



# RAPPORTI ISTISAN 21|11

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

## **Contributi del Dipartimento di Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria per un approccio *One Health***

A cura di  
U. Agrimi, V. Patriarca, I. Purificato



AMBIENTE  
E SALUTE



**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

**Contributi del Dipartimento di Sicurezza alimentare,  
nutrizione e sanità pubblica veterinaria  
per un approccio *One Health***

A cura di  
Umberto Agrimi, Valeria Patriarca, Ivana Purificato  
*Dipartimento di Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria*

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

**Rapporti ISTISAN**  
**21/11**

Istituto Superiore di Sanità

**Contributi del Dipartimento di Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria per un approccio One Health.**

A cura di Umberto Agrimi, Valeria Patriarca, Ivana Purificato

2021, iii, 68 p. Rapporti ISTISAN 21/11

Da diversi anni il Dipartimento di Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria dell'Istituto Superiore di Sanità organizza seminari per il personale interno, con l'obiettivo di condividere i risultati delle attività sia scientifiche che istituzionali. Questa iniziativa è stata promossa e organizzata con la collaborazione dei gruppi di lavoro "Formazione" e "Comunicazione" del Dipartimento. È importante sottolineare che i seminari hanno coinvolto personale sia permanente che non permanente del Dipartimento, in particolare i dottorandi, i quali, illustrando le proprie esperienze di ricerca e i risultati raggiunti, hanno proposto interessanti spunti di confronto. Di seguito, sono riportati i contributi di alcuni seminari che rappresentano un esempio di formazione attiva e di comunicazione professionale tra il personale e che ben descrivono la varietà delle attività di ricerca e istituzionali svolte dal Dipartimento.

*Parole chiave:* Batteriologia; Biomonitoraggio; Biosicurezza; Meccanismi di virulenza; Nutrizione; *One health*; Parassitologia; Patogeni enterici; Sanità pubblica veterinaria; Sorveglianza; Tossicologia ambientale; Valutazione del rischio; Virologia; Zoonosi

Istituto Superiore di Sanità

**A path of sharing and knowledge for a One Health perspective: updates from the Department of Food safety, nutrition and veterinary public health.**

Edited by Umberto Agrimi, Valeria Patriarca, Ivana Purificato

2021, iii, 68 p. Rapporti ISTISAN 21/11 (in Italian)

Since several years, the Department of Food safety, nutrition and veterinary public health of the Istituto Superiore di Sanità (the National Institute of Health in Italy) has been organizing seminars for internal staff, with the aim of sharing the results of both the scientific and institutional activities. This initiative has been promoted and organized with the collaboration of the "Training" and "Communication" working teams of the Department. It is important to underline that the seminars have involved both permanent and not permanent staff of the Department, in particular PhD students, who, by illustrating their research experiences and the results achieved, put forward interesting ideas for debate and discussion. Herein, some of the contributions to the seminars are reported and they represent an example of active training and professional communication between the staff, and well describe the variety of research and institutional activities carried out by the Department.

*Key words:* Bacteriology; Biomonitoring; Biosecurity; Enteric pathogens; Environmental toxicology; Human nutrition; Infectious diseases; One health, Parasitology; Risk assessment; Surveillance; Veterinary public health; virology; Virulence mechanisms; Zoonoses

Per informazioni su questo documento scrivere a: [ivana.purificato@iss.it](mailto:ivana.purificato@iss.it)

Si ringraziano per la costante collaborazione i componenti delle Unità dipartimentali per la Formazione e la Comunicazione del Dipartimento di Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria.

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it)

Citare questo documento come segue:

Agrimi U, Patriarca V, Purificato I (Ed.). *Contributi del Dipartimento di Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria per un approccio One Health*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2021. (Rapporti ISTISAN 21/11).

---

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Silvio Brusaferrò*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Sandra Salinetti e Manuela Zazzara*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.



# INDICE

## Premessa

*Umberto Agrimi* ..... iii

## Relazione sul biomonitoraggio in Europa: il progetto HBM4EU

*Stefano Lorenzetti* ..... 1

## Valutazione del rischio-beneficio in sicurezza alimentare: elementi chiave emersi durante il corso organizzato dalla *Denmark Technical University*

*Rosangela Tozzoli, Olimpia Vincentini, Angela Sorbo* ..... 7

## Epatite E nel mondo animale

*Luca De Sabato, Iliaria Di Bartolo* ..... 17

## Rotavirus dall'animale all'uomo

*Giovanni Ianiro* ..... 23

## Sviluppo di un saggio molecolare a supporto della sorveglianza nazionale della Shigellosi in Belgio nel 2018

*Eleonora Ventola* ..... 28

## Amebe a vita libera patogene (*Free-Living Amoebae, FLA*)

*Margherita Montalbano Di Filippo* ..... 34

## (A)cross *Campylobacter*: cross contamination events at domestic kitchens

*Maria João Cardoso* ..... 38

## Contaminazione da sostanze perfluoroalchiliche in Veneto: valutazione dell'esposizione alimentare e caratterizzazione del rischio

*Francesca Iaconi, Francesco Cubadda* ..... 40

## Ruolo della barriera epiteliale intestinale nelle patologie glutine dipendenti

*Olimpia Vincentini* ..... 47

## Approcci *One Health* nella valutazione del rischio delle sostanze utilizzate in mangimistica

*Alberto Mantovani, Ivana Purificato* ..... 56

## Valutazione mediante *audit* dei sistemi di gestione della biosicurezza dei laboratori

*Renata Borroni, Gianni Ciccaglioni, Rosanna Adone, Antonio Capocefalo,  
Iliaria Di Bartolo, Rita Di Benedetto, Giovanni Ianiro, Marina Monini, Paola Petrucci,  
Sergio Sbrenni* ..... 61



## PREMESSA

Il Dipartimento di Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria sviluppa le sue attività in numerosi e diversificati ambiti disciplinari.

Sicurezza chimica e microbiologica degli alimenti, malattie a trasmissione alimentare, nutrizione, alimentazione e salute, sanità pubblica veterinaria sono i settori nei quali si incardinano le attività istituzionali e di ricerca del Dipartimento.

Tale varietà di competenze offre l'opportunità di organizzare e offrire al proprio personale percorsi di formazione attiva e passiva in numerosi ambiti e di esercitare, specialmente il personale più giovane, a collocare nei giusti contesti di riferimento, scientifici o istituzionali, le proprie attività specialistiche.

In particolare, la collocazione del Dipartimento all'interno del principale istituto di sanità pubblica nazionale, offre l'opportunità di indirizzare la crescita professionale del personale del Dipartimento all'interno della visione e dell'approccio *One Health*.

Tale paradigma, che riconosce la salute dell'uomo come strettamente connessa a quella degli animali e dell'ambiente propone uno sguardo ampio e inclusivo del concetto di salute e offre l'opportunità di una formazione aperta e pronta all'integrazione e alla collaborazione transdisciplinare e interprofessionale.

Scopo dei contributi qui presentati è quello di esporre il contenuto di alcuni dei seminari svolti dal Dipartimento nei suoi diversi ambiti di competenza.

Umberto Agrimi

*Direttore del Dipartimento*

*Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria*



# RELAZIONE SUL BIOMONITORAGGIO IN EUROPA: IL PROGETTO HBM4EU

Stefano Lorenzetti

*Dipartimento di Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Introduzione

Come da definizione, il biomonitoraggio umano (*Human BioMonitoring*, HBM) ha lo scopo di misurare nel corpo umano (fluidi biologici, unghie, capelli) le sostanze chimiche ambientali e i loro metaboliti fornendo una misura aggregata del livello di esposizione alle sostanze chimiche attraverso diverse vie di esposizione.

Il progetto europeo HBM4EU si prefigge di porre le basi scientifiche di un'azione comune a livello europeo. Durante la conferenza del 28 settembre 2018 “*Conference under the auspices of the Austrian Presidency of the Council of the European – science and policy for healthy citizens*” (Vienna, Austria), di cui verranno riportate sinteticamente le principali tematiche di discussione, è stato enfatizzato il ruolo dell’HBM come uno strumento importante per valutare le esposizioni della popolazione umana alle sostanze chimiche e, quindi, come strumento in grado di servire l’agenda delle sostanze chimiche fornendo “alle autorità una visione più completa dell’esposizione effettiva della popolazione agli inquinanti, in particolare in gruppi sensibili come i bambini, e per fornire prove migliori per guidare risposte adeguate”. Le limitazioni nell’attuale comprensione dei rischi chimici per la salute umana, con lacune nei dati di tossicità ed esposizione per un gran numero di sostanze emergenti utilizzate nei prodotti di consumo, rendono fondamentali i dati di HBM, soprattutto per quanto riguarda le caratteristiche e gli effetti dell’esposizione a lungo termine e a basse dosi di miscele di sostanze chimiche.

## Progetto europeo HBM4EU

Il progetto europeo quinquennale HBM4EU (contratto n. 733032) (2017-2021) Horizon2020 ([www.hbm4eu.eu/about-hbm4eu/](http://www.hbm4eu.eu/about-hbm4eu/)), coordinato dall’Agenzia per l’ambiente tedesca (*UmweltBundesAmt*, UBA; [www.umweltbundesamt.de/en/](http://www.umweltbundesamt.de/en/)), in stretta collaborazione con l’Istituto fiammingo per la ricerca tecnologica (*Vlaamse Instelling voor Technologisch Onderzoek*, VITO; <https://vito.be/en>).

Il progetto, che coinvolge istituzioni di 30 diversi Stati nonché l’Agenzia per l’ambiente europea (*European Environment Agency*, EEA; [www.eea.europa.eu/](http://www.eea.europa.eu/)) e la Commissione Europea, ha lo scopo principale di coordinare e migliorare il biomonitoraggio umano in Europa fornendo dati sull’attuale esposizione chimica dei cittadini europei, sulle conseguenze per la salute umana di tale esposizione e, quindi, di suggerire le migliori azioni per l’ambiente e la salute ai decisori politici. L’Italia è rappresentata dal Ministero della Salute e dall’Istituto Superiore di Sanità.

La particolarità organizzativa di questo progetto risiede nella fattiva collaborazione tra ricercatori e decisori politici (*policy makers*), come evidenziato dalla presenza nel consorzio sia di istituti di ricerca che di agenzie e commissioni europee che dei rappresentanti nazionali coinvolti nelle politiche relative alla sicurezza chimica. Tra gli obiettivi chiave del progetto infatti

ci sono: i) l'armonizzazione delle procedure per il biomonitoraggio umano nei diversi stati europei, in modo da fornire ai decisori politici dati comparabili tra loro sull'esposizione umana (*human internal exposure*) a livello transnazionale; ii) associare i dati sull'esposizione aggregata interna (*aggregate internal exposure*) con l'esposizione esterna e identificare le vie e le fonti di esposizione; iii) produrre l'evidenza scientifica sui legami causali tra l'esposizione umana alle sostanze chimiche e gli effetti avversi per la salute umana; e iv) adattare le metodologie di valutazione del rischio chimico per utilizzare i dati di biomonitoraggio umano tenendo conto del contributo di più vie di esposizione al carico chimico totale nel corpo umano, il cosiddetto *body burden* (1, 2).

## Sostanze chimiche d'interesse del progetto HBM4EU

Al fine di raggiungere gli obiettivi chiave del progetto, HBM4EU ha incentrato la propria attività di ricerca pianificandola in tre cicli successivi basati su liste di priorità in cui vengono individuate, per ogni ciclo, le sostanze chimiche di maggior interesse per la salute pubblica ([www.hbm4eu.eu/the-substances/](http://www.hbm4eu.eu/the-substances/)). Il primo ciclo di prioritizzazione è stato condotto nel 2016, il secondo nel periodo 2017-18 e il terzo è stato pianificato per il periodo 2020-21. Quest'ultimo, in realtà, servirebbe a indirizzare future iniziative di biomonitoraggio umano (<https://www.eea.europa.eu/themes/human/human-biomonitoring/prioritisation-and-substances>).

Le sostanze chimiche oggetto di interesse per HBM4EU presenti nella prima e seconda lista di priorità sono elencate nella Tabella 1. A tutt'oggi sono disponibili pubblicazioni indicizzate del consorzio HBM4EU per le seguenti sostanze chimiche della prima lista di priorità: cromo esavalente (3), Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) (4) e ftalati (5, 6).

**Tabella 1. Liste delle sostanze chimiche prioritarie del progetto HBM4EU**

	<b>Prima lista di priorità (2016)</b>	<b>Seconda lista di priorità (2017-2018)</b>
1	<i>Aniline family</i> – Famiglia dell'anilina	<i>Acrylamide</i> – Acrilamide
2	<i>Bisphenols</i> – Bisfenoli	<i>Aprotic solvents</i> – Solventi aprotici
3	<i>Cadmium and chromium VI</i> – Cadmio e Cromo esavalente	<i>Arsenic</i> – Arsenico
4	<i>Chemical mixtures</i> – Miscela chimiche	<i>Diisocyanates</i> – Diisotiocianati
5	<i>Emerging substances</i> – Sostanze chimiche emergenti	<i>Lead</i> – Piombo
6	<i>Flame retardants</i> – Ritardanti di fiamma	<i>Mercury</i> – Mercurio
7	<i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)</i> – Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)	<i>Mycotoxins</i> – Micotossine
8	<i>Per-/poly-fluorinated compounds</i> – Composti per-/poli-fluoroalchilici	<i>Pesticides</i> – Pesticidi
9	<i>Phthalates and Hexamoll® DINCH</i> – Ftalati e Hexamoll® DINCH	<i>Benzophenones</i> – Benzofenoni

Le strategie per l'individuazione delle sostanze chimiche inserite nelle sopra citate liste di priorità sono state definite in due documenti progettuali (*scoping documents*), disponibili come prodotti finali del progetto stesso, in cui si possono trovare le informazioni sulla classificazione delle sostanze chimiche, le domande di ricerca relativa alle politiche e gli obiettivi di ricerca per ogni sostanza chimica. A tali *scoping documents* ([www.hbm4eu.eu/the-substances/](http://www.hbm4eu.eu/the-substances/)) si rimanda per una completa comprensione delle scelte nella composizione delle liste di priorità del progetto.

È importante evidenziare, infine, il ruolo chiave dei biomarcatori come collegamenti essenziali tra studi sull'esposizione e rilevamento degli effetti sulla salute umana. Il progetto HBM4EU, infatti, prevede la compilazione di due diversi inventari di biomarcatori, di esposizione e di effetto. Per definizione (*Report WHO, 2001*) (7) i biomarcatori di esposizione (*biomarkers of exposure*) sono le stesse sostanze chimiche (o loro metaboliti o loro complessi con molecole bersaglio) che sono misurate in un organismo vivente, solitamente nei fluidi biologici umani o comunque in tessuti in cui è possibile minimizzare l'invasività della raccolta, mentre i biomarcatori di effetto (*biomarkers of effect*) sono costituiti da parametri biochimici, fisiologici o altre attività biologiche misurabili in un organismo vivente e che, quindi a seconda della loro variazione, possono essere associati con cambiamenti di eventi pato-fisiologici chiave o come propedeutici all'insorgenza di una malattia. La ricerca sui biomarcatori di effetto costituisce una delle attività chiave anche nel settore dei contaminanti emergenti e, in particolare, per i cosiddetti Interferenti Endocrini (*Endocrine Disruptors*), in cui l'utilizzo di marcatori tossicologici che siano misurabili marcatori di effetto endocrino-dipendenti, cellula-specifici, è una delle frontiere della tossicologia delle sostanze chimiche (8, 9), in quanto strumenti trasversali per la ricerca in modelli sperimentali *in vitro* e *in vivo*.

## **Conferenza internazionale *Human Biomonitoring in Europe***

La conferenza internazionale *Human Biomonitoring in Europe - Science and policy for healthy citizens* si è svolta il 28 settembre 2018 a Vienna (Austria), sotto la presidenza austriaca dell'Unione Europea (UE). Scopo della conferenza era quello di evidenziare i benefici del biomonitoraggio umano per l'elaborazione delle iniziative regolamentari dei decisori politici nonché presentare i primi risultati dell'iniziativa congiunta europea HBM4EU e avviare la discussione sul futuro del biomonitoraggio umano in Europa.

Alla conferenza hanno partecipato rappresentanti di alto livello dell'Austria e dell'UE, nonché rappresentanti di ministeri e agenzie nazionali, istituti di ricerca, Organizzazioni Non Governative (ONG), associazioni industriali e di parti interessate provenienti da tutti gli stati membri europei.

Le tematiche e gli obiettivi principali del progetto HBM4EU sono state affrontate in tre diverse sessioni e in una tavola rotonda finale.

Alla fine della conferenza, il consiglio direttivo di HBM4EU (*Steering Board Conference Conclusions*) ha riassunto le conclusioni della stessa in due concetti guida del progetto: valori aggiunti del biomonitoraggio umano e iniziativa europea sostenibile di biomonitoraggio umano.

Le conclusioni riportate come valori aggiunti del biomonitoraggio umano sono le seguenti:

- i dati del biomonitoraggio umano rappresentano l'unica misura disponibile del *body burden* effettivo dell'esposizione chimica. Essi completano i sistemi di monitoraggio esistenti e obbligatori per l'ambiente e gli alimenti;
- i dati del biomonitoraggio umano e la loro analisi sono riconosciuti come preziosi per la valutazione e la gestione del rischio chimico e per migliorare le politiche ambientali e sanitarie dell'UE;
- il biomonitoraggio umano è un settore in cui le sinergie tra le aree politiche sono ben identificate e in cui l'interesse comune favorisce una buona collaborazione;
- il vantaggio di una stretta collaborazione tra l'UE, gli Stati membri e altri Paesi europei sia per il raggiungimento di obiettivi comuni, sia per l'utilizzo efficiente delle risorse disponibili, è riconosciuto. È un buon esempio del valore aggiunto dell'UE;

- la comunicazione ai, e con i cittadini sulla sicurezza delle sostanze chimiche incontrate nella vita quotidiana e nelle possibilità di gestione dei rischi è importante e qui i dati biomonitoraggio umano sono uno strumento utile per le informazioni basate sui fatti;
- il biomonitoraggio umano nell'UE è importante anche per una portata globale, ad esempio per la valutazione dell'efficacia delle convenzioni internazionali;
- il biomonitoraggio umano può contribuire a migliorare la sicurezza sul lavoro e svolge un ruolo importante nel rispondere alla contaminazione ambientale.

Nell'ambito dell'iniziativa europea sostenibile di biomonitoraggio umano sono state inoltre evidenziate le seguenti conclusioni:

- i partecipanti ad alto livello delle istituzioni dell'UE e degli Stati membri hanno espresso, nel corso della conferenza, un forte e unanime sostegno a lungo termine di un'iniziativa europea di biomonitoraggio umano;
- gli sforzi e le risorse dedicati allo sviluppo di elementi di strutturazione a livello dell'UE nell'attuale iniziativa HBM4EU, basati sull'esperienza acquisita in passato, non devono andare perduti. Diversi Paesi stanno rafforzando o sviluppando centri nazionali con il sostegno dei loro ministeri e agenzie;
- per garantire la sostenibilità, è stata espressa la necessità di una domanda normativa a livello dell'UE per il biomonitoraggio umano. Una domanda normativa può quindi essere tradotta in un mandato per un'agenzia dell'UE con assegnazione delle risorse associate;
- i dati raccolti dovrebbero essere facilmente accessibili, centralizzati e utilizzabili in tutti i settori normativi. La piattaforma IPCHEM, sviluppata e mantenuta dalla Commissione europea ([ipchem.jrc.ec.europa.eu/RDSIdiscovery/ipchem/index.html](http://ipchem.jrc.ec.europa.eu/RDSIdiscovery/ipchem/index.html)), è un importante elemento costitutivo, che dovrebbe diventare una parte intrinseca dei processi europei di regolamentazione chimica;
- i partecipanti alla conferenza hanno convenuto che le istituzioni dell'UE dovrebbero svolgere un ruolo nella sostenibilità per garantire procedure inclusive e trasparenti e una rapida acquisizione dei dati del biomonitoraggio umano nei processi politici;
- oltre a un approccio armonizzato al monitoraggio dei dati, dalla raccolta dei campioni all'analisi, sono importanti le linee guida comuni per l'analisi e l'interpretazione dei dati per creare conoscenze a supporto della valutazione e della gestione del rischio;
- inoltre, è necessaria una forte componente di ricerca per comprendere, tra l'altro, l'impatto sulla salute delle esposizioni chimiche;
- il forte impegno degli Stati membri sarà essenziale per garantire che la capacità nazionale di contribuire a un'iniziativa dell'UE sia sviluppata e mantenuta.

## **Attività di ricerca dipartimentali e sostanze chimiche d'interesse del progetto HBM4EU**

La scelta delle sostanze chimiche di interesse del progetto HBM4EU nonché gli studi delle associazioni tra esposizione alle sostanze chimiche ed effetti sulla salute umana mediati dall'utilizzo di biomarcatori di effetto si sovrappongono con gli interessi di ricerca delle Unità Operative di alimentazione, nutrizione e salute e di sicurezza chimica degli alimenti del Dipartimento di Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria.

Bisfenoli e ftalati sono additivi della plastica (plasticizzanti) da tempo studiati in diversi progetti europei e nazionali (es. *Endocrine Disruptors in silico in vitro – Evaluation and Substitution for Industrial Applications* – LIFE-EDESIA, LIFE12 ENV/IT/000633, 2013-16;

Commissione europea 2012-17 e “Metodi alternativi *in vitro*: tossicità riproduttiva maschile prostata-mediata di potenziali SVHC<sup>1</sup>”, Ministero della Salute 2012-13) che hanno condotto a diverse pubblicazioni sui biomarcatori di effetto per la salute umana e sullo *screening* mediante saggi in silico e *in vitro* di sostituti a minore o assente attività endocrina (8-11).

Pesticidi e micotossine sono classi chimiche anch'esse molto studiate sia per individuarne gli effetti biologici che per fornire una informazione sulla esposizione nella popolazione italiana o europea complementare a quella valutata secondo metodi tradizionali, nonché infine, per la ricerca di biomarcatori di effetto (12-15). I composti perfluoroalchilici costituiscono, per le caratteristiche tossicologiche e per i loro molteplici impieghi in rilevanti settori industriali, una delle classi di contaminanti più rilevanti sotto il profilo sanitario anche alla luce della grande quantità di molecole che caratterizza questa classe e della loro diversificazione strutturale. Gli alimenti costituiscono, nella generalità dei casi, la via di esposizione più significativa; pertanto la conoscenza dei livelli di contaminazione nelle diverse filiere alimentari costituisce un elemento di conoscenza indispensabile nel processo di valutazione del rischio. In questo contesto l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) ha partecipato allo studio di monitoraggio che ha interessato la Regione Veneto e che ha posto le basi per definire un modello di stima dell'esposizione a tali sostanze. Attualmente, la messa appunto di metodiche avanzate per l'individuazione di biomarcatori di esposizione vede coinvolte, oltre ad altri dipartimenti dell'ISS, anche l'Unita Operativa Sicurezza degli alimenti (“Sviluppo e validazione di metodi ‘non-target/multi-target’ per la identificazione e determinazione di sostanze per- e poli-fluoroalchiliche nella catena alimentare, ai fini della valutazione del rischio”; Ministero della Salute, ricerca corrente, 2016-2020).

Gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) nonché arsenico, cadmio, cromo e altri elementi in traccia, sono tra le sostanze oggetto di studio per dati di esposizione che associno la presenza di tali contaminanti nel seme umano a effetti avversi per la fertilità maschile – progetto FAST, Ministero della Salute, Bergamo *et al.* 2016 (16) Montano *et al.* 2021 (17) – o come biomarcatori predittivi di malattie dell'apparato riproduttivo maschile (progetto PRO-HEALTH, Fondazione ProSud Onlus, [www.fondazionepro.it/cosa-facciamo/](http://www.fondazionepro.it/cosa-facciamo/)) (18).

## Bibliografia

1. Bueckers J, David M, Koppen G, Bessems J, Scheringer M, Lebret E, Sarigiannis D, Kolossa-Gehring M, Berglund M, Schoeters G, Trier X. Development of policy relevant human biomonitoring indicators for chemical exposure in the European population. *J Environ Res Public Health* 2018;15(10).
2. Bopp SK, Barouki R, Brack W, Dalla Costa S, Dorne JCM, Drakvik PE, Faust M, Karjalainen TK, Kephelopoulos S, van Klaveren J, Kolossa-Gehring M, Kortenkamp A, Lebret E, Lettieri T, Nørager S, Rüegg J, Tarazona JV, Trier X, van de Water B, van Gils J, Bergman Å. Current EU research activities on combined exposure to multiple chemicals. *Environ Int* 2018;120:544-62.
3. Murawski A, Roth A, Schwedler G, Schmied-Tobies MIH, Rucic E, Pluym N, Scherer M, Scherer G, Conrad A, Kolossa-Gehring M. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in urine of children and adolescents in Germany – Human biomonitoring results of the German environmental survey 2014-2017 (GerES V). *Int J Hyg Environ Health* 2020;226:113491.
4. Santonen T, Alimonti A, Bocca B, Duca RC, Galea KS, Godderis L, Göen T, Gomes B, Hanser O, Iavicoli I, Janasik B, Jones K, Kiilunen M, Koch HM, Leese E, Leso V, Louro H, Ndaw S, Porras SP, Robert A, Ruggieri F, Scheepers PTJ, Silva MJ, Viegas S, Wasowicz W, Castano A, Sepai O. Setting up a collaborative European human biological monitoring study on occupational exposure to hexavalent chromium. *Environ Res* 2019;177:108583.

---

<sup>1</sup> Substances of Very High Concern

5. Kasper-Sonnenberg M, Koch HM, Apel P, Rütther M, Pälme C, Brüning T, Kolossa-Gehring M. Time trend of exposure to the phthalate plasticizer substitute DINCH in Germany from 1999 to 2017: Biomonitoring data on young adults from the Environmental Specimen Bank (ESB). *Int J Hyg Environ Health* 2019;222(8):1084-92.
6. Schwedler G, Conrad A, Rucic E, Koch HM, Leng G, Schulz C, Schmied-Tobies MIH, Kolossa-Gehring M. Hexamoll® DINCH and DPHP metabolites in urine of children and adolescents in Germany. Human biomonitoring results of the German Environmental Survey GerES V, 2014-2017. *Int J Hyg Environ Health* 2019;1:113397.
7. World Health Organization. *Biomarkers in risk assessment: validity and validation. International Programme on Chemical Safety (IPCS), Environmental Health Criteria 222*. Geneva: World Health Organization; 2001.
8. Lorenzetti S, Marcoccia D, Mantovani A. Biomarkers of effect in endocrine disruption: how to link a functional assay to an adverse outcome pathway. *Ann Ist Super Sanità* 2015;51(2):167-71.
9. Lorenzetti S, Aquilina G, Caloni F, Coccia EM, Cozzini P, Cruciani G, Fouassier A, Gissi A, Goracci L, Heinonen T, Hubert P, Madia F, Nevelli F, Rainer A, Rovida C, Vitale A, De Angelis I. Non Animal Methodologies (NAMs): research, testing, assessment and applications – Ecopa Symposium 2019. *Altex* 2020;37(2):317-20.
10. Lorenzetti S, Cozzini P. The substitution principle within REACH regulation: nuclear receptor-bound endocrine disruptors. *Nuclear Receptor Research* 2017;4:101205.
11. Cavaliere F, Lorenzetti S, Cozzini P. Molecular modelling methods in food safety: Bisphenols as case study. *Food Chem Toxicol* 2020;137:111116.
12. Miraglia M, De Santis B, Minardi V, Debegnach F, Brera C. The role of sampling in mycotoxin contamination: a holistic view. *Food Addit Contam* 2005;22(1):31-6.
13. Panzacchi S, Mandrioli D, Manservigi F, Bua L, Falcioni L, Spinaci M, Galeati G, Dinelli G, Miglio R, Mantovani A, Lorenzetti S, Hu J, Chen J, Perry MJ, Landrigan PJ, Belpoggi F. The Ramazzini Institute 13-week study on glyphosate-based herbicides at human-equivalent dose in Sprague Dawley rats: study design and first in-life endpoints evaluation. *Environ Health* 2018;17(1):52.
14. De Santis B, Debegnach F, Miano B, Moretti G, Sonogo E, Chiaretti A, Buonsenso D, Brera C. Determination of deoxynivalenol biomarkers in Italian urine samples. *Toxins Basel* 2019;11(8).
15. Manservigi F, Lesseur C, Panzacchi S, Mandrioli D, Falcioni L, Bua L, Manservigi M, Spinaci M, Galeati G, Mantovani A, Lorenzetti S, Miglio R, Anderson MA, Kristensen DM, Perry MJ, Swan SH, Chen J, Belpoggi F. The Ramazzini Institute 13-week pilot study on glyphosate-based herbicides administered at human-equivalent dose to Sprague-Dawley rats: effects on development and endocrine system. *Environ Health* 2019;18(1):15.
16. Bergamo P, Volpe MG, Lorenzetti S, Mantovani A, Notari T, Cocca E, Cerullo S, Di Stasio M, Cerino P, Montano L. Human semen as an early, sensitive biomarker of highly polluted living environment in healthy men: a pilot biomonitoring study on trace elements in blood and semen and their relationship with sperm quality and RedOx status. *Reprod Toxicol* 2016;66:1-9.
17. Montano L, Ceretti E, Donato F, Bergamo P, Zani C, Viola GCV, Notari T, Pappalardo S, Zani D, Ubaldi S, Bollati V, Consoles C, Leter G, Trifuoggi M, Amoresano A, Lorenzetti S; FAST study group. Effects of a lifestyle change intervention on semen quality in healthy young men living in highly polluted areas in Italy: the FAST Randomized Controlled Trial. *Eur Urol Focus*, 2021; S2405-4569(21)00041-9.
18. Verze P, Cai T, Lorenzetti S. Male fertility and the role of the prostate in health and disease. *Nature Rev Urol* 2016;13:379-86.

# **VALUTAZIONE DEL RISCHIO-BENEFICIO IN SICUREZZA ALIMENTARE: ELEMENTI CHIAVE EMERSI DURANTE IL CORSO ORGANIZZATO DALLA *DENMARK TECHNICAL UNIVERSITY***

Rosangela Tozzoli, Olimpia Vincentini, Angela Sorbo  
*Dipartimento di Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## **Introduzione**

A partire dal 2018 il *National Food Institute* dell'Università Tecnica della Danimarca (*Denmark Technical University*, DTU) organizza un corso residenziale sulla valutazione rischio-beneficio (*Risk-Benefit Assessment*, RBA) in sicurezza alimentare e nutrizione. L'obiettivo del seminario svolto il 1° aprile 2019 è stato condividere con i colleghi l'esperienza acquisita durante la partecipazione al corso "*Risk-Benefit Assessment in Foods: methods for quantifying health effects*" (Valutazione del rischio/beneficio degli alimenti: metodi per quantificare gli effetti sulla salute), organizzato dalla DTU nel novembre 2018. Il corso, rivolto a studenti di dottorato e scienziati da istituti coinvolti nella valutazione del rischio, ha avuto la durata di otto giorni. I docenti, affiliati alla DTU, hanno articolato il corso in lezioni teoriche e pratiche, includendo esercitazioni cui era dedicata una parte consistente di tempo. Al termine del corso ai partecipanti è stato somministrato un test per valutare il grado di comprensione acquisito rispetto a uno studio RBA. Ai discenti che hanno superato il test sono stati assegnati 2,5 crediti secondo il sistema europeo di trasferimento e accumulazione dei crediti (*European Credit Transfer and accumulation System*, ECTS), che tengono conto dell'apprendimento basato sui risultati di un determinato percorso formativo e sul relativo carico di lavoro (ore di corso).

