaminati. Per quanto riguarda rame e zinco le percentuali di superamento sono state piuttosto basse (rispettivamente $\leq 0,1$ e $\leq 0,4\%$), mentre per il cromo non è stata riscontrata alcuna evidenza di possibili non conformità.

Tabella 2. Valori di parametro superiori ai limiti di legge

Procedura di campionamento	Cr	Cu	Fe	Ni	Pb	Zn
Valori superiori ai limiti di legge						
RDT	0,0	0,1	3,4	4,5	2,0	0,4
30M	0,0	0,1	1,8	2,5	2,1	0,2
240M	0,0	0,0	2,8	5,8	4,0	0,1
Limiti di legge ($\mu\text{g l}^{-1}$)	50 ^a	1000 ^{ab}	200 ^a	20 ^a	10 ^{ac}	3000 ^d

a: in accordo al DL.vo 31/2001; b: il corrispondente limite europeo è 2000 $\mu\text{g l}^{-1}$; c: in vigore fino al 2013; d: in accordo al DPR 236/1988.

I dati ottenuti applicando la procedura RDT sono stati confrontati con i corrispondenti valori acquisiti dai campioni raccolti applicando le procedure 30MS o 240MS. Per ogni elemento target e per ogni utenza sono stati calcolati i rapporti tra le concentrazioni derivanti da due delle tre differenti procedure di campionamento. I valori così ottenuti sono stati mediati geometricamente (Tabella 3).

Per i rapporti RDT/30MS e 240MS/30MS, le rispettive medie geometriche risultano significativamente superiori ad 1,0 (rispettivamente 1,1-1,4 e 1,0-1,6). Viceversa i rapporti medi 240min/RDT risultano compresi tra 0,9 e 1,2. Ciò significa che le due modalità di

campionamento RDT e 240MS forniscono, in media, risultati dello stesso ordine di grandezza, mentre la modalità 30MS tende a sottostimare i valori raggiunti con la procedura 240MS. In generale è possibile concludere che i dati ottenibili con il campionamento RDT consentono il raggiungimento di una buona stima dell'*intake* settimanale medio senza dover ricorrere alla più onerosa procedura basata su 4 ore di stagnazione.

Tabella 3. Media geometrica dei rapporti tra i dati ottenuti dalle due differenti modalità di campionamento

Parametro	RDT / 30MS	240MS / 30MS	240MS / RDT
Cr	1,12	0,97	0,94
Cu	1,44	1,52	1,12
Fe	1,42	1,26	0,86
Ni	1,39	1,41	1,16
Pb	1,06	1,25	1,22
Zn	1,37	1,61	1,22
Min	1,06	0,97	0,86
Max	1,44	1,61	1,22

Conclusioni

In questo studio è stata valutata l'entità delle modifiche apportate alla qualità delle acque destinate al consumo umano distribuite in Italia, dai materiali attualmente utilizzati in acquedottistica. È stata realizzata un'indagine significativa, sulle caratteristiche chimiche e chimico-fisiche dell'acqua prelevata all'utenza da un numero rappresentativo, sia per potenzialità che per distribuzione geografica, di Gestori di acquedotto e di Laboratori pubblici di controllo (ARPA).

Nel corso dello studio sono stati effettuati più di 6.000 prelievi presso più di 3.800 utenze distribuite tra pubbliche e private. I campioni di acqua sono stati analizzati per valutare la concentrazione di ferro, cromo, nichel, piombo, rame e zinco. Sono stati, inoltre, esaminati gli effetti prodotti dalle operazioni di campionamento applicando tre differenti modalità di prelievo: RDT (prelievo casuale senza scorrimento), 30MS (flusso per 5 min e prelievo dopo 30 min di stagnazione) e 240MS (flusso per 5 min e prelievo dopo 240 min di stagnazione).

Al fine di garantire l'armonizzazione dei dati prodotti nell'ambito del progetto, di consentire analisi aggregate e di assicurare una agevole leggibilità dei dati è stato elaborato e realizzato un database operante in ambienti informatici di diffusione generale. Tal approccio ha consentito la costituzione presso l'ISS della prima banca dati nazionale sulla cessione di metalli in reti di adduzione e distribuzione di acque destinate a consumo umano.

