

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Sicurezza alimentare e salute dell'infanzia

A cura di
Francesca Maranghi, Francesca Baldi e Alberto Mantovani

Dipartimento di Sanità Alimentare e Animale

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

05/35

Istituto Superiore di Sanità

Sicurezza alimentare e salute dell'infanzia.

A cura di Francesca Maranghi, Francesca Baldi e Alberto Mantovani
2005, iii, 139 p. Rapporti ISTISAN 05/35

Questo rapporto nasce dall'ampliamento delle tematiche trattate nella prima edizione del Corso "Salute del bambino e sicurezza alimentare: valutazione e comunicazione del rischio" (Istituto Superiore di Sanità, 2004), sviluppando le indicazioni sia dell'*Authority* europea per la sicurezza alimentare sia della strategia della Commissione Europea per l'ambiente e la salute, incentrata sulla prevenzione dei rischi per l'infanzia. I temi trattati, attraverso un approccio interdisciplinare, vanno dalle specifiche caratteristiche dell'analisi del rischio per l'età evolutiva alla caratterizzazione di biomarcatori di esposizione, effetto e suscettibilità sino alle interazioni fra sicurezza alimentare e qualità nutrizionale. Particolare attenzione viene data ad aspetti emergenti tra cui l'esposizione alimentare ad interferenti endocrini e i fattori di rischio per le alterazioni dello sviluppo neurocomportamentale e immunitario. L'obiettivo generale è quello di contribuire a nuove strategie di prevenzione, promuovendo la interazione fra ricerca e intervento sanitario.

Parole chiave: Alimentazione, Analisi del rischio, Biomarcatori, Esposizione, Interferenti endocrini, Sviluppo

Istituto Superiore di Sanità

Food safety and children's health.

Edited by Francesca Maranghi, Francesca Baldi and Alberto Mantovani
2005, iii, 139 p. Rapporti ISTISAN 05/35 (in Italian)

This report extends the topics dealt with in the first edition of the Course "Children's health and food safety: risk assessment and risk communication" (Istituto Superiore di Sanità, Rome, 2004); in particular, it aims at developing the indications by the European Food Safety Authority as well as of the environment and health strategy of the European Commission, that is centered on the prevention of risks for children. On the basis of an interdisciplinary approach, the topics range from the specific requirements of children-targeted risk analysis, through to the characterization of biomarkers of exposure, effect and susceptibility as well as to the interactions between food safety and nutritional quality. Particular attention is given to emerging aspects such as the dietary exposure to endocrine disrupters and the risk factors for alterations of neurobehavioural and immune development. The general objective is to contribute to novel preventive strategies by promoting the interactions between research and public health interventions.

Keywords: Nutrition, Risk analysis, Biomarkers, Exposure, Endocrine disrupters, Development

Il rapporto è stato realizzato nell'ambito dei progetti di ricerca finalizzata (art. 12 DL.vo 502/1992): "Analisi del rischio alimentare da contaminanti ambientali - ARACNA" (3AG/F7) e "Analisi del rischio correlato alla presenza di residui negli alimenti di origine animale - SARA" (4AF/F3).

Per informazioni su questo documento scrivere a: alberto.mantovani@iss.it.

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

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

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

© Istituto Superiore di Sanità 2005

INDICE

Introduzione	1
Vulnerabilità dell'infanzia	4
Introduzione.....	4
Susceptibilità specifica dell'infanzia	4
Esempi specifici.....	6
Valutazione dell'esposizione	7
Modelli animali per studiare l'età evolutiva	7
Conclusioni.....	9
Bibliografia.....	10
Nuovi aspetti nell'analisi del rischio per l'età evolutiva	12
Introduzione.....	12
Alterazioni della pubertà.....	12
Alterazioni della funzione immunitaria	14
Alterazioni della flora batterica intestinale	16
Conclusioni.....	18
Bibliografia.....	19
Esposizione a sostanze chimiche presenti nella dieta in età pediatrica	24
Introduzione.....	24
Categorie di sostanze chimiche presenti nella dieta	25
Sostanze chimiche che residuano negli alimenti	25
Contaminanti chimico-ambientali	26
Additivi e aromi	26
Specificità dell'età evolutiva in termini di esposizione a sostanze chimiche.....	27
Fattori che limitano l'esposizione a sostanze chimiche.....	28
Fattori che aumentano l'esposizione potenziale.....	29
Banche dati di consumo di alimenti nell'età evolutiva	30
Stima dell'esposizione, metodologie utilizzate e loro applicazione alla fascia pediatrica	32
Implicazioni in termini di comunicazione del rischio e di educazione alimentare	34
Bibliografia.....	35
Esposizione a contaminanti negli alimenti e nell'ambiente <i>indoor</i>	39
Introduzione.....	39
Esposizione a PCB.....	40
Esposizione ambientale ad altre sostanze di interesse tossicologico	44
Conclusioni.....	45
Bibliografia.....	46
Esposizione a xenobiotici attraverso il latte materno	48
Introduzione.....	48
Profilo chimico-fisico di PCDD, PCDF e PCB	48
Tossicità.....	50
Contaminazione degli alimenti	51
Latte materno	53
Conclusioni.....	55
Bibliografia.....	55

Contaminanti e allattamento al seno: rischi e benefici per lo sviluppo neuropsicologico	59
Introduzione	59
Benefici dell'allattamento al seno	59
Allattamento al seno e sviluppo neuropsicologico	60
Xenobiotici nel latte materno	62
Vulnerabilità del sistema nervoso all'esposizione a contaminanti durante lo sviluppo	62
Aspetti metodologici nella valutazione degli effetti di contaminanti ambientali sul neurosviluppo	63
Valutazione degli effetti	64
Valutazione dell'esposizione	64
Altre variabili	65
Effetti dell'esposizione ai PCB sullo sviluppo neuropsicologico	65
Conclusioni	67
Bibliografia	68
Esposizione agli ftalati attraverso gli alimenti per l'infanzia	72
Bibliografia	74
Biomarker di esposizione e di dose efficace nelle prime fasi della vita	76
Introduzione	76
Specificità biologica nelle prime fasi della vita ed esposizione a sostanze chimiche	76
Modalità di esposizione prenatale, durante l'allattamento e nella prima infanzia	78
Ruolo dei <i>biomarker</i> nella valutazione del rischio	82
Applicazione di <i>biomarker</i> per la valutazione dell'esposizione in età prenatale e pediatrica	85
Stima dell'esposizione prenatale	86
Scelta e analisi dei campioni biologici	86
Valori di riferimento e valori limite	92
Problemi etici relativi al trattamento e all'utilizzo dei dati	92
Conclusioni	94
Bibliografia	95
Suscettibilità dei bambini ad effetti associati ad esposizione a xenobiotici: il ruolo della tossicocinetica e possibili conseguenze per la valutazione del rischio	101
Bibliografia	108
Botulismo infantile	109
Introduzione	109
La malattia: patogenesi e spettro clinico	109
Diagnosi	110
Caratterizzazione dell'agente etiologico	110
Fattori di rischio	110
Veicolo delle spore	111
Botulismo infantile in Europa	112
Conclusioni	114
Raccomandazioni	115
Bibliografia	115
Intolleranze alimentari in età pediatrica	117
La malattia celiaca	117
Epidemiologia	117

Eziopatogenesi.....	118
Sintomatologia.....	119
Diagnosi e terapia.....	119
Bibliografia.....	120
Nutrizione, ambiente e funzionalità tiroidea nell'infanzia.....	121
Ruolo degli ormoni tiroidei.....	121
Lo iodio, micronutriente essenziale per l'attività tiroidea.....	121
Carenza iodica ambientale.....	122
Esposizione a carenza iodica in gravidanza e funzione tiroidea nel neonato.....	123
Interferenti tiroidei.....	124
Bibliografia.....	125
Principio di precauzione e rischi alimentari.....	128
Precauzione e metodo scientifico.....	128
Importanza del principio di precauzione.....	128
Definizioni e inquadramento storico.....	129
Definizioni in documenti istituzionali, dichiarazioni, normative.....	129
Principio di precauzione nell'Unione Europea.....	130
Sintesi degli elementi fondamentali del principio di precauzione sulla base dei documenti istituzionali.....	131
Rischio, precauzione, alimentazione.....	131
Importanza del principio di precauzione nel settore alimentare.....	131
Considerazioni sulla recente evoluzione del rischio alimentare.....	132
Due esempi emblematici.....	133
Alcuni spunti offerti dai due casi.....	136
Bibliografia.....	136

INTRODUZIONE

Francesca Maranghi, Alberto Mantovani, Agostino Macri
Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Questo rapporto nasce dall'ampliamento delle tematiche trattate nella prima edizione del Corso "Salute del bambino e sicurezza alimentare: valutazione e comunicazione del rischio" organizzato dall'Istituto Superiore di Sanità il 21-23 giugno 2004, il quale a sua volta proponeva e sviluppava, nell'ambito della sicurezza alimentare, le indicazioni della strategia per l'ambiente e la salute lanciate dalla Commissione Europea a partire dal 2004 e incentrate sulla prevenzione dei rischi per l'infanzia.

Il rilievo dato all'età evolutiva nella moderna analisi del rischio scaturisce da diversi ordini di considerazioni. In primo luogo, si tratta di una fase particolarmente vulnerabile sia dal punto di vista dell'esposizione a xenobiotici sia da quello della possibile induzione di alterazioni persistenti nei processi di sviluppo e maturazione funzionale. In secondo luogo, occorre considerare la complessa natura multifattoriale dei rischi per la salute dell'infanzia, in cui infatti sia la suscettibilità individuale che gli stili di vita giocano un ruolo fondamentale. Nei paesi industrializzati, accanto ad un notevole miglioramento della salute dei bambini – misurato secondo indicatori sanitari convenzionali – si osserva tuttavia anche l'incremento di problemi relativamente nuovi, quali disturbi immunitari, neurocomportamentali o della pubertà. È probabile che l'esposizione a xenobiotici non sia il fattore di rischio principale per tali patologie; essa può tuttavia rappresentare la componente più direttamente identificabile e modificabile, diventando pertanto un elemento importante nelle strategie di prevenzione.