Verranno di seguito riportate nozioni di base del RBA, fondamentali appresi durante il corso per avvicinarsi a tale disciplina, di considerevole interesse nelle tematiche di Sicurezza Alimentare e Nutrizione.

## **Principi di RBA**

Gli alimenti sono essenziali per la vita, rappresentando la fonte di nutrienti ed energia necessari per la salute. Tuttavia, a essi possono essere associati effetti avversi per la salute, in quanto potrebbero contenere tossine, sostanze chimiche pericolose e microrganismi patogeni (1). Inoltre, l'assunzione di una quantità giornaliera troppo elevata o al contrario insufficiente di un determinato alimento potrebbe portare a fenomeni di tossicità o di carenze nutrizionali (1). La valutazione rischio-beneficio è una disciplina scientifica di recente sviluppo (2) e rappresenta uno strumento di base per supportare decisioni in termini di sicurezza alimentare e di nutrizione. Tale disciplina prevede una analisi integrata che tiene conto sia degli effetti benefici che di quelli avversi derivanti dall'assunzione di alimenti, prendendo in considerazione aspetti microbiologici, chimici e nutrizionali. Per fare ciò si rende necessario un approccio interdisciplinare che comprenda competenze differenti, nell'area della statistica, chimica, microbiologia epidemiologia

e nutrizione. A tale scopo, infatti, il *team* deputato all'RBA deve essere composto da esperti di diverse discipline per permettere la valutazione integrata dei diversi effetti.

L'RBA è una parte integrante dell'analisi rischio-beneficio, che comprende, analogamente all'analisi del rischio, la valutazione, la gestione e la comunicazione del rischio-beneficio. La differenza con la valutazione del rischio consiste nel fatto che nell'esercizio di RBA, parallelamente alla valutazione degli effetti avversi, come ad esempio la possibile presenza in un alimento di patogeni o composti tossici, viene intrapresa la valutazione dei benefici collegati al consumo di un determinato alimento o composto, come raffigurato schematicamente in Figura 1.

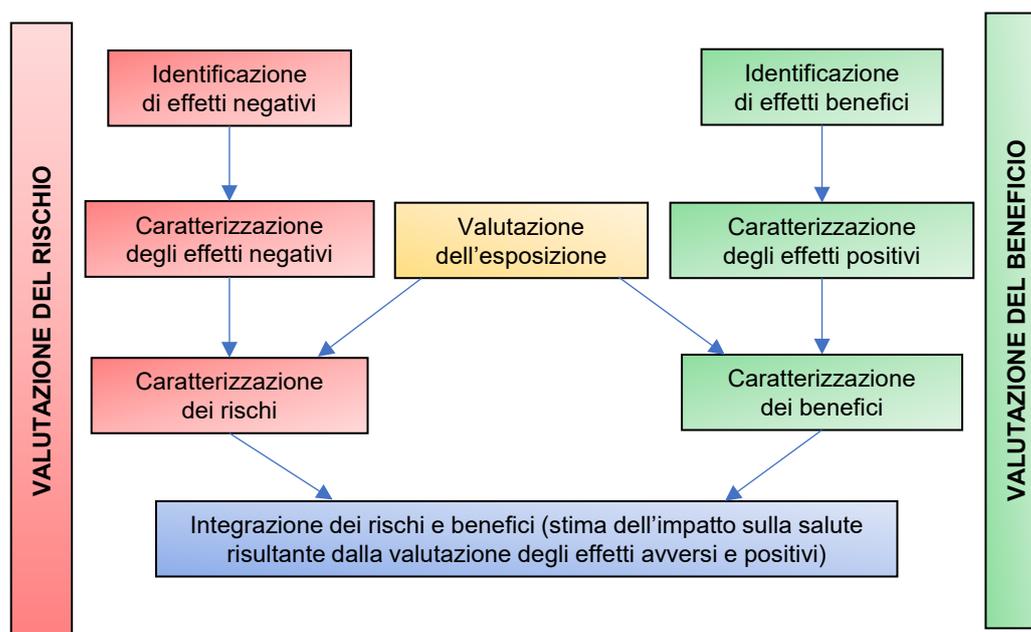


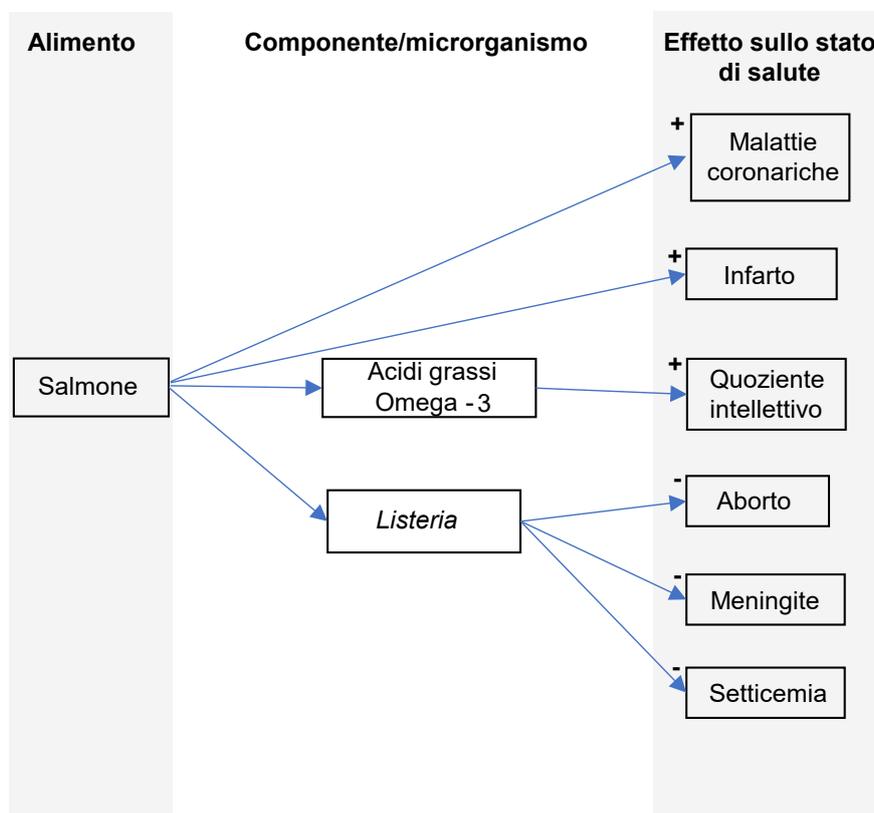
Figura 1. Diagramma delle fasi del RBA (adattato da EFSA, 2010) (18)

In una valutazione del rischio, il termine “pericolo” è usato per definire un agente biologico, chimico o fisico in grado di causare effetti negativi sulla salute (3). Il termine “beneficio” viene utilizzato per descrivere gli effetti positivi. Tuttavia, nel campo della “Nutrizione”, lo stesso agente potrebbe essere una fonte di rischio e beneficio a seconda dell’esposizione del consumatore (4), in quanto nella caratterizzazione del rischio in tossicologia e microbiologia, il rischio aumenta con la dose secondo il modello a soglia e i benefici non sono presenti. Contrariamente ai non nutrienti, i nutrienti presentano un rischio duale, l’assunzione di un alimento o di una sua componente segue un modello diverso in quanto l’assunzione può essere insufficiente o troppo elevata e la cosiddetta “finestra del beneficio” viene definita dall’LTI (*Lower Threshold Intake*) al di sotto del quale c’è un insufficiente apporto e dall’UL (*Upper Intake Level*) al di sopra del quale si può avere un effetto avverso.

La fase iniziale dell’RBA è costituita dalla domanda di rischio-beneficio, che può essere posta da *risk manager*, consumatori, produttori o anche affrontata dal gruppo di RBA in maniera autonoma. La domanda posta per dare il via a un RBA è di fondamentale importanza, deve essere chiara, specificando quale alimento/composto/dieta considerare, la popolazione di interesse e normalmente richiede la comparazione di due scenari, uno di riferimento (consumo attuale) rispetto a uno alternativo, che devono essere ben definiti nella richiesta. L’integrazione dei rischi

e benefici, stimati per ognuno dei due scenari nel corso dell'RBA, viene resa possibile mediante l'utilizzo di metriche comuni (1), come il calcolo del DALY (*Daily Adjusted Life Years*), come verrà in seguito spiegato con più dettaglio.

È molto importante definire il livello di aggregazione dell'RBA, ovvero qual è il punto di partenza della nostra valutazione rischio beneficio: un determinato componente, un alimento o una particolare dieta. Questo porterà allo sviluppo di un diverso schema di RBA, a seconda del livello di aggregazione. Infatti, quando una domanda di rischio beneficio riguarda un componente, verranno considerate gli alimenti che lo contengono e i diversi effetti che ha sulla salute. Ad esempio, l'acido folico viene assunto mediante la dieta, ma anche attraverso l'uso di integratori, e può avere effetti positivi sulla riduzione di incidenza di malattie come l'anemia megaloblastica e a carico del tubo neurale, tuttavia può mascherare la deficienza di vitamina B12. D'altro canto, se nel nostro RBA partiamo dalla valutazione degli effetti di un determinato alimento dovremo tenere in considerazione i diversi componenti presenti (di tipo microbiologico o chimico o tossicologico) e i relativi effetti sulla salute umana. La Figura 2 riporta un esempio di schema di RBA a livello di aggregazione di alimento. Con il segno + sono indicati effetti benefici e con il segno – gli effetti avversi alla salute.



**Figura 2. Schema dell'RBA a livello di alimento (esempio del salmone) (adattato da Nauta et al. 2018) (1)**

Inoltre, nell'ambito del RBA in sicurezza alimentare e nutrizione possiamo distinguere due approcci: l'approccio di tipo *bottom-up* che avvia la valutazione del rischio-beneficio con la caratterizzazione degli effetti sulla salute a partire da un alimento o un componente o una dieta, e

uno definito *top-down*, che parte dall'osservazione di effetti sulla salute umana, come studi epidemiologici, per rintracciarne la sorgente (5). Per quanto concerne i pericoli chimici, normalmente viene impiegato l'approccio *bottom-up* in quanto spesso non sono disponibili studi epidemiologici a supporto. Lo stesso vale anche per i patogeni alimentari, tuttavia sono possibili applicazioni di tipo *top-down* relativi a studi di eventi epidemici e di *source attribution*. In ultimo, per quanto concerne l'RBA su fattori nutrizionali viene spesso impiegato l'approccio *top-down* (1).

## Sviluppo del RBA e introduzione alla metodologia

L'RBA è una disciplina emergente i cui contorni e contenuti sono ancora in corso di definizione. Tuttavia, molti sforzi sono stati fatti in Europa per sviluppare un metodo comune. Il primo lavoro sulla metodologia del RBA è stato sviluppato dalla *European Food Safety Authority* (EFSA) nel 2006 (6), seguito nel 2010 dalle raccomandazioni da seguire per l'analisi dell'RBA (7, 8). In parallelo l'Istituto nazionale per la salute pubblica e l'ambiente olandese, il RIVM (*Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu*), ha pubblicato uno studio che descrive l'albero decisionale nell'RBA (9). In seguito, il gruppo internazionale di ricercatori del progetto BRAFO (*Benefit-Risk Analysis for Foods*) ha suggerito un approccio integrato applicando la metodologia a diversi casi-studio e pubblicato un documento consenso (10, 11). BRAFO, progetto finanziato dalla Commissione Europea, mirava a sviluppare un quadro scientifico ai fini di un confronto quantitativo dei rischi per la salute umana e dei benefici di alimenti e componenti alimentari presenti nella dieta basati su una scala comune di misurazione.

Come definito nel corso del progetto BRAFO, il processo di RBA inizia con la prevalutazione e la formulazione del problema per stabilire l'ambito della valutazione. In sostanza, una valutazione del rapporto rischio-beneficio stima se una variazione dell'assunzione comporterà un effetto netto benefico o negativo sulla salute. Pertanto, la valutazione è di solito formalizzata come il confronto degli effetti sulla salute di due (o più) scenari, uno di riferimento e uno alternativo, fornendo supporto scientifico utile per valutare quale scenario sia preferibile. Gli effetti sulla salute hanno molteplici dimensioni, che possono essere riassunte in termini di incidenza, gravità, durata, tasso di mortalità e numero di anni di vita persi a causa della mortalità precoce dovuta all'effetto.

Il progetto BRAFO introduce un approccio a più livelli (*tiered approach*) nell'RBA. In particolare, vengono identificati quattro livelli, che si differenziano principalmente per l'integrazione di rischi e benefici, e in ogni livello l'impatto sulla salute netto viene valutato con crescente precisione. In ogni livello viene definito un criterio che consente al valutatore di determinare se interrompere o continuare. In molti casi, una valutazione di livello inferiore in cui i rischi e i benefici sono valutati qualitativamente può essere sufficiente per mostrare una chiara differenza tra gli impatti sulla salute dei due scenari. In altri casi, metodi sempre più sofisticati per integrare quantitativamente rischi e benefici vengono utilizzati a livelli più alti per valutare l'impatto sulla salute:

- I primi due livelli prevedono una valutazione di tipo qualitativo: nel primo livello viene portata avanti la valutazione separata dei rischi e dei benefici, senza necessità di integrazione, mentre nel secondo livello vi è una integrazione delle risultanze della caratterizzazione dei rischi e dei benefici che tuttavia rimane ancora su un piano prettamente qualitativo. In questi due casi vi è una netta prevalenza degli effetti avversi o di quelli benefici, tale da non richiedere ulteriori approfondimenti.

- Il terzo livello è necessario quando sono presenti effetti sia positivi che negativi, ma nessuno dei due è chiaramente dominante. In questo livello, rischi e benefici sono integrati quantitativamente in una metrica comune, mediante un approccio deterministico.
- Nel quarto livello, rischi e benefici sono integrati quantitativamente in una metrica comune mediante un approccio probabilistico.

In definitiva lo scopo del progetto BRAFO era di creare una base scientifica più forte per la comunicazione dei rischi e benefici per il consumatore, compresa l'espressione appropriata di incertezza.

Altri progetti hanno contribuito a implementare un quadro comune tra cui QALIBRA (*Quality of Life – Integrated Benefit and Risk Analysis web-based tool for assessing food safety and health benefits*) che ha sviluppato un software online che permette il confronto rischio e beneficio tramite il calcolo del DALY o il QALY (*Quality Adjusted Life Years*) (12). Nel progetto BENERIS (*Benefit-risk assessment for food: an iterative value-of information approach*) è stata creata una piattaforma per lo scambio di informazioni (<http://en.opasnet.org/w/Beneris>). Il progetto BEPRARIBEAN (*Best Practices for Risk-Benefit Analysis: experience from out of food into food*) ha stabilito le buone pratiche nell'analisi del rischio-beneficio in diversi campi: medicina, ambiente, microbiologia degli alimenti, alimentazione e nutrizione (13).

## Una metrica comune: il DALY

Nell'ambito del *tiered approach* per la valutazione RB (*Risk Benefit*), una valutazione qualitativa è sufficiente se è chiaramente dominante il rischio rispetto al beneficio o viceversa. Se, invece, è necessario applicare un approccio quantitativo, una volta che le valutazioni iniziali hanno permesso di caratterizzare individualmente i rischi e i benefici, i diversi esiti ottenuti devono essere combinati tra loro utilizzando una metrica comune.

A tale scopo è possibile applicare diverse metriche, e tra quelle maggiormente utilizzate spicca il DALY.

Il DALY è stato introdotto nell'ambito del progetto *Global Burden of Disease (GBD) study* promosso nel 1990 dalla Banca Mondiale e condotto dalla *World Health Organization* in collaborazione con l'*Harvard School of Public Health* e con l'*Institute for Health Metrics and Evaluation*. Lo studio GBD è uno studio epidemiologico osservazionale che descrive la mortalità e la morbilità delle principali malattie, lesioni e fattori di rischio per la salute a livello globale, nazionale e regionale. Tale studio parte dal presupposto che le malattie hanno un diverso impatto sulla salute in una popolazione sia in termini di incidenza che di mortalità, ed è stato ideato per verificare, in termini quantitativi, l'impatto delle malattie sulla società e di prioritizzare gli eventuali interventi dando informazioni ai decisori delle politiche sanitarie. Successivamente, a questo primo progetto ne sono seguiti altri su base nazionale, fino ad arrivare allo studio GBD del 2010, che si può considerare una pietra miliare avendo comportato un grande sforzo empirico per quantificare le perdite di salute associate a una ampia gamma di effetti non fatali di malattie e a casi di infortuni, e che viene tutt'ora aggiornato.

La filosofia alla base del DALY è che ogni persona nasce con la prospettiva di vivere per un certo numero di anni potenzialmente in condizioni ottimali di salute. Da un punto di vista quantitativo tale condizione ottimale corrisponde allo 0% di disabilità mentre l'evento "morte" comporta un 100% di disabilità. Gli individui possono perdere anni vissuti in salute a causa di una malattia o in seguito a una morte prematura rispetto all'aspettativa di vita presa come riferimento (14).

Sostanzialmente il DALY è un sistema di pesatura che combina gli anni persi per morte e gli anni vissuti in condizioni di disabilità, come schematizzato nella Figura 3 (15). Allo scopo di dare un peso al tempo vissuto non in piena efficienza fisica, si attribuisce a ogni anno di vita un quoziente di disabilità. Questa misurazione viene effettuata usando come unità di misura il tempo e una unità di DALY corrisponde a un anno perso in termini di vita in salute.

Il calcolo viene effettuato applicando la formula:

$$DALY = YLD + YLL$$

dove YLD (*Years Lived with Disability*) corrisponde agli anni vissuti in condizioni di disabilità e YLL (*Years of Life Lost*) rappresenta gli anni di vita persi per morte prematura.

Nello specifico, ciascuno di questi due fattori può essere quantificato applicando le seguenti equazioni:

$YLD = I \times d \times DW$  dove I= incidenza della malattia/disabilità, DW= peso di disabilità associato alla patologia (definito dallo studio del GBD), e d=durata in anni della condizione di disabilità/malattia

$YLL = N \times LE$ , dove N=numero di morti, LE=aspettativa di vita residua al momento del decesso.

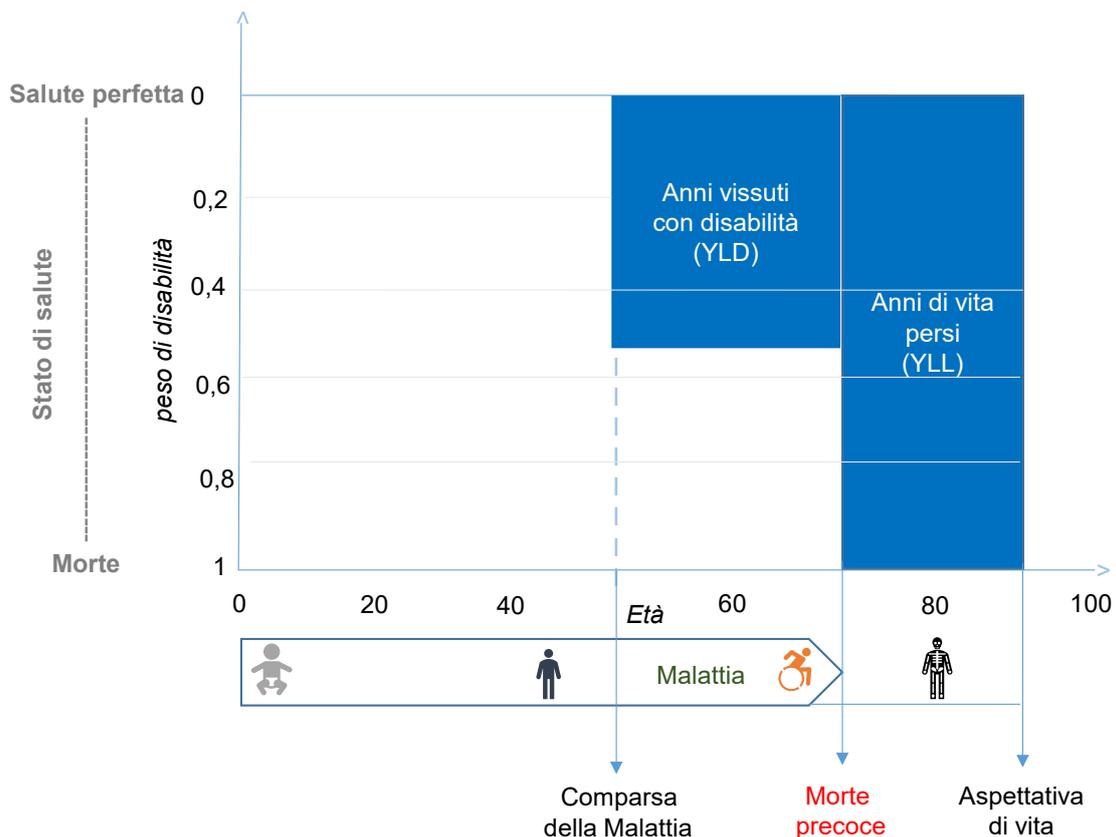


Figura 3. Schema dei fattori che contribuiscono al DALY (tratto da Boué et al. 2015) (15)

In generale, l'aspetto metodologico alla base del DALY è stato ben sviluppato nell'ultimo ventennio, ma è stata spesso sottolineata l'importanza di ben documentare e implementare anche i passaggi fondamentali che precedono il calcolo. È opportuno, infatti, applicare un approccio *step by step*, che si articola in diverse fasi così sintetizzabili:

1. Definizione della popolazione in studio anche in termini di area geografica e arco di tempo dello studio.
2. Definizione del modello di malattia, anche detto *health outcome tree*, che è una rappresentazione schematica dei diversi stati di salute associati alla malattia e delle possibili transizioni tra questi stati. Questa fase è fondamentale in tutti gli studi RB perché serve come guida per le successive fasi dell'analisi. È particolarmente complessa perché può essere difficile identificare tutti gli effetti positivi e negativi sulla salute in generale o su uno specifico *endpoint* associati all'assunzione di certi alimenti o a una particolare dieta. Il modello di malattia deve attentamente considerare il decorso della malattia, caratterizzato da differenti stati di salute che possono avere diversi livelli di gravità (es. fasi acute o croniche, conseguenze a breve o lungo termine).
3. Raccolta dei dati, che è in genere il passaggio più difficile e che richiede più tempo. È anche quello cruciale dal momento che la qualità della stima finale del DALY dipende dalla qualità dei dati utilizzati. Ovviamente quanto più i dati sono dettagliati tanto più precisa sarà la stima. In mancanza di informazioni è possibile utilizzare dei modelli di estrapolazione. In generale devono essere raccolti tre gruppi di dati: demografici, epidemiologici e dati sulla gravità della malattia.
4. Valutazione dei dati in particolare considerando in modo critico potenziali *bias*.
5. Calcolo del DALY, che può essere effettuato usando specifici strumenti di calcolo standardizzati o implementando e adattando allo scopo comuni programmi di calcolo (software di gestione e analisi dei dati, come ad esempio Excel o R).

Sono disponibili diverse risorse elettroniche, che possono aiutare sia nella comprensione dei concetti alla base del DALY sia nel calcolo. In particolare, può essere utile la consultazione dei seguenti link:

- <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool> fornisce informazioni sull'impatto di una malattia (*Burden of disease*);
- <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/> può essere utilizzato per verificare i fattori di rischio che contribuiscono al carico della malattia nei diversi Paesi;
- <https://irisk.foodrisk.org/> è un sistema consultabile tramite registrazione e fornisce informazioni circa i rischi microbiologici e chimici a seguito dell'assunzione dei diversi alimenti restituendo una stima del carico sulla salute in una certa popolazione;
- <http://daly.cbra.be/> può essere utilizzato per sviluppare il calcolo del DALY in ambiente R.

In linea con l'aspetto pratico del corso sono state organizzate esercitazioni con la proposta di vari *case-study*. Sono stati presi in considerazione i seguenti casi:

- basso Quoziente Intellettivo (QI) di bambini esposti a metilmercurio nella vita fetale;
- infezione da *Listeria* (listeriosi) perinatale o acquisita;
- malattia coronarica fatale.

È stato chiesto di preparare un modello per ciascun caso, di determinare quale parte del modello contribuisca al YLD e quale a YLL e di calcolare il DALY.

Per il primo *case-study* è stato proposto uno scenario alternativo con aumento del consumo di pesce e quindi con un diverso livello di assunzione di metilmercurio. È stato chiesto di verificare se ci fossero effetti sull'incidenza del basso QI passando dallo scenario di riferimento (consumo di 223 g di pesce a settimana) a quello alternativo (consumo di 350 g di pesce a settimana). Per rispondere al quesito è stato necessario quantificare i DALY associati ai due scenari e calcolarne la differenza (DALY<sub>alt</sub>-DALY<sub>rif</sub>).

Dal punto di vista dell'interpretazione del risultato, in generale, se la differenza di DALY tra lo scenario alternativo e quello di riferimento è minore di zero, l'incidenza dell'evento è più alta nello scenario di riferimento che nell'alternativo. Ovviamente la situazione è opposta se la differenza di DALY è maggiore di zero. Nell'esercizio proposto la differenza è risultata positiva indicando che l'incidenza di basso QI è maggiore nello scenario alternativo, come intuitivo visto l'aumentato consumo di pesce e quindi l'aumentata esposizione a metilmercurio.

La trattazione diventa più complessa quando sullo stesso *endpoint* ci possono essere effetti opposti associati al consumo di un certo alimento, come, ad esempio, il caso in cui si consideri che il consumo di pesce in gravidanza espone il feto non solo al metilmercurio ma anche all'acido docosaesaenoico (DHA), che influenzano il QI dei nati rispettivamente in una direzione positiva (effetto benefico) e negativa (effetto avverso) (16).

Solo a titolo esemplificativo, in Figura 4 si schematizza il modello della malattia nel caso della listeriosi perinatale, oggetto del secondo approfondimento proposto. In seguito all'infezione sono possibili due scenari: soggetti asintomatici e soggetti sintomatici. Nel caso dei malati saranno possibili tre eventi: la morte, la guarigione e la disabilità permanente dovuta a meningite. A ogni scenario e a ogni evento che contribuiscono al DALY è associata una probabilità P: nel caso dei soggetti sintomatici gli eventi potranno contribuire al fattore YLD (casella in azzurro con tratteggio) o YLL (casella in rosso con bordo spesso).

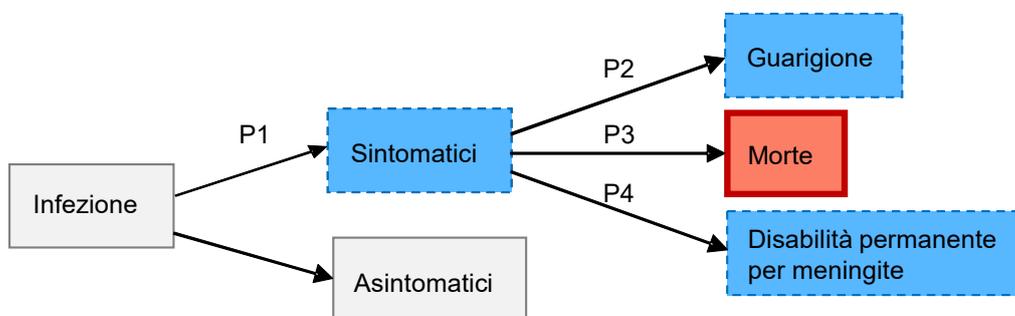


Figura 4. Modello di malattia schematizzato della listeriosi perinatale

Tutti i casi proposti hanno comportato un *health outcome tree* abbastanza semplice, ma questi schemi diventano molto più complessi se si considerano diversi *endpoint* e diverse vie di esposizione.

Nella fase finale del corso è stato anche trattato l'argomento delle sostituzioni, che si rivela essere molto complesso e ancora oggi poco esplorato e raramente incluso nell'analisi RB. In generale, una analisi RB compara gli effetti sulla salute di scenari di assunzione alimentare differenti considerando specifiche modifiche nelle quantità e nelle tipologie degli alimenti consumati. *A latere* queste modifiche, però, possono comportare, come conseguenza, una variazione nell'assunzione di altri alimenti a causa della necessità di compensare la parte della dieta modificata (eliminazione o aggiunta di alcune tipologie alimentari). Il livello di complessità dovuto a questo ulteriore aspetto ha spesso portato a trascurare l'effetto delle sostituzioni nelle valutazioni perché l'inclusione avrebbe implicato una estensione e complicazione della lista di rischi e benefici da inserire nella valutazione. Ad esempio, spesso sono stati condotti RBA collegati all'aumento del consumo di pesce ma non altrettanto spesso è stata inclusa nella valutazione la conseguente diminuzione dell'assunzione di altri alimenti e il relativo effetto sulla salute (17).

È stato infine sottolineato come la differente terminologia usata nell'ambito dell'analisi RB possa generare confusione. In particolare, esiste un diverso uso di termini tra i valutatori dei Paesi del Nord Europa e le indicazioni date dall'EFSA (18) ed è stato evidenziato come parte del lavoro che la comunità tecnico/scientifica sta svolgendo sia proprio nel superamento di queste discrepanze.

## Conclusioni

Molte delle sfide individuate nei progetti RBA europei (15) rimangono ancora aperte e includono lacune nei dati e nelle conoscenze; limitazioni metodologiche; difficoltà nell'aggregare/confrontare rischi e benefici e nel combinare dati umani con dati estrapolati da studi su animali; mancanza di armonizzazione dei concetti; complessità nella comunicazione dei risultati di un RBA. Inoltre, tutti i progetti e gli studi condotti sottolineano la necessità di valutazioni più ampie e complesse che inglobino, oltre agli effetti sulla salute pubblica, ulteriori aspetti come, ad esempio, l'impatto sulla società e la sostenibilità ambientale ed economica.

In conclusione, il corso ha evidenziato che nell'RBA si deve applicare un approccio che integri le conoscenze scientifiche su alimentazione, tossicologia, chimica e microbiologia con l'epidemiologia umana. L'ampia applicabilità delle valutazioni del rapporto rischio-beneficio, inoltre, consente di studiare non solo l'impatto sulla salute di un singolo alimento ma addirittura di diversi tipi di dieta. Il corso ha anche rimarcato la necessità di un rapporto continuo e trasparente tra i valutatori, i gestori e i comunicatori dell'RB. È, infatti, importante che le richieste alle quali i valutatori sono chiamati a rispondere siano chiare ed esaustive ma c'è anche la necessità che le conclusioni quantitative siano tradotte in modo che la comunicazione risulti trasparente e comprensibile ai diversi livelli, incluso il consumatore.