Dai risultati ottenuti risulta che il nichel può rivestire un interesse di tipo sanitario, in quanto sono state riscontrate in alcuni casi (4,5% dei campioni prelevati con modalità RDT) concentrazioni superiori ai limiti di legge; fenomeni di cessioni da ferro, in concentrazioni significative dal punto di vista sanitario, sono stati rilevati nel 3,4% dei campioni prelevati con modalità RDT. Di minore importanza dal punto di vista sanitario risultano essere rame e zinco, per i quali sono stati registrati superamenti delle concentrazioni di riferimento rispettivamente del 0,4% e 0,1% sui campioni prelevati in modalità RDT. Nella totalità dei campioni prelevati con modalità RDT non è stato riscontrato cromo in concentrazioni superiore al valore di parametro. Per quanto riguarda il piombo livelli superiori ai valori soglia sono spesso registrati

in tubazioni zincate e sono presumibilmente riconducibili a cessioni dello stesso impianto di distribuzione, in cui il piombo è utilizzato in lega per favorire interventi di saldatura.

Per quanto riguarda il confronto relativo ai rapporti tra coppie di modalità di campionamento si evince che sia i dati RDT che quelli 240MS sono quasi sempre più elevati dei corrispondenti valori 30MS, mentre le due modalità di campionamento RDT e 240MS forniscono in media risultati dello stesso ordine di grandezza. Da queste informazioni è possibile ipotizzare che al crescere del numero di prelievi effettuati in modalità RDT migliori la concordanza con i valori acquisiti operando in modalità 240MS. Sulla base di questo risultato, la valutazione del rapporto tra costi e benefici tende a far preferire la modalità di campionamento RDT a quella 240MS.

Bibliografia

1. Italia. Decreto legislativo 2 febbraio 2001, n. 31. Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale Supplemento Ordinario* n. 52, 3 marzo 2001.
2. American Water Works Association. *Water quality and treatment*. American Water Works Association, USA;1990.
3. Lytle DA and Schock MR. *Impact of stagnation time on the dissolution of metal from plumbing materials*. Proc. AWWA Annual Conf. 1997.

IDENTIFICAZIONE DEL RISCHIO ASSOCIATO ALL'INSORGENZA DEI TUMORI DI TIPO FAMILIARE: RUOLO DEI MODELLI SPERIMENTALI

Maria Teresa Russo
Reparto di Cancerogenesi Sperimentale e Computazionale

Riassunto

Lo scopo di questo lavoro è creare una rete di comunicazione tra le varie competenze che si occupano di cancro coloretale e allestire un saggio funzionale che possa essere utile per avere informazioni sul significato delle varianti della proteina MUTYH. Si tratta di una DNA glicosilasi del sistema di riparazione per escissione di basi (BER) coinvolto nella riparazione del danno ossidativo. Negli ultimi 10 anni numerose mutazioni nella proteina MUTYH sono state identificate in pazienti con poliposi adenomatosa coloretale (MAP). Conoscere, quindi il significato funzionale delle mutazioni è utile per il miglioramento della diagnosi molecolare e la consulenza genetica in famiglie con mutazioni con patogenicità incerta. Si tratta di un esempio di come la ricerca di base possa poi essere utilizzata dai clinici e dai genetisti al fine di migliorare la consulenza genetica.

Introduzione

Il cancro è una malattia molto diffusa e si annovera tra le prime cause di morte del nostro secolo, può colpire persone di ogni età, sebbene le persone anziane siano colpite con maggiore frequenza dal momento che i danni al genoma tendono ad accumularsi nel tempo. Negli ultimi anni si sono accumulate numerose informazioni che hanno permesso di stabilire un'associazione tra rischio di cancro ed esposizione a fattori ambientali. La chemio-prevenzione del cancro si articola in varie fasi, prevenzione primaria, secondaria e terziaria, e può essere vista come una piramide. Alla base possiamo collocare il processo di prevenzione primaria, del quale si occupa anche il nostro Dipartimento, e che consiste di interventi diretti sulla popolazione sana, al fine di diminuire i fattori di rischio che aumentano la probabilità di insorgenza della malattia. È quindi un processo molto importante perché volto ad eliminare o almeno a ridurre le possibili fonti causali di insorgenza dei tumori. Il passaggio immediatamente successivo è la prevenzione secondaria, o diagnosi precoce di una patologia nascente, rivolta quindi ad un segmento più ristretto della popolazione, in cui i soggetti presentano uno stadio preclinico della malattia (pre-maligno nel caso di cancro), al fine di intervenire sulla stessa precocemente per prevenirne la progressione e ridurre gli effetti negativi. Infine la prevenzione terziaria è rivolta a soggetti guariti da una malattia per ridurre le complicazioni e le probabilità di recidive, mentre l'apice della piramide è riservato alla terapia. L'importanza del concetto di prevenzione primaria è ben riassunta nel seguente pensiero di Lorenzo Tomatis (a lungo Direttore dell'*International Agency for Research on Cancer* di Lione): "Quando si parla di prevenzione del cancro, tutti pensano alla cosiddetta diagnosi precoce, ma c'è una prevenzione che si può fare a monte, cercando non di limitare i danni della malattia diagnosticandola al più presto, quanto piuttosto evitando l'insorgere del cancro, impedendo l'esposizione alle sostanze che lo provocano. La prevenzione primaria si occupa proprio di questo: fare ricerca sulle sostanze naturali o sintetiche per capire quali siano cancerogene e, una volta individuate, suggerire alle autorità sanitarie delle misure di salute pubblica per toglierle dalla circolazione. Si tratta di una strategia che