In tali strategie, parallelamente e oltre a fattori più propriamente ambientali, risalta il ruolo dell'alimentazione quale componente fondamentale della salute e del benessere: il controllo dei rischi alimentari per l'infanzia dovrà, dunque, tenere presenti in uguale misura sia la qualità nutrizionale sia la sicurezza nei confronti di residui e contaminanti.

L'abbondante disponibilità di alimenti accompagnata da una deficiente cultura alimentare sta determinando un aumento progressivo del rischio di squilibri metabolici quali l'obesità che spesso sono associati a serie conseguenze per la salute nell'età adulta. A tal proposito, i dati provenienti dalla ricerca scientifica devono indurre ad una maggiore attenzione nei confronti del monitoraggio dei consumi alimentari e degli stili di vita nelle diverse fasce di età ed essere utilizzati come base di informazioni per interventi di educazione e informazione alimentare che raggiungano e coinvolgano l'intera popolazione.

Quanto alla sicurezza alimentare, si tratta di una priorità per l'Unione Europea che, nel libro bianco per la sicurezza alimentare, promuove un approccio complessivo nei confronti della filiera produttiva del tipo "dalla fattoria alla forchetta" (http://europa.eu.int/comm/dgs/health_consumer/library/pub/pub06_en.pdf). La *European Food Safety Authority* (EFSA, <http://www.efsa.eu.int>) è stata appunto istituita nel 2003 con lo scopo di fornire la base scientifica alle decisioni sulla sicurezza alimentare dell'Unione Europea; le proposte dell'EFSA (ad esempio, limiti massimi ammissibili di residui o contaminanti), formulate sulla base dei moderni approcci per l'analisi del rischio, tengono conto della necessità di proteggere le fasce più vulnerabili e soprattutto l'infanzia. Tuttavia, per la realizzazione dei nuovi principi per la sicurezza alimentare, è indispensabile anche prevedere l'intervento sul territorio. In primo luogo, è necessaria la conoscenza e il controllo integrato della filiera alimentare, ottenibili con il contributo di tutte le professioni sanitarie (medici, veterinari, chimici, laboratoristi). Contestualmente, è anche necessario utilizzare in maniera tempestiva ed efficace i dati di

monitoraggio sugli alimenti prodotti dalle strutture preposte quali Istituti Zooprofilattici, ARPA, impegnate nel controllo dei residui negli alimenti. Queste informazioni rappresentano infatti la base sia per programmare eventuali interventi sulla filiera alimentare e sul contesto ambientale sia per monitorare i risultati degli interventi stessi. Ad esempio, un'efficiente strategia di controllo potrebbe concentrarsi sulle filiere produttive che contribuiscono maggiormente all'esposizione a sostanze quali antibiotici, diossine, metalli pesanti, pesticidi. L'alimentazione è ormai riconosciuta come la via di esposizione fondamentale per la popolazione generale, in particolare per i bambini, riguardo sia a xenobiotici (in particolare ai contaminanti ambientali, meno conosciuti e controllati delle sostanze direttamente usate nelle filiera agroalimentare, come pesticidi e farmaci zootecnici) sia a sostanze bioattive "naturali" quali fitoestrogeni e tossine di origine batterica o fungina. Tuttavia, le basi di dati disponibili sono ancora insufficienti per valutare la reale esposizione e i possibili riflessi sulla salute. In particolare, è difficile o impossibile definire valori di riferimento nella popolazione per i biomarcatori di esposizione a molte delle principali sostanze e occorre definire inoltre determinanti dell'esposizione quali stili alimentari, stili di vita, fattori sociali e comportamentali nonché il contesto ambientale generale.

Tali determinanti portano necessariamente a considerare anche problemi di equità relativi sia alla qualità e sicurezza degli alimenti che al più generale contesto ambientale, comprese le differenze esistenti nella popolazione in merito all'informazione e alla consapevolezza sui possibili rischi per sé e per la propria famiglia. Pertanto, non si può certo escludere che fattori di rischio, che risultino noti e ben controllati per la maggioranza dei cittadini, rappresentino invece un serio problema per una minoranza, non per questo da trascurare ma da tutelare con maggiore attenzione e da coinvolgere con maggiore impegno.

Il ruolo della comunicazione del rischio e dell'educazione sanitaria e alimentare non può, pertanto, essere sottovalutato. Come ha rilevato nel 2003 il "Rapporto Infanzia e Adolescenza" dei Pediatri di Famiglia (<http://www.italiasalute.it/news.asp?ID=5023>), esiste il rischio che il bambino diventi "burattino nelle mani del consumismo" e che, ignorando le sue esigenze, venga trattato da "piccolo adulto". Ad esempio, nei confronti del problema del sovrappeso dei bambini occidentali occorre educare prima di tutto gli adulti: su dieci bambini in sovrappeso infatti, quattro lo sono perché, sensibili ai messaggi pubblicitari televisivi e non consapevoli degli effetti, chiedono e ottengono i prodotti pubblicizzati. In altri casi, il cibo è utilizzato dai genitori come mezzo per calmare, gratificare e/o appagare il bambino. Aggiungiamo che l'atteggiamento sociale e culturale verso l'infanzia rischia a volte di coniugare un'attitudine iperprotettiva (verso "lo sporco", "gli animali", ecc.) con l'ignoranza dei rischi reali per la salute derivanti dall'alimentazione e dall'ambiente. A tale proposito, merita un cenno la "teoria dell'igiene", che verrà ripresa successivamente nel Rapporto, secondo cui la drastica riduzione della carica microbica nell'ambiente di vita potrebbe alterare la maturazione della funzione immunitaria nelle prime fasi della vita, predisponendo al rischio di allergie alimentari.

Una moderna analisi del rischio nel campo della sicurezza alimentare inoltre non può prescindere dalla valutazione della qualità nutrizionale degli alimenti. L'eventuale rischio associato all'esposizione a xenobiotici andrebbe idealmente sempre valutato in rapporto all'assunzione di sostanze naturali bioattive, vitamine, oligoelementi, ecc., nonché alla vulnerabilità generale associata allo status nutrizionale e metabolico. Va sottolineata dunque l'assoluta priorità della ricerca in questo ambito, sia sperimentale sia clinica: la conoscenza delle possibili interazioni fra xenobiotici e nutrienti è, infatti, tuttora molto insufficiente. Più in generale, le conoscenze ad oggi disponibili non permettono di stabilire un nesso causa-effetto nei confronti di un rischio per la salute umana derivante dall'esposizione a molti fattori, tra cui la gran parte delle sostanze chimiche. È verosimile che nel prossimo futuro stime del rischio più puntuali per i diversi xenobiotici vengano fornite da indagini che impieghino misure più precise

dell'esposizione e dei cofattori che modulano la suscettibilità individuale. Tuttavia non serve aspettare ulteriori dati per accertare "senza ombra di dubbio" un danno in atto. Il principio di precauzione definito dalla Unione Europea (<http://europa.eu.int/scadplus/leg/it/lvb/l32042.htm>) richiede di intervenire con misure preventive qualora esista un sospetto ragionevole di rischio; tale intervento, che potrà successivamente essere modificato con l'apporto di ulteriori dati scientifici, rappresenterà la scelta, fra quelle possibili, che assicuri il maggiore livello di tutela per la comunità e per il singolo soggetto.

Infine, va sottolineato come la sicurezza alimentare costituisca un settore della ricerca e della sanità pubblica particolarmente dinamico, per l'evoluzione delle pratiche produttive come dei consumi. Un esempio è rappresentato dalla dieta "globalizzata", che porta all'introduzione di nuove varietà di alimenti vegetali e animali (frutta, specie ittiche, ecc.) o all'aumentato consumo di prodotti un tempo marginali, come la soia: una maggiore varietà di prodotti alimentari può essere desiderabile, tuttavia non sono interamente conosciuti gli effetti associati all'assunzione di nuovi allergeni o sostanze bioattive, ecc. Un altro elemento da considerare è il possibile impatto delle tecnologie usate nella produzione agrozootecnica sulla qualità degli alimenti dai punti di vista non solo della sicurezza ma anche, e soprattutto, nutrizionale. Un esempio è la crescente attenzione che il Panel "Additivi e sostanze utilizzate nei mangimi" dell'EFSA (http://www.efsa.eu.int/science/feedap/catindex_en.html) mostra verso le influenze sulla composizione degli alimenti di origine animale: l'utilizzo di sali di iodio nell'alimentazione di specie quali le bovine da latte è stato recentemente valutato anche quale possibile strumento per ridurre la carenza iodica subclinica, tuttora presente nella popolazione, soprattutto in età infantile, di numerose aree dell'Europa e dell'Italia (http://www.efsa.eu.int/science/feedap/feedap_opinions/808_en.html).

In conclusione, attraverso un approccio interdisciplinare che coinvolge competenze sia veterinarie che biomediche e chimiche, questo Rapporto intende presentare lo stato dell'arte su un complesso di argomenti di particolare rilievo per la protezione dell'infanzia dai rischi alimentari, quali gli effetti a lungo termine sullo sviluppo endocrino, immunitario e nervoso nonché sulla caratterizzazione di biomarcatori di esposizione, effetto e suscettibilità. L'obiettivo generale dei diversi interventi è quello di rafforzare la interazione fra ricerca e intervento sanitario in modo da ottimizzare e rinnovare i sistemi di sorveglianza e le strategie di prevenzione anche al fine di promuovere comportamenti e stili di vita più corretti e consapevoli.