## Bibliografia

1. Nauta MJ, Andersen R, Pilegaard K, Pires SM, Ravn-Haren G, Tetens I, Poulsen M. Meeting the challenges in the development of risk-benefit assessment of foods. *Trends in Food Sci Tech* 2018;76:90-100.
2. Pires SM, Boué G, Boobis A, Hanna Eneroth, Hoekstra J, Membré JM, Persson IM, Poulsen M, Ruzante J, van Klaveren J, Thomsen ST, Nauta MJ. Risk Benefit Assessment of foods: Key findings from an international workshop. *Food Res Int* 2019;116:859-69.
3. WHO. *IPCS risk assessment terminology*. Geneva, Switzerland: WHO Document Production Services; 2004. Harmonization project. Document n. 1. Disponibile all'indirizzo: <https://www.who.int/ipcs/publications/methods/harmonization/en/>
4. Renwick AG, Flynn A, Fletcher RJ, Muller DJ, Tuijtelaars S, Verhagen H. Risk-benefit analysis of micronutrients. *Food Chem Toxicol* 2004;42(12):1903-22.
5. Cassini A, Hathaway S, Havelaar A, Koopmans M, Koutsoumanis K, Messens W, Muller-Seitz G, Nørrung B, Rizzi V and Scheutz F. Special issue: microbiological risk assessment. *EFSA Journal* 2016;14(S1):s0507:10.
6. EFSA (European Food Safety Authority). *Tolerable upper intake levels for minerals and vitamins. Scientific committee on food, Scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies*. Parma: European Food Safety Authority; 2006.
7. EFSA (European Food Safety Authority). Guidance on human health risk-benefit assessment of food. *EFSA Journal* 2010;8(7):1673-714.

8. EFSA (European Food Safety Authority). Scientific opinion on principles for deriving and applying dietary reference values. *EFSA Journal* 2010;8:1458-87.
9. Fransen H, de Jong N, Hendriksen M, Mengelers M, Castenmiller J, Hoekstra J, van Leeuwen R, Verhagen H. A tiered approach for risk-benefit assessment of foods. *Risk Anal* 2010;30:808-16.
10. Hoekstra J, Hart A, Boobis A, Claupein E, Cockburn A, Hunt A, Knudsen I, Richardson D, Schilter B, Schütte K, Torgerson PR, Verhagen H, Watzl B, Chiodini A. BRAFO tiered approach for Benefit-Risk Assessment of Foods. *Food Chem Toxicol* 2012;50:S684-S698.
11. Boobis A, Chiodini A, Hoekstra J, Lagiou P, Przyrembel H, Schlatter J, Watzl B. Critical appraisal of the assessment of benefits and risks for foods. "BRAFO Consensus Working Group". *Food Chem Toxicol* 2013;55:659-75.
12. Hart A, Hoekstra J, Owen H, Kennedy M, Zeilmaker MJ, de Jong N, Gunnlaugsdottir H. Qalibra: a general model for food risk-benefit assessment that quantifies variability and uncertainty. *Food Chem Toxicol* 2013;54:4-17.
13. Verhagen H, Tijhuis MJ, Gunnlaugsdóttir H, Kalogeras N, Leino O, Luteijn JM, Magnússon SH, Odekerken G, Pohjola MV, Tuomisto JT, Ueland Ø, White BC, Holm F. State of the art in benefit-risk analysis: Introduction. *Food Chem Toxicol* 2012;50:2-4.
14. Devleeschauwer B, Havelaar AH, de Noordhout CM, Haagsma JA, Praet N, Dorny P, Duchateau L, Torgerson PR, Van Oyen H, Speybroeck N. Calculating disability-adjusted life years to quantify burden of disease. *Int J Public Health* 2014;59:565-9.
15. Boué G, Guillou S, Antignac JP, Le Bizec B, Membré JM. Public health risk-benefit assessment associated with food consumption – a review. *European J Nutr Food Safety* 2015;5:32-58.
16. Zeilmaker MJ, Hoekstra J, van Eijkeren JCH, de Jong N, Hart A, Kennedy M, Owen H, Gunnlaugsdottir H. Fish consumption during child bearing age: A quantitative risk-benefit analysis on neurodevelopment. *Food Chem Toxicol* 2013;54:30-4.
17. Thomsen ST, Monterio Pires S, Devleeschauwer B, Poulsen M, Fagt S, Ygil KH, Andersen R. Investigating the risk-benefit balance of substituting red and processed meat with fish in Danish diet. *Food Chem Toxicol* 2018;120:50-63.
18. EFSA (2010c) Scientific Committee; Guidance on human health risk-benefit assessment of food. *EFSA Journal* 2010;8(7)1673-1714.

## EPATITE E NEL MONDO ANIMALE

Luca De Sabato, Ilaria Di Bartolo

*Dipartimento di Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria,*

*Istituto Superiore di Sanità, Roma*

### Introduzione

Il virus dell'Epatite E (*Hepatitis E Virus*, HEV) è un virus a trasmissione oro-fecale che causa nell'uomo un'epatite acuta. In Italia e in Europa, il genotipo 3 è il più comune nei casi di malattia nell'uomo e nei serbatoi animali (suino, cinghiale, cervo). La via alimentare è la principale via di trasmissione. Casi di Epatite E sono stati causati dal consumo di salsicce di fegato di suino o cinghiale, in cui era presente il virus, consumati crudi o poco cotti. L'attività svolta all'Istituto Superiore di Sanità (ISS) si è rivolta principalmente alla ricerca di HEV nel serbatoio animale e alla caratterizzazione molecolare dei ceppi circolanti per valutarne il potenziale zoonotico.

HEV-3 è stato identificato in tutti i punti della filiera di produzione del suino, dall'allevamento al punto vendita, con prevalenze elevate negli allevamenti anche in animali prossimi alla macellazione. I sieri e le feci prelevati da conigli da compagnia e da allevamento sono risultati negativi per la presenza di HEV ma positivi per anticorpi anti-HEV, confermando l'esposizione al virus.

Il virus circola anche nei selvatici. È stato identificato con prevalenze elevate in due popolazioni di cinghiali del centro e sud dell'Italia, evidenziando la circolazione di nuove varianti virali molto vicine a ceppi identificati nell'uomo. Inoltre, l'analisi degli anticorpi IgG anti-HEV ha evidenziato l'esposizione al virus in una popolazione di cervi da una zona dell'Italia centrale.

Per valutare la circolazione del genotipo zoonotico e di altri virus della famiglia *Hepeviridae*, il genoma del virus è stato ricercato anche nei topi e nei ratti. La ricerca del virus è stata effettuata nel contenuto intestinale e nel fegato di ratti e topi catturati all'interno di alcuni allevamenti suini. Un ratto è risultato positivo per un ceppo HEV-3 che era identico al ceppo circolante nei suini dello stesso allevamento. Inoltre, un secondo ratto era positivo per un ceppo di un'altra specie di HEV: HEV-C, il cui potenziale zoonotico non è ancora chiaro. I risultati ottenuti evidenziano il ruolo dei roditori di potenziali vettori per la diffusione del virus negli allevamenti suini.

### Virus dell'Epatite E

Il virus dell'HEV è un virus a RNA con un genoma a singolo filamento positivo lungo circa 7,2 kb. HEV appartiene alla famiglia *Hepeviridae*, nel genere *Orthohepevirus* che è suddiviso in 4 specie (*Orthohepevirus A-D*). Gli *Orthohepevirus A* sono classificati in 8 genotipi, i genotipi HEV-1 e HEV-2 infettano esclusivamente l'uomo, mentre HEV-3, HEV-4 e HEV-7 sono gli unici che presentano un potenziale zoonotico, infatti sono stati rilevati nell'uomo e nei suini, nei cinghiali, nei cervidi, mentre il genotipo HEV-7 è stato descritto nei dromedari. I genotipi HEV-5 e HEV-6 sono stati descritti esclusivamente nei cinghiali in Asia. Infine, il genotipo HEV-8, è stato rilevato nei cammelli in Asia (1).

HEV-1 e HEV-2 hanno un ciclo interumano, causano epidemie nei Paesi in via di sviluppo legate alle cattive condizioni sanitarie. In Europa e negli Stati Uniti il genotipo HEV-3 è il più

comune, mentre HEV-4 circola principalmente in Asia. Sia HEV-3 che HEV-4 sono zoonotici e i principali serbatoi sono suini, cinghiali e cervi. Ceppi vicini ma in un *lineage* separato dal genotipo HEV-3 sono stati rilevati nei conigli e nominati rHEV. Vari studi di infezioni sperimentali hanno dimostrato che ceppi di rHEV sono in grado di infettare suini e primati non umani, suggerendo così il potenziale rischio di trasmissione zoonotica. In Francia, tale rischio è stato confermato dall'infezione in un paziente affetto da epatite E con un ceppo rHEV.

Gli *Orthohepevirus C*, altra specie della famiglia *Hepeviridae*, sono suddivisi in HEV-C1 che infetta roditori ed eulipotifli (topo muschiato) e HEV-C2 che infetta il furetto e il visone. La trasmissione zoonotica dei ceppi appartenenti a questa specie è ancora dibattuta. Suini e scimmie non sono suscettibili all'infezione con ceppi di HEV-C1 di ratto come evidenziato da studi di infezioni sperimentali. Tuttavia, due studi hanno riportato la presenza di anticorpi diretti contro HEV-C1 nei lavoratori forestali in Germania e la presenza di IgG e IgM diretti contro HEV-C1 nei sieri di pazienti che presentavano un'epatite acuta, suggerendo che potessero essere stati infettati da ceppi di HEV-C1.

In Europa, il genotipo HEV-3 è quello più comune ed è considerato un patogeno emergente come confermato dal crescente numero di casi descritti negli ultimi 10 anni. In Europa la via di trasmissione più comune è quella alimentare.

Il serbatoio animale principale di HEV-3 è il suino e gli alimenti di origine suina in particolare quelli prodotti con il fegato sono considerati il principale veicolo di trasmissione dell'infezione all'uomo se consumati crudi o poco cotti.

Un altro importante serbatoio del virus sono alcuni selvatici, in particolare i cinghiali da cui si ipotizza possa aver avuto origine il virus poi trasmesso al suino.

In Europa, la sieroprevalenza registrata nella popolazione generale o nei donatori di sangue è molto variabile, compresa tra il 6,1% e il 52,5%, dato in parte giustificato da approcci metodologici diversi ma anche dall'esistenza di alcune zone iper-endemiche. Tali aree, descritte anche in Italia, come Abruzzo (22,8%) e Sardegna (19,9%) (2), sembrano associate alle abitudini alimentari del luogo come il consumo di salsicce di fegato di maiale fresche e/o di cinghiale.

A oggi, non esistono sistemi efficienti di crescita *in vitro* del virus la cui classificazione si basa sull'analisi delle sequenze genomiche. In base alla variabilità genetica riscontrata tra i ceppi di HEV i genotipi sono stati ulteriormente distinti in sottotipi o varianti genetiche. I ceppi HEV-3 sono classificati in 12 sottotipi (da HEV-3a - HEV-3l), circolanti diversamente nelle varie aree geografiche. HEV-3c, HEV-3e e HEV-3f sono i più comuni in Europa. HEV-3a è comune in USA. Tuttavia, con l'aumento delle sequenze prodotte, stanno aumentando il numero di sottotipi che, non essendo ancora disponibile un sistema di classificazione univoco, restano a oggi non classificati ma confermano la variabilità genetica di HEV (1).

## HEV nella filiera del suino

Nel corso degli ultimi 10 anni sono stati condotti diversi studi di sorveglianza lungo la filiera di produzione del suino, con l'obiettivo di valutare la circolazione di HEV e comprendere il rischio che alimenti infetti possano arrivare al consumatore. La ricerca del virus è stata condotta mediante tecniche molecolari volte ad amplificare porzioni del genoma virale (*RiboNucleic Acid*, RNA, *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR e/o *Real-Time RT-PCR*).

Nel biennio 2012-2014, 242 campioni fecali sono stati raccolti da suini in diverse fasi di produzione (dai 5 ai 220 giorni) in otto allevamenti localizzati in tutta Italia. HEV è stato rilevato in 6 allevamenti e in 45 (18,6%) dei 242 campioni analizzati (3). Un secondo studio è stato svolto su 274 suini selezionati da 6 diverse aziende suinicole del Nord Italia, testando la presenza dell'RNA virale nelle feci. Il genoma di HEV è stato rilevato in 115 feci (42%). Tutte le aziende

sono risultate positive per HEV, con una prevalenza compresa tra il 12,8% e il 72,5%. I suini positivi per HEV sono stati rilevati in tutte le fasce d'età e le fasi di produzione (riproduttori e ingrasso), sebbene l'infezione fosse più diffusa nei soggetti svezzati che nei suini da ingrasso più anziani (42,2% contro 27,0%). Le sequenze nucleotidiche ottenute dei ceppi appartenevano al genotipo zoonotico HEV-3 (4).

La ricerca degli anticorpi diretti contro HEV è stata condotta in 48 suini di 8 mesi di età, in un macello del Nord Italia, tramite un test ELISA. La sieroprevalenza media nel gruppo di animali è risultata dell'87,0%. Dagli stessi animali sono stati inoltre raccolti campioni di bile, fegato e feci e l'RNA di HEV è stato rilevato tramite RT-PCR. La bile è la matrice con una più frequente positività (51,1%), seguita da feci (33,3%) e fegato (20,8%). Trentuno dei 48 suini (64,6%) erano positivi per l'RNA di HEV in almeno una delle matrici analizzate. La prevalenza più elevata è stata riscontrata negli animali di 3-4 mesi rispetto agli animali più adulti di 9-10 mesi (95,0% contro 42,9%). I ceppi identificati sono stati classificati nel genotipo zoonotico HEV-3 (5).

Infine, la presenza di HEV è stata valutata nelle salsicce di fegato di maiale vendute in un negozio al dettaglio a Roma. Complessivamente, il virus è stato rilevato nelle salsicce di fegato crude (10 su 45 fette, 250 mg ciascuna, 22,2%) e secche (1 su 23 fette, 4,3%). Le sequenze ottenute hanno confermato la presenza di porzioni di genoma del genotipo zoonotico HEV-3 tuttavia il ritrovamento dell'RNA virale non necessariamente corrisponde al virus vivo (6).

Questi studi hanno dimostrato che HEV-3 è presente in tutti i punti della filiera, con prevalenze elevate negli animali all'allevamento, più basse al macello ed è presente anche nei prodotti alimentari in vendita. Inoltre, i ceppi sequenziati presentavano correlazioni evolutive con ceppi virali circolanti sia nell'uomo che negli animali, confermando il ruolo del suino quale serbatoio di ceppi zoonotici.

## HEV nei cinghiali

Durante la stagione venatoria 2016-2017, sono stati raccolti 92 fegati da altrettanti cinghiali (*Sus scrofa*) abbattuti in cinque comuni dell'Italia centrale (7). L'RNA di HEV è stato rilevato nel 52,2% dei campioni di fegato campionati con una prevalenza compresa nelle 5 aree tra lo 0% e 65,7%. I cinghiali positivi per HEV sono stati rilevati in tutte le aree di caccia tranne una. L'analisi filogenetica condotta sulle sequenze ha mostrato che i ceppi circolanti appartenevano al genotipo HEV-3 e ha permesso la loro classificazione nei sottotipi HEV-3c e HEV-3f. Gli animali cacciati dalla stessa squadra, lo stesso giorno e quindi presumibilmente erano appartenenti allo stesso gruppo familiare erano positivi per ceppi virali identici (identità nucleotidica pari al 100%). Il fegato è l'organo principale di replicazione del virus, quindi è l'organo preferito per la ricerca del virus. Tuttavia, l'infezione è caratterizzata da una fase viremica che potrebbe determinare la presenza del virus nel circolo sanguigno e quindi nel muscolo. Mentre la viremia è di breve durata nel suino, appare prolungata nel cinghiale. Per dimostrare l'eventuale presenza del virus nei muscoli di cinghiali, è stato eseguito uno studio di monitoraggio in due aree geografiche in cui già erano stati ritrovati animali positivi per il virus.

Il genoma del virus è stato ricercato in campioni di fegato e muscoli raccolti da 196 cinghiali (*Sus scrofa*). Venti animali (10,2%) erano positivi nei fegati, 11 dei quali erano anche positivi nei muscoli (8).

L'analisi filogenetica dei ceppi ha confermato il rilevamento del genotipo HEV-3 e i ceppi classificati nei diversi sottotipi di HEV-3: 3c, 3f, 3i. HEV è stato identificato nelle due popolazioni di cinghiali evidenziando la circolazione di nuove varianti virali molto vicine a ceppi identificati nell'uomo. La presenza del virus nel muscolo è probabilmente dovuta alla viremia, tuttavia non essendo il sangue disponibile non è stata valutata la presenza del virus. Inoltre, la presenza del

virus suggerisce un possibile rischio di infezione dovuto al consumo di carne contaminata consumata poco cotta.

Il cinghiale rappresenta un serbatoio importante del virus con un potenziale rischio per l'uomo, soprattutto nelle zone in cui si consumano prodotti a base di carne di cinghiale, inoltre, vista la vicinanza con ceppi rilevato nei suini non è da escludere un eventuale passaggio del virus in caso di contatto tra le due specie animali.

## HEV nei cervi

In questo studio, è stata valutata la circolazione di HEV in una popolazione di cervi (*Cervus elaphus*) dell'Italia centrale ricercando anticorpi specifici diretti contro il virus e il genoma dell'RNA nei sieri (9). Un totale di 35 su 251 sieri di cervo sono risultati positivi per le IgG anti-HEV. L'RNA di HEV è stato rilevato in 10 dei 91 sieri esaminati. Il sequenziamento della regione capsidica del genoma virale ha confermato la presenza del genotipo HEV-3. I risultati hanno confermato quindi la circolazione del virus nella popolazione di cervi in Italia anche con viremia confermandone il ruolo di serbatoio del virus zoonotico.

## HEV in conigli d'allevamento

La recente identificazione in pazienti affetti da epatite E di ceppi di rHEV, identificati nei conigli, ha evidenziato il ruolo di questa specie come possibile serbatoio del virus. Nel periodo 2013-2014, con l'obiettivo di valutare la circolazione del virus nei conigli di allevamento e d'affezione, è stato condotto uno studio sierologico per la ricerca di anticorpi anti-HEV (10). La sieroprevalenza era del 3,40% in 206 conigli di allevamento (raccolti in 7 allevamenti) e del 6,56% in 122 animali domestici. I sieri positivi per le IgG sono risultati negativi alla presenza dell'RNA virale. Solo un campione di siero di un coniglio di allevamento è risultato positivo per le IgM, ma negativo per l'RNA virale. Dagli stessi animali sono state prelevate anche le feci anch'esse negative per la presenza dell'RNA virale. I risultati hanno confermato la circolazione di HEV nelle popolazioni di conigli, in misura ridotta rispetto ai suini.

## HEV nei topi e nei ratti

Topi e ratti sono anch'essi serbatoi del virus HEV ma il ruolo zoonotico è ancora dibattuto appartenendo a una specie diversa. Tuttavia, topi e ratti sono molto comuni negli allevamenti di suini in cui entrano in contatto con le feci spesso positive per HEV-3. Per tale ragione si è valutata la presenza di HEV nel contenuto intestinale e in campioni di fegato prelevati da 47 ratti (*Rattus rattus*) e 21 topi domestici (*Mus musculus*) catturati all'interno di quattro allevamenti di suini nel Nord Italia in tre dei quali erano stati precedentemente rilevati suini positivi per HEV-3 (11). Per questo, è stata valutata la presenza nei ratti e topi sia dei genotipi zoonotici HEV-3 e HEV4 che di HEV-C.

Il contenuto intestinale di due ratti è risultato positivo per l'RNA di HEV-C1 e per l'RNA HEV-3. I due ratti provenivano da due diversi allevamenti di suini positivi per HEV-3. Le analisi delle sequenze hanno confermato la presenza di un ceppo di HEV-C1 e di un ceppo sottotipo HEV-3e. Il ceppo virale HEV-3e rilevato nel ratto era identico ai ceppi HEV rilevati nei suini dello

stesso allevamento suggerendo l'ingestione di feci di suino ed escludendo replicazione attiva del virus nel ratto, essendo risultati negativi i fegati. Nessun topo è risultato essere positivo.

## Conclusioni

Nell'ultimo decennio il numero delle infezioni nell'uomo dovute al genotipo HEV-3 sono aumentate in tutta Europa e sono principalmente causate dal consumo di alimenti (crudi o poco cotti) di origine animale (suino, cinghiale e cervo) positivi al virus. Di recente con l'avvento di tecniche molecolari sempre più sensibili, si sono scoperti molti serbatoi animali del virus e il numero di nuove varianti virali è molto aumentato, confermando un'ampia eterogeneità dei virus della famiglia *Hepeviridae*. Alla luce della potenziale natura zoonotica di alcune specie di HEV, il ruolo dei nuovi serbatoi animali come fonte di infezione per l'uomo deve essere studiato in modo approfondito. Tali studi dovranno essere condotti *in vitro*, migliorando i sistemi di crescita del virus sulle cellule che sono ancora poco efficaci, ma anche attraverso il sequenziamento del genoma virale. Lo studio dell'evoluzione del virus e dei potenziali siti di legame alla cellula ospite aiuteranno a capire come il virus circoli nella popolazione animale e a identificare sottotipi o varianti virali che possono infettare l'uomo.

## Bibliografia

1. EFSA BIONe HealthAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), Ricci A, Allende A, Bolton D, Chemaly M, Davies R, Fernandez Escamez PS, Herman L, Koutsoumanis K, Lindqvist R, Nørrung B, Robertson L, Ru G, Sanaa M, Simmon s M, Skandamis P, Snary E, Speybroeck N, Ter Kuile B, Threlfall J, Wahlstrom H, Di Bartolo I, Johne R, Pavio N, Rutjes S, van der Poel W, Vasickova P, Hempen M, Messens W, Rizzi V, Latronico F and Girones R, 2017. Scientific Opinion on the public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a food-borne pathogen. *EFSA Journal* 2017;15(7):4886-89.
2. Spada E, Pupella S, Pisani G, Bruni R, Chionne P, Madonna E, Villano U, Simeoni M, Fabi S, Marano G, Marcantonio C, Pezzotti P, Ciccaglione AR, Liunbruno GM. A nationwide retrospective study on prevalence of hepatitis E virus infection in Italian blood donors. *Blood Transfus* 2018;16(5):413-21.
3. Monini M, Di Bartolo I, Ianiro G, Angeloni G, Magistrali CF, Ostanello F, Ruggeri FM. Detection and molecular characterization of zoonotic viruses in swine fecal samples in Italian pig herds. *Arch Virol* 2015;160(10):2547-56.
4. Di Bartolo I, Martelli F, Inglese N, Pourshaban M, Caprioli A, Ostanello F, Ruggeri FM. Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy. *Vet Microbiol* 2008;132(1-2):47-55.
5. Di Bartolo I, Ponterio E, Castellini L, Ostanello F, Ruggeri FM. Viral and antibody HEV prevalence in swine at slaughterhouse in Italy. *Vet Microbiol* 2011;149(3-4):330-8.
6. Di Bartolo I, Angeloni G, Ponterio E, Ostanello F, Ruggeri FM. Detection of hepatitis E virus in pork liver sausages. *Int J Food Microbiol* 2015;(16)193:29-33.
7. De Sabato L, Ostanello F, De Grossi L, Marcario A, Franzetti B, Monini M, Di Bartolo I. Molecular survey of HEV infection in wild boar population in Italy. *Transbound Emerg Dis* 2018;65(6):1749-56.
8. De Sabato L, Amoroso MG, Ianiro G, Esposito C De Grossi L, Fusco G, Barone A, Martini E, Ostanello F, Di Bartolo I. (2020). Detection of hepatitis E virus in livers and muscle tissues of wild boars in Italy. *Food and Environmental Virology* 2020;12(1):1-8.

9. Di Bartolo I, Ponterio E, Angeloni G, Morandi F, Ostanello F, Nicoloso S, Ruggeri FM. Presence of hepatitis E virus in a RED Deer (*Cervus elaphus*) population in Central Italy. *Transbound Emerg Dis* 2017 Feb;64(1):137-43.
10. Di Bartolo I, De Sabato L, Marata A, Martinelli N, Magistrali CF, Monini M, Ponterio E, Ostanello F, Ruggeri FM. Serological survey of hepatitis E virus infection in farmed and pet rabbits in Italy. *Arch Virol* 2016;161(5):1343-6.
11. De Sabato L, Ianiro G, Monini M, De Lucia A, Ostanello F, Di Bartolo I. Detection of hepatitis E virus RNA in rats caught in pig farms from Northern Italy. *Zoonoses Public Health* 2020;67(1):62-69.

# ROTAVIRUS DALL'ANIMALE ALL'UOMO

Giovanni Ianiro

*Dipartimento di Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria,*

*Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Introduzione

I rotavirus sono i principali agenti eziologici virali di gastroenterite acuta (*Acute GastroEnteritis*, AGE) nell'uomo e negli animali. Ogni anno l'infezione da rotavirus causa nei pazienti di età compresa tra 0 e 5 anni circa 200.000 morti, soprattutto nei Paesi in via di sviluppo dell'Africa sub-sahariana e del sud est asiatico. I rotavirus sono suddivisi in 9 gruppi antigenici (A-H) e quelli appartenenti al gruppo A (*group A Rotavirus*, RVA) sono i maggiori responsabili di casi sporadici ed epidemie di AGE in tutto il mondo sia nell'uomo che nell'animale, essendo in grado di infettare diverse specie.

La natura segmentata del genoma di RVA consente ai virus di andare incontro a fenomeni di riassortimento genico quando due o più varianti virali coinfettano lo stesso ospite. Questi eventi permettono di generare nuove varianti virali spesso in grado di effettuare il salto di specie, dall'animale all'uomo e viceversa.

La tematica trattata in questo seminario riguarda esattamente la natura ubiquitaria degli RVA nell'uomo e nell'animale, ma anche nell'ambiente e nelle acque, con particolare attenzione alla possibilità di trasmissione inter-specie di nuove varianti virali. Nel seminario verranno presentati i dati di circolazione del virus nella popolazione pediatrica italiana e nei serbatoi animali a contatto con l'uomo, dagli uccelli ai suini.

## Classificazione dei Rotavirus A

I rotavirus di gruppo A (RVA) appartengono alla famiglia *Reoviridae*, sono virus caratterizzati da 3 capsidi concentrici e sono privi di *envelope*. Il capsido più interno racchiude un genoma composto da 11 segmenti di RNA (*RiboNucleic Acid*) a doppio filamento (*double-stranded RNA*, dsRNA), che codificano per 6 proteine strutturali (*Viral Protein*, VP) e 5 o 6 proteine non-strutturali (*nonstructural protein*, NSP). Le proteine strutturali VP7 e VP4 costituiscono gli antigeni di rotavirus riconosciuti da anticorpi neutralizzanti codificando, rispettivamente, per la proteina del capsido esterno e per la *spike* virale necessaria per l'interazione con i recettori che mediano l'ingresso del virus nella cellula. Le sequenze nucleotidiche dei geni 9 (VP7) e 4 (VP4) sono alla base della classificazione dei RVA in genotipi, definendo G-tipi (VP7) e P-tipi (VP4), posti in combinazione in una classificazione binomiale G/P (1,2).

I genotipi che causano oltre il 95% delle infezioni umane a livello mondiale sono 6: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] e G12P[8]. Il restante 5% delle infezioni è causato da varianti virali definite non-comuni o rare (3).

## Riassortimento genico

L'insorgenza di una variante non-comune, spesso caratterizzata da una combinazione G/P insolita, è dovuta all'intrinseca capacità di riassortimento genico di questi virus dovuta dalla natura segmentata del loro genoma. Infatti, quando due o più genotipi di RVA co-infettano la stessa cellula ospite, la generazione della risultante progenie virale può avvenire in maniera mista grazie alla segregazione casuale e indipendente dei segmenti genomici (riassortimento) durante le fasi finali di assemblaggio dei nuovi virioni (2, 4).

Questo meccanismo evolutivo può coinvolgere anche varianti virali animali, creando degli ibridi uomo/animale, che possono ugualmente generare due scenari: un'infezione "dead-end" dovuta al non adattamento alla nuova specie ospite; la generazione di una nuova variante epidemica che bene si adatta alla nuova specie ospite. Nel caso dell'uomo, due dei genotipi maggiormente circolanti (G9P[8] e G12P[8]) sono derivati dall'elevato adattamento all'ospite umano dei due G-tipi suini G9 e G12 in combinazione con un genoma tipicamente umano, ricalcando perfettamente il secondo scenario descritto in precedenza (5, 6).

## Vaccinazione

L'elevato tasso di mortalità nella popolazione pediatrica correlato all'infezione da RVA è dovuto a una gastroenterite acuta disidratante che difficilmente risulta auto-remissiva, richiedendo ospedalizzazione e terapie reidratanti. La via di trasmissione del virus è quella oro-fecale e le morti causate dall'infezione da RVA si concentrano maggiormente in Paesi in via di sviluppo dell'Africa sub-sahariana e nel Sud-Est asiatico, i cui sistemi sanitari risultano spesso fragili a livello di infrastrutture e di disponibilità di materiali idonei alle cure. Altri fattori che giocano un ruolo centrale nell'incremento della mortalità in questi Paesi sono la mancanza di riserve idriche potabili, lo stato di malnutrizione dei pazienti pediatrici e le condizioni igieniche estremamente precarie degli ambienti di vita quotidiana (7).

Tutti questi fattori hanno portato all'implementazione di due vaccini costituiti da varianti virali vive attenuate e alla conseguente campagna vaccinale globale, con particolare attenzione ai Paesi in via di sviluppo.

I due vaccini licenziati nel 2006 e disponibili in commercio sono il Rotarix (GlaxoSmithKlein), vaccino monovalente costituito da una variante RVA umana viva attenuata di genotipo G1P[8] che rappresenta il genotipo maggiormente circolante nella popolazione umana a livello mondiale, e il RotaTeq (Merck), vaccino pentavalente costituito da 4 varianti RVA vive attenuate generate dal riassortimento *in vitro* di ceppi virali umani e bovini, risultando nella presenza di specificità antigeniche per i genotipi G1, G2, G3, G4 e P[8]. Entrambi i vaccini sono risultati estremamente efficaci garantendo un elevato grado di protezione (riduzione delle infezioni di oltre il 95% nei Paesi con copertura vaccinale superiore al 60%) sia a livello omotipico che eterotipico, grazie all'altrettanto elevato grado di cross-reazione sierotipica dei diversi genotipi di RVA circolanti nella popolazione umana.

La vaccinazione ha ridotto la mortalità annua nella popolazione pediatrica mondiale da circa 750,000 pazienti nel 2006 a circa 200,000 nel 2019 (7).