protegge tutti – il ricco come il povero – ma purtroppo spesso è bistrattata da scienziati, politici e autorità sanitarie.

Il lavoro che illustro in questo rapporto è un progetto del Network Nazionale Italiano sui Tumori eredo-familiari finanziato da Alleanza Contro il Cancro. Si tratta di un esempio di prevenzione che si può collocare a cavallo tra prevenzione primaria e secondaria. L'obiettivo del progetto è quello di creare una rete italiana di centri che si occupano di tumori eredo-familiari, denominata *Italian Network TEF* (inTEF), per favorire sia l'integrazione delle attività di ricerca e cliniche dei centri che in Italia si occupano di questo tipo di tumori che la loro partecipazione a consorzi collaborativi internazionali. Inoltre si prefigge di creare uno strumento operativo per i Servizi Sanitari Nazionale e Regionali (SSN e SSR) per orientarli nella gestione dei soggetti con patologie neoplastiche a probabile o sospetta origine ereditaria.

Mettere in comunicazione: creazione del sito web

Il modo più diretto di stare in contatto in tempo reale e scambiare informazioni è la disponibilità di un sito web. Abbiamo quindi creato un nuovo sito web all'interno del server dell'Istituto Superiore di Sanità allo scopo di: 1) favorire l'integrazione delle attività di ricerca e assistenziali dei centri che in Italia si occupano dei tumori eredo-familiari, in modo tale da implementare le attività inerenti la consulenza genetica oncologica (CGO), la diagnostica molecolare (test genetici) e i programmi di prevenzione primaria e secondaria; 2) Fornire uno strumento operativo per i SSN e SSR per la gestione dei soggetti con sospetto di tumore eredo-familiare; 3) Realizzare una banca di materiale biologico alla quale possono attingere tutti i partecipanti alla rete (Figura 1).

Network nazionale italiano Tumori Eredo-Famigliari

Ministero della Salute

Responsabile: Coordinatori inTEF

Progetto

Circa il 5-10% di tutti i tumori sono riconducibili ad una predisposizione di tipo ereditario, e vengono definiti "tumori eredo-famigliari" (TEF). In Italia diversi centri offrono attività assistenziali per i TEF. Queste strutture potrebbero aumentare il loro potenziale, se inserite in una "rete" nazionale che promuova la realizzazione di risorse comuni.

Obiettivi principali

Obiettivo del progetto è creare una rete italiana di centri che si occupano di tumori eredo-familiari denominata "Italian Network TEF" (inTEF), per favorire l'integrazione delle attività di ricerca e cliniche dei centri che in Italia si occupano di tumori eredo-familiari e la partecipazione a consorzi collaborativi internazionali. Sarà realizzato uno strumento operativo per i Servizi Sanitari Nazionale e Regionali (SSN e SSR) per orientarli nella gestione dei soggetti con patologie neoplastiche a probabile o sospetta origine ereditaria.