VULNERABILITÀ DELL'INFANZIA

Francesca Maranghi

Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità

Introduzione

Durante la varie fasi del ciclo vitale, l'organismo incontra diverse "finestre" di suscettibilità che possono variamente dipendere da fattori legati ad età e sviluppo, condizioni fisiologiche e metaboliche particolari, ad esempio la gravidanza oppure a malattie croniche come il diabete e la celiachia, oppure legate al sesso e/o a fattori genetici e a specifici stili di vita.

Tali fasi comportano in genere delle situazioni farmacodinamiche e farmacocinetiche che possono riflettersi sulla reattività dell'organismo a stimoli di varia natura (chimici, microbiologici, ecc.) provenienti dall'esterno (1).

Da un punto di vista tossicologico, le specie animali utilizzate come modello nei test standardizzati e negli studi scientifici sono in generale tutte piuttosto omogenee per età, stato di salute, condizioni ambientali di vita, apporto alimentare, fattori genetici. La situazione "reale" di esposizione umana comporta invece l'importanza di considerare una serie di variabili legate a determinanti sia interni che esterni all'individuo e/o alla popolazione in esame (2).

Durante lo sviluppo e il differenziamento il bambino risulta particolarmente suscettibile e vulnerabile all'azione di xenobiotici presenti negli alimenti e nell'ambiente. Infatti differenti situazioni metaboliche, fisiologiche e anatomiche si avvicendano nel corso del ciclo vitale. Con il termine di *children* si usa di solito rappresentare periodo di tempo che va dalla nascita fino al raggiungimento dell'età adulta; all'interno di questo si possono distinguere le fasi di "vita neonatale" che corrisponde al primo mese di vita extrauterina, il "bambino piccolo (*infant*)" fino ai due anni di età, il "bambino (*children*)" fino ai 12 anni circa e "l'adolescente" fino ai 18 anni o al raggiungimento della maturità sessuale (3).

Suscettibilità specifica dell'infanzia

Da un punto di vista funzionale, la fase di *children* è sicuramente quella in cui si completano i principali processi che definiscono la fase intrauterina da quella extrauterina ed è caratterizzata dunque da sensibili differenze sia dinamiche che cinetiche rispetto all'età adulta.

Considerando quelle che sono le principali vie di esposizione – orale, dermica e inalatoria – si osserva, ad esempio, che nel tratto gastrointestinale, rispettivamente l'assorbimento dei nutrienti per pinocitosi, il flusso ematico, le zone deputate all'assorbimento per superficie sono superiori rispetto all'adulto; inoltre il pH dello stomaco è più alto e la chiusura del tratto gastrointestinale avviene intorno al primo mese di vita, coadiuvata e accelerata sembra dall'allattamento al seno. Bisogna ricordare poi che una dieta latteica può favorire l'assorbimento di alcuni elementi come, ad esempio, i metalli (piombo, cadmio, mercurio), il che potrebbe in parte giustificare la maggiore suscettibilità del bambino al potenziale tossico di tali elementi (4).

Per quanto riguarda invece l'assorbimento attraverso la pelle, i bambini presentano una maggiore superficie corporea e permeabilità cutanea, quest'ultima soprattutto nei nati prematuri, che potrebbero essere associate ad un superiore apporto di xenobiotici attraverso la cute.

Nei bambini, inoltre, sebbene la superficie polmonare sia inferiore, tuttavia il volume inalato risulta superiore rispetto all'adulto determinando ancora una possibile aumentata assunzione di contaminanti attraverso questa via. Si stima infatti che, fra i 7 e i 14 anni di età, la deposizione di particolato fine aerodisperso per superficie polmonare sia di un 35% superiore rispetto all'adulto. Tale dato riveste un'importanza fondamentale anche nell'ambito della suscettibilità dell'infanzia ai fenomeni allergici (5).

La composizione corporea dei bambini è caratterizzata da un minore contenuto lipidico tissutale alla nascita e da una maggiore percentuale di acqua; tale equilibrio potrebbe influenzare l'eventuale diffusione e accumulo di sostanze a forte carattere lipofilo come, ad esempio, i contaminanti organici persistenti (DDT e altri pesticidi organoclorurati, PCBs, diossine, PBDE).

Da un punto di vista metabolico, il maggiore peso relativo del fegato del bambino presuppone un'elevata capacità di estrazione e clearance accompagnate anche da un maggiore potenziale di bioattivazione di metaboliti tossici a seguito di esposizione a xenobiotici. L'imaturità dei sistemi enzimatici di fase I e II tuttavia controbilancia tali effetti con un metabolismo più lento, una minore attivazione ma anche con una minore capacità di detossificazione dell'organismo immaturo rispetto all'adulto. Alcune isoforme del principale sistema metabolico epatico, il citocromo P450, quali i CYP 1A2, 2C, 2E1 ad esempio, sono ancora presenti in percentuale inferiore rispetto all'adulto mentre altre, quali il CYP 3A7, sono specificamente rappresentate solo in questa fase del ciclo vitale per poi diminuire drasticamente a maturità. È interessante notare come sostanze che siano substrato di tali isoforme possano essere metabolizzate in misura quantitativamente e qualitativamente differente nel bambino rispetto all'adulto (4).

La funzionalità renale è ancora immatura determinando una minore capacità di escrezione e di eliminazione dei metaboliti.

La capacità delle proteine plasmatiche di legare i propri substrati è ancora limitata in questa fase del ciclo vitale diminuendone la biodisponibilità e la diffusione nell'organismo.

Il peso relativo del cervello è maggiore nel bambino così come si osserva un maggiore flusso ematico a livello del sistema nervoso centrale (SNC), mentre la barriera ematoencefalica risulta ancora non completamente efficiente; tale superiore permeabilità può risultare in un'elevata esposizione del bambino a xenobiotici idrosolubili. Da un punto di vista anatomico, alcuni processi quali la mielinizzazione della materia bianca, la maturazione assonale e la propagazione dendritica nonché la moltiplicazione delle cellule della glia avvengono dopo la nascita. Bisogna inoltre sottolineare che qualsiasi deviazione nella sequenza stabilita di eventi che si susseguono durante questa fase delicata e cruciale di sviluppo e differenziazione del SNC, si tradurrà in un *imprinting* comportamentale, per definizione non modificabile, che indurrà l'organismo a crescere nel suo stesso deficit (6).

Anche il sistema immunitario, sebbene completamente sviluppato alla nascita, tuttavia durante l'infanzia è ancora suscettibile di modifiche; infatti la produzione di linfociti T e B attivati continua dopo la nascita a seguito del contatto con l'antigene specifico.

Il sistema endocrino regola e influenza tutti gli altri apparati e organi, soprattutto durante la fase di sviluppo e maturazione di cui ne modula le attività. Gli ormoni sessuali regolano il progredire della crescita e della maturazione sessuale; durante la fase prepuberale, il sistema riproduttivo non è completamente quiescente ma esiste un livello basale di produzione ormonale che ne regola le funzioni. La tiroide presiede alla crescita dell'organismo e controlla i processi di maturazione e sviluppo a livello cerebrale. L'ormone della crescita specificamente interagisce con i tessuti muscolare e osseo (7, 8).

Esempi specifici

È facile immaginare dunque la crescente attenzione del mondo scientifico verso le sostanze sospettate di comportarsi come Interferenti Endocrini (IE) (9); essi rappresentano un gruppo di contaminanti ampiamente diffusi negli alimenti e nell'ambiente in grado di modulare l'omeostasi endocrina, soprattutto degli ormoni sessuali steroidei e degli ormoni tiroidei. La fase più sensibile all'azione degli IE è sicuramente quella riproduttiva, considerata come un *continuum* che va dalla produzione di gameti alla fertilizzazione, fino allo sviluppo intrauterino e postnatale della progenie. Particolare attenzione va riservata alla valutazione dei rischi per l'infanzia, per le summenzionate considerazioni sul ruolo fondamentale svolto dal sistema endocrino nelle prime fasi di vita.

Possono considerarsi potenziali bersagli degli IE tutti quei tessuti/organi in cui siano presenti recettori specifici per gli ormoni steroidi e/o tiroidei, tra cui il tessuto scheletrico, il sistema cardiovascolare e il SNC; esiste inoltre un'ampia gamma di effetti che prescindono dalla semplice competizione per il legame al recettore e che possono coinvolgere la sintesi, il trasporto, il legame a proteine specifiche degli ormoni. Pertanto, è verosimile che i rischi sanitari associati all'esposizione a IE non si limitino ad interferenze con la funzione riproduttiva.

Tra le sostanze di cui si conoscono gli effetti sul sistema endocrino, i principali sono contaminanti organici persistenti (POPs) (policlorobifenili [PCBs], ritardanti di fiamma polibromurati [PBDE], diossine, pesticidi organoclorurati [DDT e metaboliti]), diversi pesticidi e biocidi (ad es., stannorganici), sostanze di uso industriale (gli ftalati, il bisfenolo A); recentemente suscitano attenzione anche i possibili effetti endocrini di alcuni metalli, ad es. i composti dell'arsenico (As) (9). Possono considerarsi IE anche sostanze diverse dai tipici contaminanti alimentari e/o ambientali, come i "fitoestrogeni", sostanze di origine vegetale che sono presenti negli alimenti ma anche, ad esempio, in prodotti di uso comune a base di estratti di piante.