## Sorveglianza delle gastroenteriti da RVA in Italia

Dal 2007 è attiva in Italia la sorveglianza delle gastroenteriti acute da rotavirus (RotaNet-Italia) come parte di un contesto più ampio, a livello europeo, del progetto di sorveglianza EuroRotaNet, gestito dall'Università di Liverpool. L'Istituto Superiore di Sanità (ISS) svolge il ruolo di istituto centrale sul territorio nazionale e raccoglie campioni fecali dai reparti di pediatria e/o microbiologia da 13 laboratori periferici regionali. I campioni vengono testati tramite test immunoenzimatici commerciali dai laboratori periferici e, una volta confermati come positivi, vengono schedati e inviati presso l'Unità di Virologia, reparto Zoonosi Emergenti, del Dipartimento di Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria dell'ISS per le ulteriori analisi di genotipizzazione. La genotipizzazione consiste nella definizione dei genotipi G e P, i quali vengono successivamente inviati all'Università di Liverpool come parte del dato europeo totale. La sorveglianza dei genotipi viene effettuata per il continuo monitoraggio dei genotipi circolanti in Europa al fine di valutare l'emergenza di nuove varianti virali potenzialmente epidemiche. Inoltre, dopo l'introduzione della vaccinazione in diversi Paesi europei, la sorveglianza aiuta a valutare l'efficacia del vaccino con la relativa riduzione dei casi, nonché la possibile circolazione di varianti virali vaccino-derivate.

In Italia, la vaccinazione anti-RVA è stata introdotta nella scheda vaccinale pediatrica come vaccinazione raccomandata e non obbligatoria a partire dal 1° gennaio 2017. A oggi, dai dati delle coperture vaccinali disponibile sul sito del Ministero della Salute, si può osservare come la copertura sia ancora bassa (16,5%), con fluttuazioni osservabili dai dati riportati dalle singole regioni italiane.

I dati di sorveglianza delle gastroenteriti da RVA in Italia presentati nel seminario dipartimentale si riferiscono alla circolazione dei genotipi di RVA nell'era pre-vaccinale, durante il periodo che va dal 1° settembre 2014 al 31 agosto 2017, rappresentativo di 3 stagioni di sorveglianza (8).

Durante il periodo oggetto di studio, sono stati genotipizzati 2202 campioni fecali positivi per RVA. È stata evidenziata la circolazione dei 6 genotipi umani descritti in precedenza, con *cluster* di prevalenza differenti a seconda del territorio regionale di provenienza del campione. Nelle regioni del Nord Italia si è registrata una elevata circolazione dei genotipi G1P[8] e G9P[8], al Centro Italia ha prevalso il genotipo emergente G12P[8], mentre nelle regioni del Sud Italia è stato riscontrato prevalentemente il genotipo G2P[4]. Il dato globale nazionale risultante dai 3 anni di indagine ha visto prevalere il genotipo G12P[8] (24,7%), seguito dal G9P[8] (24,3%) e dal G1P[8] (20,8%).

L'analisi statistica dei *trend* associati alla circolazione dei diversi genotipi durante le 3 stagioni di sorveglianza ha evidenziato come nella stagione 2014/15 i genotipi G1P[8] e G4P[8] fossero prevalenti per poi avere un *trend* discendente, fino alla scarsa rilevazione di entrambi nella stagione 2016/17. *Trend* opposti sono stati osservati per i genotipi G12P[8] e G3P[8], con un cambio dell'epidemiologia molecolare di questi virus a cavallo delle 3 stagioni oggetto dello studio.

L'infezione è avvenuta principalmente in pazienti di età compresa tra 0 e 5 anni, interessando tutti i genotipi rilevati. Dall'analisi statistica si è osservato come i pazienti affetti dal genotipo G12P[8] presentassero un'età significativamente maggiore (10 mesi;  $p=0,045$ ) rispetto ai pazienti affetti da tutti gli altri genotipi. Inoltre, il 5% delle infezioni ha riguardato pazienti adulti, mentre un altro 5% delle infezioni è stato registrato come nosocomiale.

## Evidenze di zoonosi

Le combinazioni genotipiche di RVA dimostrano una stretta specie-specificità che ha permesso di delineare una definita epidemiologia molecolare di questi virus nelle diverse specie. Ciononostante, i rotavirus sono in grado di effettuare il salto di specie risultando in 3 possibili scenari differenti: 1) infezione asintomatica con scarso rilascio di virus nelle feci; 2) infezione sintomatica ma scarso adattamento alla specie umana con conseguente bassa contagiosità; 3) infezione sintomatica accompagnata da elevato adattamento, spesso a seguito di eventi di riassortimento genico, con conseguente diffusione epidemica. Il terzo scenario, si può verificare quando le varianti coinvolte nel riassortimento sono caratterizzate da genotipi che possono essere “condivisi” a livello epidemiologico tra uomo e animale.

La specie che condivide con l'uomo il maggior numero di genotipi di RVA è quella suina. In particolare, le 6 varianti G1, G2, G3, G4, G9 e G12 umane sono tutte condivise con il suino, seppur in combinazione con P-tipi differenti. Una situazione simile, ma meno accentuata esiste per i bovini. A livello di genotipi, il genotipo G3 rappresenta un genotipo ubiquitario, in grado di infettare un numero molto elevato di specie, inclusi uomo, suini, bovini, equini, ovi-caprini, roditori, primati, cani, gatti e conigli. Ugualmente, tra i genotipi VP4, il P-tipo 6 (P[6]) è molto diffuso tra i ceppi di RVA animali ed è contemporaneamente molto diffuso nella popolazione umana in Africa (9).

Come precedentemente accennato, i G-tipi G9 e G12, caratteristici dei rotavirus suini e scarsamente circolanti nell'uomo fino alla fine degli anni '90, dopo eventi di riassortimento, si sono adattati alla specie umana, diventando prevalenti in diverse aree del mondo, Italia inclusa.

Oltre alla conferma dell'ampia circolazione nell'uomo dei genotipi G9P[8] e G12P[8], la sorveglianza delle gastroenteriti da RVA ha permesso di rilevare anche diversi casi sporadici di infezione sintomatica in pazienti pediatriche con ceppi non-comuni che presentavano forti evidenze di trasmissione zoonotica. Questi casi sporadici hanno avuto in comune la caratteristica di non essere riassortanti con varianti umane e, per questo, scarsamente adattate alla diffusione nella popolazione umana.

Queste evidenze sono state confermate dopo l'analisi di campioni fecali animali, per i quali non esiste in Italia una vera e propria sorveglianza, ma che rappresenta una delle attività centrali dell'Unità di Virologia del Dipartimento di Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinariaS.

L'analisi di campioni fecali suini ha mostrato una larga circolazione nel maiale dei genotipi G4 e G9, largamente circolanti nell'uomo in Italia.

Analogamente, l'analisi di feci bovine ha evidenziato la circolazione in Nord Italia dei G-tipi G6, G8 e G10 in combinazione con P-tipi tipicamente bovini (P[5] e P[11]), mentre nell'uomo sono stati rilevati gli stessi G-tipi non-comuni associati con P-tipi tipicamente umani (P[4] e P[8]), presumibilmente a seguito di eventi di riassortimento genico.

Per quanto riguarda le specie aviarie, c'è una scarsa condivisione dei genotipi e non sono stati rilevati nell'uomo ceppi di RVA derivanti dai volatili. In uno studio del 2015, la circolazione di RVA nei pulcini è stata rilevata nei pulcini d'allevamento con percentuali molto elevate (59,9%) (10). Nessuna rilevazione ha dato successo nella fauna aviaria selvatica.

La caratterizzazione molecolare di tutto il genoma di ceppi di RVA, sia nell'uomo che nell'animale, ha permesso di evidenziare in alcuni casi la presenza di varianti virali estremamente variegata, possibilmente derivate da eventi di riassortimento multiplo dopo infezione di ospiti differenti. Un esempio di questo tipo di evento nell'uomo è stato riscontrato in due pazienti pediatriche sintomatiche che presentavano nelle loro feci un virus di genotipo G8 di derivazione bovina, associato a un intero genoma di RVA tipico dei conigli. Analogamente, l'analisi di feci di ratto ha permesso di evidenziare la presenza di un ceppo di RVA con una combinazione

genomica molto complessa che includeva un gene di chiara derivazione umana associata a un genoma che conteneva varianti genotipiche nuove e mai osservate in precedenza in nessun ospite animale (11).

Anche l'analisi ambientale dei reflui fognari di diverse città italiane ha evidenziato la presenza di RVA e i genotipi rilevati sono sia quelli tipicamente umani che, più scarsamente, alcuni genotipi animali rari (G26 e P[19]). La presenza di RVA è stata rilevata in reflui fognari sia pre- che post-trattamento chimico/fisico delle acque evidenziando una elevata resistenza ambientale di questi patogeni (12).

In conclusione, i rotavirus di gruppo A sono patogeni ubiquitari con una intrinseca capacità di passaggio e adattamento attraverso le diverse specie, uomo incluso. Il serbatoio animale, soprattutto in ambito domestico, gioca un ruolo fondamentale nella possibilità di diffusione epidemica di nuove varianti virali nella popolazione pediatrica umana. Il monitoraggio contemporaneo dei genotipi di RVA circolanti nell'uomo e negli animali rappresenta uno strumento efficace per la predizione e il controllo di eventi di riassortimento e salto di specie.

## Bibliografia

1. Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* 1989;53:410-49.
2. Desselberger U. Rotaviruses. *Virus Res* 2014;190:75-96.
3. Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol* 2005;15(1):29-56.
4. Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B, Griffin DD, Banyai K, Ramachandran M, et al. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis* 2005;192(1):S146-59.
5. Ianiro G, Heylen E, Delogu R, Zeller M, Matthijssens J, Ruggeri FM, et al. Genetic diversity of G9P[8] rotavirus strains circulating in Italy in 2007 and 2010 as determined by whole genome sequencing. *Infect Genet Evol* 2013;16:426-32.
6. Delogu R, Ianiro G, Camilloni B, Fiore L, Ruggeri FM. Unexpected spreading of G12P[8] rotavirus strains among young children in a small area of central Italy. *J Med Virol* 2015;87(8):1292-302.
7. Burnett E, Parashar UD, Tate JE. Global impact of rotavirus vaccination on diarrhea hospitalizations and deaths among children <5 years old: 2006-2019. *J Infect Dis* 2020.
8. Ianiro G, Micolano R, Di Bartolo I, Scavia G, Monini M, RotaNet-Italy study group. Group A rotavirus surveillance before vaccine introduction in Italy - September 2014 to August 2017. *Euro Surveill* 2019;24(15).
9. Martella V, Banyai K, Matthijssens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol* 2010;27;140(3-4):246-55
10. Falcone E, Busi C, Lavazza A, Monini M, Bertoletti M, Canelli E, et al. Molecular characterization of avian rotaviruses circulating in Italian poultry flocks. *Avian Pathol* 2015;44(6):509-15.
11. Ianiro G, Di Bartolo I, De Sabato L, Pampiglione G, Ruggeri FM, Ostanello F. Detection of uncommon G3P[3] rotavirus A (RVA) strain in rat possessing a human RVA-like VP6 and a novel NSP2 genotype. *Infect Genet Evol* 2017;53:206-11.
12. Ruggeri FM, Bonomo P, Ianiro G, Battistone A, Delogu R, Germinario C, et al. Rotavirus genotypes in sewage treatment plants and in children hospitalized with acute diarrhea in Italy in 2010 and 2011. *Appl Environ Microbiol* 2015;81(1):241-9.

# SVILUPPO DI UN SAGGIO MOLECOLARE A SUPPORTO DELLA SORVEGLIANZA NAZIONALE DELLA SHIGELLOSI IN BELGIO NEL 2018

Eleonora Ventola

Dipartimento di Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma

## Introduzione

*Shigella*, batterio gram-negativo ed enteropatogeno intra-cellulare, è l'agente eziologico della dissenteria bacillare o shigellosi nell'uomo. Ogni anno l'infezione da *Shigella* causa la morte di circa 165000 pazienti in tutto il mondo, di cui un terzo bambini con età inferiore ai 5 anni (1).

La modalità di trasmissione principale è da persona a persona per via oro-fecale. Il consumo di acqua e gli alimenti contaminati risultano essere modalità di trasmissione meno comuni. La bassa dose infettiva (10-100 CFU, *Colony Forming Units*) facilita la diffusione del patogeno. Il genere *Shigella* è suddiviso in quattro specie: *S. sonnei*, *S. boydii*, *S. dysenteriae* e *S. flexneri*, ciascuna con diversi sierotipi caratterizzati dalle variazioni dell'antigene somatico (O) del lipopolisaccaride, tranne la specie *S. sonnei*, di cui è noto un solo sierotipo (1).

Diversi studi filogenetici propongono di raggruppare le specie *Shigella* all'interno della specie *Escherichia coli* (*E. coli*). (2). In particolare, il patotipo *E. coli* entero-invasivo (*Enteroinvasive Escherichia coli*, EIEC) sembra essere stato identificato come l'antenato evolutivo diretto di *Shigella*, avendo acquisito un grande plasmide di tipo F (pINV) che codifica per l'equipaggiamento molecolare necessario per l'invasione, la sopravvivenza e la diffusione del batterio all'interno dell'ospite, condividendo quindi lo stesso meccanismo di patogenesi (3). Studi filogenetici suggeriscono che questa acquisizione è avvenuta più volte in eventi indipendenti (4) e ulteriori mutazioni pato-adattive hanno agito progressivamente per aumentare la potenziale virulenza di *Shigella* (5).

Il principale obiettivo del seminario, svolto presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS), ha riguardato la condivisione dell'esperienza di formazione presso l'Istituto di salute pubblica del Belgio "Sciensano" dove sono stati approfonditi alcuni aspetti dell'analisi molecolare di *Shigella*. In particolare, è stata presentata la messa a punto della piattaforma molecolare Luminex, per l'identificazione e geno-sierotipizzazione di *Shigella* e per la sua differenziazione dagli *E. coli*, al fine di superare i metodi di sierotipizzazione classica. Tale studio è stato effettuato nell'ambito della sorveglianza nazionale della shigellosi in Belgio.

## Patogenesi della shigellosi

Le attuali conoscenze sui meccanismi di patogenesi della shigellosi derivano da studi su *S. flexneri*. Dopo l'ingestione orale, il patogeno sopravvive all'ambiente acido dello stomaco e al microbiota intestinale competitivo per raggiungere l'ileo, il colon e il retto (1). *Shigella* utilizza una gamma di proteine effettrici per invadere (es. IpaA-D), replicarsi e diffondersi in tutto l'epitelio intestinale (es. VirG/IcsA). Questi effettori e il sistema di secrezione di tipo III,

attraverso il quale vengono iniettati nel citosol della cellula ospite, sono codificati da un plasmide di virulenza comune a tutte le specie di *Shigella* (1).

L'infezione ha inizio quando il batterio oltrepassa la barriera delle cellule epiteliali del lume intestinale per transitosi attraverso le cellule M, cellule epiteliali specializzate, e raggiunge la sub mucosa dove viene fagocitato dai macrofagi residenti. *Shigella* assicura la sua sopravvivenza nei macrofagi inducendone rapidamente la morte piroptotica (6), un tipo di morte cellulare programmata e coordinata dall'attivazione di caspasi, accompagnata da danno alla membrana, frammentazione del DNA e rilascio di citochine pro-infiammatorie come interleuchina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e IL-18.

Questa segnalazione pro-infiammatoria attiva ulteriormente la risposta immunitaria innata che coinvolge le cellule NK e attira i leucociti PoliMORFO nucleati (PMN), il cui afflusso distrugge la barriera epiteliale, aggravando l'infezione e facilitando l'invasione di piú batteri. I batteri liberi invadono le cellule epiteliali dal lato basolaterale, si spostano nel citoplasma mediante polimerizzazione di actina e si diffondono alle cellule adiacenti (7).

## Saggio molecolare Luminex

Le specie di *Shigella* ed EIEC, filogeneticamente correlate, sono responsabili di milioni di episodi di dissenteria in tutto il mondo. Tuttavia, molti laboratori clinici hanno difficoltà a differenziare gli *E. coli* non-EIEC, EIEC e *Shigella*, portando a imprecisioni nella sorveglianza nazionale di *Shigella* e all'aumento del numero di campioni erroneamente identificati come *E. coli*.

La sorveglianza nazionale della shigellosi in Belgio viene eseguita dal Centro di Riferimento Nazionale per la Shigellosi (*National Reference Center for Salmonella and Shigella* spp., NRCS), che riceve ogni anno circa 400 colture di *Shigella*, raccolti su base volontaria dai laboratori diagnostici periferici. Nel periodo 2013-2018 sono stati raccolti e confermati 2066 ceppi di *Shigella* così distribuiti: il 72,1% di *S. sonnei*, 21,9% *S. flexneri*, 4,3% *S. boydii* e 1,7% *S. dysenteriae*.

*Shigella* spp. sono generalmente identificate e tipizzate mediante l'utilizzo di prove biochimiche, sierologiche e di mobilità. Questi saggi richiedono tempo e possono dare risultati discordanti, a causa di possibili *cross*-reazioni degli antigeni-O tra *E. coli* e *Shigella* (8).

Pertanto, in questo lavoro è stato messo a punto un approccio molecolare alternativo per migliorare la capacità di discriminazione, a beneficio della sorveglianza epidemiologica nazionale di *Shigella*.

Tale approccio combina l'identificazione delle specie (*Shigella/E. coli*) e i sierogruppi di *S. flexneri* e *S. sonnei* in un unico test e permette di ottenere risultati in 48 ore, a basso costo.

Il metodo si basa su una procedura di *Multiplex Oligonucleotide Ligation-PCR* (MOL-PCR), che utilizza microsfere MagPlex™ -TAG disponibili in commercio per il rilevamento dei target, in seguito analizzati con la piattaforma Luminex MAGPIX®, la quale consente la determinazione fino a 50 geni simultaneamente (9,10). Per l'individuazione del patotipo EIEC/*Shigella*, sono stati selezionati due geni target: *ipaH* (invasive plasmid antigen H) (11) e il gene plasmidico *invC* (12), mentre per distinguere la specie EIEC da *Shigella* e identificare gli *E. coli* non-EIEC sono stati utilizzati tre geni target: *lacY* (13), *cadA* (5) e il gene *speG*. Questo specifico gene risulta essere mutato o deletato nelle specie di *Shigella*, mentre è integro negli *E. coli* (14).

Inoltre sono stati inclusi i geni *wbgZ* e *rfc* (12) per il rilevamento e la discriminazione rispettivamente di *S. sonnei* e *S. flexneri*.

Per la sierotipizzazione molecolare di *S. flexneri* sono stati scelti nove geni target tra cui: *wzx1-5* e *wzx6*, caratteristici per la sintesi e la modifica dell'antigene-O, i geni *gtrI*, *gtrII*, *gtrIV*, *gtrV*,

*gtrX* e *gtrIc* che codificano specifiche glucosiltransferasi e il gene *oac* il quale codifica una O-acetiltransferasi (15).

La sierotipizzazione molecolare di *S. boydii* e *S. dysenteriae* è stata omessa, in quanto ciò avrebbe richiesto l'inclusione di ulteriori 31 geni target, aumentando sostanzialmente il costo di reazione per coprire solo una minoranza di campioni (circa 5%). Ciò non esclude che in futuro si possa utilizzare il saggio Luminex anche per l'analisi molecolare delle due specie di *Shigella* in questione.

## Identificazione e sierotipizzazione molecolare di *Shigella* e differenziazione dagli EIEC e *E. coli* non-EIEC

Nell'ambito della sorveglianza della shigellosi in Belgio, è stato condotto uno studio per analizzare e caratterizzare ceppi di *Shigella*, inviati al NRCS (*National Reference Center for Salmonella and Shigella* spp.) tra il 2013 e il 2018, attraverso l'utilizzo del metodo Luminex.

In particolare, è stata valutata l'efficacia del metodo nel distinguere *Shigella* da *E. coli* non-EIEC ed EIEC, analizzando 30 ceppi di *S. sonnei* e 185 ceppi di *S. flexneri*, già tipizzati mediante i metodi biochimici e sierologici tradizionali.

A questa raccolta sono stati aggiunti 33 isolati, che non sono stati identificati come *Shigella* spp., 16 ceppi EIEC e 6 isolati non tipizzabili, che presentavano reazioni di agglutinazione non specifiche (16).

Tutti i campioni confermati come *S. sonnei* o *S. flexneri* con metodi tradizionali, hanno mostrato risultati positivi per i geni *ipaH* (99,5%) o *invC* (95,2%) e negativi per *speG*, *lacY* e *cadA*. I 33 isolati non identificati come *Shigella* e i 6 ceppi non tipizzabili sono risultati negativi per *ipaH* e *invC*.

Tuttavia, tali ceppi hanno mostrato una positività per i seguenti geni: *speG* (37/39), *lacY* (19/39) e/o *cadA* (21/39), portando a identificarli come *E. coli*.

Per quanto riguarda la previsione del sierotipo di *Shigella*, tutti i ceppi di *S. sonnei* (n=30) e 175 ceppi su 185 (95%) di *S. flexneri* hanno mostrato il 100% di concordanza tra tipizzazione molecolare e sierotipizzazione classica (Tabella 1).

I 16 ceppi EIEC esaminati hanno fornito un profilo intermedio, in quanto 15/16 ceppi EIEC hanno mostrato la presenza dei geni *ipaH* e *invC*, mentre i geni *speG*, *lacY* e *cadA* sono stati rilevati rispettivamente in 11/16, 6/16 e 0/16 degli isolati. Il gene *speG* codifica l'enzima spermidina acetiltransferasi responsabile della conversione della spermidina in N-acetilspermidina; è stato dimostrato che un livello più elevato di spermidina aumenta la sopravvivenza di *Shigella* nei macrofagi conferendole una maggiore resistenza allo stress ossidativo (14).

Il saggio Luminex ha permesso simultaneamente di identificare le specie di *Shigella/E. coli* e i sierotipi di *S. sonnei* e *S. flexneri*, con una sensibilità e una specificità rispettivamente del 96,6% e del 98,4%, superando così alcuni limiti della sierotipizzazione tradizionale.

Inoltre, i risultati hanno mostrato la concordanza tra sierotipizzazione classica (fenotipica) e sierotipizzazione molecolare (genotipica) nel 100% di *S. sonnei* (30 ceppi su 30) e nel 95 % di *S. flexneri* (175 ceppi su 185).

I 10 ceppi di *S. flexneri*, che hanno mostrato dei risultati discordanti tra la sierotipizzazione classica e la tipizzazione molecolare, sono stati sequenziati mediante *Next Generation Sequencing* (NGS), che ha permesso di caratterizzare i geni responsabili della sintesi o della modifica dell'antigene-O.

Tabella 1. Media dei dati grezzi del saggio Luminex, divisi per specie e sierotipi di *Shigella* testate durante la validazione del test\*

Siero-gruppo (n. di ceppi testati)	Media dell'intensità di fluorescenza (S/N) del saggio Luminex per ogni gene target															
	<i>ipaH</i>	<i>InvC</i>	<i>speG</i>	<i>lacY</i>	<i>cadA</i>	<i>rfc</i>	<i>wbgZ</i>	<i>oac</i>	<i>gtrII</i>	<i>gtrI</i>	<i>gtrX</i>	<i>gtrV</i>	<i>wzx6</i>	<i>gtrIV</i>	<i>wzx1-5</i>	<i>gtrC</i>
<i>S. flexneri</i> 1b (n. 30)	2,9	3,4	0,9	0,8	0,9	4,8	0,9	5,0	1,0	3,2	1,0	1,0	1,1	1,0	2,8	1,1
<i>S. flexneri</i> 1c (n. 7)	4,0	3,7	1,1	0,8	0,9	7,1	1,1	1,2	1,4	4,2	1,3	1,2	1,2	1,2	4,4	4,0
<i>S. flexneri</i> 2a (n. 30)	2,8	3,7	1,0	0,9	1,0	4,5	0,9	1,0	4,2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	2,7	1,0
<i>S. flexneri</i> 2b (n. 19)	2,7	3,6	0,9	0,8	0,9	4,2	0,9	0,9	3,7	1,0	3,3	0,9	1,0	0,9	2,6	0,9
<i>S. flexneri</i> 3a (n. 33)	3,1	3,8	1,1	1,0	1,3	4,8	1,1	5,5	1,2	1,2	3,8	1,1	1,2	1,2	3,0	1,1
<i>S. flexneri</i> 3b (n. 11)	3,6	4,3	1,0	1,0	1,2	5,9	1,1	6,6	1,2	1,5	2,3	1,1	1,2	1,1	3,3	1,1
<i>S. flexneri</i> 4a (n. 11)	3,0	3,7	1,0	0,9	1,1	5,1	0,9	1,0	1,1	1,1	1,0	1,1	1,1	3,9	2,7	1,0
<i>S. flexneri</i> 4b (n. 1)	3,9	5,4	1,3	1,4	1,4	6,7	1,3	6,4	1,3	1,2	1,3	1,4	1,3	4,7	3,7	1,3
<i>S. flexneri</i> 5 (n. 1)	1,3	1,1	6,5	1,1	5,6	8,1	1,1	1,2	1,2	1,2	1,1	7,0	1,1	1,2	1,3	1,1
<i>S. flexneri</i> 6 (n. 30)	3,4	4,6	1,0	0,8	0,9	1,0	0,9	1,0	1,0	1,1	1,1	1,0	3,9	1,0	1,0	1,0
<i>S. flexneri</i> x (n. 8)	3,9	4,9	1,1	1,0	1,0	6,6	1,1	3,7	1,1	1,1	4,7	1,1	1,2	1,1	3,5	1,1
<i>S. flexneri</i> y (n. 4)	4,3	5,1	1,1	1,3	1,6	6,6	1,1	1,3	1,4	1,4	1,4	1,3	1,5	1,4	4,0	1,4
<i>S. sonnei</i> (n. 30)	3,3	3,0	1,1	1,1	1,2	1,1	3,8	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,2	1,1	1,1	1,1
Non <i>Shigella</i> (n. 39)	1,2	1,2	6,1	3,5	2,5	1,4	1,1	1,1	1,2	1,2	1,2	1,2	1,3	1,2	1,5	1,2
EIEC (n. 16)	3,8	3,3	3,1	2,6	0,7	0,7	0,7	0,9	1,1	0,7	1,2	0,8	0,9	1,0	2,0	0,9

\*Il *read-out* è calcolato come intensità di fluorescenza mediana, che viene convertita in rapporti *signal-to-noise* (S/N), se positivo è > 2 (grassetto). Il singolo isolato disponibile di *S. flexneri* 5 è stato confermato come *E. coli* basato sul *Whole Genome Sequencing*

In sei ceppi sono state identificate, quindi, inserzioni, delezioni e mutazioni *frameshift* nei geni *oac*, *gtrI* e *gtrV*, impedendone la loro espressione; inoltre, in quattro ceppi sono state rilevate mutazioni nel promotore a monte dell'operone *gtr*, suggerendo una riduzione dei livelli di espressione genica. Le mutazioni intervenute in questi ceppi hanno quindi generato un sierotipo differente rispetto a quello ottenuto mediante l'analisi classica (Tabella 2).

Per quanto riguarda gli EIEC, come previsto, hanno mostrato un profilo molecolare intermedio, infatti il gene *speG* è presente nel 68,7% dei casi, mentre in *Shigella speG* è assente, in quanto deleta o mutata, mostrando che la perdita della sua funzione è un tratto importante

nell'evoluzione pato-adattativa (17). In futuro, per aumentare il potere discriminatorio del test molecolare, per quanto riguarda gli EIEC, si potrebbero incrementare e incorporare nuovi target, come suggerito dal lavoro di Dhakal *et al.* (18).

**Tabella 2. Analisi NGS dei ceppi *S. flexneri* con risultati discrepanti tra sierotipizzazione tradizionale e tipizzazione basata sul saggio Luminex**

Sierotipizzazione tradizionale	Tipizzazione molecolare Luminex	Commento analisi NGS
<i>S. flexneri</i> 3b	<i>S. flexneri</i> 1b	Indel rilevato in <i>gtrI</i> in posizione 340
<i>S. flexneri</i> 3b	<i>S. flexneri</i> 3a	Mutazioni del promotore dell'operone <i>gtr</i> nelle posizioni -6, -7, -12, -13, -14, -17, -18 e -19
<i>S. flexneri</i> 3b	<i>S. flexneri</i> 3a	Mutazioni del promotore dell'operone <i>gtr</i> nelle posizioni -6, -7, -12, -13, -14, -17, -18 e -19
<i>S. flexneri</i> 3b	<i>S. flexneri</i> 3a	Mutazioni del promotore dell'operone <i>gtr</i> nelle posizioni -6, -7, -12, -13, -14, -17, -18 e -19
<i>S. flexneri</i> 3b	<i>S. flexneri</i> 3a	Mutazioni del promotore dell'operone <i>gtr</i> nelle posizioni -6,-7, -12, -13, -14, -17, -18 e -19
<i>S. flexneri</i> 5	<i>S. flexneri</i> 5a/ <i>E. coli</i>	<i>gtrV/rfc</i> rilevato, <i>ipaH</i> assente
<i>S. flexneri</i> x	<i>S. flexneri</i> 3a	Indel rilevato in <i>oac</i> in posizione 543
<i>S. flexneri</i> x	<i>S. flexneri</i> 3a	Indel rilevato in <i>oac</i> in posizione 718
<i>S. flexneri</i> x	<i>S. flexneri</i> 3a	<i>Frameshift</i> rilevato in <i>oac</i> in posizione 346
<i>S. flexneri</i> x	<i>S. flexneri</i> 3a	<i>Frameshift</i> rilevato in <i>oac</i> in posizione 346

## Bibliografia

1. Kotloff KL, Riddle MS, Platts-Mills JA, Pavlinac P, Zaidi AKM. Shigellosis. *Lancet* 2017;391:801-12.
2. Pupo GM, Lan GR, Reeves PR. Multiple independent origins of Shigella clones of Escherichia coli and convergent evolution of many of their characteristics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10567-72.
3. Sansonetti PJ, Kopecko DJ, Formal SB. Involvement of a plasmid in the invasive ability of Shigella flexneri. *Infect Immun* 1982;35:852-60.
4. Pettengill EA, Pettengill JB, Binet R. Phylogenetic analyses of Shigella and enteroinvasive Escherichia coli for the identification of molecular epidemiological markers: Whole-genome comparative analysis does not support distinct genera designation. *Front Microbiol* 2016;6:1573.
5. Prosseda G, Carmela Latella M, Barbagallo M, Nicoletti M, Al Kassas R, Casalino M, Colonna B. The two- faced role of cad genes in the virulence of pathogenic Escherichia coli. *Res Microbiol* 2007;158:487-93.
6. Ashida H, Kim M, Sasakawa C. Manipulation of the host cell death pathway by Shigella. *Cell Microbiol* 2014;16:1757-66.
7. Schroeder G, Hilbi H. Molecular pathogenesis of Shigella spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin Microbiol* 2008;21:134-56
8. Sun Q, Lan R, Wang Y, Zhao A, Zhang S, Wang J, Wang Y, Xia S, Jin D, Cui Z, Zhao H, Li Z, Ye C, Zhang S, Jing H, Xu J. Development of a multiplex PCR assay targeting O-antigen modification genes for molecular serotyping of Shigella flexneri. *J Clin Microbiol* 2011;49:3766-70.