In rilievo

In data 10/02/2009 si svolgerà a Roma, presso l'aula Bovè dell'Istituto Superiore di Sanità, la seconda riunione operativa dei responsabili delle U.O. partecipanti al progetto e dei collaboratori esterni
Congresso AIFEG 2008

In data 14/03/2008 si è svolta a Milano, presso l'INI, la prima riunione operativa dei responsabili delle U.O. partecipanti al progetto e dei collaboratori esterni

Chi siamo

Il progetto si articola in quattro aree:

- Test genetici, Paolo Radice (INT - Roma)
- Consulenza genetica oncologica, Li Varesco (IST - Genova)
- Saggi funzionali, Margherita Bignardi (Roma)
- Sorveglianza di donne ad alto rischio tumore mammario, Franca Podo (ISS Roma)

Area riservata

L'accesso a questa sezione è riservato agli utenti registrati.

Link

- Alleanza contro il cancro
- Leiden Open Variation Database
- Ministero della salute
- MUTYH page at uniprot
- Unità Operative afferenti al network

[M]appa del Sito

[A] Progetto :: [B] Obiettivi principali :: [C] In rilievo
[E] Chi siamo :: [O] Area riservata
[I] Informazioni :: [R] Cerca :: [K] Contattaci :: [W] Link
[H] Home

Figura 1. Schermata principale del sito web della rete inTEF. La colonna di sinistra contiene la descrizione del progetto e i relativi obiettivi, mentre nella colonna di destra sono indicate le unità operative del progetto, le relative competenze e una serie di link ad altri siti accreditati

Il sito è un bigliettino da visita della rete inTEF e in quanto tale contiene informazioni sui progetti di ricerca in atto, ma anche varie informazioni sulle attività svolte dai centri inTEF. Inoltre il sito web può essere utilizzato come fonte di studio sulle patologie di cui si occupa inTEF inserendo informazioni presenti nella letteratura scientifica sulle mutazioni dei geni coinvolti nei tumori eredo-familiari. In definitiva lo scopo principale della creazione del sito web è stato quello di fornire informazioni scientifiche attendibili e validate in un contesto internazionale e che possano essere di aiuto per un ampliamento delle conoscenze sulla patogenicità delle mutazioni identificate.

I tumori eredo-familiari e difetti nei sistemi di riparazione del danno al DNA

Circa il 5-10% di tutti i tumori sono riconducibili ad una predisposizione di tipo ereditario: i “tumori eredo-familiari”. Il cancro del colon-retto rappresenta una delle forme tumorali più comuni nei paesi sviluppati. La maggioranza di questi tumori insorge da una lesione benigna, chiamata adenoma (o polipo adenomatoso). L’adenoma precede il cancro anche di anni, e spesso in questa fase non dà nessun disturbo. L’asportazione endoscopica degli adenomi impedisce che essi progrediscano verso il cancro del colon e riduce negli anni successivi il rischio di ammalarsi di questa malattia. La poliposi adenomatoso di tipo coloretale (FAP) in particolare è una sindrome di tipo ereditario che conferisce un alto rischio di cancro coloretale attraverso la formazione di adenomi coloretali multipli. È associata ad una mutazione a livello germinale nel gene soppressore tumorale APC (*Adenomatous Polyposis Coli*). Sia la poliposi classica che quella attenuata sono ereditate in maniera dominante. È stata recentemente identificata una nuova adenomatosi di tipo poliposico, non associata alla classica mutazione del gene APC, ma ad una mutazione biallelica a livello germinale nel gene del *Base Excision Repair* MUTYH. Per assonanza con la FAP questa nuova poliposi, associata quindi a un’eredità di tipo recessivo, è stata definita MAP (*MUTYH Associated Polyposis*). Le cellule tumorali di questi pazienti mostrano un eccesso di trasversioni G:C>T:A a livello somatico nei geni APC, K-RAS e altri geni che controllano la proliferazione cellulare nel colon. Questo pattern di mutazioni è tipico di un difetto nei geni della riparazione del danno ossidativo indotto dalle specie reattive dell’ossigeno (ROS). La produzione di ROS che si verifica durante il normale metabolismo aerobico rappresenta una fonte costante di danno al DNA e la purina ossidata 8-ossiguanina (8-oxoG) rappresenta una delle lesioni più pericolose. Questa base ossidata si appaia in maniera termodinamicamente stabile sia con la canonica Citosina che con l’Adenina. Questo mis-appaiamento se non viene riparato da luogo a mutazioni per trasversione GC:TA. Gli enzimi di riparazione del danno al DNA, MTH1, OGG1 e MUTYH, mitigano l’alto potenziale mutageno della 8-oxoG. In maniera particolare MUTYH è una DNA glicosilasi che rimuove l’Adenina dall’appaiamento scorretto con la 8-oxoG ripristinando la sequenza corretta 8-oxoG:C. Questo appaiamento è il substrato della DNA glicosilasi OGG1 che rimuove direttamente la base ossidata 8-oxoG. Sebbene la DNA glicosilasi MUTYH contribuisca in maniera indiretta alla riparazione dell’8-oxoG, l’azione concertata di queste due glicosilasi impedisce l’insorgenza di mutazioni di questo tipo (Figura 2).