In merito alla specifica suscettibilità dell'infanzia, gli isoflavoni (daizeina e genisteina), classe più conosciuta fra i fitoestrogeni presente soprattutto nei legumi, nel trifoglio, negli oli di semi e nelle noci di differenti famiglie botaniche, rappresentano un esempio calzante considerando il crescente utilizzo, principalmente per fenomeni di intolleranze alimentari, del latte artificiale per la prima infanzia a base di soia. Gli isoflavoni vengono definiti modulatori selettivi del recettore estrogeno, soprattutto il beta, e possiedono attività sia ormonale che non ormonale, ad esempio la genisteina è un potente antiossidante naturale (10). La concentrazione plasmatica di questi due composti nei bambini alimentati con latte di soia risulta essere tra le 13000-22000 volte superiore rispetto alla concentrazione dell'estradiolo naturale in quella fase del ciclo vitale. Inoltre, mentre la percentuale piuttosto variabile riscontrata nelle urine presupporrebbe che la clearance renale e/o l'assorbimento intestinale degli isoflavoni sia inferiore rispetto all'individuo adulto tuttavia i succitati livelli plasmatici suggeriscono un efficiente assorbimento a livello intestinale probabilmente favorito dall'imaturità dei sistemi enzimatici batterici deputati ai processi di biotrasformazione dei fitoestrogeni, che contribuisce a renderli maggiormente biodisponibili. Pochi dati sono disponibili a tutt'oggi sulla fisiologia e sugli effetti metabolici e molecolari di tali composti nell'organismo umano soprattutto per quanto riguarda la fase evolutiva; si ravvisa dunque la necessità di studi epidemiologici a lungo termine per verificare i potenziali effetti benefici e/o avversi a seguito di esposizione nelle fasi iniziali e cruciali del ciclo vitale (11).

Valutazione dell'esposizione

I bambini non risultano solo più suscettibili ai potenziali effetti avversi indotti dagli xenobiotici presenti negli alimenti e nell'ambiente. Esiste anche una vulnerabilità specifica dell'infanzia che è legata ad una serie di fattori sia intrinseci che estrinseci al bambino. Sappiamo infatti che, considerando il peso corporeo come riferimento, i bambini assumono più cibo e acqua rispetto all'adulto, il volume di aria inalata è maggiore e il derma risulta più permeabile. Dunque l'esposizione attraverso le principali sorgenti, orale, inalatoria e dermica, risulta quantitativamente aumentata (12).

Bisogna inoltre ricordare che i bambini seguono regimi dietetici specifici che variano da un punto di vista sia qualitativo che quantitativo soprattutto durante il primo anno di vita, per stabilizzarsi verso una dieta più simile a quella dell'adulto intorno ai due anni di età. Ciò implica un maggiore consumo di alcuni tipi di alimenti, ad esempio latte e latticini oppure alimenti per l'infanzia, con un conseguente maggiore e differenziato apporto di contaminanti rispetto all'adulto. Ciò implica la necessità di un processo di valutazione dell'esposizione mirato a questa fase del ciclo vitale che tenga in considerazione sia aspetti dietetici che nutrizionali (3).

I bambini inoltre sono responsabili diretti della propria vulnerabilità attraverso alcuni aspetti specifici del loro comportamento. Sappiamo infatti che i bambini in generale trascorrono un tempo superiore in ambienti indoor, sia esso l'abitazione, il nido, la scuola, ecc., rispetto all'adulto. In tali luoghi l'esposizione a contaminanti avviene sia attraverso l'aria che la polvere; quest'ultima soprattutto rappresenta una sorgente notevole di IE e altri xenobiotici che vi rimangono adesi dando luogo a fenomeni di persistenza e magnificazione (13, 14). Il maggiore e più frequente contatto del bambino con il suolo, sia all'interno che all'esterno, determina un conseguente maggiore intake di sostanze che viene ulteriormente amplificato dall'abitudine di portare tutto alla bocca; alcuni studi hanno stimato che un bambino in media è in grado di ingerire fino a 500 mg di polvere o derivati del suolo al giorno (15). Le mani e le ginocchia dei bambini che procedono a "gattoni" possono dare origine ad un assorbimento superiore di xenobiotici attraverso la cute; anche gli animali domestici trattati con antiparassitari aumentano l'esposizione dei bambini che giocano di frequente con loro. La scarsa igiene delle mani prima dei pasti può, a sua volta, rappresentare un'ulteriore sorgente di esposizione. Si è stimato che i bambini fra i 2-3 anni tengano le mani in bocca per almeno 30 minuti al giorno. Da ciò appare evidente come l'*uptake* di contaminanti da parte dei bambini sia estremamente variabile e come i metodi tradizionali di valutazione possano portare ad un'analisi quantitativa del rischio non realistica; utili a questo proposito studi di biomonitoraggio su campioni di urina e/o plasma già impiegati con successo per l'esposizione a pesticidi e che possono fornire un'interpretazione più affidabile del risultato (16).

Modelli animali per studiare l'età evolutiva

Nell'ambito della identificazione del rischio per l'età evolutiva di fondamentale importanza sono i modelli animali selezionati a tale scopo. Attualmente le linee guida internazionali prevedono l'utilizzazione di studi a più generazioni su roditori, convenzionalmente ratti e topi, che consentono di seguire il modello sperimentale dal periodo pre-concepimento, durante il concepimento, l'accoppiamento e la gravidanza fino allo svezzamento della prole e successivamente, a seconda se si tratti di uno studio a due o tre generazioni, lo sviluppo e maturazione sessuale della generazione/i successive. I parametri selezionati sono la

sopravvivenza della prole, la crescita e maturazione, la fertilità e le performances riproduttive. Tali test sono gli unici che consentono dunque di seguire lo sviluppo e la maturazione dell'individuo a partire dallo stadio di gamete fino alla sua capacità di produrre prole sana (17). Inoltre queste procedure possono essere completate, qualora studi mirati a breve termine ne diano indicazione, con ulteriori valutazioni sullo sviluppo di altri sistemi correlati quali quello immunitario e/o nervoso.

Un'altra procedura accreditata per lo studio di possibili effetti di sostanze chimiche sullo sviluppo e sulla differenziazione è il protocollo del *peripubertal rat assay* in cui gli animali vengono trattati immediatamente dopo lo svezzamento per un periodo di circa 20 giorni; tale test è raccomandato per lo studio di sostanze sospettate di interferire con il sistema endocrino (18). Infatti, accanto alle tradizionali osservazioni del controllo del peso, consumo di mangime, ecc., durante il trattamento vengono esaminati alcuni parametri chiave quali ad esempio il distacco del prepuzio e l'apertura della vagina; al momento del sacrificio poi vengono registrati i pesi degli organi con particolare riferimenti alle ghiandole endocrine (timo, tiroide, surreni, ecc.) e agli organi riproduttivi sia maschili che femminili; inoltre il prelievo del sangue consente di misurare possibili alterazioni dei livelli sierici di ormoni quali il testosterone, gli ormoni tiroidei, la prolattina. Tale procedura ha contribuito ad esempio ad evidenziare gli effetti di alcuni composti dello stagno sul sistema riproduttivo del ratto maschio (19). Tali composti, utilizzati come catalizzatori e stabilizzatori industriali ma anche come biocidi e pesticidi, hanno mostrato di indurre un'ampia gamma di effetti, molti dei quali su base endocrina, sia su animali da laboratorio che su specie selvatiche, soprattutto in ambiente acquatico. La somministrazione di tributilstagno e di trifenilstagno a ratti maschi per 30 giorni da 23° al 53° giorno dopo la nascita ha evidenziato tra l'altro un ritardo nel distacco del prepuzio, alterazioni nei pesi degli organi riproduttivi e modifiche nei livelli di testosterone e ormone luteinizzante, confermando un effetto specifico di tali contaminanti sullo sviluppo del sistema riproduttivo maschile.

Un esempio specifico di effetto differenziato a seconda della fase del ciclo vitale dell'organismo può essere considerato quello dell'insetticida organofosfato chlorpyrifos (CPF). Comunemente utilizzato sia in agricoltura che in ambito domestico per il controllo dei parassiti, il CPF ha sostituito altri pesticidi dello stesso gruppo a causa della sua stabilità e della apparente bassa tossicità. Gli studi di tossicità sull'organismo adulto hanno evidenziato come il CPF – e il suo metabolita attivo CPF oxon – risultino neurotossici mediante un meccanismo specifico di inibizione dell'enzima colinesterasi che determina il blocco del metabolismo della acetilcolina, il suo accumulo con conseguente iperstimolazione colinergica a livello dei tessuti bersaglio. Nei roditori esposti nel periodo fetale e nei neonati, il CPF mostra una tossicità circa 100 volte superiore rispetto all'adulto e alcuni effetti specifici quali una desensibilizzazione dei recettori nicotinici generata dall'effetto su quelli colinergici, un'azione di interferenza sui recettori muscarinici, sul *pathway* dell'adenilico ciclasi, sulla sintesi dell'RNA, del DNA e del legame coi fattori di trascrizione nonché uno specifico disturbo sul sistema dei neurotrasmettitori. Tutti questi effetti si manifestano a dosi più basse rispetto a quelle che inducono tossicità sistemica nell'adulto e sono altamente specifici per l'organismo in via di sviluppo (8).