9. Ceyskens PJ, Garcia-Graells C, Fux F, Botteldoorn N, Mattheus W, Wuyts V, De Keersmaecker S, Dierick K, Bertrand S. Development of a Luminex xTAG® assay for cost-effective multiplex detection of  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2016;71(9):2479-83.
10. Wuyts V, Roosens NHC, Bertrand S, Marchal K, De Keersmaecker SCJ. Guidelines for optimisation of a multiplex oligonucleotide ligation-PCR for characterisation of microbial pathogens in a microsphere suspension array. *Biomed Res Int* 2015;2015:790170.
11. Venkatesan MM, Buysse JM, Hartman AB. Sequence variation in two *ipaH* genes of *Shigella flexneri* 5 and homology to the LRG-like family of proteins. *Mol Microbiol* 1991;5:2435-45.
12. Ojha SC, Yean CY, Ismail A, Singh KKB. A pentaplex PCR assay for the detection and differentiation of *Shigella* species. *Biomed Res Int* 2013;2013:412370.
13. Pavlovic M, Luze A, Konrad R, Berger A, Sing A, Busch U. Development of a duplex real-time PCR for differentiation between *E. coli* and *Shigella* spp. *J Appl Microbiol* 2011; 110:1245-51.
14. Barbagallo M, Di Martino ML, Marcocci L, Pietrangeli P, De Carolis E, Casalino M, Colonna B, Prosseda G. A new piece of the *Shigella* pathogenicity puzzle: Spermidine accumulation by silencing of the *speG* gene. *PLoS ONE* 2011;6:e27226
15. Gentle A, Ashton PM, Dallman TJ, Jenkins C. Evaluation of molecular methods for serotyping *Shigella flexneri*. *J Clin Microbiol* 2016;54:1456-61.
16. Ventola E, Bogaerts B, De Keersmaecker SGJ, Vanneste K, Roosens NHC, Mattheus W, Ceyskens PJ. Shifting national surveillance of *Shigella* infections toward geno-serotyping by the development of a tailored Luminex assay and NGS workflow. *Microbiology Open* 2019;8:e00807
17. Campilongo R, Di Martino ML, Marcocci L, Pietrangeli P, Leuzzi A, Grossi M, Casalino M, Nicoletti M, Micheli G, Colonna B, Prosseda G. Molecular and functional profiling of the polyamine content in enteroinvasive *E. coli*: looking into the gap between commensal *E. coli* and harmful *Shigella*. *PLoS ONE* 2014;9:e106589.
18. Dhakal R, Wang Q, Lan R, Howard P, Sintchenko V. Novel multiplex PCR assay for identification and subtyping of enteroinvasive *Escherichia coli* and differentiation from *Shigella* based on target genes selected by comparative genomics. *J Med Microbiol* 2018;67:1257-64.

## **AMEBE A VITA LIBERA PATOGENE (FREE-LIVING AMOEBAE, FLA)**

Margherita Montalbano Di Filippo

*Dipartimento di Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

### **Introduzione**

Per molto tempo, solo i parassiti obbligati sono stati considerati possibili patogeni. Questo concetto è diventato insostenibile con l'identificazione di diversi generi di amebe a vita libera (*Free Living Amoebae*, FLA) in grado di infettare l'uomo e altri mammiferi, causando quadri patologici molto gravi.

Questa scoperta ha rivoluzionato il concetto di parassitismo, abbattendo la barriera che separa gli organismi viventi dai parassiti. Per il basso numero d'infezioni riscontrate, le amebe non hanno mai rappresentato un argomento sanitario d'interesse prioritario, anche se la mancanza di farmaci efficaci e l'esito spesso fatale delle malattie indotte da alcune generi, le hanno sempre rese oggetto d'interesse e di studio nell'area della microbiologia ambientale. Tuttavia, un'attenzione particolare è loro rivolta recentemente per il potenziale ruolo di veicolo di microrganismi patogeni presenti nell'ambiente.

Oggetto del presente seminario è lo stato dell'arte sulle specie amebiche la cui diffusione nell'ambiente potrebbe costituire un rischio per la salute umana. Saranno descritti le caratteristiche ecologiche di questi organismi, il loro adattamento e le dinamiche d'interazione con gli altri microrganismi.

### **Amebe a vita libera: ecologia ed epidemiologia**

Le FLA sono dei parassiti facoltativi ampiamente distribuiti in natura, per questo possedere delle informazioni accurate sulla loro ecologia e la loro distribuzione è particolarmente importante, visto che alcuni generi (*Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Sappinia*, *Vermamoeba* e *Naegleria*) sono agenti causali di patologie gravi nell'uomo e negli animali.

Le amebe a vita libera sono state isolate in *habitat* diversissimi tra loro, come: stagni, laghi, impianti di acqua a uso domestico e non (acque potabili e non), sorgenti termali, terme, piscine, acquari, impianti idroelettrici, nel suolo, in acque reflue, acqua di mare e sedimenti oceanici, nell'aria e nelle torri di raffreddamento delle centrali elettriche e nucleari. Nell'uomo sono state isolate nel naso e nella gola dei pazienti con malattie respiratorie e in soggetti sani, e nelle secrezioni bronchiali, auricolari e nei campioni di feci di pazienti con diarrea.

In generale, la sorgente d'infezione non è stata identificata, ma si ipotizza sia rappresentata dall'acqua, in particolare da acqua con temperature elevate.

Le infezioni causate da questi organismi ampiamente diffusi in natura sono rare ma stanno aumentando sempre più globalmente per la combinazione di diversi fattori tra cui: (i) l'aumento delle attività ricreative in acqua dolce durante le ondate di caldo – principale fattore di rischio per l'acquisizione della meningoencefalite primaria dovuta a *Naegleria (N.) fowleri*; (ii) un numero crescente di soggetti immuno-compromessi sensibili all'encefalite amebica granulomatosa

causata da *Acanthamoeba spp.* e *Balamuthia mandrillaris* e (iii) portatori di lenti a contatto a rischio di acquisire la cheratite amebica causata da diverse specie di *Acanthamoeba* e *Vermamoeba*.

Tuttavia, l'incidenza "reale" delle malattie amebiche non è precisamente nota. Fino al 2010, sono stati segnalati in tutto il mondo oltre 150 casi di encefalite granulomatoso dovuti ad *Acanthamoeba spp.* e più di 4000 casi di cheratite amebica (1).

La maggior parte dei casi clinici sono quindi rappresentati da infezioni oculari causate per lo più da *Acanthamoeba* ma diversi studi hanno evidenziato che tali infezioni potrebbero essere più prevalenti di quanto precedentemente riconosciuto e causate da altri generi di amebe a vita libera (es. *Vermamoeba*). Inoltre, dal 1965 a oggi, sono stati segnalati più di 190 casi di meningoencefalite fulminante causata da *N. fowleri* e sono stati riportati più di 85 ulteriori casi di encefalite dovuti a *Balamuthia* (1, 2).

Il numero effettivo è probabilmente più alto, poiché la diagnosi per encefalite amebica (*Acanthamoeba* e *Balamuthia*) e per meningoencefalite fulminante (*Naegleria*) viene solitamente effettuata durante l'autopsia, cosa che raramente viene eseguita in molti Paesi (3).

In Italia le prime segnalazioni di amebe a vita libera risalgono agli anni '80: dal 1982 al 1984 sono stati condotti i primi studi epidemiologici in piscine termali e nei fanghi in Nord Italia (4-6) riconoscendo morfologicamente diversi generi di amebe a vita libera (*Acanthamoeba*, *Vermamoeba* e *Naegleria*).

Dopo queste prime segnalazioni di amebe a vita libera potenzialmente patogene nell'ambiente, negli anni '90 furono invece diagnosticate le prime infezioni amebiche umane, in particolare: un singolo caso di encefalite dovuta ad *Acanthamoeba spp.* in un paziente immuno-compromesso (7) e i primi casi di cheratite amebica (8-10).

Più recente è l'unico caso di meningoencefalite fulminante, nel Nord Italia, causato da *Naegleria fowleri* diagnosticata *post mortem* in un bambino che probabilmente ha acquisito l'infezione dopo aver nuotato in un fiume (11).

Dal 2009, grazie all'uso di strumenti di biologia molecolare in diagnosi è stato possibile segnalare e caratterizzare molti più casi clinici (cheratiti amebiche) (12-16) ampliando sempre di più gli studi epidemiologici analizzando diverse matrici ambientali (acque potabili, fontane ornamentali, pozzi, piscine, riuniti dentali, acque termali) (17-20).

## Organismi resistenti alle amebe: implicazioni di carattere sanitario

Alla rilevanza sanitaria che hanno assunto negli ultimi anni questi parassiti facoltativi, si aggiunge l'interesse legato alla loro capacità di fagocitare batteri, funghi e virus, che riescono a sopravvivere e replicarsi al loro interno, e che vengono indicati con il termine di *Amoeba Resistant Microorganism* (ARM).

Le amebe rappresenterebbero un possibile serbatoio per molti patogeni umani capaci di sopravvivere e replicarsi all'interno delle amebe (es. *Legionella spp.*, *Chlamidia spp.*, micobatteri non tubercolari) e, nel contempo, un efficiente veicolo in grado di incrementare la loro persistenza e diffusione nell'ambiente. Per questa funzione ecologica che ha forti implicazioni di carattere sanitario, è stato riconosciuto alle amebe il ruolo di "Cavallo di Troia" (conosciuto come *Trojan horse*) per molte infezioni.

Tra le numerose specie batteriche che interagiscono con successo con le amebe a vita libera, molte sono note per essere patogene per l'uomo (21). Più di 100 agenti patogeni comprovati per l'uomo sono capaci di sopravvivere e replicarsi all'interno di varie specie amebiche (22). Il

numero effettivo è probabilmente più alto, poiché nella maggior parte degli studi in cui si analizzano le interazioni patogene dell'ospite spesso solo una, in genere *Acanthamoeba polyphaga*, è stata utilizzata e una gamma di agenti patogeni batterici non è stata ancora testata per interagire con le amebe a vita libera. Importanti patogeni come *Legionella pneumophila*, *Legionella micdadei*, *Vibrio cholera* sopravvivono non solo nei trofozoiti (stato attivo dell'ameba) ma anche nelle cisti (stato di resistenza dell'ameba) (23). È stato dimostrato che i batteri all'interno dei trofozoiti mostrano una maggiore resistenza ai biocidi, che aumenta ulteriormente quando si trovano all'interno delle cisti: quindi, i batteri patogeni interiorizzati nelle amebe rappresentano un rischio per la salute pubblica perché non sono raggiunti dal trattamento convenzionale con biocidi (23).

Per quanto riguarda le interazioni delle amebe con i virus, è anche abbastanza recente la segnalazione della presenza di un "mimivirus" (*microbe mimicking virus*) all'interno del genere *Acanthamoeba*, il più grande virus finora individuato (400 nm), e associato alle *Iridoviridae*, *Phycodnaviridae* e *Poxviridae*, il cui ruolo come patogeno umano non è ancora stato stabilito (23). Recentemente, un mimivirus è stato scoperto in *A. polyphaga*. Inoltre, è noto in letteratura che *Coxsackie virus* e *Adenovirus* possono infettare e sopravvivere all'interno di *Acanthamoeba*.

## Prospettive future

Tra gli studiosi del settore è sempre più diffusa l'opinione che la ricerca delle amebe a vita libera dovrebbe essere inserita in qualsiasi valutazione del rischio per gli agenti patogeni dell'acqua (potabile e non potabile) non solo allo scopo di ridurre le amebe stesse ma anche nell'ottica del controllo dei microrganismi patogeni che esse potrebbero veicolare.

Nell'analisi del rischio per la presenza di amebe a vita libera nell'acqua, la letteratura scientifica suggerisce di considerare tre aspetti importanti: (i) le amebe a vita libera sono agenti patogeni per l'uomo e causano gravi patologie, (ii) possono essere infettate da diversi ARB (*Antibiotic Resistant Bacteria*) patogeni, e (iii) possono agire da serbatoio e veicolo per batteri e virus (più raramente per funghi e altri protozoi) patogeni all'interno degli impianti idrici agevolando efficacemente il contatto con l'uomo.

Tuttavia, sono ancora molti gli aspetti dell'interazione tra amebe a vita libera e ARB che non sono tutt'ora chiari e che dovranno essere indagati in futuro per poter sviluppare strategie di controllo adeguate alla problematica.

## Bibliografia

1. Diaz JH. Increasing Intracerebral Infections Caused by free-living amoebae in the United States and worldwide. *Journal of Neuroparasitology* 2010;10:1-10.
2. Shin HJ, Im K. Pathogenic free-living amoebae in Korea. *The Korean Journal of Parasitology* 2004;42:93-119.
3. Ma P, Visvesvara GS, Martinez AJ, Theodore FH, Daggett PM, Sawyer TK. Naegleria and Acanthamoeba infections: Review. *Rev Inf Dis* 1990;12:490-513.
4. Scaglia M, Strosselli M, Grazioli V. Le amebe a vita libera, agenti di meningoencefaliti nell'uomo: ricerche epidemiologiche nelle acque non potabili della città di Pavia. *Giornale di Malattie Infettive e Parassitarie* 1982;34:1140-8.
5. Scaglia M, Strosselli M, Grazioli V, Gatti S, Bernuzzi AM, De Jonckheere JF. Isolation and identification of pathogenic Naegleria australiensis (Amoebida, Vahlkampfiidae) from a spa in northern Italy. *Appl Environ Microbiol* 1983;46:1282-5.

6. Scaglia M, Strosselli M, Grazioli V, Gatti S, Bernuzzi AM. First isolation in Italy of *Naegleria australiensis* (De Jonckheere, 1981). *Parassitologia* 1984;26;305-9.
7. Di Gregorio C, Rivasi F, Mongiardo N, De Rienzo B, Wallace S, Visvesvara GS. Acanthamoeba meningoencephalitis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 1992;116;1363-5.
8. Manso E, Biavasco F, Lupidi R, Giovannini A, Frongia G, Varaldo PE. Primo isolamento in Italia di un ceppo di Acanthamoeba da un paziente affetto da cheratite bilaterale. *Microbiol Med* 1993;8;100-4.
9. Giovannini A, Tittarelli R, Bertelli E, Frongia GB, Mariotti C, Manso E, Biavasco F. Bilateral Acanthamoeba keratitis in a gas-permeable contact lens wearer. *Ophthalmologica* 1994;208;321-4.
10. Mancino R, Iori A, Palma S, Corsi A, Cancrini G, Cerulli L. Acanthamoeba keratitis associated with contact lenses; report of three cases in Italy. *Parassitologia* 1997;39;37-40.
11. Cogo PE, Scaglia M, Gatti S, Rossetti F, Alaggio R, Laverda AM, Zhou L, Xiao L, Visvesvara GS. Fatal *Naegleria fowleri* meningoencephalitis, Italy. *Emerg Infect Dis* 2004;10;1835-7.
12. Di Cave D, Monno R, Bottalico P, Guerriero S, D'Amelio S, D'Orazi C, Berrilli F. Acanthamoeba T4 and T15 genotypes associated with keratitis infections in Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28;607-12.
13. Gatti S, Rama P, Matuska S, Berrilli F, Cavallero A, Carletti S, Bruno A, Maserati R, Di Cave D. Isolation and genotyping of Acanthamoeba strains from corneal infections in Italy. *J Med Microbiol* 2010;59;1324-30.
14. Di Cave D, D'Alfonso R, Dussey-Comlavi KA, D'Orazi C, Monno R, Berrilli F. Genotypic heterogeneity based on 18S-rRNA gene sequences among Acanthamoeba isolates from clinical samples in Italy. *Experimental Parasitology* 2014;145.
15. Pinna A, Porcu T, Boscia F, Cano A, Erre G, Mattana A. Free-living amoebae Keratitis. *Cornea* 2017;36;785-90.
16. Antonelli A, Favuzza E, Galano A, Montalbano Di Filippo M, Ciccone N, Berrilli F, Mencucci R, Di Cave D, Rossolini GM. Regional spread of contact lens-related Acanthamoeba keratitis infection in Italy. *New Microbiol* 2018;41;83-5.
17. Montalbano Di Filippo M, Santoro M, Lovreglio P, Monno R, Capolongo C, Calia C, Fumarola L, D'Alfonso R, Berrilli F, Di Cave D. Isolation and molecular characterization of free-living amoebae from different water sources in Italy. *Int J Environ Res Public Health* 2015;12;3417-27.
18. Corsaro D, Köhler M, Montalbano Di Filippo M, Venditti D, Monno R, Di Cave D, Berrilli F, Walochnik J. Update on *Acanthamoeba jacobsoni* genotype T15, including full-length 18S rDNA molecular phylogeny. *Parasitol Res* 2017;116;1273-84.
19. Montalbano Di Filippo M, Novelletto A, Di Cave D, Berrilli F. Identification and phylogenetic position of *Naegleria* spp. from geothermal springs in Italy. *Exp Parasitol* 2017;183;143-9.
20. Montalbano Di Filippo M, Berrilli F, Di Cave D, Novelletto A. Novel data from Italian *Vermamoeba vermiformis* isolates from multiple sources add to genetic diversity within the genus. *Parasitol Res* 2019;118;1751-9.
21. Ecke DJ, Sampath R, Willett P, Samant V, Massire C, Hall TA, Hari K, McNeil JA, Buchen-Osmond C, Budowle B. The Microbial Rosetta Stone database: A common structure for microbial biosecurity threat agents. *J Forensic Sci* 2005;50;1380-5.
22. Thomas V, McDonnell G, Denyer SP, Maillard JY. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: Risks for water quality. *FEMS Microbiol Rev* 2010;34;231-59.
23. Balczun C, Scheid PL. Free-Living Amoebae as Hosts for and Vectors of Intracellular Microorganisms with Public Health Significance. *Viruses* 2017;9;1-18.

# **(A)CROSS CAMPYLOBACTER: CROSS CONTAMINATION EVENTS AT DOMESTIC KITCHENS**

Maria João Cardoso

*Dipartimento di Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## **Introduction**

Campylobacteriosis is the most reported zoonosis in the European Union since 2005 and the most common cause of bacterial foodborne diarrhoeal disease worldwide. In 2017, 596 cases of human campylobacteriosis were reported in Portugal. *Campylobacter jejuni* is the main species infecting humans, but the observed prevalence of *Campylobacter (C.) coli* in Portugal is higher than that reported for other western countries. It has been recognized that contaminated chicken is the major vehicle for consumer's exposure to *Campylobacter*.

## **Objective**

This work was developed in the scope of SafeConsume project and its main objective was to evaluate possible cross-contamination events that can contribute to the spread of *Campylobacter* spp. in domestic kitchen environments during food preparation. Thus, 18 households were visited in October 2017 and the period between February and April 2018 to observe consumers preparing a recipe that included poultry and a raw vegetable salad.

## **Methodology**

Poultry samples and swabs from domestic kitchen surfaces and utensils were collected before and after food preparation. Samples were also taken from tap handle, cabinet, drawer and refrigerator handles and the countertop surface. Other surfaces were sampled depending on observed behaviours during the individual food preparation sessions, such as: kitchen cloth, hand towel, sponge, cutting boards and the sink. Detection and enumeration of *Campylobacter* were performed according to the methods recommended by the International Organization for Standardization and species confirmation was performed by a multiplex Polymerase Chain Reaction assay. Pheno- and genotypic characterization of 72 *Campylobacter* spp. isolates was carried out through antimicrobial susceptibility, Pulse-Field Gel Electrophoresis (PFGE) and *flaA*-Short Variable Region (SVR) sequencing.

## **Results**

From the 18 chicken samples analysed, 14 were *Campylobacter*-positive at least by one of the methods applied (occurrence of 77.8%).

The microbial load ranged from  $< 1.0 \times 10^1$  to  $2.2 \times 10^3$  Colony Forming Units/g, with only one sample showing a contamination level above 103 CFU/g, the established limit present in Regulation (EC) No 2017/1495. Cross-contamination events were observed in four kitchens, between the chicken meat and two cutting boards, two sinks and one kitchen cloth. Both *C. jejuni* and *C. coli* were recovered from these surfaces/utensils. Very high levels of resistance to ciprofloxacin (100%) and tetracycline (94.4%) were observed.

High resistance to erythromycin was also observed in this study (40.3%), differing from values reported by EFSA in 2016. *Campylobacter coli* isolates showed higher resistance to all antimicrobial agents tested than *C. jejuni*. Additionally, MultiDrug Resistance (MDR) was observed in 63.9% of the isolates, of which 75.6% were *C. coli*.

PFGE typing showed a high diversity among isolates, as well as flaA-SVR typing (29 pulsotypes, 16 flaA alleles and 8 flaA peptide identities).

## Conclusion

These results highlight the potential for the dissemination of resistant *Campylobacter* strains in the environment through the preparation of chicken meat and the need to educate the consumer for an appropriate handling of raw poultry meat products.

## Significance of the study (non-technical explanation)

SafeConsume (<http://safeconsume.eu/>) aims to create new strategies to help the consumer to mitigate food risks by increasing knowledge and skills in responsible and safe food handling and consumption, and ultimately to reduce the number of foodborne illness at consumer stage.

The project runs with 32 partners in 14 countries in Europe and among them are three multinational companies and four small and medium-sized enterprises. It focuses on the five most significant foodborne hazards in Europe: *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *norovirus*, *Salmonella* spp. and *Toxoplasma gondii*.

Campylobacteriosis is the most reported foodborne disease in the European Union, and it is caused by *Campylobacter* spp. These bacteria are known to be frequently present in chicken meat, so it is considered the main route of human infection.

This study consisted of visiting consumers' houses, to observe people's practices in the kitchen when handling raw poultry and to collect food and kitchen environmental samples for microbiological analysis.

The high prevalence of *Campylobacter* spp. in chicken meat was confirmed, as well as the transfer of these bacteria from the meat to the kitchen surfaces and utensils, through molecular biology techniques.

It was also observed that the bacteria recovered during this study were resistant to several antibiotics. This study points out the importance of consumers' education towards safe handling of broiler meat and the prevention of campylobacteriosis.

# CONTAMINAZIONE DA SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE IN VENETO: VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE ALIMENTARE E CARATTERIZZAZIONE DEL RISCHIO

Francesca Iacononi, Francesco Cubadda  
*Dipartimento di Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Introduzione

L'acido perfluorooctanoico (PFOA) e l'acido perfluorooctansolfonico (PFOS) sono le due molecole più importanti appartenenti alla classe delle sostanze perfluoroalchiliche (*perfluoroalkyl substances*, PFAS), un vasto gruppo di composti organici di sintesi prodotti e utilizzati a livello globale sin dagli anni '40 del secolo scorso. I PFAS sono costituiti da una catena alchilica idrofobica parzialmente o interamente fluorurata, tipicamente contenente da 4 a 16 atomi di carbonio, e da un gruppo terminale idrofilo. Questa struttura conferisce loro specifiche caratteristiche fisico-chimiche come la repellenza all'acqua e ai grassi, la stabilità e la tensioattività, con molteplici impieghi in un vasto campo di applicazioni industriali e prodotti di consumo.

L'esposizione della popolazione generale ai PFAS avviene in massima parte per via alimentare, attraverso il consumo di alimenti e acqua. Gli alimenti vegetali possono venire contaminati dal terreno e dell'acqua utilizzati per coltivarli, quelli di origine animale – fonti prevalenti di esposizione – dai PFAS concentratisi nell'organismo animale tramite l'acqua e/o i mangimi; la presenza di PFAS in imballaggi alimentari e attrezzature impiegate durante le lavorazioni alimentari contribuiscono ulteriormente all'esposizione alimentare.

Data la persistenza e l'assenza di metabolismo, la prolungata esposizione porta a un loro bioaccumulo nell'organismo che è un fattore determinante per il potenziale rischio per la salute. Di conseguenza, e analogamente ad altri contaminanti persistenti, il valore guida identificato dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (*European Food Safety Authority*, EFSA) nel 2008 (1), aggiornato nel 2018 (2) e nuovamente aggiornato nel 2020 (3), è definito come assunzione tollerabile settimanale (*Tolerable Weekly Intake*, TWI). A differenza dei contaminanti persistenti liposolubili come le diossine, il bioaccumulo dei PFAS non è associato ai grassi, ma all'interazione con le proteine plasmatiche; questa caratteristica contribuisce a determinare le matrici più importanti per l'esposizione alimentare.

Il parere scientifico del 2018 ha segnato un notevole passo in avanti rispetto alla precedente valutazione del rischio condotta dall'EFSA grazie soprattutto alla disponibilità di studi epidemiologici che evidenziavano effetti di rilevanza sanitaria correlati all'assunzione cronica di questi due PFAS. I TWI identificati in tale opinione sono stati notevolmente inferiori rispetto a quelli della iniziale valutazione di dieci anni prima, di 81 volte per il PFOS e 1750 volte per il PFOA (2). Nel 2020 l'EFSA ha adottato un nuovo parere dove, utilizzando la metodologia recentemente messa a punto per valutare gli effetti dell'esposizione congiunta a più sostanze contemporaneamente presenti ("approccio delle miscele") (4), ha identificato un TWI di gruppo pari a 8 ng/kg p.c. per settimana per la somma di PFOA, PFOS, acido perfluorononanoico (*perfluorononanoic acid*, PFNA) e acido perfluoroesano solfonico (*perfluorohexane sulfonate*,

PFHxS). Questi PFAS hanno il sistema immunitario come primo bersaglio e la diminuzione della risposta alle vaccinazioni nei bambini come effetto critico; per essi è stata assunta uguale potenza. Acqua potabile, pesce, frutta, uova e prodotti a base di uova sono risultati essere i principali contributi all'esposizione alimentare nella popolazione europea (4).

Un'ampia area del Veneto nelle province di Vicenza, Padova e Verona è interessata da una estesa contaminazione da PFAS che ha il suo cuore nella cosiddetta zona rossa, comprendente 23 comuni (5). Su richiesta della Direzione Prevenzione, Sicurezza Alimentare, Veterinaria della Regione del Veneto, l'Istituto Superiore di Sanità nel 2019 ha condotto uno studio di esposizione alimentare a PFOA e PFOS per la popolazione della zona rossa e per la popolazione generale del Veneto, questa ultima considerata come esposizione di fondo di riferimento, secondo 9 scenari definiti (6). È stato inoltre caratterizzato il rischio per i sottogruppi appartenenti a 5 diverse fasce di età. I risultati dello studio sono qui descritti e la caratterizzazione del rischio aggiornata sulla base del nuovo TWI di gruppo identificato dall'EFSA (4).

## Valutazione dell'esposizione alimentare

Le stime hanno mirato a quantificare i livelli di esposizione di PFOA e PFOS per la popolazione delle due sotto-aree dell'area rossa, la zona rossa A (quella di massimo impatto) comprendente 13 comuni e la zona rossa B comprendente 10 comuni. Tali livelli di esposizione sono stati confrontati con l'esposizione stimata per la popolazione generale del Veneto (fuori dalla zona rossa) assunta come esposizione di fondo di riferimento ("baseline") (6).

I gruppi di popolazione considerati sono stati pertanto:

1. Popolazione generale del Veneto;
2. Popolazione dell'area rossa, zona A;
3. Popolazione dell'area rossa, zona B.

All'interno di questi gruppi di popolazione, sono stati considerati i seguenti sottogruppi appartenenti a diverse fasce di età:

- bambini di età compresa nell'intervallo 3 - <10 anni;
- adolescenti di età compresa nell'intervallo 10 - <18 anni;
- adulti di età compresa nell'intervallo 18 - <65 anni;
- anziani di età compresa nell'intervallo 65 - <75 anni;
- molto anziani di età  $\geq 75$  anni.

Per quanto riguarda gli scenari espositivi, sono stati effettuati tre studi distinti:

1. studio longitudinale sulla popolazione dell'area rossa esposta solo mediante consumo dell'acqua di rete, la cui assunzione di PFAS è stata stimata in tre successive fasi temporali: (i) pre-intervento sulla rete acquedottistica (installazione dei filtri a carbone attivo, GAC, avvenuta nel 2013), (ii) nella fase transitoria di implementazione dell'intervento sulla rete acquedottistica (anni 2013-2017), (iii) nella fase successiva al completamento dell'intervento sulla rete acquedottistica (dal 2018, esposizione corrente);
2. studio sulla popolazione esposta solo mediante consumo dell'acqua di impianti autonomi (pozzi privati, esposizione corrente);
3. studio sulla popolazione esposta mediante il consumo degli alimenti di origine locale, esposizione che si somma a quella attraverso l'acqua di rete (nelle tre diverse fasi temporali sopra descritte) o, in alternativa, attraverso l'acqua di impianti autonomi (pozzi privati, esposizione corrente).

Gli scenari di esposizione – uno di "baseline" riferito alla popolazione del Veneto residente in aree non impattate dalla contaminazione da PFAS, tre riferiti alla zona rossa con consumo di

acqua di rete locale, uno riferito alla zona rossa con consumo di acqua di pozzo, tre riferiti alla zona rossa con consumo di acqua di rete e alimenti locali, uno finale riferito alla zona rossa con consumo di acqua di pozzo e alimenti locali – sono dettagliati nella Tabella 1.