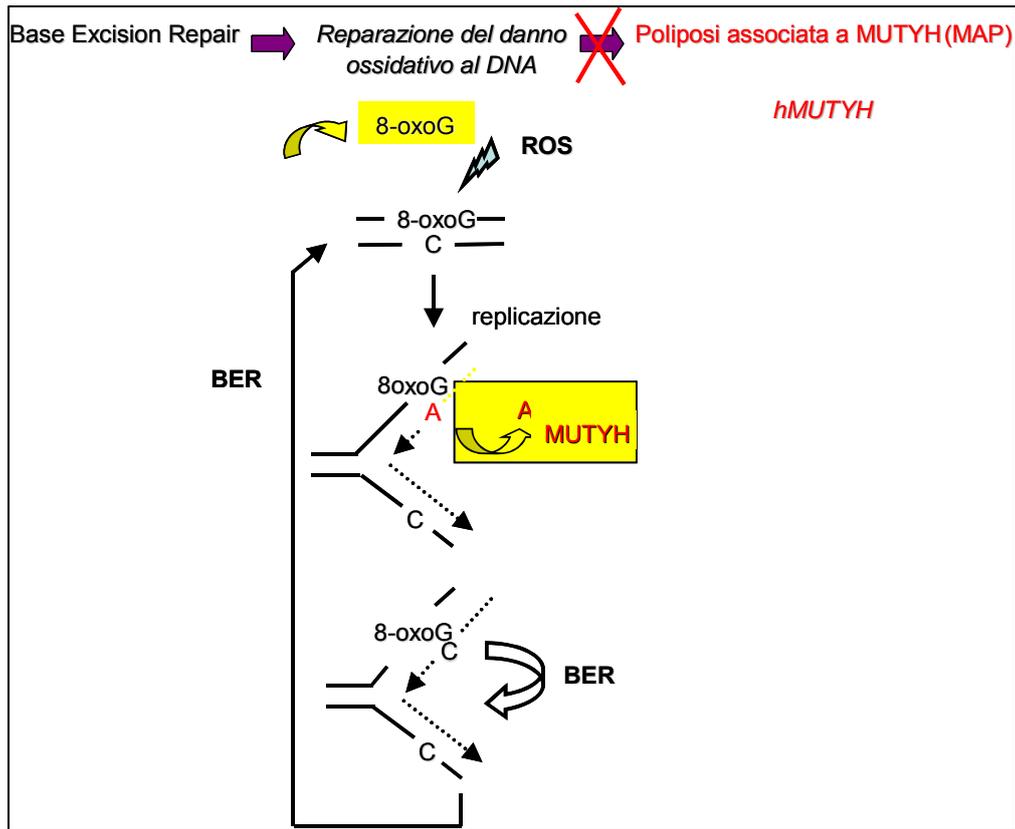


Figura 2. Schema esemplificativo dell'associazione tra difetti nella riparazione per escissione di basi (Base Excision Repair, BER) e poliposi coloretale e meccanismo d'azione delle due principali DNA glicosilasi del BER nella rimozione della 8-oxoG

Saggio funzionale per l'identificazione di difetti della proteina MUYH

Tra i tumori eredo-familiari solo il 3% è associato a mutazioni in geni noti. Conoscere il gene che porta al tumore permette di effettuare una consulenza genetica oncologica, di sviluppare test genetici diagnostici del tumore e inoltre di allestire saggi funzionali. Tali saggi hanno lo scopo di identificare il significato patogenetico delle mutazioni trovate in famiglie con elevato rischio di cancro del colon-retto.