Un punto chiave nella selezione del modello animale è l'individuazione dei periodi critici di suscettibilità nell'organismo in via di sviluppo; infatti, mentre di solito questi sono ben identificati nell'uomo, non sempre ciò è altrettanto vero nelle specie animali. Periodi di vulnerabilità nei roditori da laboratorio paragonabili a quelli umani non sono facilmente definiti e spesso essi risultano strettamente dipendenti dal singolo organo e/o sistema bersaglio. I vari eventi che caratterizzano la fase di sviluppo non sono sincronizzati attraverso le specie: la tabella 1 illustra e paragona le diverse età e le fasi di maturazione fisiologica dell'uomo e del ratto; appare evidente come diverse possano essere le fasi di maturazione e suscettibilità nelle diverse specie (20).

Tabella 1. Paragone fra i periodi di maturazione fisiologica nell'uomo e nel ratto (6)

Periodo	Uomo	Ratto	Note
Neonatale	Nascita → 1 mese	Nascita → 1 giorno	Fase di transizione fra l'ambiente intrauterino e la vita autonoma
Infanzia (infancy)	> 1 mese	> 1 giorno	Capacità metabolica limitata per molti sistemi enzimatici; periodo di rapida maturazione
Infanzia (childhood)	> 6 mesi	> 5 giorni	Attività della maggior parte dei sistemi metabolici, prossima, uguale o superiore all'adulto
Adolescenza	>12 anni	> 8 settimane	Passaggio all'attività metabolica dell'adulto; fase di inizio per gli studi di tossicità subcronica e cronica nel ratto
Adulto	> 18 anni	> 6 mesi	Fase di inizio della sperimentazione clinica nell'uomo e test ripetuti nel ratto

A tal proposito, per effettuare una corretta identificazione dei rischi per l'età evolutiva, è necessario che l'organo bersaglio e/o la funzione biologica in studio del modello sperimentale si trovino nella corrispondente fase di sviluppo nella specie umana con paragonabili caratteristiche di suscettibilità e vulnerabilità. Ricordiamo infatti che per molti sistemi, come ad esempio quello riproduttivo, le fasi di maturazione risultano più compresse da un punto di vista temporale nell'animale rispetto all'uomo (20). Inoltre alcuni eventi che nei modelli animali risultano accadere dopo la nascita, nella specie umana possono avvenire ancora in epoca prenatale; esempio ne sia la barriera ematoencefalica che nel topo appena nato risulta in uno stadio di maturazione molto inferiore rispetto a quello di un bambino appena nato.

Conclusioni

La valutazione del rischio tossicologico è un processo per fasi che ha lo scopo di identificare, valutare e caratterizzare il rischio derivante dall'esposizione della popolazione generale a tutte quelle sostanze che possono venir rilasciate, volontariamente e/o incidentalmente, negli alimenti e nell'ambiente sia esso *indoor* che *outdoor*; a questi composti si è esposti durante l'intero ciclo vitale in generale a concentrazioni basse e costanti che si discostano da quelle normalmente utilizzate nell'ambito dei protocolli sperimentali su animali da laboratorio. Tali test hanno lo

scopo di identificare le sorgenti di rischio, gli organi/sistemi bersaglio nonché possibilmente il meccanismo d'azione degli xenobiotici individuati. Dagli studi sperimentali si ottiene un valore definito LOEL (*Lowest Observed Effect Level*) oppure un NOEL (*No Observed Effect Level*) cui si applicano opportuni Fattori di Incertezza (*Uncertainty Factors*, UFs) che dipendono, ad esempio, dalla gravità dell'effetto, dalla necessità di estrapolare da animale a uomo, dalla presenza di sottogruppi di popolazione maggiormente suscettibili, per ottenere una Dose di riferimento giornaliera; a tale dose si assume che la popolazione possa essere esposta senza apprezzabili effetti sulla salute. Nell'ambito della valutazione dell'esposizione si considera tradizionalmente l'individuo adulto con caratteristiche standard di peso, altezza, consumo di cibo, ecc. (1).

Tuttavia negli ultimi anni è apparso quantomai opportuno, anche alla luce della individuazione di nuove classi di contaminanti con effetti potenzialmente specifici per l'età evolutiva – come appunto gli IE – focalizzare le priorità di ricerca e intervento a carattere sia nazionale che internazionale appunto sui bambini.

In ambito tossicologico emerge l'importanza di elaborare e selezionare modelli sperimentali in vivo e *in vitro* specifici per l'identificazione del rischio nell'età evolutiva; inoltre di fondamentale importanza l'identificazione, nell'ambito di tali modelli, di finestre di esposizione specifiche per l'effetto in studio e per il modello selezionato.

Una fase successiva dovrebbe prevedere il potenziamento degli studi mirati a valutare effetti a lungo termine a seguito di esposizione precoce in epoca pre, peri- e postatale; la definizione di valori di riferimento per i contaminanti nella popolazione generale con particolare attenzione a quella infantile e la selezione di opportuni biomarcatori di esposizione e/o effetto anche attraverso campagne mirate di biomonitoraggio. Da non trascurare inoltre, soprattutto per quei composti altamente rappresentati negli alimenti e nell'ambiente quali gli IE, la definizione di modelli per studiare effetti combinati di più sostanze, che rispecchia la situazione "reale" di esposizione per la popolazione generale. A tal proposito, le moderne metodiche molecolari di tossicogenomica, quali ad esempio il *microarray assay*, consentendo di analizzare simultaneamente numerosi set di geni coinvolti nei principali pattern metabolici dell'organismo, possono rappresentare un promettente strumento per uno screening iniziale di valutazione della possibile alterazione dell'espressione genica.

Tali metodi combinati consentirebbero di addivenire ad un approccio il più possibile olistico alla prevenzione.

Bibliografia

1. The Swedish National Chemicals Inspectorate. KEMI Report - Human Health Risk Assessment. *Proposal for the use of assessment (uncertainty factors)*. 2003 N.1/03. Disponibile all'indirizzo: http://www.kemi.se/upload/Trycksaker/Pdf/Rapporter/Rapport1_03.pdf; ultima consultazione 27/12/05.
2. Brent RL. Utilization of animal studies to determine the effects and human risks of environmental toxicants (drugs, chemicals and physical agents). *Pediatrics* 2004;113(4):984-95.
3. Schwenk M, Gundert-Remy U, Heinemeyer G, Olejniczak K, Stahlmann R, Kaufmann W, Bolt HM, Greim H, von Keutz E, Gelbke HP. Children as a sensitive subgroup and their role in regulatory toxicology: DGPT workshop report. *Arch Toxicol* 2003;77:2-6.
4. Ginsberg G, Hattis D, Sonawane B. Incorporating pharmacokinetic differences between children and adults in assessing children's risks to environmental toxicants. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;198:164-83.

5. de Zwart LL, Haenen HEMG, Versantvoort CHM, Wolterink G, van Engelen JGM, Sips AJAM. Role of biokinetics in risk assessment of drugs and chemicals in children. *Regul Toxicol Pharmacol* 2004;39:282-309.
6. Scheuplein R, Charnley G, Dourson M. Differential sensitivity of children and adults to chemical toxicity. I. Biological Basis. *Regul Toxicol Pharmacol* 2002;35:429-47.
7. Dourson M, Charnley G, Scheuplein R. Differential sensitivity of children and adults to chemical toxicity. II. Risk and Regulation. *Regul Toxicol Pharmacol* 2002;35:448-67.
8. Aldridge JE, Gibbons JA, Flaherty MM, Kreider ML, Romano JA, Levin ED. Heterogeneity of toxicant response: sources of human variability. *Toxicol Sci* 2003;76:3-20.
9. Dipartimento Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità. *Interferenti Endocrini*. Disponibile all'indirizzo: <http://progetti.iss.it/inte/>; ultima consultazione 5/12/05.
10. Ososki AL, Kennelly EJ. Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytotherapy Research* 2003;17:845-69.
11. Setchell KDR, Zimmer-Nechemias L, Cai J, Heubi JE. Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *Lancet* 1997;350:23-7.
12. Shea KM. Global environmental change and children's health: understanding the challenges and finding solutions. *J Pediatr* 2003;143(2):149-54.
13. Landrigan P, Garg A, Droller DB. Assessing the effects of endocrine disruptors in the National Children's Study. *Environ Health Perspect* 2003;111(13):1678-82.
14. Rogan WJ, Ragan NB. Evidence of effects of environmental chemicals on endocrine system in children. *Pediatrics* 2003;112(1):247-52.
15. Rudel RA, Camann DE, Spengler JD, Korn LR, Brody JG. Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust. *Environ Sci Technol* 2003;37(20):4543-53.
16. Butte W, Heinzow B. Pollutants in house dust as indicators of indoor contamination. *Rev Environ Contam Toxicol* 2002;175:1-46.
17. Organisation for Economic Co-operation and Development (1999). *Detailed Review Document on Classification Systems for Reproductive Toxicity in OECD Member Countries*. Series on Testing Assessment / Adopted. Guidance and Review Documents, n.15. Disponibile all'indirizzo: http://www.oecd.org/document/30/0,2340,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html; ultima consultazione 27/12/05.
18. Stoker ET, Parks LG, Gray LE, Cooper RL. Endocrine-disrupting chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid function in the male rat, a focus on the EDSTAC Recommendations. *Crit Rev Toxicol* 2000;30:197-252.
19. Grote K, Stahlschmidt B, Talsness CE, Gericke C, Appel KE, Chahoud I. Effects of organotin compounds on pubertal male rats. *Toxicology* 2004;202:145-58.
20. Morford LL, Henck JW, Breslin WJ, DeSesso JM. Hazard identification and predictability of children's health risk from animal data. *Environ Health Perspect* 2004;112(2):266-71.