**Tabella 1. Scenari espositivi contemplati nello studio**

Scenario	Popolazione target	Origine dei dati sui livelli di presenza
1. "Baseline"	Popolazione del Veneto residente in aree non impattate dalla contaminazione da PFAS, consumo di alimenti con livelli di fondo di PFAS (corrispondenti a quelli medi europei)	Opinione EFSA [2], per alimenti e acqua potabile
2. Zona rossa, consumo di acqua di rete, pre-intervento	Popolazione residente nella zona rossa, consumo di acqua di rete locale, alimenti con livelli di fondo di PFAS (corrispondenti a quelli medi europei)	Per gli alimenti, Opinione EFSA [2]; per acqua potabile, monitoraggio zona rossa (dati prima del settembre 2013)
3. Zona rossa, consumo di acqua di rete, durante intervento	Popolazione residente nella zona rossa, consumo di acqua di rete locale, alimenti con livelli di fondo di PFAS (corrispondenti a quelli medi europei)	Per gli alimenti, Opinione EFSA [2]; per acqua potabile, monitoraggio zona rossa (dati nel periodo settembre 2013-dicembre 2017)
4. Zona rossa, consumo di acqua di rete, postintervento	Popolazione residente nella zona rossa, consumo di acqua di rete locale, alimenti con livelli di fondo di PFAS (corrispondenti a quelli medi europei)	Per gli alimenti, Opinione EFSA [2]; per acqua potabile, monitoraggio zona rossa (dati 2018)
5. Zona rossa, consumo di acqua di pozzo	Popolazione residente nella zona rossa, consumo di acqua di impianti privati, alimenti con livelli di fondo di PFAS (corrispondenti a quelli medi europei)	Per gli alimenti, Opinione EFSA [2]; per acqua potabile, monitoraggio zona rossa (dati 2018)
6. Zona rossa, consumo di acqua di rete, pre-intervento; consumo di alimenti locali	Popolazione residente nella zona rossa, consumo di acqua di rete e di alimenti locali	Per gli alimenti, dati monitoraggio zona rossa e Opinione EFSA [2]; per acqua potabile, monitoraggio zona rossa (dati prima del settembre 2013)
7. Zona rossa, consumo di acqua di rete, durante intervento; consumo di alimenti locali	Popolazione del Veneto residente nella zona rossa, consumo acqua di rete e di alimenti locali	Per gli alimenti, dati monitoraggio zona rossa e Opinione EFSA (ESFA, 2018); per acqua potabile, monitoraggio zona rossa (dati nel periodo settembre 2013-dicembre 2017)
8. Zona rossa, consumo di acqua di rete, post intervento; consumo di alimenti locali	Popolazione del Veneto residente nella zona rossa, consumo acqua di rete e di alimenti locali	Per gli alimenti, dati monitoraggio zona rossa e Opinione EFSA [2]; per acqua potabile, monitoraggio zona rossa (dati 2018)
9. Zona rossa, consumo di acqua di pozzo; consumo di alimenti locali	Popolazione residente nella zona rossa, consumo di acqua di impianti privati e di alimenti locali	Per gli alimenti, dati monitoraggio zona rossa e Opinione EFSA [2]; per acqua potabile, monitoraggio zona rossa (dati 2018)

L'esposizione è stata stimata a livello individuale moltiplicando per ciascun alimento i livelli di presenza (concentrazioni medie di PFOA e PFOS) con quelli di consumo (dato individuale per ciascuno dei 642 soggetti incluso nell'indagine nazionale sui consumi alimentari INRAN-SCAI 2005-2006, area Nord-Est) e sommando i contributi per tutti gli alimenti, secondo la formula:

$$E_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^n C_{i,k} \times L_{k,j}}{BW_i}$$

dove  $E_{ij}$  è l'esposizione alimentare al contaminante  $j$  dell'individuo  $i$ ,  $n$  è il numero di alimenti nella dieta,  $C_{i,k}$  è il consumo dell'alimento  $k$  da parte dell'individuo  $i$ ,  $L_{k,j}$  è il livello di presenza (concentrazione analitica) del contaminante  $j$  nell'alimento  $k$ ,  $BW_i$  è il peso corporeo del soggetto  $i$ .

Dalla distribuzione delle esposizioni della popolazione adulta è stata calcolata la media e il 95° percentile (esposizione elevata). Per le altre fasce d'età, in ragione della limitata numerosità del campione incluso nell'indagine sui consumi alimentari, è stato possibile calcolare l'esposizione media ma non un percentile elevato di esposizione. In ragione della consistente presenza di dati non quantificati (inferiori ai *Limit of Quantification/Limit of Detection* – LoD/LoQ – analitici), le stime più attendibili sono state considerate quelle in *lower bound level* (LB), nelle quali i valori inferiori al LoD/LoQ sono stati assunti uguali a 0 (2-3); va tuttavia tenuto presente che tali stime, per definizione, producono una sottostima dell'esposizione reale. I dati sui livelli di presenza di PFOA e PFOS negli alimenti locali originano dallo studio di monitoraggio condotto dal Dipartimento di Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria dell'Istituto Superiore di Sanità in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie e l'Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale (ARPA) del Veneto su 1248 campioni (614 di origine vegetale, 634 di origine animale), mentre quelli sulle acque derivano dal database di ARPA Veneto sul monitoraggio delle acque (6).

Per il PFOA, le stime mostrano livelli espositivi molto elevati nello scenario 2 e livelli elevati nello scenario 5 seguito dal 4. L'esposizione della popolazione allacciata alla rete idrica cala drasticamente a seguito dell'avvio (scenario 3) e della messa a regime (scenario 4) degli interventi di trattamento delle acque rispetto alla fase pre-intervento (scenario 2). L'esposizione attuale (scenario 4) è sostanzialmente indistinguibile da quella di "baseline" stimata per la popolazione generale del Veneto (scenario 1). L'esposizione della popolazione che fa uso di impianti autonomi permane invece su livelli elevati (scenario 5). Il consumo di alimenti locali, che negli scenari espositivi considerati viene ipotizzato in via esclusiva come *worst case* (la popolazione di riferimento utilizza il solo prodotto locale per le tipologie alimentari per le quali si dispone di dati "locali"), da un contributo addizionale misurabile, ma non si discosta radicalmente dai corrispondenti scenari 2-5 (massimo nello scenario 6, seguito dal 9 e dal 7). Gli elevati livelli espositivi negli scenari 6/2, 9/5, 7/4 sono coerenti con le evidenze sui livelli ematici misurati negli studi di biomonitoraggio (7). La zona B mostra *trend* analoghi a quelli della zona A, con l'eccezione dei livelli espositivi della popolazione che fa uso di impianti autonomi (scenario 5), che non presentano le criticità della zona A. Nello scenario "baseline" (scenario 1) la principale fonte di esposizione al PFOA per i bambini (e in misura minore, per gli adolescenti) è il latte vaccino, seguito dall'acqua e dalle uova e prodotti a base di uova. Negli scenari 2, 3 e 5, in riferimento alla zona A, l'acqua diventa la principale fonte di esposizione al PFOA (69-87% dell'esposizione alimentare globale). Negli adulti e negli anziani, l'acqua è la principale fonte di esposizione nello scenario di "baseline", seguita da latte, uova e prodotti a base di uova e pesce. Negli scenari 2, 3 e 5, in riferimento alla zona A, il contributo dell'acqua all'esposizione al PFOA diviene ancora più preponderante (76-95% dell'esposizione alimentare globale). Lo scenario 4,

tanto per la zona A che per la zona B, vede invece tutti i gruppi alimentari contribuire all'esposizione in modo analogo allo scenario di "baseline", per tutte le fasce d'età. Negli scenari che contemplano il consumo di prodotti alimentari di produzione locale, le uova, e i prodotti a base di uova, divengono una fonte espositiva importante in termini percentuali, che diventa preponderante (42-48% del totale, secondo la fascia d'età) nello scenario 8 in cui – rispetto agli scenari 6, 7 e 9 – l'acqua torna a contribuire all'esposizione complessiva in termini analoghi a quelli dello scenario di "baseline". Un altro alimento che fornisce un contributo percentuale rilevante all'esposizione nello scenario 8 è la carne bovina (fino al 17% negli adolescenti). Nella zona B si osservano invece – sempre per lo scenario 8 – contributi percentuali dei vari alimenti sovrapponibili allo scenario di "baseline". Nel caso del PFOS l'esposizione media stimata mostra solo un limitato incremento rispetto a quella di "baseline" (scenario 1) nella fase precedente agli interventi sulla rete acquedottistica, sia nella zona A che nella zona B. Gli alimenti (specialmente il pesce e i prodotti ittici e le uova) hanno un contributo percentuale all'esposizione marcatamente più elevato (e l'acqua marcatamente inferiore) rispetto al PFOA.

## Caratterizzazione del rischio

L'esposizione alle due sostanze è stata valutata in relazione al TWI di gruppo di 8 ng/kg p.c. per settimana per la somma di PFOA, PFOS, PFNA e PFHxS.

Per il PFOA (Tabella 2), nello scenario "baseline" l'esposizione della popolazione adulta è pari al 30% circa del TWI (95° percentile pari al 60% circa). L'esposizione aumenta per le fasce giovanili della popolazione ed è il 90% del TWI per i bambini.

Nell'area rossa, per le famiglie della zona A allacciate alla rete acquedottistica, prima dell'intervento sulla rete medesima, l'esposizione degli adulti era di 4 volte il TWI. Nella zona B, l'esposizione degli adulti era di 3 volte il TWI. Questi rapporti erano circa doppi nel caso dei bambini. L'intervento sulla rete ha prodotto una drastica diminuzione dell'esposizione e oggi l'esposizione stimata è indistinguibile da quella di "baseline", anche per la zona A. Per le famiglie della zona A che fanno uso di impianti autonomi l'esposizione permane invece elevata (1,9 e 4,1 volte il TWI per gli adulti e i bambini, rispettivamente).

Il consumo di alimenti di origine locale, nello scenario 8, determina per gli adulti un aumento dell'esposizione al 50% del TWI, mentre è 1,2 volte il TWI al 95° percentile. L'impatto è minore nel caso dei bambini (cfr. con gli scenari 1 e 4). Per il PFOS (Tabella 3), l'esposizione "baseline" degli adulti è pari a 1,3 volte il TWI. L'esposizione media stimata negli scenari espositivi contemplanti l'uso di acqua di rete si innalza lievemente al di sopra di questo valore nella fase precedente agli interventi sulla rete acquedottistica, sia nella zona A che nella zona B. Col consumo di alimenti locali in aggiunta a quello dell'acqua di rete l'esposizione media degli adulti prima degli interventi era pari a 1,7 volte il TWI (scenario 6), mentre oggi è 1,5 volte il TWI (scenario 8). Col consumo di acqua di pozzo tale esposizione è 1,7 volte il TWI (scenario 9). Contrariamente al PFOA, l'esposizione al PFOS dei bambini è inferiore a quella degli adulti in tutti gli scenari espositivi. Altra differenza sostanziale rispetto al PFOA sono le esposizioni elevate (95° percentile) che si distanziano notevolmente da quelle medie, segnalando una distribuzione fortemente asimmetrica, vale a dire con un maggiore numero di soggetti aventi esposizioni considerevolmente superiori a quella media. In questi soggetti l'esposizione e il rischio associato sono marcatamente elevati. L'esposizione cumulativa di "baseline" a PFOA e PFOS è pari a 1,6 volte il TWI per gli adulti e 1,7 volte il TWI per i bambini. Oggi, tali valori sono pari a 2,0 e 2,1 volte il TWI per i soggetti residenti nella zona A che consumano alimenti locali (scenario 8) e aumenta a 3,8 e 5,8 volte il TWI per i residenti che in aggiunta si servono dell'acqua dei pozzi privati a scopo potabile.

**Tabella 2. Rapporto esposizione al PFOA in LB (95° percentile) vs. TWI di gruppo per la popolazione del Veneto e della zona rossa A nei diversi scenari di esposizione**

Scenari di esposizione	Classe di età				
	Bambini	Adolescenti	Adulti	Anziani	Molto anziani
<b>Veneto</b>					
<b>Scenario 1 "baseline"</b>					
LB	0,9	0,4	0,3 (0,6)	0,3	0,3
<b>Zona Rossa A - Solo Acqua locale</b>					
<b>Scenario 2</b>					
LB	8,2	4,9	4 (8,4)	4,1	3,9
<b>Scenario 3</b>					
LB	2,5	1,4	1,1 (2,3)	1,1	1,1
<b>Scenario 4</b>					
LB	0,8	0,4	0,3 (0,6)	0,3	0,3
<b>Scenario 5</b>					
LB	4,1	2,4	1,9 (3,9)	1,9	1,9
<b>Zona Rossa A - Acqua e alimenti locali</b>					
<b>Scenario 6</b>					
LB	8,3	5,2	4,2 (9)	4,2	4,0
<b>Scenario 7</b>					
LB	2,6	1,7	1,3 (2,5)	1,3	1,2
<b>Scenario 8</b>					
LB	0,9	0,6	0,5 (1,2)	0,4	0,4
<b>Scenario 9</b>					
LB	4,1	2,6	2,1 (4,3)	2,1	2,0

**Tabella 3. Rapporto esposizione al PFOS in LB (media e 95° percentile) vs. TWI di gruppo per la popolazione della zona rossa A nei 9 scenari di esposizione**

Scenari di esposizione	Classe di età				
	Bambini	Adolescenti	Adulti	Anziani	Molto anziani
<b>Veneto</b>					
<b>Scenario 1 "baseline"</b>					
LB	0,8	0,4	1,3 (7,8)	1,0	0,8
<b>Zona Rossa A - Solo Acqua locale</b>					
<b>Scenario 2</b>					
LB	1,2	0,7	1,5 (8,1)	1,2	1,0
<b>Scenario 3</b>					
LB	0,8	0,4	1,3 (7,9)	1,0	0,8
<b>Scenario 4</b>					
LB	0,8	0,4	1,3 (7,8)	1,0	0,8
<b>Scenario 5</b>					
LB	1,3	0,7	1,5 (8,1)	1,2	1,0
<b>Zona Rossa A - Acqua e alimenti locali</b>					
<b>Scenario 6</b>					
LB	1,6	0,9	1,7 (8,3)	1,4	1,1
<b>Scenario 7</b>					
LB	1,2	0,7	1,5 (8,2)	1,2	0,9
<b>Scenario 8</b>					
LB	1,2	0,6	1,5 (8,1)	1,1	0,9
<b>Scenario 9</b>					
LB	1,7	0,9	1,7 (8,4)	1,4	1,1

Va sottolineato che questi elevati livelli espositivi e di rischio sono raggiunti senza il contributo di PFNA e PFHxS. Sebbene presumibilmente più ridotto, secondo le stime EFSA (3), il contributo di PFNA e PFHxS determina un ulteriore aumento, attualmente non quantificabile, dell'esposizione complessiva ai PFAS per il quale il TWI di gruppo è fissato; pertanto, tale contributo rappresenta un'incertezza che riduce in qualche misura il carattere cautelativo della stima del rischio.

Gli allevatori, in particolare, e con essi tutti i soggetti che presentano un significativo consumo di prodotti locali e/o autoprodotti (specialmente alimenti di origine animale), sono verosimilmente un sottogruppo di popolazione con esposizioni elevate. L'uso di acqua con significativi livelli di PFAS nelle attività agro-zootecniche può essere un fattore importante nel determinare un aumentato ingresso di PFAS nella filiera alimentare e, di conseguenza, un'aumentata esposizione per chi consuma prodotti che da essa originano. Il contemporaneo consumo di acqua potabile prodotta da impianti autonomi può determinare, specialmente per il PFOA nella zona A, il raggiungimento di livelli espositivi particolarmente elevati.

Ogni stima è affetta da incertezze e l'analisi delle incertezze è parte integrante di una corretta e trasparente valutazione del rischio. Una discussione delle incertezze che insistono sulla valutazione qui esposta è presentata altrove (6). Pur tenendo conto di tali incertezze, i dati mostrano come in taluni scenari realistici l'esposizione alimentare sia significativamente superiore al TWI definito da EFSA, indicando la necessità di misure di gestione e riduzione del rischio.

## Bibliografia

1. EFSA CONTAM Panel, 2008. Opinion on Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts. *EFSA Journal* 2008;6(7):653-784.
2. EFSA CONTAM Panel, 2018. Scientific Opinion on the risk to human health related to the presence of perfluorooctane sulfonic acid and perfluorooctanoic acid in food. *EFSA Journal* 2018;16(12):5194-478.
3. EFSA CONTAM Panel, 2020. Scientific opinion on the risk for human health related to the presence of perfluoroalkyl substances in food. *EFSA Journal* 18(9):6223:391.
4. EFSA Scientific Committee, 2019. Guidance on harmonised methodologies for human health, animal health and ecological risk assessment of combined exposure to multiple chemicals. *EFSA Journal* 2019;17(3):5634-711.
5. World Health Organization (WHO). *Keeping our water clean: the case of water contamination in the Veneto Region, Italy*. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2017. Disponibile al sito: [https://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0019/341074/pfas-report-20170606-h1330-print-isbn.pdf](https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0019/341074/pfas-report-20170606-h1330-print-isbn.pdf).
6. Istituto Superiore di Sanità (ISS - Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e sanità pubblica Veterinaria). *Contaminazione da sostanze perfluoroalchiliche in Veneto: valutazione dell'esposizione alimentare e caratterizzazione del rischio - Relazione finale*; Regione Veneto; 2018. Disponibile al link: <https://www.regione.veneto.it/web/sanita/tutela-acque-destinate-al-consumo-umano>.
7. Ingelido AM, Abballe A, Gemma S, Dellatte E, Iacovella N, De Angelis G, Zampaglioni F, Marra V, Miniero R, Valentini S, Russo F, Vazzoler M, Testai E, De Felip E. Biomonitoring of perfluorinated compounds in adults exposed to contaminated drinking water in the Veneto Region, Italy. *Environment International* 2018;110:149-59.

# **RUOLO DELLA BARRIERA EPITELIALE INTESTINALE NELLE PATOLOGIE GLUTINE DIPENDENTI**

Olimpia Vincentini

*Dipartimento di Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## **Introduzione**

Negli ultimi anni la prevalenza dei disordini correlati all'ingestione di glutine è notevolmente aumentata, un fenomeno associato a diversi fattori tecnologici, ambientali e biologici.

La crescente complessità nella nomenclatura e la presentazione clinica di patologie legate all'ingestione di glutine hanno portato allo sviluppo di nuova classificazione che comprende diverse patologie: Celiachia, Dermatite erpetiforme, Atassia da glutine, Sensibilità al glutine non celiaca, e Allergia al grano, che presentano sovrapposizioni nella presentazione clinica.

Ogni disturbo esibisce una risposta fisiopatologica unica dopo l'ingestione di glutine, complesso proteico principale del grano con componenti proteiche che si trovano anche in altri cereali, tra cui farro, segale e orzo.

Recenti studi suggeriscono che la barriera mucosale intestinale sia primariamente coinvolta nella risposta: infatti la presenza di glutine altera molti dei meccanismi di barriera, con perdita della sua funzione, dando il via a una serie di risposte immuni, sia innate che adattative, che causano il danno intra ed extra-intestinale.

## **Celiachia, sensibilità al glutine e allergia: tre patologie innescate dallo stesso alimento. Il ruolo della barriera intestinale**

L'aumento dei disordini correlati all'ingestione di glutine è notevolmente aumentata, fenomeno che associato da una parte al miglioramento delle metodiche diagnostiche, dall'altra a fattori ambientali che comprendono diverse ipotesi tra cui l'utilizzo di varietà di grano con un più alto contenuto di glutine rispetto al passato a causa di cambiamenti tecnologici nella coltivazione, o anche le infezioni virali (1), o l'uso dell'enzima transglutaminasi nei cibi pronti al consumo (2), oppure ancora l'uso di antibiotici nella prima infanzia (3), la quantità di glutine nello svezzamento (4) o una disbiosi del microbioma che favorisca la patologia attuali (5).

Si è assistito anche a un aumento del consumo mondiale di frumento. Infatti, molti Paesi stanno vivendo una progressiva occidentalizzazione, con un aumento della dieta mediterranea, che si basa su un ampio numero di alimenti che incorporano il glutine (compreso il frumento). In particolare, il consumo di grano sta progressivamente sostituendo il consumo di riso in molti Paesi del Nord Africa, Medio Oriente, e Asia (6).

Esistono inoltre nuove varianti di grano che si sono create come risultato della meccanizzazione sempre più marcata dell'agricoltura e del crescente utilizzo di pesticidi e fertilizzanti che potrebbero avere avuto un ruolo determinante nell'aumentata concentrazione di peptidi tossici nei "nuovi" cereali (gliadine, glutenine, inibitori dell'amilasi tripsina). Anche il

tempo di lievitazione dei prodotti da forno si è progressivamente ridotto con il risultato di una diminuita digestione dei peptidi tossici del glutine all'interno di tali alimenti (7).

Tutti questi fattori hanno portato a un aumento di disturbi clinici sia di tipo intestinale che extra-intestinale (8).

I disturbi correlati al glutine possono essere suddivisi in gruppi di entità cliniche che condividono l'esposizione alimentare come fattore eziologico, sono classificati principalmente in autoimmuni (come celiachia, dermatite erpetiforme, atassia del glutine), allergici (allergia al grano) e possibilmente immuno-mediata (come la sensibilità al glutine/grano non celiaca) (Figura 1). Ogni disturbo mostra una risposta fisiopatologica unica, anche se ci possono essere delle sovrapposizioni nella presentazione clinica.

L'esistenza di questa vasta gamma di reazioni avverse al glutine ha sollevato la questione del perché questa proteina alimentare sia così problematica per tanti individui nel mondo (9).

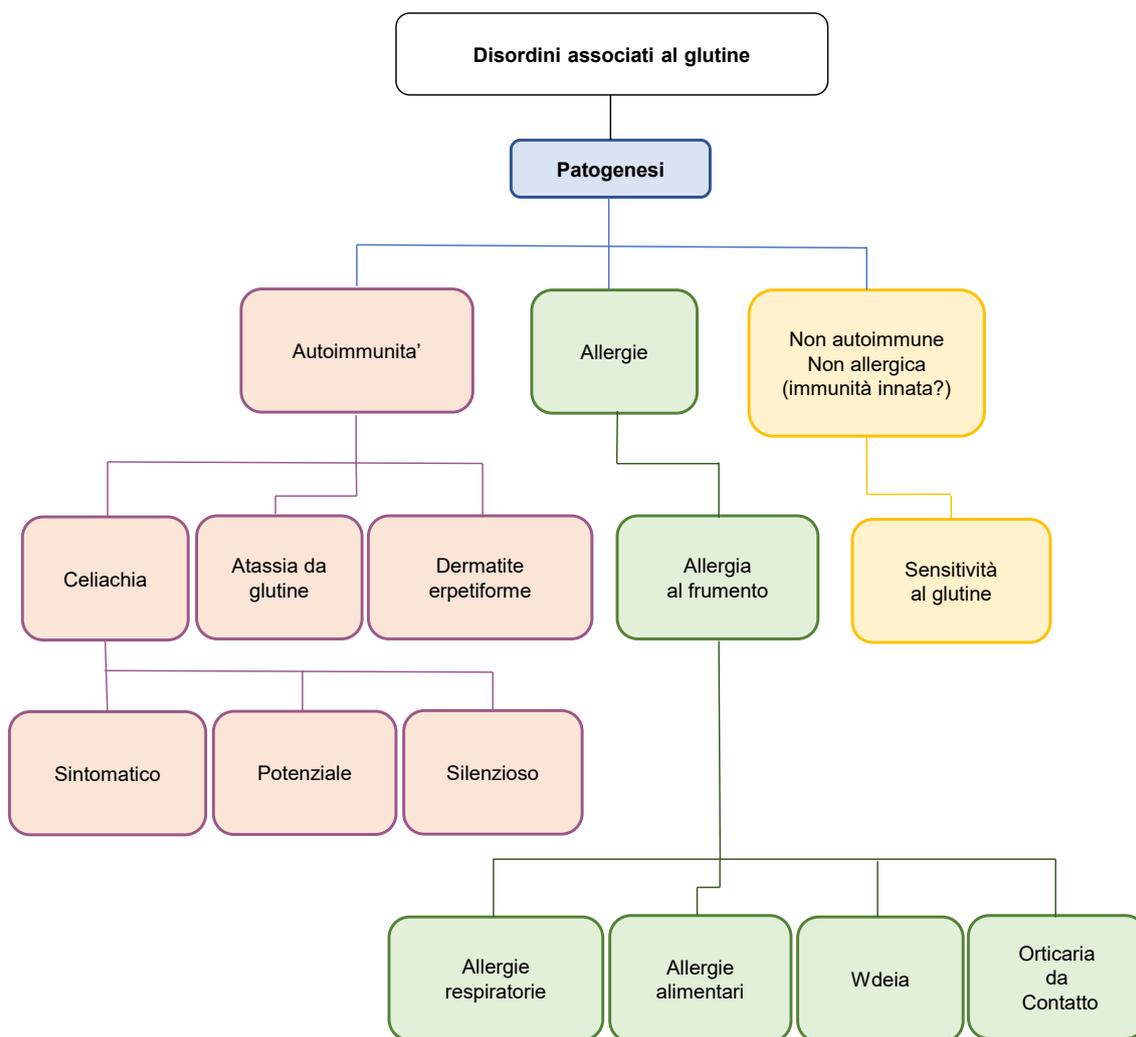


Figura 1. Classificazione dei disturbi legati al glutine (tratto da Sapone, 2012) (9)

La barriera intestinale ha un ruolo cruciale nella protezione dell'organismo da agenti patogeni e possibili sostanze nocive derivate dall'ambiente esterno. Cellule epiteliali, immunitarie, componenti del microbiota intestinale e i peptidi antimicrobici svolgono funzioni cruciali nel mantenimento della sua funzione di barriera difensiva.

In condizioni fisiologiche l'epitelio intestinale, grazie alle giunzioni strette (*tight junctions*) intercellulari, forma una barriera al passaggio di macromolecole quali il glutine; solo piccole quantità di frazioni antigeniche supera la barriera epiteliale. Gran parte di queste proteine (>90%) oltrepassa la barriera attraverso la via trans-cellulare; durante questo percorso i peptidi subiscono una degradazione lisosomiale che li rende inattivi dal punto di vista immunologico.

Le rimanenti frazioni antigeniche sono invece trasportate intatte attraverso la via para-cellulare grazie a una fine regolazione delle *tight junctions*, portando allo sviluppo di una risposta immunitaria che si traduce in uno stato di tolleranza antigenica (10).

La barriera epiteliale intestinale garantisce la "tolleranza" agli antigeni comuni sia mediante la trasformazione delle proteine in piccoli peptidi non immunogeni sia attraverso la distruzione per apoptosi delle cellule che si sono attivate nella rapida e transitoria risposta immune.

Sebbene la compromissione della barriera epiteliale sia descritta in tutte e tre le condizioni cliniche, il suo ruolo di potenziale di co-fattore patogenetico, in particolare nella celiachia e nella sensibilità al grano non celiaca, è ancora una questione dibattuta (11). Precedenti studi hanno dimostrato che la gliadina può causare un aumento immediato e transitorio della permeabilità intestinale (12).

Questo effetto è secondario al legame di specifici frammenti di gliadina non digeribili al recettore della chemochina CXCR3 con successivo rilascio di zonulina, un modulatore di giunzioni intercellulari strette (13). Questo processo si svolge in tutte le persone che ingeriscono glutine.

Per la maggior parte, questi eventi non portano a conseguenze anormali. Tuttavia, questi stessi eventi possono portare a un processo infiammatorio in soggetti geneticamente predisposti quando il sistema di sorveglianza immunologica riconosce erroneamente il glutine come patogeno.

Il glutine è un complesso proteico che origina dall'unione, in presenza di acqua, di due tipi di proteine: la gliadina e la glutenina presenti nel frumento e in altri cereali (orzo, farro, segale e kamut). Gliadine e glutenine sono le principali frazioni proteiche del glutine e sono responsabili delle caratteristiche tecnologiche e nutrizionali dei prodotti a base di farina di frumento. Le glutenine formano un complesso reticolo nelle cui maglie vengono intrappolate le gliadine che a loro volta trattengono le molecole d'acqua rendendo l'impasto nello stesso tempo soffice ed elastico (14).

Le gliadine, solubili in alcool, rappresentano la classe di proteine con il ruolo eziologico più rilevante nei disturbi correlati al glutine in quanto sono contenuti i principali epitopi antigenici per i soggetti celiaci. Contengono sequenze altamente ripetute di glutammina e residui di prolina che li rendono resistenti alla completa digestione nell'intestino perché nel tratto digerente dell'uomo mancano enzimi digestivi (prolil-endopeptidasi) in grado di rompere il legame endopeptidico.

## Celiachia

È una Enteropatia autoimmune permanente scatenata dal glutine-gliadina del grano e dalle analoghe proteine alcool-solubili di segale (secalina) e orzo (ordeina) in soggetti geneticamente predisposti, portatori degli alleli DQ2/8.

La celiachia colpisce l'1% della popolazione e rappresenta un modello unico di malattia autoimmune, dal momento che è noto l'autoantigene (tTG), il *trigger* ambientale (glutine) e uno

specifico allele (*Human Leukocyte Antigen*, HLA) è presente nella totalità dei pazienti. L'eliminazione del *trigger* ambientale determina la remissione della malattia e la successiva riesposizione provoca la riaccensione della infiammazione. La diagnosi di celiachia è effettuata mediante uno *screening* iniziale sierologico seguito per la conferma da biopsia intestinale.

Il test sierologico di elezione per la diagnosi di celiachia è la ricerca degli anticorpi antitransglutaminasi IgA, che mostra una specificità e una sensibilità del 95% (15).

In seguito alla comparsa della malattia celiaca si osserva un progressivo appiattimento della mucosa fino ad arrivare alla completa atrofia dei villi associata a ipertrofia delle cripte, con infiltrazione di cellule infiammatorie (plasmacellule, linfociti, eosinofili e mastcellule).

Nella celiachia la presenza del glutine altera molti dei meccanismi di barriera, con perdita della sua funzione, e dà il via a una serie di risposte immuni sia innate che adattative che esitano nel danno intra ed extra-intestinale (16).

Affinché si realizzi la reazione immunitaria responsabile della malattia è necessario che la gliadina superi l'epitelio intestinale e raggiunga la lamina propria, sede in cui ha inizio la anomala risposta del sistema immunitario che porterà successivamente al danno tissutale (17).

La gliadina stimola la risposta immune innata, a sua volta impostando il tipo e l'intensità della risposta immunitaria adattativa stimolando una potente attivazione delle cellule T gliadino-specifica della lamina propria.

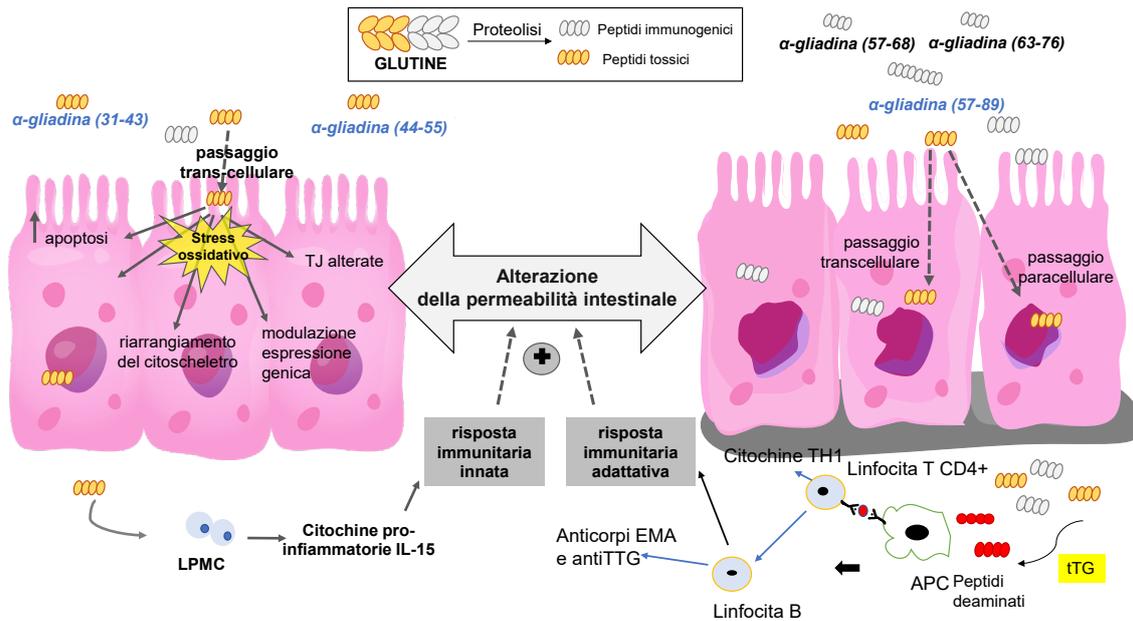
Nelle prime fasi della celiachia l'integrità delle *tight junctions*, e quindi la permeabilità dell'epitelio intestinale, risulta alterata, si nota una modificazione citoscheletrica degli enterociti che permette la migrazione dei linfociti verso le cellule presentanti l'antigene (APC) che in questo modo possono attivarsi (17); si assiste perciò a un maggiore assorbimento di macromolecole, tra cui il glutine.