Negli ultimi 10 anni sono state individuate numerose mutazioni che riguardano i vari domini funzionali della proteina MUTYH. Tra le varie classi le mutazioni missenso rappresentano la maggioranza delle varianti individuate. Tra queste, alcune varianti sono molto comuni come la Y165C o la G382D, mentre altre varianti sono state identificate solamente in alcune famiglie. Affinché una mutazione biallelica a livello germinale del gene MUTYH abbia un ruolo patogenetico nello sviluppo dell'adenomatosi coloretale è necessaria la perdita della proteina. Tuttavia fin'ora il significato di molte mutazioni missenso rimane ancora da chiarire. Di conseguenza, in famiglie con varianti di incerta patogenesi, la diagnosi molecolare, e la consulenza genetica rappresentano un problema. In questo scenario si colloca il nostro studio

volto all'allestimento di un saggio funzionale che permette di identificare le conseguenze fenotipiche di mutazioni di MUTYH.

Il nostro saggio funzionale per MUTYH prevede l'utilizzo di una linea cellulare derivata da un topo *knock-out* per *Mutyh* in cui è stato trasfettato un vettore contenente il cDNA del gene MUTYH umano sia in forma *wild-type* (WT) che in forma mutata. In questo sistema sperimentale sono stati analizzati i livelli basali di danno ossidativo e la capacità delle cellule di riparare il danno ossidativo indotto da un agente ossidante (Figura 3).

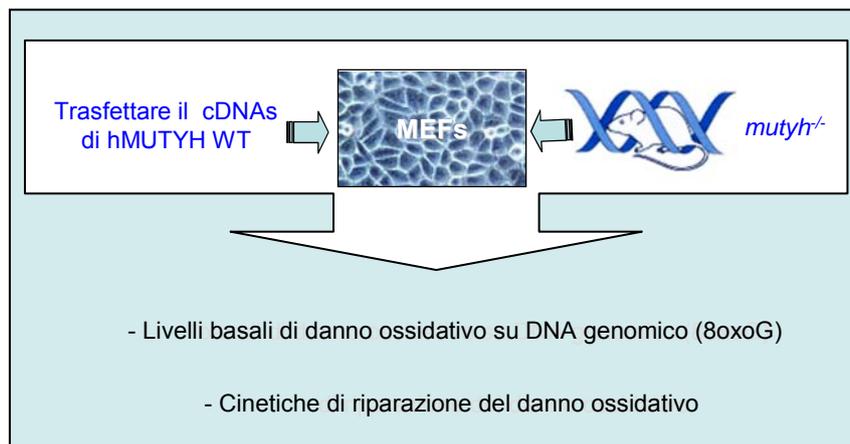


Figura 3. Schema del saggio sperimentale. Fibroblasti embrionali derivati da topi difettivi per la proteina Mutyh sono stati trasfettati con un vettore contenente il cDNA del gene MUTYH umano sia in forma *wild-type* che mutata. In questo sistema sperimentale abbiamo analizzato i livelli endogeni di danno ossidativo e la capacità delle cellule di riparare questo danno

Utilizzando HPLC accoppiato a rivelazione elettrochimica è possibile misurare i livelli di 8-oxoG nel genoma e valutare quindi il contributo di MUTYH al controllo dei livelli basali di danno ossidativo. Cellule murine difettive in *Mutyh*^{-/-} hanno mostrato livelli di 8-oxoG due volte superiori rispetto a cellule di topo WT. Inoltre l'espressione in queste cellule del gene MUTYH umano ha ridotto notevolmente i livelli della purina ossidata nel genoma riportandoli a livelli WT (Figura 4A). Quindi la presenza della proteina MUTYH umana nelle cellule difettive di topo è sufficiente a complementarne il difetto. Utilizzando lo stesso approccio abbiamo anche misurato la cinetica di riparazione del danno ossidativo al DNA. Come mostrato in Figura 4B le cellule complementate con la proteina WT mostrano una cinetica di riparazione più rapida rispetto alle cellule *Mutyh*^{-/-}.

In conclusione, abbiamo dimostrato che in assenza dell'attività enzimatica di MUTYH si osserva un aumentato livello di danno ossidativo basale e ad una inefficiente attività riparativa e che il ripristino dell'espressione della proteina WT umana reverte questo fenotipo. Abbiamo quindi messo a punto un saggio funzionale in cui è possibile analizzare la funzione biologica di mutazioni della proteina MUTYH umana associate con l'insorgenza del cancro coloretale in un background di mammifero. I risultati ottenuti con questo saggio funzionale potranno essere utilizzati, in collaborazione con i genetisti medici e i clinici, per una più corretta diagnosi molecolare delle varianti di incerta patogenicità presenti in famiglie affette da tumori eredo-familiari e per la conseguente consulenza genetica.