NUOVI ASPETTI NELL'ANALISI DEL RISCHIO PER L'ETÀ EVOLUTIVA

Alberto Mantovani (a) Anna Maria Ferrini (b)

(a) *Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Introduzione

La specificità dell'analisi del rischio per l'età evolutiva in sicurezza è associata sia ad una diversa vulnerabilità generale rispetto all'adulto legata, ad esempio, ad un diverso consumo di alimenti, sia alla suscettibilità di funzioni dell'organismo con prolungati processi di maturazione (1). Pertanto, è necessario dare attenzione all'intero complesso di eventi che caratterizzano lo sviluppo postnatale, dalla nascita alla fase critica della pubertà. Alcuni fattori di rischio a lungo termine per l'età evolutiva stanno ricevendo una notevole attenzione e vi è una crescente mole di dati scientifici, sia su modelli sperimentali che epidemiologici: un esempio è rappresentato dalle sostanze che possono interferire con lo sviluppo neurocomportamentale (2).

Le conoscenze e la disponibilità di modelli di studio sono invece minori per altri possibili rischi, di cui per contro viene riconosciuta l'importanza crescente nei paesi sviluppati. Questo articolo si propone, pertanto, di riassumere e valutare i dati disponibili sul ruolo di fattori di rischio associati all'alimentazione, quali residui e contaminanti, in tre problemi emergenti per la salute dell'età evolutiva: le alterazioni della pubertà, i disturbi immunitari e la funzionalità della flora microbica intestinale.

Alterazioni della pubertà

Vi è una chiara tendenza a lungo termine verso un anticipo della pubertà nei paesi sviluppati, probabilmente dovuta ai cambi nell'alimentazione e negli stili di vita. Ad esempio, uno studio portoghese del 2003 riporta che l'età media della prima mestruazione nell'arco di 100 anni è passata da 15 anni (donne nate nel 1880-90) a 12 anni (nate nel 1970-80) (3). Questo è un dato di cui tenere conto in ambito sanitario, ma non può essere considerato un fenomeno patologico, anche se potrebbe forse aumentare la suscettibilità a fattori esterni che "forzano" l'equilibrio endocrino. L'interazione di differenti fattori, genetici e ambientali, è indicata dalle differenze fra diversi paesi e gruppi etnici; ad esempio, negli USA la tendenza è particolarmente evidente nelle ragazzine afroamericane (4). Accanto a questi fattori più generali, alcuni studi indicano un possibile ruolo di sostanze chimiche, in particolare dei contaminanti organici persistenti, quali il DDT e altri insetticidi clorurati e i policlorodifenili (PCB) (5). Si tratta di sostanze che persistono nell'ambiente, bioaccumulano nelle catene alimentari e negli organismi grazie alla forte affinità per i lipidi, e possono indurre effetti a lungo termine mediante diversi meccanismi, associati in generale con l'interferenza con l'omeostasi endocrina; pertanto questi inquinanti rappresentano un potenziale problema di esposizione umana anche molti anni dopo i divieti in atto nei paesi industrializzati. Gladen *et al.* (6) hanno osservato una modesta, ma significativa, associazione fra l'esposizione precoce a PCB e al DDE, metabolita del DDT, e il maggiore peso

e statura alla pubertà, sia pure con evidenti differenze legate al sesso e al gruppo etnico; l'esposizione precoce a DDE mostra anche una possibile associazione con l'età al menarca (7). Si tratta di dati che meritano attenzione, indicando un effetto sui processi fisiologici della formazione della struttura corporea e di maturità riproduttiva di xenobiotici a livelli di esposizione attesi nella popolazione generale; per contro, non si possono al momento trarre conclusioni sull'effettiva importanza per la salute di tali osservazioni, in particolare come segnali di interferenza con l'equilibrio degli ormoni steroidi e ipofisari (8).

Le limitate conoscenze sui meccanismi che modulano il processo della pubertà sono ancora più evidenti riguardo ai fattori (endogeni, nutrizionali e/o ambientali) coinvolti nell'avvio chiaramente prematuro della pubertà, noto come "pubertà precoce". Si tratta di un complesso di disturbi che nella gran parte dei casi devono tuttora essere definiti "idiopatici" (9). In particolare, salvo alcune, rare sindromi genetiche associate con un drammatico quadro clinico di disendocrinia, è difficile identificare geni con un ruolo importante nella predisposizione alla pubertà precoce (10).

La prematurità, il basso peso alla nascita e l'obesità infantile sono fattori di rischio per la pubertà precoce, indicando l'importanza della nutrizione nelle prime fasi della vita, in particolare riguardo ad un eccessivo incremento ponderale nella prima infanzia (11). Questo aspetto rileva anche la difficoltà nel trovare adeguati modelli sperimentali per i meccanismi coinvolti nella pubertà precoce, almeno nei classici studi che utilizzano roditori. Nel ratto, infatti, il ritardo di crescita intrauterino è correlato ad un significativo ritardo nella maturità sessuale e ad una riduzione nel numero dei follicoli ovarici (12); l'assunzione complessiva di calorie dopo lo svezzamento è invece direttamente associata con un'accelerazione della maturità sessuale (13), un dato che sembrerebbe confermare la correlazione osservata nell'essere umano fra anticipo della pubertà e migliore alimentazione.

Alcuni studi indicano il ruolo di residui e contaminanti negli alimenti come fattori di rischio per fenomeni sia di pubertà precoce nelle bambine che di ginecomastia nei bambini. In particolare l'attenzione va agli "interferenti endocrini" (IE) (14), un eterogeneo gruppo di composti utilizzati nella filiera agrozootecnica, in prodotti di consumo o industriali, accomunati dalla capacità di alterare l'equilibrio endocrino, spesso con effetti di tipo estrogenico o antiandrogenico. In Italia focolai di telarca e di ginecomastia nei bambini in età scolare sono stati in passato associati all'uso (illegale in Europa, ma talora insufficientemente controllato) di anabolizzanti ad azione ormonale nell'allevamento di animali da carne a crescita rapida, quale il vitello che è spesso presente nelle mense scolastiche; tuttavia queste ipotesi non sono sempre state confermate (15-16). A Portorico a partire dalla fine degli anni '70 si è verificato un drammatico incremento di casi di pubertà precoce in bambine di età dai 6 mesi agli 8 anni con incidenze di 6,2 e 1,62 su 1.000, rispettivamente nelle bambine sotto i 2 anni e sopra i 2 anni; tali incidenze erano oltre 10 volte superiori a quelle di una popolazione riferimento (Minnesota, USA) ed hanno giustificato l'istituzione a Portorico di un registro epidemiologico per controllare l'andamento del fenomeno e valutarne le possibili sequele a lungo termine sulla salute e il benessere psicofisico (17). In gran parte delle bambine colpite sono stati riscontrati elevati livelli ematici di ftalati; si ipotizza un'esposizione alimentare, anche se l'origine non è stata chiarita (18). Gli ftalati, sono utilizzati come additivi nelle plastiche e anche in cosmetici, anche se vietati in Europa in oggetti per la prima infanzia (giocattoli, tettarelle) e nelle pellicole per alimenti ad elevata componente grassa. Diversi ftalati, soprattutto il diesel etilftalato, sono considerati IE in quanto inducono effetti estrogenici e antiandrogeni in animali da laboratorio; benché siano considerati sostanze con basso potere di bioaccumulo, il vasto utilizzo li rende contaminanti potenzialmente ubiquitari, come indica uno studio del 2003 in Puglia che ha evidenziato la presenza del diesel etilftalato e del suo metabolita monoetil, nel sangue materno e nel cordone ombelicale (19). Gli effetti endocrini di alcuni ftalati possono essere dovuti ad una

diretta azione agonista sul recettore nucleare pregnano-X che media l'induzione di cascate enzimatiche coinvolte nella sintesi degli steroidi e nel metabolismo di xenobiotici (20). L'adozione e la migrazione sono riconosciuti fattori di rischio per la pubertà precoce. I bambini nati in paesi in via di sviluppo e adottati da famiglie nei paesi industrializzati rappresentano infatti, un gruppo ad alto rischio; lo stress da adattamento al nuovo ambiente di vita è senz'altro un fattore importante, ma viene considerato anche un possibile ruolo per gli IE (21). Uno studio belga ha evidenziato l'associazione fra pubertà precoce e livelli ematici di DDE (metabolita del DDT) in bambine immigrate, nate in paesi ove questo pesticida è ancora utilizzato (22).

Il possibile ruolo dei contaminanti chimici non è limitato alla pubertà precoce. In due comunità del Belgio ad elevata esposizione a contaminanti ambientali, i livelli ematici di PCB e diossine erano associati ad un significativo ritardo degli indicatori di maturazione sessuale negli adolescenti dei due sessi (23). Va notato che queste sostanze hanno meccanismi di azione ed effetti diversi dagli IE con effetti "estrogenici", quali DDT e ftalati. La conoscenza dei meccanismi di tossicità è, infatti, una base necessaria per valutare le associazioni fra livelli di esposizione a determinati xenobiotici ed effetti.

Diverse sostanze inducono alterazioni degli indicatori macroscopici di maturazione sessuale (pervietà della vagina, distacco del prepuzio, ecc.) nei roditori. Ad esempio, l'insetticida clorurato metossicloro, considerato un IE ad azione estrogenica, accelera la maturazione sessuale nel ratto femmina e la ritarda nel ratto maschio (24). In mancanza di marcatori più sensibili e di una solida base scientifica per estrapolare gli effetti sperimentali all'essere umano, tali studi possono essere inadeguati per un'accurata valutazione del rischio. Pertanto, vi è un crescente interesse verso protocolli sperimentali mirati allo studio degli effetti dell'esposizione ad IE e altri xenobiotici nel periodo prepuberale, considerata come una fase specificamente suscettibile e critica per la maturazione dell'individuo (25, 26).