Responsabile di questa aumentata permeabilità intestinale sembra essere una aumentata espressione della zonulina (peptide intestinale coinvolto nella regolazione delle *tight junctions*) (13).

L'esposizione alla gliadina ha mostrato di alterare le proprietà barriera delle cellule epiteliali intestinali Caco-2, causando una riduzione dei livelli di resistenza elettrica trans-epiteliale (*Transepithelial Electrical Resistance*, TEER) e un aumento della permeabilità al destrano 4 kDa associato a una ridotta espressione di occludina, ZO-1 e claudins-3 e -4 (18, 19).

Il glutine assunto con la dieta è digerito dagli enzimi digestivi producendo una miscela di peptidi resistenti agli enzimi pancreatici e alle peptidasi intestinali, tra cui due peptidi che raggiungono il lume intestinale dove innescano due distinti percorsi immunologici: il peptide immunogenico 33-mer, che avvia una forte risposta del sistema immunitario adattivo e il peptide 31-43 che stimola l'immunità innata (Figura 2).

Il 33-mer è assorbito intatto per via trans/para-cellulare nella lamina propria, contiene un motivo centrale ridondante PQQQLPY ricco di proline e glutammine la cui esposizione alla tTG causa la deamidazione dei residui di glutamina in acido glutamico che aumenta l'affinità di legame con l'HLA DQ2-DQ8 delle cellule APC (Antigen Presenting Cells), attivando così la risposta adattativa con formazione di anticorpi contro la transglutaminasi tissutale (TG-2) ha assunto ruolo patogenico in quanto modifica gli epitopi delle cellule T specifiche della gliadina, ma è anche l'autantigene riconosciuto da specifici anticorpi. I linfociti Th1 attivati indirizzano la risposta immunitaria attraverso il rilascio di citochine quali  $\gamma$ -interferone (IFN- $\gamma$ ) che genera lo stato infiammatorio, riduce la resistenza delle giunzioni strette, aumentando la permeabilità alle cellule della risposta immunitaria e ai peptidi gliadinici, e stimola la secrezione degli anticorpi caratteristici della patologia e IL-2 che stimolano la proliferazione e il differenziamento dei linfociti T citotossici (Cytotoxic T Lymphocytes, CTL).



**Figura 2. Ruolo dei peptidi tossici e immunoigenici nel causare il danno intestinale. Ambedue attraversano l'epitelio attivando la risposta immunitaria innata e adattativa nei soggetti celiaci (adattata da Ferretti, 2012) (20)**

I linfociti appartenenti alla sottopopolazione Th2, invece, indirizzano la risposta immunitaria in senso umorale dell'immunità acquisita, secernendo fattori quali IL-4, IL-5, IL-10 che inducono la proliferazione e il differenziamento dei linfociti (20).

Il peptide p31-43 è coinvolto invece nell'attivazione dell'immunità innata inducendo l'espressione dei primi marcatori di attivazione epiteliale e porta all'apoptosi enterocitaria sia nell'intestino dei celiaci che in linee cellulari intestinali sensibili, inducendo la produzione di IL-15 negli enterociti e nelle cellule dendritiche, stimolando la proliferazione di linfociti CD8+ con TCR  $\alpha/\beta$ , cellule NK, linfociti TCR  $\gamma/\delta$ + e agisce come fattore di crescita per gli IELs. Inoltre, i frammenti gliadinici hanno mostrato di indurre la maturazione funzionale e fenotipica di cellule dendritiche anche di soggetti non celiaci (22, 23). Il p31-43 ha mostrato di attivare le cellule Caco-2 mediante un'aumentata espressione di proteine coinvolte nell'infiammazione come IRak, nfbk, p44/42 (23) e di indurre il rilascio di citochine infiammatorie in un sistema di cocultura bidimensionale con linfociti di pazienti celiaci (24).

L'internalizzazione del p31-43 a livello epiteliale tramite endocitosi induce un'attivazione precoce della trans-glutaminasi tissutale (TG2), favorendo uno stato pro-ossidativo: ciò indica che la TG2 non è solo centrale per la risposta adattativa alla gliadina come principale enzima deamidante degli epitopi immunodominanti, ma è anche un attore chiave nell'inizio dell'infiammazione nella celiachia. L'accumulo lisosomiale del p31-43 induce una attivazione epiteliale attraverso l'asse ROS-TG2 generando un fenotipo proinfiammatorio che porta a una perturbazione di meccanismi regolatori sulla superficie mucosale e un'interferenza nel processo autofagico. La transglutaminasi agisce dunque come un reostato di ubiquitinazione e degradazione del proteasoma inducendo l'infiammazione attraverso la diminuita espressione del PPAR $\gamma$  (25).

## Sensibilità al glutine non celiaca

La più recente definizione afferma che la sensibilità al glutine non celiaca (*Non Celiac Gluten Sensitivity*, NCGS) è una condizione in cui i sintomi sono causati dall'ingestione di glutine in assenza di anticorpi specifici per la celiachia e una atrofia dei villi classica, con una presentazione variabile dell'HLA e di anticorpi anti-glutadina di primo livello. Dal punto di vista genetico il *gluten sensitivity* presenta una positività per HLA-DQ2 e/o DQ8 nel 50% dei casi circa rispetto al riscontro di questi marker genetici nel 99% dei celiaci e nel 30% della popolazione generale (26).

La presentazione clinica della NCGS comprende sintomi gastrointestinali, come dolori e gonfiore addominali, nausea e sintomi extra-intestinali come fatica, mal di testa, dolori articolari e muscolari, disturbi dell'umore e manifestazioni cutanee (es. eczema o eruzioni cutanee) (8). Questi sintomi compaiono a breve distanza dall'ingestione del glutine, scompaiono con l'astinenza da glutine e ricompaiono in seguito a challenge con glutine, a distanza di poche ore o qualche giorno.

Contrariamente alla celiachia e alla allergia al grano, non ci sono chiari criteri sierologici o istopatologici per confermare la diagnosi di NCGS. La diagnosi di *gluten sensitivity* è infatti al momento una diagnosi di esclusione, caratterizzata dalla negatività dei test immunologici per l'allergia al grano (anticorpi di classe IgE diretti verso il grano e Prick test), dalla negatività per la sierologia tipica per celiachia (anticorpi anti-endomisio e anti-transglutaminasi) e da una biopsia intestinale normale o con alterazioni minime (Marsh 0/1 con incremento dei linfociti intra-epiteliali, ma con villi assolutamente normali). Sui pazienti sensibili al glutine è stato riscontrato, mediante test lattulosio-mannitolo, un danno della barriera intestinale, rivelatosi reversibile a seguito dell'eliminazione di alimenti contenenti frumento.

Le cause della sensibilità al glutine di tipo non celiaco sono ancora oggetto di studio e ricerca, sebbene le evidenze suggeriscano un'alterazione dei meccanismi legati all'immunità innata piuttosto che un'attivazione di quella adattiva (27). Possono entrare in causa diverse componenti. In primo luogo, oltre al glutine, diverse proteine del frumento, per esempio gli inibitori dell'amilasi/inibitori della tripsina (*Amylase/Trypsin Inhibitors*, ATI), una famiglia di proteine a basso peso molecolare altamente resistente alla proteolisi intestinale in grado di stimolare l'immunità innata (28). In secondo luogo, i cosiddetti *Fermentable Oligosaccharides, Disaccharides, Monosaccharides And Polyols* (FODMAP), carboidrati ad alta fermentazione dei cereali, lattosio e fruttani sono oggetto di numerose e controverse "discussioni" e sono stati indicati come la causa di alcuni sintomi in soggetti con intestino irritabile e pazienti NCGS. Dato che il grano è una delle principali fonti di FODMAP, questo può spiegare i vantaggi della dieta priva di glutine. Tuttavia, va sottolineato che i FODMAP non possono essere esclusivamente responsabili dei sintomi presenti nei soggetti NCGS, poiché questi pazienti sperimentano una risoluzione dei sintomi durante una dieta aglutinata pur continuando a ingerire FODMAP da altre fonti, come legumi (una fonte molto più ricca di FODMAP rispetto al grano. Sarebbe dunque più corretto parlare di sensibilità al grano di tipo non celiaco, piuttosto che sensibilità al glutine. Questa è una grande differenza, almeno per gli scienziati nel campo alimentare in quanto è plausibile che anche altre componenti del grano possano essere coinvolte nel disturbo e sicuramente l'esposizione al glutine non può essere usata in maniera intercambiabile con l'esposizione al grano (29).

## Allergia al grano

L'allergia al grano è un disturbo caratterizzato dall'attivazione immunitaria in cui le cellule T helper di tipo 2 (Th2) mediano le reazioni delle immunoglobuline E (IgE) e non IgE dopo l'esposizione (di solito nella dieta) al grano. Sintomi possono essere lievi, come dermatite atopica, asma, vomito, dolore addominale e diarrea o gravi come shock anafilattico (8).

Nelle reazioni non IgE, la presenza di grano può portare a una risposta immunitaria caratterizzata da infiammazione mediata da cellule T ed eosinofili nel tratto gastrointestinale. La barriera difettosa è ritenuta come un fattore chiave nelle allergie non mediate da IgE come l'esofagite eosinofila o gastrite eosinofila.

Al contrario, si ritiene che le allergie IgE-dipendenti sono il risultato di una alterazione della tolleranza orale che causa una alterazione immunitaria distorta da Th2 con produzione di anticorpi IgE specifiche e degranolazione di istamina dai mastociti che danneggiano la barriera intestinale. A differenza inoltre della celiachia, in cui l'attore principale è il glutine, nell'allergia al grano possono intervenire altri "attori", ossia altre componenti del grano oltre alle glutenine e gliadine (componenti del glutine), ma anche albumine, prolamine e globuline. Un esempio è costituito dall'inibitore dell'alfa-amilasi, presente nel grano e causa sia di reazioni allergiche respiratorie che alimentari. Un altro esempio sono le nsLTP (*non specific Lipid Transfer Protein*), una famiglia di proteine presenti nel regno vegetale e in alcuni pollini. Questa proteina può causare reazioni allergiche sia di tipo inalatorio che alimentare; si sospetta anche un effetto sensibilizzatore da contatto.

Da un punto di vista clinico, l'allergia al grano si può manifestare come:

- allergia alimentare, con le sue manifestazioni classiche, gastrointestinali, cutanee (es. orticaria, dermatite atopica nei bambini), bronchiali, nei bambini la dermatite atopica; nell'adulto si manifesta prevalentemente con quella che si definisce "analifassi cibo dipendente esercizio indotta" (*Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis*, WDEIA);
- allergia di tipo respiratorio: asma del panettiere o raffreddore allergico del panettiere, malattia tipicamente professionale, in cui la via di ingresso dell'allergene è la via inalatoria;
- orticaria da contatto, che si osserva principalmente nei soggetti che per motivi di lavoro si trovano più a contatto con derivati del glutine; ma è presente anche ad esempio in quelle donne predisposte che utilizzano cosmetici che contengono idrolizzati proteici di glutine (10).

La percentuale delle persone colpite da allergie alimentari oscilla tra l'11 e il 25%, mentre le popolazioni del Nord Europa sono più soggette all'allergia al grano di quelle del Sud Europa.

Si osserva principalmente nei bambini e tende a migliorare o risolversi in età adulta. Gli adulti soffrono invece di una forma permanente di allergia al glutine del grano o dell'anafilassi grano-dipendente indotta dall'esercizio fisico (WDEIA) (11).

I test diagnostici di primo livello nella allergia al grano includono il dosaggio degli anticorpi specifici IgE (RAST) nel siero e il Prick Test (cutaneo), tuttavia il valore predittivo di questi esami è inferiore al 75%, specialmente negli adulti, a causa di una cross-reattività con i pollini dell'erba. Inoltre molti reagenti per Prick Test in commercio hanno una bassa sensibilità poiché sono delle miscele di proteine del grano idrosolubili e che quindi non hanno gli allergeni della frazione insolubile della gliadina. Negli ultimi anni sono state isolate e individuate come allergeni numerose proteine del grano e alcune di loro sono attualmente utilizzate nei test diagnostici *in vitro*, aumentandone l'accuratezza e la sensibilità.

L'introduzione dei cereali nell'alimentazione umana, avvenuta circa 10000 anni fa, ha creato le condizioni per lo sviluppo nell'uomo, di malattie correlate all'esposizione al glutine. Una dieta priva di glutine è d'obbligo per i soggetti celiaci e migliora i sintomi nella NCGS, ma a lungo

termine una dieta priva di glutine può essere associata a deficienze nutrizionali, per tale motivo richiede di essere monitorata nella sua gestione.

## Bibliografia

1. Bouziat R, Hinterleitner R, Brown JJ, Stencel-Baerenwald JE, Ikizler M, Mayassi T, Meisel M, Kim SM, Discepolo V, Pruijssers AJ, Ernest JD, Iskarpatyoti JA, Costes LM, Lawrence I, Palanski BA, Varma M, Zurenski MA, Khomandiak S, McAllister N, Aravamudhan P, Boehme KW, Hu F, Samsom JN, Reinecker HC, Kupfer SS, Guandalini S, Semrad CE, Abadie V, Khosla C, Barreiro LB, Xavier RJ, Ng A, Dermody TS, Jabri B. Reovirus infection triggers inflammatory responses to dietary antigens and development of celiac disease. *Science* 2017;356(6333):44-50.
2. Lerner A, Matthias T. Processed food additive microbial transglutaminase and its cross-linked gliadin complexes are potential public health concerns in celiac disease. *Int J Mol Sci* 2020;8;21(3):1127.
3. Dydensborg Sander S, Nybo Andersen AM, Murray JA, Karlstad Ø, Husby S, Størdal K. association between antibiotics in the first year of life and celiac disease. *Gastroenterology* 2019;156(8):2217-29.
4. Lionetti E, Castellana S, Francavilla R, Pulvirenti A, Tonutti E, Amarri S, Barbato M, Barbera C, Barera G, Bellantoni A, Castellano E, Guariso G, Limongelli MG, Pellegrino S, Polloni C, Ughi C, Zuin G, Fasano A, Catassi C; SIGENP Working group on Weaning and CD Risk. Introduction of gluten, HLA status, and the risk of celiac disease in children. *N Engl J Med* 2014;2;371(14):1295-303.
5. Valitutti F, Cucchiara S, Fasano A. Celiac disease and the microbiome. *Nutrients* 2019;11(10):2403.
6. Catassi C, Cobellis G. Coeliac disease epidemiology is alive and kicking, especially in the developing world. *Dig Liver Dis* 2007;39(10):908-10.
7. de Lorgeril M and Salen P. Gluten and wheat intolerance today: are modern wheat strains involved? *Int J Food Sci Nutr* 2014;65(5):577-81.
8. Elli L, Branchi F, Tomba C, Villalta D, Norsia L, Ferretti F, Roncoroni L, Bardella MT. Diagnosis of gluten related disorders: Celiac disease, wheat allergy and non-celiac gluten sensitivity. *World J Gastroenterol* 2015;21(23):7110-9.
9. Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PH, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Rostami K, Sanders DS, Schumann M, Ullrich R, Villalta D, Volta U, Catassi C, Fasano A. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med* 2012;10(13).
10. Schumann M, Siegmund BJ, Schulzke D, Fromm D. Celiac disease: role of the epithelial barrier. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2017;3:150-62.
11. Cardoso-Silva D, Delbue D, Itzlinger A, Moerkens R, Withoff S, Branchi F, Schumann M. Intestinal barrier function in gluten-related disorders. *Nutrients* 2019;11(10):2325.
12. Silano M, Vincentini O, De Vincenzi M. Toxic, immunostimulatory and antagonist gluten peptides in celiac disease. *Curr Med Chem* 2009;16(12):1489-98.
13. Sturgeon C, Fasano A. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. *Tissue Barriers* 2016;4(4):e1251384.
14. Koning F. Adverse effects of wheat gluten. *Ann Nutr Metab* 2015;67(suppl 2):8-14.
15. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, Troncone R, Giersiepen K, Branski D, Catassi C, Lelegman M, Mäki M, Ribes-Koninckx C, Ventura A, Zimmer KP. ESPGHAN Working group on Coeliac disease diagnosis, on ESPGHAN Gastroenterology Committee; European Society for Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;54(1):136-60.

16. Odenwald MA, Turner JR. The intestinal epithelial barrier: A therapeutic target? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;14(1):9-21.
17. Clemente MG, De Virgiliis S, Kang JS, Macatagney R, Musu MP, Di Pierro MR, Drago S, Congia M, Fasano A. Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut* 2003;52(2):218-23.
18. Sander, GR, Cummins, AG, Henshall, T, Powell, BC. Rapid disruption of intestinal barrier function by gliadin involves altered expression of apical junctional proteins. *FEBS Lett* 2005;579:4851-5.
19. Capozzi A, Vincentini O, Gizzi P, Porzia A, Longo A, Felli C, Mattei V, Mainiero F, Silano M, Sorice M, Misasi R. modulatory effect of gliadin peptide 10-mer on epithelial intestinal CACO-2 cell inflammatory response. *PLoS One* 2013;8(6):e66561.
20. Ferretti G, Bacchetti T, Masciangelo S and Saturni L. Celiac Disease, Inflammation and Oxidative Damage: A Nutrigenetic Approach. *Nutrients* 2012;4(4):243-57.
21. Stepniak D, Koning F. Celiac disease--sandwiched between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol* 2006;67(6):460-8.
22. Palova Jelikova L, Rozkova D, Pecharova B, et al. Gliadin fragments induce phenotypic and functional maturation of human dendritic cells. *J Immunol* 2005;175:7038-45.
23. Giordani L, Del Pinto T, Vincentini O, Felli C, Silano M, Viora M. Two wheat decapeptides prevent gliadin-dependent maturation of human dendritic cells. *Exp Cell Res* 2014;321(2):248-54.
24. Vincentini O, Maialetti F, Gonnelli E, Silano M. Gliadin-dependent cytokine production in a bidimensional cellular model of celiac intestinal mucosa. *Clin Exp Med* 2015;15(4):447-54.
25. Luciani A, Villella VR, Vasaturo A, Giardino I, Pettoello-Mantovani M, Guido S, Cexus ON, Peake N, Londei M, Quarantino S, Maiuri L. Lysosomal accumulation of gliadin p31-43 peptide induces oxidative stress and tissue transglutaminase-mediated PPAR $\gamma$  downregulation in intestinal epithelial cells and coeliac mucosa. *Gut* 2010;59:311.
26. Catassi C Julio C Bai, Bonaz B, Bouma G, Calabrò A, Carroccio A, Gemma Castillejo, Ciacci, C Cristofori F, Dolinsek J, Francavilla R, Elli L, Green, P Holtmeier W, Koehler P, Koletzko S, Meinhold C, Sanders D, Schumann M, Schuppan D, Ullrich R, Vécsei A, Volta U, Zevallos V, Sapone A, Fasano A Non-Celiac Gluten sensitivity: the new frontier of gluten related disorders. *Nutrients* 2013;5(10):3839-53.
27. Leonard MM, Sapone A, Catassi C, Fasano A. Celiac disease and nonceliac gluten sensitivity: a review. *JAMA* 2017;318(7):647-56.
28. Junker Y, Zeissig S, Kim SJ, et al. Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. *J Exp Med* 2012;209(13):2395-408.
29. Biesiekierski JR, Peters SL, Newnham ED, Rosella O, Muir JG, Gibson PR. No effects of gluten in patients with self-reported non-celiac gluten sensitivity after dietary reduction of fermentable, poorly absorbed, short-chain carbohydrates. *Gastroenterology* 2013;145(2):320-8.

# APPROCCI *ONE HEALTH* NELLA VALUTAZIONE DEL RISCHIO DELLE SOSTANZE UTILIZZATE IN MANGIMISTICA

Alberto Mantovani, Ivana Purificato  
Dipartimento di Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma

## Introduzione

La *One Health* è un approccio che espande e sviluppa negli ambiti sia della ricerca sia dell'intervento, la collaborazione transdisciplinare in tutti i temi di sanità pubblica che coinvolgono la salute umana, la salute degli animali e l'ambiente. La *One Health* nasce molto prima che il termine fosse coniato dalla collaborazione medico-veterinaria sulle zoonosi. Attualmente, la *One Health* comprende anche la valutazione dei rischi tossicologici per la salute umana, animale e degli ecosistemi derivanti dalla esposizione delle filiere alimentari di origine animale e definiti "le nuove zoonosi" (1, 2). E, in questo ambito, l'alimentazione animale emerge oramai come un elemento cruciale per la salute dei consumatori e la sostenibilità della zootecnia.

## Alimentazione animale: uno "snodo" della *One Health*

Nella visione strategica del libro bianco della Commissione Europea (3) la sicurezza degli alimenti è un valore basilare che va tutelato, con la valutazione dei rischi basata su prove scientifiche, dai "campi alla tavola" vale dire partendo dalla salute degli organismi viventi produttori di alimenti, quindi anche da ciò che mangiano gli animali da reddito. Nell'alimentazione animale confluiscono fattori legati all'ambiente, alla fisiologia animale, alle tecnologie zootecniche, all'economia e alle esigenze dei consumatori. Costituendo un vero "snodo" della *One Health*.

Due aspetti emergenti del ruolo della mangimistica nella *One Health* sono la valutazione rischio-beneficio e la ricerca di ingredienti innovativi e più sostenibili. Il ruolo nella valutazione rischio-beneficio è particolarmente evidente in acquacoltura, dal momento che il pesce può essere visto come fonte determinante sia di nutrienti essenziali (omega-3, iodio, vitamine D3 e B12) sia di contaminanti (metilmercurio, diossine, policlorobifenili, polibromodifenil eteri -PBDE). La qualità e il tipo di ingredienti mangimistici sono cruciali per il bilancio fra contaminanti e nutrienti nell'alimento "pesce". Un notevole successo in questo campo è stato realizzato dal progetto Europeo AQUAMAX – cui ha partecipato il Dipartimento di Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) – con l'introduzione di mangimi a base vegetale per l'alimentazione dei salmonidi: si è così ridotto il bioaccumulo di interferenti endocrini e altri contaminanti tossici per l'età evolutiva (metilmercurio, diossine, PBDE) evitando, nel contempo, un calo significativo di omega-3 (4). Lo studio sui mangimi a base vegetale in acquacoltura ci porta all'ambito più della ricerca di ingredienti innovativi con (i) una maggiore sostenibilità ambientale (es. in termini di consumo di acqua e suolo) ed economica rispetto agli ingredienti convenzionali e, nel contempo, (ii) senza effetti indesiderati per la salute

animale e/o umana. L'elenco comprende sottoprodotti delle industrie alimentari, residui di biomasse e biocarburanti, alghe e, naturalmente, farine e altri ingredienti derivati da insetti (5).

La valutazione del rischio degli ingredienti innovativi deve tenere conto di fattori intrinseci (es. alte concentrazioni di zolfo e tannini nelle biomasse, con rischio per la salute animale), dell'eventuale capacità di bioaccumulo (es. di metalli pesanti nelle alghe), della qualità delle materie prime e della filiera, con pericoli che vanno dal "riciclo" di additivi o residui di imballaggi alla vulnerabilità bei confronti di contaminazioni batteriche e fungine. Pertanto, accanto agli aspetti nutrizionali e di sostenibilità, per ciascuna tipologia di ingredienti innovativo occorre individuare i possibili pericoli per la salute animale, umana e degli ecosistemi e le strategie per la gestione del rischio (6).

## Esempi di valutazioni dell'Autorità europea per la sicurezza alimentare

La *European Food Safety Authority* (EFSA) si articola in dieci gruppi permanenti di esperti (Panel) di cui uno specificamente dedicato agli additivi e alle sostanze utilizzate in alimentazione animale, il FEEDAP (*Panel on additives and products or substances used in animal feed* <https://www.efsa.europa.eu/en/panels/feedap>). Per contro la valutazione del rischio delle sostanze indesiderate nei mangimi, dalle micotossine agli elementi tossici, fa parte dei compiti del Panel sui contaminanti (CONTAM, *Panel on contaminants in the food chain*, <https://www.efsa.europa.eu/en/panels/contam>).

Le sostanze utilizzate in mangimistica rappresentano un gruppo ampio ed eterogeneo che va dai nutrienti (vitamine, elementi in traccia), ai coccidiostatici agli enzimi e ai probiotici, quindi gli utilizzi e le proprietà farmacodinamiche e farmacocinetiche sono disparate. Il FEEDAP, con un approccio interdisciplinare, deve valutare la sicurezza, e, conseguentemente i potenziali rischi, dell'additivo per gli animali e il consumatore, nonché le possibili ricadute per la sicurezza degli utilizzatori e per l'ambiente, alle condizioni d'uso proposte: specie animale/i, tipologia produttiva (es. pollo da carne, galline ovaiole) e concentrazioni nei mangimi (7). L'integrazione di informazioni molto diverse in una valutazione unitaria è un valido esempio pratico di messa in atto dell'approccio *One Health*.

Un gruppo di sostanze che – al contrario di enzimi e probiotici – presentano profili di tossicità non scevri di aspetti preoccupanti sono i coccidiostatici, usati per il trattamento preventivo di massa di diffuse infezioni protozarie con un potenziale pesante impatto sulle produzioni – soprattutto nelle specie avicole. Un esempio è il *narasin* (8), un agente ionoforo usato nel pollo da carne alla concentrazione massima autorizzata di 70 mg/kg mangime. La rivalutazione della sicurezza d'uso da parte del FEEDAP ha confermato sia la bassa tolleranza ai sovradosaggi da parte degli animali sia la neurotossicità osservata negli animali da laboratorio e su cui si basa la Dose Giornaliera Ammissibile (DGA) di 0,005 mg/kg p.c. Per contro, la sostanza è velocemente metabolizzata e non bioaccumula, mostrando solo una modesta persistenza (sostanza parentale più metaboliti) nella pelle e nel fegato. Il limite massimo di residui di 0,05 mg/kg in tutti i tessuti, senza tempo di sospensione data la bassa persistenza, è ampiamente sufficiente per garantire che l'assunzione di residui non superi la DGA anche in seguito al consumo elevato e prolungato di tessuti di animali trattati, purché ovviamente si rispetti la dose massima autorizzata. Per contro, ove non si mettano in atto misure di protezione vi sono rischi per gli utilizzatori (es. personale addetto alla miscelazione nel mangimificio o nell'azienda zootecnica): la sostanza ha la proprietà di formare polveri inabili, possiede una considerevole tossicità inalatoria ed è irritante per gli occhi. L'ultimo, ma solo in ordine di menzione, aspetto della *One Health* riguarda la salute degli

ecosistemi. L'approccio del FEEDAP considera il potenziale di esposizione dei comparti ambientali (escrezione in forma attiva, persistenza in acqua e suolo, bioconcentrazione) integrato dai dati di tossicità su organismi del suolo (invertebrati) e acquatici (alghe, artropodi, pesci). Nel caso del *marasin*, pur avendo una certa tossicità nei test sperimentali sugli organismi modello, la bassa esposizione degli ecosistemi non indica un rischio, sempre considerando il livello massimo d'uso autorizzato: infatti, solo una modesta frazione della sostanza assunta viene escreta in forma attiva, la persistenza è bassa e la degradazione è rapida, mentre non si ha alcun bioaccumulo. Pertanto, l'integrazione di studi e informazioni molto differenti, dalle prove zootecniche sino ai test ecotossicologici, fornisce un quadro completo sui diversi aspetti di interesse per la prevenzione e gestione del rischio, mettendo così in pratica i principi della *One Health*.

Un aspetto interessante dell'approccio *One Health* è lo studio della fisiologia animale per modificare le condizioni d'uso riducendo i rischi e mantenendo l'effetto desiderato. Come è noto, diversi nutrienti in traccia (es. iodio, selenio, rame, vitamina A) hanno una riconosciuta tossicità a dosi eccessive: nei casi dello zinco e del cobalto il FEEDAP ha rivalutato i fabbisogni nutrizionali animali per raccomandare la riduzione dei livelli massimi autorizzati, ottenendo un ascolto favorevole da parte del legislatore europeo.

Al tempo del parere del FEEDAP (anno 2014) (9) la valutazione dei livelli massimi autorizzati di zinco (Zn) non ha evidenziato rischi per la salute degli animali o dei consumatori. L'elemento ha, tuttavia, una riconosciuta eco-tossicità per gli organismi del suolo o acquatici. L'uso diffuso di "integratori" a base di Zn ai livelli autorizzati può dare un contributo significativo alla presenza ambientale; considerando i quantitativi e il drenaggio dal suolo alle acque superficiali si ha un rischio, soprattutto a lungo termine, per pesci e artropodi.

Il problema ha richiesto una revisione critica:

- (i) dei fabbisogni nutrizionali nelle diverse specie;
- (ii) della concentrazione di Zn nei mangimi senza supplementazione;
- (iii) dei livelli di uso reali della supplementazione;
- (iv) della biodisponibilità dello Zn nei diversi mangimi, un valore inversamente proporzionale alla escrezione nell'ambiente.

Questa valutazione interdisciplinare ha portato a proporre nuovi livelli massimi di Zn nei mangimi, più bassi e più mirati ai fabbisogni delle diverse specie (es. da 150 a 100 mg/kg per i ruminanti) con una riduzione stimata delle emissioni di zinco dagli allevamenti di circa il 20% (9).

Il cobalto (Co) è un integratore necessario in piccole dosi, ma fondamentale per formare la vitamina B12; mentre il Co incorporato nella vitamina ha una tossicità bassissima, i composti inorganici hanno una considerevole tossicità e soprattutto sono cancerogeni per inalazione. In questo caso, quindi, il FEEDAP ha affrontato un problema riguardante, in primo luogo, il rischio per gli utilizzatori, perché il bioaccumulo nei tessuti edibili è limitato (10). Anche in questa valutazione ha posto le basi per una opzione regolatoria indirizzata a minimizzare il rischio per la salute umana proteggendo, nel contempo, i fabbisogni nutrizionali animali. Solo ruminanti e conigli hanno bisogno della supplementazione con Co inorganico per sintetizzare la vitamina B12 perché degradano la vitamina B12 assunta direttamente; quindi il FEEDAP ha raccomandato di limitare la supplementazione di Co inorganico a queste specie, riducendo comunque i livelli massimi di integrazione a 0,3 mg/kg di Co aggiunto. Il FEEDAP ha inoltre considerato che il problema dell'esposizione a polveri inalabili esiste anche per il Co inorganico, comunque presente nei mangimi; ha pertanto proposto di ridurre il livello massimo di Co totale (*background* inevitabile più eventuale supplementazione) per tutte le specie da 2 a 1 mg/kg mangime. Anche con queste limitazioni, gli integratori a base di Co dei mangimi non rappresentano un rischio per gli utilizzatori solo se danno luogo a polveri inalabili, entro i limiti tollerabili internazionali di esposizione lavorativa per il Co (10). La valutazione delle evidenze scientifiche e delle

caratteristiche fisiologiche delle diverse specie zootecniche ha permesso, quindi, una migliore gestione di un possibile rischio per la salute umana. Anche in questo caso le raccomandazioni del FEEDAP sono state accolte dal legislatore europeo.