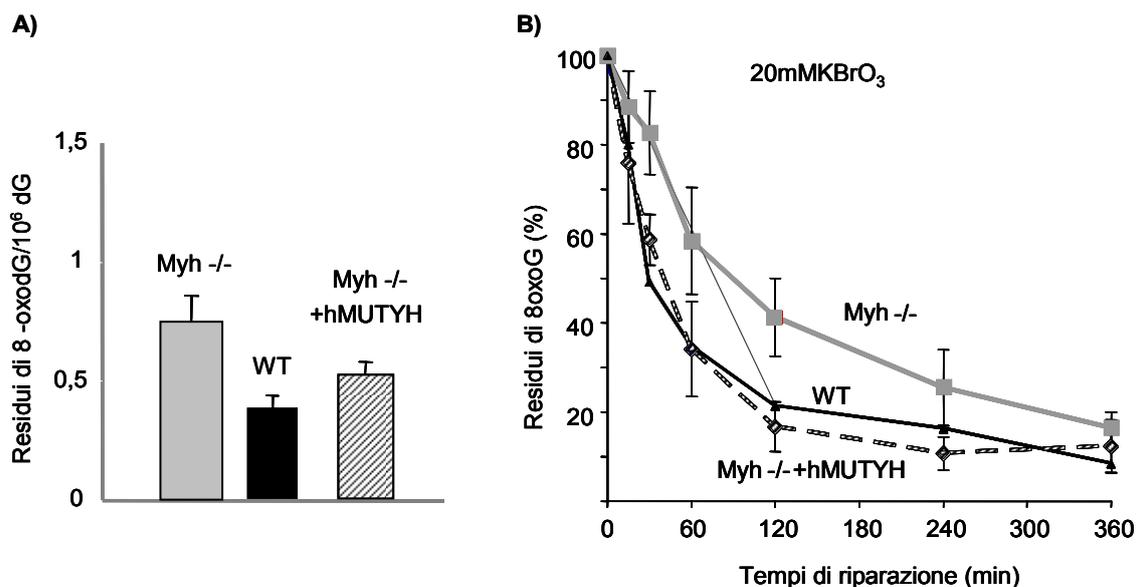


Figura 4. A) Livelli basali di danno ossidativo in cellule di topo difettive per Mutyh (barra grigia) a confronto con cellule murine WT (barra nera) e con cellule mutyh^{-/-} trasfettate con il cDNA codificante il gene MUTYH umano WT (barra tratteggiata); **B)** Cinetiche di riparazione della 8-oxoG in cellule di topo difettive per Mutyh (linea grigia) a confronto con cellule murine WT (linea nera) e con cellule mutyh^{-/-} trasfettate con il cDNA codificante il gene MUTYH umano WT (linea tratteggiata)

Bibliografia di riferimento

- Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, Fleming N, Livingston AL, Williams GT, Hodges AK, Davies DR, David SS, Sampson JR, Cheadle JP. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet* 2002;30(2):227-32.
- Aretz S, Uhlhaas S, Goergens H, Siberg K, Vogel M, Pagenstecher C, Mangold E, Caspari R, Propping P, Friedl W. MUTYH-associated polyposis: 70 of 71 patients with biallelic mutations present with an attenuated or atypical phenotype. *Int J Cancer* 2006;119(4):807-14.
- David SS, O'Shea VL, Kundu S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* 2007;447(7147):941-50.
- D'Errico M, Parlanti E, Dogliotti E. Mechanism of oxidative DNA damage repair and relevance to human pathology. *Mutat Res* 2008;659(1-2):4-14. Epub 2007 Oct 26.
- Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M *et al*. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991;66(3):589-600.
- Molatore S, Russo MT, D'Agostino VG, Barone F, Matsumoto Y, Albertini AM, Minoprio A, Degan P, Mazzei F, Bignami M, Ranzani GN. MUTYH mutations associated with familial adenomatous polyposis: functional characterization by a mammalian cell-based assay. *Hum Mutat* 2010;31(2):159-66.
- Russo MT, De Luca G, Degan P, Bignami M. Different DNA repair strategies to combat the threat from 8-oxoguanine. *Mutat Res* 2007;614(1-2):69-76.