Un altro aspetto di notevole interesse è la valutazione delle conseguenze a lungo termine. Uno stimolo in tale senso viene da alcuni studi su roditori che mostrano una modulazione della maturazione del tessuto mammario con l'esposizione alimentare a "fitoestrogeni": si tratta di sostanze con attività endocrina contenute in alimenti vegetali, quali la genisteina, particolarmente presente nella soia, e i lignani, prodotti dalla flora intestinale metabolizzando precursori presenti in cereali e verdura (27, 28). Pertanto, ulteriori studi potranno focalizzarsi sulle ricadute a lungo termine delle interferenze con lo sviluppo endocrino e riproduttivo, quali la predisposizione al cancro in specifici tessuti e le alterazioni dell'equilibrio immunitario.

Alterazioni della funzione immunitaria

L'incremento di disturbi respiratori su base allergica nei bambini dei paesi industrializzati è stato esaminato da un gruppo di lavoro della strategia europea "Ambiente e Salute" (29) che ha individuato, oltre alla predisposizione genetica, il fumo passivo e la presenza di allergeni nella polvere domestica tra i principali fattori di rischio. Un altro fenomeno meritevole di attenzione sono le allergie a componenti alimentari, che possono colpire il 4-6% dei bambini negli USA, con un evidente incremento di incidenza a partire dagli anni '90 (30). Pertanto, l'infanzia è un momento critico per la maturazione della funzione immunitaria. Un'indicazione sull'importanza delle esposizioni precoci nella patogenesi dei disturbi immunitari viene dagli studi sulla celiachia, in cui è molto elevato il rischio di patologie autoimmuni; il rischio non è associato con gli indicatori quantitativi di assunzione del glutine, mentre è direttamente correlato con il ritardo nella diagnosi, vale a dire con una più prolungata esposizione al glutine durante l'età evolutiva (31).

Accanto ai fattori genetici e ambientali accennati sopra, l'alimentazione e il metabolismo nutrizionale hanno sicuramente un ruolo nell'asma. Nelle donne, ma non negli uomini, la gravità dell'asma è correlata con l'indice di massa corporea; l'associazione è più forte nelle donne che hanno avuto menarca precoce (32). Uno studio su una coorte di adolescenti vietnamiti ha identificato una specifica associazione fra il rischio di rinocongiuntivite allergica e l'incremento sia dell'indice di massa corporea che della percentuale di grasso corporeo; tale associazione non era presente per altre forme allergiche, comprese le allergie alimentari (33) e inoltre non è costante fra i diversi gruppi etnici asiatici, per fattori genetici e/o alimentari ancora da identificare (34). L'apparente parallelismo degli aumenti sia di malattie allergiche sia di obesità osservati negli ultimi decenni merita ulteriori indagini; in particolare, le acquisizioni sull'attività metabolica del tessuto adiposo meritano attenzione. Un esempio è la leptina, una citochina prodotta dagli adipociti (adipochina) che agisce come mediatore fra lo stato nutrizionale e le funzioni neuroendocrina e immune (35). La leptina modula l'attività T-helper e aumenta sia durante i processi infiammatori sia in numerosi disturbi autoimmuni. (35).

Lo sviluppo della funzione immunitaria può essere influenzato da componenti bioattive negli alimenti. Elevati livelli materni di assunzione di antiossidanti (vitamine C ed E) possono ridurre il rischio di eczema e rinite nei primi due anni di vita, mentre ulteriori indagini sono in corso per valutare eventuali effetti sul rischio di asma e allergie negli anni successivi (36). Riguardo ai fitoestrogeni, i dati disponibili corroborano ulteriormente l'interazione fra modulazione endocrina e immunitaria. L'esposizione attraverso la dieta a genisteina in utero e durante l'allattamento induce nel ratto un incremento dei linfociti T nella milza, e in particolare delle sottopopolazioni T-suppressore/citossici mentre nel timo aumentano i linfociti T-helper; altri aspetti interessanti comprendevano che gli effetti immunitari erano accompagnati solo da lievi effetti endocrini (riduzione del testosterone), che erano circoscritti ai maschi e infine che non erano modificati dal proseguimento o meno dell'esposizione dopo lo svezzamento, rilevando così l'importanza delle esposizioni precoci (37). Nei soggetti affetti da asma, il consumo di genisteina (calcolato in base all'assunzione di prodotti a base di soia) è associato ad una migliore funzionalità respiratoria; per contro, non sono state osservate associazioni con il consumo di antiossidanti, alimenti vegetali, grasso e fibre (38).

Diversi sono gli xenobiotici potenzialmente presenti come residui e contaminanti negli alimenti che possono colpire la funzione immunitaria in studi tossicologici sui roditori. È interessante osservare come tali effetti vengano sovente indotti da sostanze che interferiscono anche con il sistema endocrino e/o nervoso. Esempi sono metalli pesanti come mercurio e arsenico (39), diversi insetticidi tra cui piretroidi (39) e organofosfati (40), e alcuni ritardanti di fiamma bromurati, composti a largo utilizzo caratterizzati da potenziale bioaccumulo e da effetti neurocomportamentali e tireostatici (41). Inoltre, gli studi indicano la possibilità sia di effetti additivi fra diversi xenobiotici, ad esempio, fra piretroidi e metalli pesanti (39), sia l'aggravamento degli effetti con la contemporanea esposizione a diete squilibrate con eccesso di lipidi o proteine, verosimilmente per un incremento dello stress ossidativo (40). Importanti contaminanti alimentari con effetti immunotossici comprendono, gli agonisti del recettore arilico quali diossine, PCB 126 e altri PCB coplanari, e idrocarburi policiclici aromatici: un possibile meccanismo è la reciproca interferenza fra il recettore e l'importante fattore di trascrizione NFκB (*Nuclear factor kappa B*), uno dei principali agenti coinvolti nell'infiammazione e nell'apoptosi (42).

Considerando la riconosciuta importanza dell'immunotossicità fra gli effetti di diversi gruppi di xenobiotici, ne è stato fatto un uso limitato nella valutazione del rischio, ad esempio per definire livelli massimi accettabili o tollerabili, rispettivamente, di residui e contaminanti alimentari. Uno dei motivi è la complessità degli effetti, in particolare dei marcatori più sensibili, quali il bilancio delle citochine o delle immunoglobuline, il rapporto fra le

sottopopolazioni linfocitarie o l'induzione di ipersensibilità ritardata (37, 39); un altro è la carenza di dati sperimentali su aspetti importanti, in primo luogo la suscettibilità legata all'età ma anche l'induzione di fenomeni autoimmuni, su cui richiamano l'attenzione alcuni dati epidemiologici, ad esempio sui PCB (43). Pertanto, è ancora difficile inserire in maniera efficiente e armonizzata l'immunotossicità nell'analisi del rischio in sicurezza alimentare e i dati disponibili vanno valutati caso per caso. Un esempio recente è la valutazione degli organostannici da parte del gruppo "contaminanti" dell'*Authority* Europea per la Sicurezza Alimentare (44). Si tratta di composti liposolubili e con tendenza al bioaccumulo, in particolare negli organismi marini, che hanno avuto, e in parte tuttora hanno, diversi usi come biocidi, conservanti e additivi di materie plastiche. Analogamente ad altri composti menzionati in precedenza, gli organostannici hanno effetti endocrini e neurotossici; tuttavia studi sperimentali *ad hoc* hanno mostrato una specifica tossicità per i linfociti T con un NOEL di 0,025 mg/kg pc, inferiore di un ordine di grandezza rispetto ai NOEL per gli altri tipi di effetto. Pertanto l'immunotossicità è stata identificata come effetto critico per la definizione di livelli massimi tollerabili negli alimenti per gli organostannici. Infine, è da notare che, al contrario che per lo sviluppo riproduttivo, siano ancora scarsi gli studi che correlano l'esposizione a specifici xenobiotici e i disturbi dello sviluppo immunitario.

Come già accennato, le allergie alimentari meritano un'attenzione specifica nell'ambito del complesso dei disturbi su base immune con insorgenza nell'infanzia, data la possibile, seria interferenza con l'inizio dell'alimentazione. Si tratta di un fenomeno che si instaura nel primo anno di vita; quale prima strategia per la prevenzione primaria, il mondo pediatrico indica concordemente l'adozione dell'allattamento al seno, per almeno i primi sei mesi di vita (45). Un aspetto interessante è la "teoria dell'igiene", secondo cui un ambiente di vita a carica microbica molto bassa, quale si riscontra in molte famiglie nei paesi industrializzati, sarebbe un importante fattore di rischio per una disturbata maturazione dell'immunità intestinale, anche interferendo con la regolazione delle popolazioni intestinali di mastociti ed eosinofili (46); più in generale, è indubbia l'importanza della flora microbica intestinale nella modulazione della risposta immunitaria nelle prime fasi della vita, compreso lo sviluppo della necessaria tolleranza ad allergeni ubiquitari (47).

Alterazioni della flora batterica intestinale

La flora batterica intestinale è costituita da un insieme di microrganismi che vivono nell'intestino in stretta associazione con l'ospite formando un ecosistema complesso e realizzando una vera simbiosi con l'ospite stesso. L'ecosistema intestinale svolge un ruolo chiave nello sviluppo normale del sistema immunitario associato alla mucosa gastrointestinale, noto come GALT (*Gut-Associated Lymphoid Tissue*), che da solo contiene il 40% di tutte le cellule immunitarie del corpo umano (48, 49). Si calcola che la flora batterica intestinale possa comprendere circa 400-500 specie diverse. Ciascuna specie occupa una propria nicchia lungo il tratto gastrointestinale e svolge diverse funzioni: agisce come barriera contro i microrganismi patogeni, aumenta il rinnovamento delle cellule epiteliali della mucosa intestinale, potenzia il sistema linfatico locale, stimola le difese immunitarie aumentando la mobilitazione e l'attività fagocitaria dei macrofagi.