Questi pochi esempi indicano come l'integrazione fra competenze diverse – un elemento chiave della *One Health* – sia necessaria per rispondere a questioni complesse e produrre raccomandazioni sufficientemente forti da portare ad aggiornamenti delle normative, fine non sempre facile a ottenersi.

## One Health: progetti in corso

La *One Health* è un concetto oramai invalso, di cui è però necessario e urgente sviluppare le applicazioni nella ricerca e nella sanità pubblica. L'ISS partecipa allo *One Health European Joint Programme (One HealthEJP)*, <https://onehealthjep.eu/>), una rete europea che attualmente raccoglie 39 istituti, rappresentando la principale iniziativa transnazionale in corso sulla *One Health*. L'attività è essenzialmente incentrata sulle zoonosi alimentari e gli aspetti animale-uomo dell'antibiotico-resistenza, con una crescente attenzione verso gli aspetti ambientali.

Più specificamente attinente all'alimentazione animale è il progetto *SeaFoodTomorrow: Creating nutritious, safe and sustainable seafood for consumers of tomorrow* (<https://seafoodtomorrow.eu/>) cui l'ISS partecipa con il Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e sanità pubblica Veterinaria. Il progetto ha, tra i suoi obiettivi, quello di sviluppare mangimi che possano migliorare il profilo nutrizionale del pesce allevato, sia per la popolazione generale sia per specifiche fasce di popolazione, come anziani e bambini. Accanto e oltre alla prevenzione, la promozione della salute è una nuova frontiera che si apre alla *One Health*, con l'integrazione fra alimentazione animale e nutrizione umana.

## Bibliografia

1. Battelli G, Baldelli R, Ostanello F, Prosperi S (ed.). *Gli animali, l'uomo, l'ambiente. Ruolo sociale della sanità pubblica veterinaria*. Bologna: Bononia University Press; 2013.
2. Frazzoli C, Mantovani A (ed.). The environment-animal-human web: a “*One Health*” view of toxicological risk analysis. *Frontiers Public Health* 2018. Disponibile all'indirizzo: <http://journal.frontiersin.org/researchtopic/3593/the-environment-animal-human-web-a-one-health-view-of-toxicological-risk-analysis>
3. Europa. Commissione delle Comunità Europee. *Libro Bianco sulla Sicurezza Alimentare (COM (1999 - 719 definitivo)*). Bruxelles: Commissione delle Comunità Europee; 2000.
4. Mantovani A, Baldi F, Frazzoli C, Lorenzetti S, Maranghi F (Ed.). *Modelli per la valutazione rischio-beneficio in sicurezza alimentare*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2012. (Rapporti ISTISAN 12/50).
5. Belluco S, Mantovani A, Ricci A. Il consumo di insetti dal punto di vista della sicurezza alimentare: inquadramento normativo e valutazione dei rischi. In: Belluco S, Mantovani A, Ricci A (Ed.). *Gli insetti: una risorsa sostenibile per l'alimentazione*. Firenze: Accademia Nazionale Italiana di Entomologia; 2015. p. 21-28. Disponibile all'indirizzo: [https://www.accademiaentomologia.it/wp-content/uploads/2020/03/Monografia\\_XXVI.pdf](https://www.accademiaentomologia.it/wp-content/uploads/2020/03/Monografia_XXVI.pdf).
6. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. *Hazards associated with animal*. Rome: FAO and WHO; 2019.
7. Chesson A, Gropp J, Mantovani A, Roncancio C; Special issue: Ten years of EFSA's FEEDAP Panel and its main achievements. *EFSA Journal* 2012;10(10):s1005-13.

8. EFSA FEEDAP Panel. Scientific Opinion on the safety and efficacy of Monteban®G100 (narasin) for chickens for fattening. *EFSA Journal* 2018;16(11):5460-97.
9. EFSA FEEDAP Panel. Scientific Opinion on the potential reduction of the currently authorised maximum zinc content in complete feed. *EFSA Journal* 2014;12(5):3668-744.
10. EFSA FEEDAP Panel. Scientific Opinion on safety and efficacy of cobalt compounds (E3) as feed additives for all animal species: Cobaltous acetate tetrahydrate, basic cobaltous carbonate monohydrate and cobaltous sulphate heptahydrate, based on a dossier submitted by TREAC EEIG. *EFSA Journal* 2012;10(7):2791-816.

# VALUTAZIONE MEDIANTE *AUDIT* DEI SISTEMI DI GESTIONE DELLA BIOSICUREZZA DEI LABORATORI

Renata Borroni, Gianni Ciccaglioni, Rosanna Adone, Antonio Capoccefalo, Ilaria Di Bartolo, Rita Di Benedetto, Giovanni Ianiro, Marina Monini, Paola Petrucci, Sergio Sbrenni  
*Dipartimento di Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Introduzione

Il Ministero della Salute ha, tra i propri compiti, quello di verificare che gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS) e i Centri Nazionali di Referenza che manipolano patogeni appartenenti all'ex lista «A» dell'OIE (*Office International des Epizooties*, Organizzazione mondiale della sanità animale) garantiscano adeguati livelli di biosicurezza, intesa come *biosafety* e *biosecurity* (DL.vo 274/2006) (1).

Al fine di ottemperare in modo efficace ed efficiente a questo mandato il Ministero della Salute ha deciso di avviare un'attività di sorveglianza realizzata mediante svolgimento di *audit* dei Sistemi di Gestione della Biosicurezza (SGB) dei laboratori, avvalendosi del supporto tecnico scientifico dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS).

In questo testo il termine biosicurezza è comprensivo dei due significati di *biosafety* e di *biosecurity*.

Il termine *biosafety* fa riferimento a principi di contenimento, tecnologie e modalità operative finalizzati a prevenire un'esposizione non intenzionale o il rilascio accidentale nell'ambiente di agenti biologici e tossine.

Il termine *biosecurity* fa riferimento, invece, a mezzi e modalità di custodia e controllo degli agenti biologici e delle tossine detenuti e manipolati dal laboratorio, adottati per impedirne la perdita, la sottrazione indebita o usi non consentiti.

## Definizione dei criteri di *audit*

I laboratori oggetto dell'attività di *audit* detengono e manipolano agenti patogeni di classe 3 e sono classificati come *BioSafety Level 3* (BSL3).

A differenza dei laboratori BSL4, per i BSL3 non esistono prescrizioni generali di natura cogente o normativa utilizzabili come riferimento per la conduzione degli *audit*.

Preliminarmente all'attuazione dell'attività di *audit*, è stato quindi necessario definire e condividere con tutte le parti interessate i criteri rispetto ai quali effettuare la valutazione dei sistemi di gestione della biosicurezza dei laboratori.

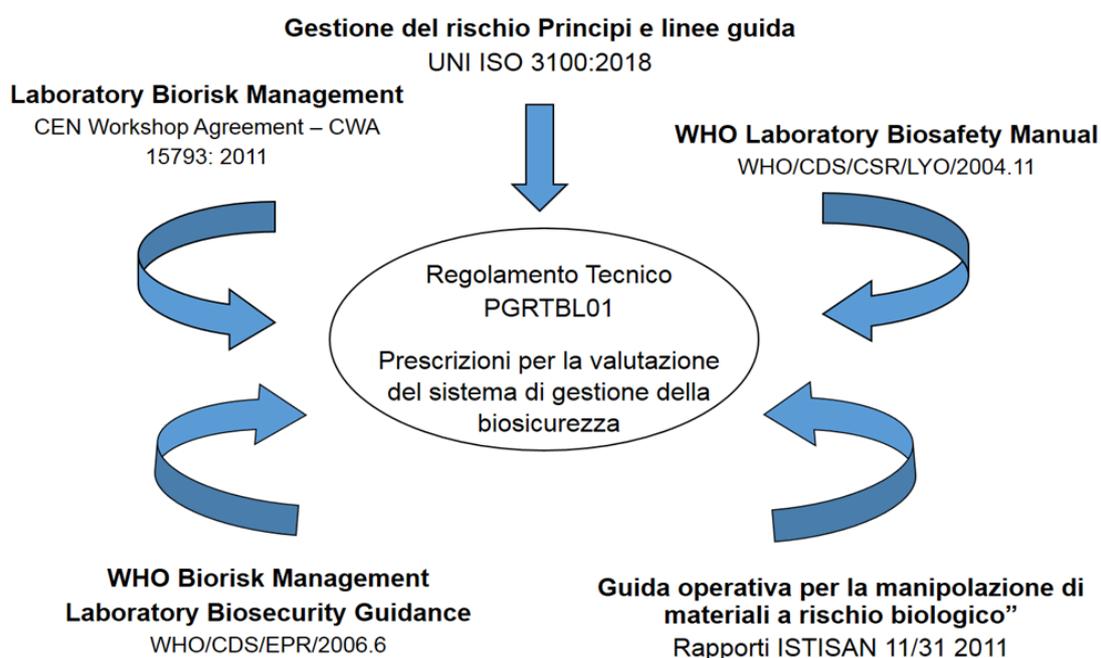
In particolare, è stato necessario provvedere alla:

- a. elaborazione di documenti di riferimento condivisi che definiscono i requisiti generali degli SGB;
- b. elaborazione di documenti di riferimento condivisi che definiscono i requisiti aggiuntivi per specifici agenti patogeni;
- c. messa a punto di liste di riscontro da utilizzare in *audit*.

Il risultato di tale attività è stata la stesura e approvazione di documenti prescrittivi, sia a carattere gestionale che tecnico e di *checklist*.

In particolare è stato predisposto il Regolamento Tecnico “Prescrizioni per la valutazione del sistema di gestione della biosicurezza” (PGRTBL01) che definisce i requisiti generali e identifica i processi ritenuti “critici” rispetto ai quali i laboratori devono definire, sulla base dell’analisi del rischio, le proprie politiche di biosicurezza, le procedure i requisiti strutturali e impiantistici, affinché i sistemi di gestione sviluppati diano garanzia di mantenere nel tempo livelli di biosicurezza adeguati.

I principi e i requisiti degli SGB identificati dal Regolamento Tecnico derivano da documenti e linee guida (2-6) riconosciuti a livello internazionale, come raffigurato schematicamente in Figura 1.



**Figura 1. Principali documenti di riferimento utilizzati per la redazione del Regolamento Tecnico. “Prescrizioni per la valutazione del sistema di gestione della biosicurezza”**

Sono stati inoltre predisposti documenti di integrazione del Regolamento Tecnico “Prescrizioni per la valutazione del sistema di gestione della biosicurezza”, contenenti requisiti aggiuntivi desunti da direttive, regolamenti, linee guida e letteratura scientifica che devono essere applicati dai laboratori che detengono patogeni specifici come, ad esempio, quelli responsabili del Carbonchio ematico negli animali e dell’Antrace nell’uomo, dell’Afta Epizootica, della Peste Suina Classica e della Peste Suina Africana.

Infine, sono state predisposte specifiche *checklist* da utilizzare per gli *audit*.

## Organizzazione di una struttura operativa deputata a gestire lo svolgimento e risultanze degli *audit*

Parallelamente alla definizione dei criteri, per garantire che le attività di *audit* svolte forniscano valutazioni affidabili circa l'adeguatezza degli SGB implementati dai laboratori, è stato necessario definire l'organizzazione e le regole di funzionamento di una struttura operativa in grado di assicurare competenza, imparzialità e trasparenza nel proprio operato.

L'organizzazione e il funzionamento della struttura deputata a gestire lo svolgimento e le risultanze degli *audit* sono stati definiti conformemente alle prescrizioni della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17021-1 "Valutazione della conformità, requisiti per gli organismi che forniscono *audit* e certificazione di sistemi di gestione. Parte 1 Requisiti" (7), escludendo i requisiti riguardanti, in modo specifico, la gestione della certificazione al momento non prevista.

La struttura, denominata "Area funzionale - Attività di *audit* ai sistemi di gestione della biosicurezza" (Area-BL), il cui organigramma è illustrato nella Figura 2, è stata inserita nel Sistema di Gestione Qualità del Dipartimento Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria dell'ISS.

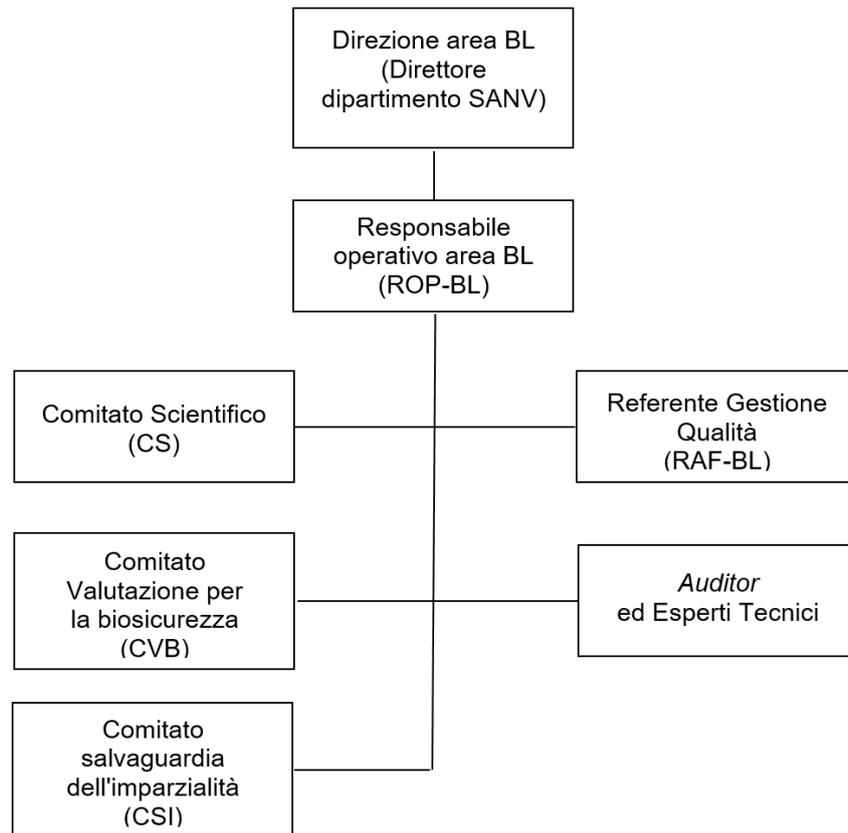


Figura 2. Organigramma dell'Area funzionale Attività di *audit* ai sistemi di gestione della biosicurezza" (Area-BL)

La direzione dell'Area-BL è assegnata al Direttore del Dipartimento di Sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria.

Sono stati nominati il Responsabile operativo, il Referente qualità, i componenti del Comitato Scientifico (CS), del Comitato Valutazione Biosicurezza (CVB), del Comitato Salvaguardia Imparzialità (CSI), gli *auditor* e gli esperti tecnici per i quali sono stati definiti i requisiti di qualifica e mantenimento di qualifica.

Particolare rilevanza ha la presenza nell'organigramma del CS, del CVB dei laboratori e del CSI per garantire competenza, imparzialità e trasparenza dell'attività di *audit* agli SGB.

La composizione e le attività dei Comitati sono riassunte nella Tabella 1.

**Tabella 1. Composizione e funzioni dei comitati dell'Area-BL**

Comitato	Composizione	Attività
CVB Comitato Valutazione Biosicurezza dei laboratori	Direttore del Dipartimento Sicurezza Alimentare, Nutrizione e sanità pubblica Veterinaria  Direttore dell'Ufficio II del Segretario Generale del Ministero della Salute  Direttore dell'Ufficio III della Direzione generale della sanità animale e dei farmaci veterinari del Ministero della Salute	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Riesamina e valuta le risultanze degli <i>audit</i></li> <li>• Dispone l'esecuzione di <i>audit</i> straordinari</li> <li>• Approva i documenti di riferimento</li> <li>• Approva il programma annuale di <i>audit</i></li> <li>• Approva la composizione dei gruppi di <i>audit</i></li> </ul>
CSI Comitato Salvaguardia Imparzialità	<p>Un componente nominato dal Ministero della Salute</p> <p>Un componente nominato dal Ministero della Difesa</p> <p>Un componente nominato dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS)</p> <p>Un componente nominato dagli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vigila sull'imparzialità nella conduzione degli <i>audit</i></li> <li>• Vigila sull'assenza di conflitti di interesse</li> </ul>
CS Comitato Scientifico	Personale con comprovata competenza in specifici settori oggetto delle attività di <i>audit</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Redige documenti di riferimento</li> <li>• Provvede all'aggiornamento di <i>auditor</i> ed esperti tecnici</li> <li>• Fornisce supporto tecnico al CVB</li> </ul>

Le regole del funzionamento dell'Area-BL e dello svolgimento delle attività di *audit* sono state definite nel rispetto dei principi e requisiti degli standard:

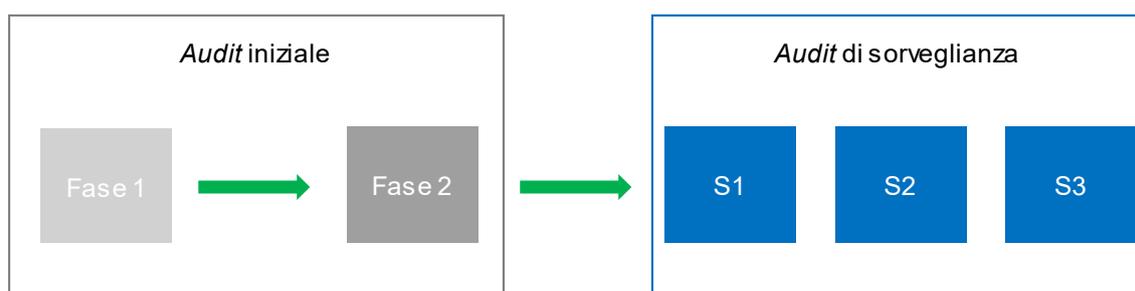
- ISO/IEC 17021-1 (7),
- ISO 9001 (8),
- ISO 19011 (9)

e sono descritte nei documenti appositamente predisposti:

- “Regolamento Comitato Valutazione per la biosicurezza”,
- “Regolamento Comitato Salvaguardia imparzialità”,
- “Procedura di svolgimento audit per la valutazione della biosicurezza”.

## Modalità di attuazione degli *audit* dei sistemi di gestione della biosicurezza

In accordo a quanto previsto dallo standard ISO/IEC 17021-1 (7) gli *audit* prevedono una pianificazione in cicli di quattro anni comprendenti un *audit* iniziale e tre *audit* di sorveglianza, come schematizzato nella Figura 3.



**Figura 3. Schema di un ciclo completo di *audit* dei sistemi di gestione della biosicurezza**

L'*audit* iniziale si compone di un *audit* di Fase 1 che riguarda aspetti a carattere prevalentemente gestionale e documentale.

L'esito positivo dell'*audit* di Fase 1 consente l'effettuazione dell'*audit* di Fase 2 che riguarda la valutazione in campo della corretta applicazione delle prescrizioni del sistema di gestione della biosicurezza, l'adeguatezza della struttura e delle dotazioni impiantistiche e strumentali.

Le Figure 4 e 5 illustrano, mediante diagrammi di flusso, le attività svolte nelle diverse fasi dell'*audit* iniziale, la gestione dei rilievi formalizzati nel corso dell'*audit* e la formulazione della valutazione finale.

Nei tre anni successivi vengono effettuati *audit* annuali di sorveglianza in campo, riguardanti tutti gli aspetti del sistema di gestione della biosicurezza.

**Audit iniziale – Fase 1**

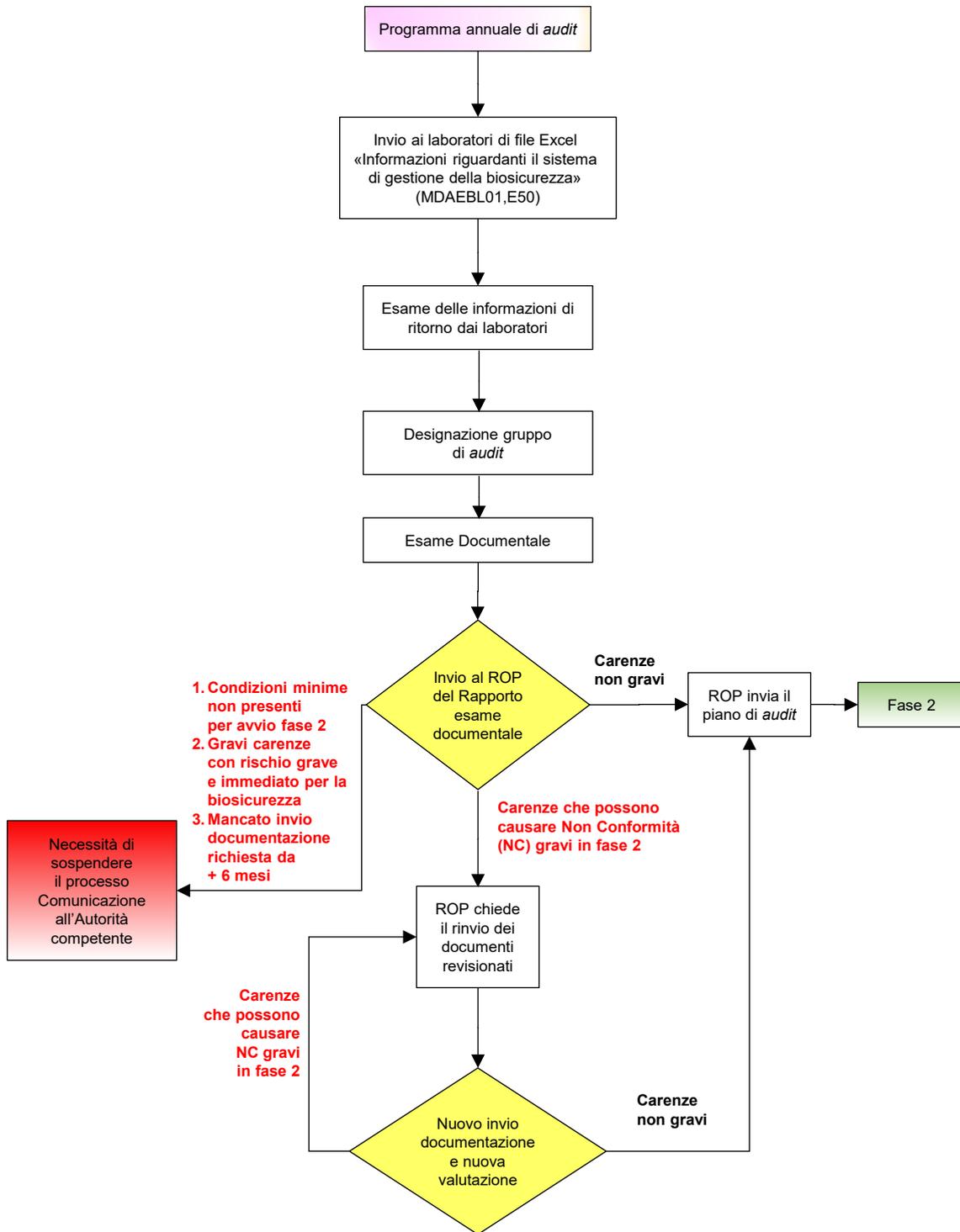
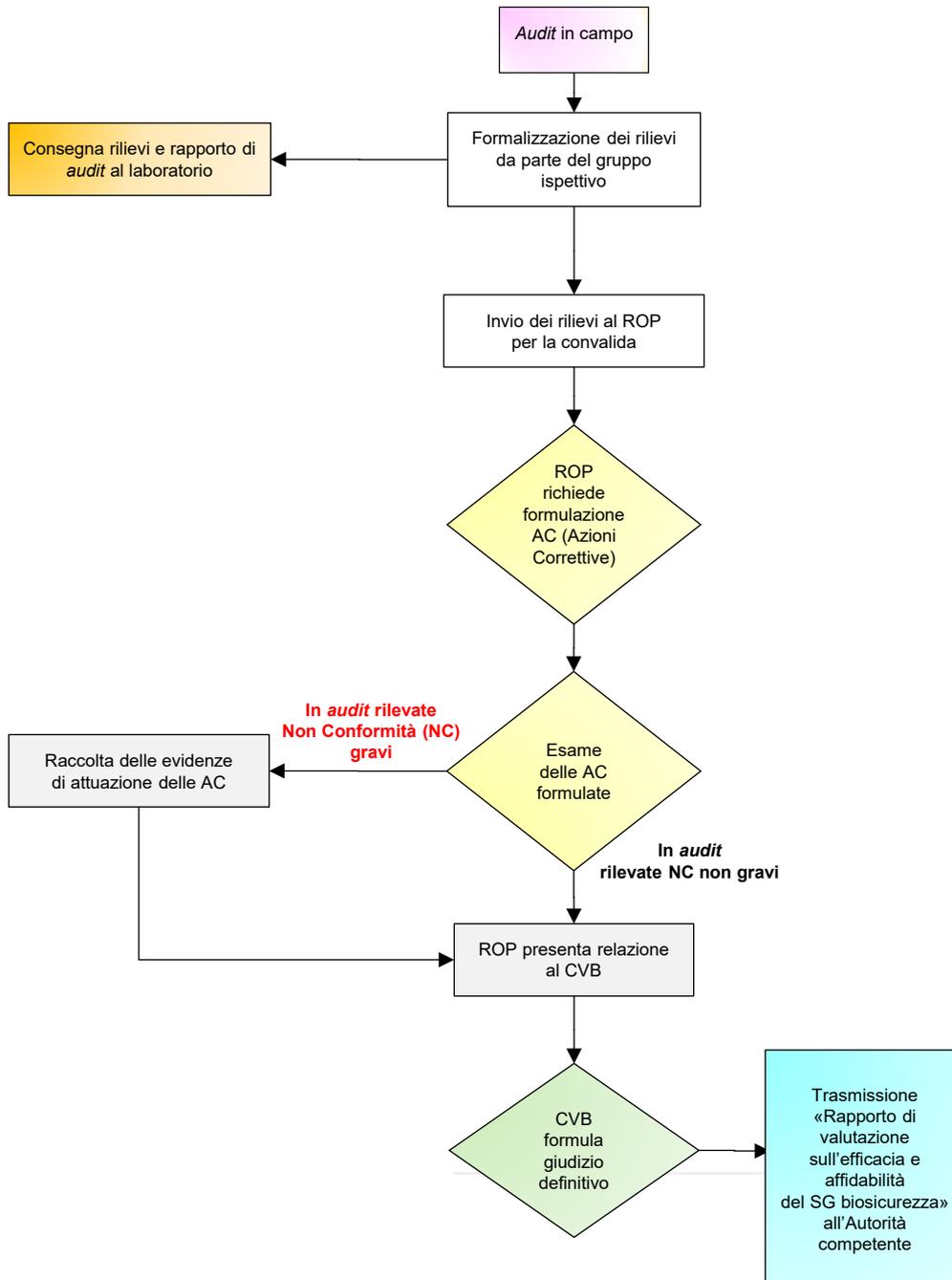


Figura 4. Attività svolte nel corso della Fase 1 dell'audit iniziale

**Audit iniziale – Fase 2**



**Figura 5. Attività svolte nel corso della Fase 2 dell'audit iniziale, gestione dei rilievi e delle attività successive all'audit**

## Sito web-area riservata biosicurezza

Il servizio informatico ha sviluppato nel sito web dell'ISS-un'area riserva, dedicata all'attività di *audit* degli SGB che consente lo scambio in tempo reale di documentazione in formato elettronico tra laboratori esterni, Ministero della Salute e area BL.

L'accesso all'area riservata del sito web avviene tramite ID e password e consente sia la consultazione da parte dei laboratori dei documenti prescrittivi prodotti dall'area BL, sia la collocazione in raccolte individuali della documentazione relativa ai rispettivi sistemi di gestione.

Nell'area riservata sono messe a disposizione dell'Autorità competente, informazioni riguardanti la tipologia e i quantitativi di patogeni manipolati dai laboratori, le spedizioni di materiale infettante ad altri laboratori, le tipologie di attività svolte (es. produzione di vaccino, produzione di materiale diagnostico, infezioni sperimentali), le caratteristiche principali degli impianti e delle strutture di contenimento in uso, gli incidenti/infortuni registrati.

## Conclusioni

In ambito veterinario, oltre alla biosicurezza in allevamento, è importante garantire la biosicurezza nei laboratori che fanno uso deliberato di patogeni potenzialmente dannosi per animali, uomo e/o ambiente. Il monitoraggio dell'adeguatezza degli SGB mediante *audit* si è rivelato uno strumento efficace di tutela della sanità pubblica in quanto garantisce tutte le parti interessate dall'esposizione e/o dal rilascio non intenzionale di patogeni.

Infine il riesame delle criticità e dei punti di forza che emergono nel corso degli *audit* contribuisce al miglioramento continuo dei sistemi di gestione e alla riduzione dei livelli di rischio residuo relativamente al biocontenimento.

## Bibliografia

1. Italia. Decreto legislativo 18 settembre 2006, n. 274. Attuazione della direttiva 2003/85/CE relativa a misure comunitarie di lotta contro l'Afta epizootica. (Art. 65 comma 1 e 2, allegati XI e XII). *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* 258 del 6 novembre 2006.
2. UNI ISO 31000. *Gestione del rischio. Principi e linee guida*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2018.
3. WHO. *Laboratory Biosafety Manual*. 3 ed. Geneva: World Health Organization; 2004.
4. Morace G, Fazzi P, Ilari R, Salvatore M, Caiola S. *Guida operativa per la manipolazione di materiali a rischio biologico*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2011 (Rapporti ISTISAN 11/31).
5. WHO. *Biorisk management: laboratory biosecurity guidance*. Geneva: World Health Organization; 2006.
6. CEN (Comité Européen de Normalisation). *Laboratory biorisk management. Workshop agreement (CWA 15793)*, Bruxelles: European Committee for Standardization; 2011.
7. UNI CEI EN ISO/IEC 17021-1. *Valutazione della conformità. Requisiti per gli organismi che forniscono audit e certificazione di sistemi di gestione. Parte 1*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2015.
8. UNI EN ISO 9001:2015. *Sistemi di gestione per la qualità. Requisiti*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2015.
9. UNI EN ISO 19011:2018. *Linee guida per audit di sistemi di gestione*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2018.

*Serie Rapporti ISTISAN  
numero di luglio 2021*

*Stampato in proprio  
Servizio Comunicazione Scientifica – Istituto Superiore di Sanità*

*Roma, luglio 2021*