È implicata inoltre nel metabolismo delle sostanze nutritive, nella fermentazione delle fibre alimentari, nel controllo quali-quantitativo dei gas intestinali, nell'utilizzazione e produzione di vitamine del complesso B, PP e K, nel metabolismo di sostanze prodotte dall'organismo come acidi della bile e ormoni, nella metabolizzazione dei farmaci e nella captazione e trasformazione

di sostanze chimiche tossiche (50-52). L'efficienza della flora batterica intestinale può essere ridotta da una serie di fattori di diversa natura (per dirne alcuni: scorretta alimentazione, diarrea o stitichezza, infezioni uro-genitali, patologie del tratto intestinale, assunzione di alcuni farmaci e, in particolare, di antibiotici) (53-57).

Prendiamo in considerazione l'effetto degli antibiotici. Gli antibiotici possono essere assunti in conseguenza di terapie, appropriate o no, ma possono anche essere introdotti con l'alimentazione, sia pure in concentrazioni molto basse, attraverso il consumo di prodotti di origine animale. Nei sistemi di produzione moderni, gli antibiotici possono essere somministrati agli animali a scopo profilattico, terapeutico o auxinico e questo può comportare il rischio della presenza di loro residui nei prodotti alimentari derivati (latte, carne, pesce, uova e miele) e destinati al consumo.

Per tutelare la salute del consumatore, il Regolamento CEE 2377/90 (58) ha introdotto il concetto di MRL (*Maximum Residue Limit*), cioè la concentrazione massima di un residuo di medicinale veterinario ammessa per una matrice alimentare in quanto ritenuta sicura per l'uomo e ne ha definito la procedura comunitaria di determinazione.

MRL sono stati di fatto fissati per una lista positiva di molecole di uso veterinario mentre, per altre considerate non ammissibili in matrici alimentari (cloramfenicolo, dapsona, nitrofurani), non è stato definito nessun MRL.

Un altro punto importante per garantire la sicurezza dei prodotti alimentari è rappresentato dalla Direttiva 96/23/EC (59) che riguarda le misure di controllo da effettuare su una serie di sostanze ad azione farmacologica utilizzate in veterinaria e sui loro residui (tra cui gli antibiotici) nei prodotti alimentari e la realizzazione di piani di sorveglianza nazionali nei prodotti destinati al consumo. La realizzazione di piani di sorveglianza nazionali implica che il controllo in merito su vasta scala ha la duplice valenza di deterrente per eventuali violazioni alla legislazione alimentare e di effettivo controllo per l'individuazione delle violazioni. Di fatto, a conferma dell'utilità del controllo ufficiale, vengono segnalate contaminazioni da residui di antibiotici in diverse matrici alimentari di provenienza animale, sia pure in percentuale estremamente bassa. È interessante notare che addirittura per il miele, considerato alimento naturale e per il quale non è previsto l'utilizzo di antibiotici, sono state evidenziate contaminazioni da residui di diverse famiglie di antibatterici, compreso il cloramfenicolo, molecola bandita nella Comunità Europea ma ancora largamente utilizzata nei paesi del sud est asiatico e quindi potenzialmente rinvenibile nei prodotti d'importazione provenienti da quei paesi.

Uno degli studi considerati per la definizione di MRL è quello riguardante le proprietà microbiologiche sulla flora intestinale umana per assicurare l'assenza di effetti inibenti su di questa una volta che l'antibiotico venga introdotto con la dieta. Il valore di MRL è normalmente molto basso ma non si può tuttavia escludere un sinergismo o un effetto additivo con altri antibiotici introdotti contemporaneamente, per esempio in concomitanza con un trattamento farmacologico. Le conseguenze limite degli antibiotici sulla flora intestinale possono portare al sopravvento da parte un microrganismo resistente, inclusi quelli produttori di tossine (la diarrea da *Clostridium difficile* nell'intestino, in seguito a trattamento con antibiotici a largo spettro cui questo microrganismo è resistente, può portare a morte il paziente (60, 61). È da considerare inoltre il caso in cui l'eventuale residuo può degradare ad una struttura diversa da quella stabilita come residuo marcatore: le penicilline sono relativamente poco stabili e facilmente possono trasformarsi in acido penicilloico (molecola allergica). Questo potrebbe sfuggire tanto al normale controllo di screening microbiologico (tale molecola è microbiologicamente inattiva) quanto a quello chimico (molecola diversa dal marcatore previsto). Sarebbe necessario pertanto contemplare la possibilità di definire, per casi particolari, ulteriori parametri di ricerca. Si ricorda anche l'importanza di disporre di metodi di analisi di screening validati per matrici alimentari ancora non previste (in particolare nel settore del latte) considerando ad esempio che

oggi il latte di capra confezionato viene raccomandato per bambini con allergia al latte vaccino e che di fatto il sistema di controllo per i residui di antibiotici in questa matrice non è ancora ben definito. Così come sono scarsi i dati sui metodi utilizzabili sul latte congelato (di pecore, capre e bufale) che viene normalmente utilizzato per le preparazioni di mozzarelle o ricotte durante l'estate. Il consumo di prodotti animali (in particolare quelli crudi o poco cotti) comporta normalmente anche l'ingestione di ceppi batterici che, patogeni o non patogeni, possono portare geni di antibioticoresistenza che potrebbero essere trasmessi a ceppi batterici intestinali umani, anche di specie tassonomicamente lontane. Questo fenomeno, che amplifica il rischio delle patologie non trattabili con gli antibiotici in questione o con quelli a resistenza crociata, rappresenta in assoluto il dato più preoccupante, in quanto la diffusione dell'antibiotico resistenza interessa un numero sempre crescente di specie batteriche ed è considerata una delle più importanti minacce attuali per la salute pubblica. Tuttavia, nella valutazione degli MRL non sono stati contemplati dati sull'induzione di antibiotico resistenza sulla flora intestinale animale e di fatto, ad oggi, l'uso degli antibiotici per gli animali è considerata la causa principale per la insorgenza di ceppi antibiotico resistenti, patogeni e non. Naturalmente l'evidenza diretta e immediata di antibioticoresistenza, anche multipla, riguarda quella associata agli agenti zoonotici. Sono stati isolati ceppi di *Salmonella enterica* non tifoidea, *S. typhimurium* DT104, Enterococcus (VRE) e *Campylobacter* spp. così come, sia pure con incidenza minore *Escherichia coli* 0157 (62). Sono venuti alla luce fenomeni di resistenze crociate fra antibiotici della stessa famiglia. L'avoparcina (usata in veterinaria) ha indotto resistenza alla vancomicina (di uso clinico) che è attualmente l'unico antibiotico attivo nei confronti di microrganismi multiresistenti quali lo *S.aureus* meticillino-resistente (MRSA) (63). L'uso dell'avoparcina ha inoltre creato un serbatoio di van-A che mediano in *Enterococcus faecalis* la resistenza ai glicopeptidi (64). I fluorochinoloni usati negli allevamenti animali hanno promosso la selezione di ceppi resistenti appartenenti alle più disparate specie batteriche. Tutto questo ha contribuito alla selezione di batteri resistenti che, attraverso la catena alimentare, possono essere trasmessi all'uomo (65, 66). Oltre questi patogeni "importanti" va considerata anche la normale popolazione microbica associata ai prodotti alimentari, che può raggiungere il consumatore senza produrre un danno evidente immediato. Anche la normale "facies" microbica può perciò essere considerata a sua volta un potenziale rifornimento di geni di antibiotico resistenza.

L'esistenza di un serbatoio di batteri antibiotico resistenti e di geni di antibiotico resistenza in un ambiente interattivo di animali, piante, esseri umani crea una diffusa possibilità di trasferimento e diffusione dell'antibiotico resistenza. Inoltre anche nello stesso intestino umano concentrazioni sub-inibenti di antibiotico possono costituire un fattore favorente l'insorgenza e la diffusione di antibiotico resistenza soprattutto in soggetti già predisposti in quanto con flora intestinale ridotta o alterata. È importante infine ricordare che la qualità dei prodotti di origine animale riflette la qualità della loro produzione. Gli antibiotici non devono sostituire le buone pratiche zootecniche, ma il loro utilizzo deve essere il più attento e mirato possibile. Le conseguenze dell'uso inappropriato si ritorcono, infatti, non solo contro chi li adopera male ma anche contro tutta la comunità nel suo complesso, sia oggi che domani.

Conclusioni

Gli aspetti emergenti della sicurezza alimentare per l'età evolutiva che, a titolo di esempio, abbiamo considerato confermano il ruolo critico delle prime fasi della vita per la salute dell'individuo e l'importanza di prevenire o ridurre l'esposizione a fattori di rischio durante lo sviluppo. I dati disponibili sottolineano il ruolo delle interazioni fra diversi fattori di rischio,

genetici, metabolici, alimentari, ambientali, socioculturali. Un esempio è lo stretto rapporto fra sicurezza alimentare e ambientale, indicato dall'importanza che può assumere l'assunzione alimentare di contaminanti attraverso meccanismi di bioaccumulo (6, 7, 18, 19, 22, 23, 43); gli alimenti originano da organismi viventi e la qualità e sicurezza degli alimenti riflettono l'ambiente in cui gli organismi crescono. Nel contempo, i dati presentati evidenziano la necessità di incrementi delle conoscenze, come base indispensabile per più accurate strategie per l'analisi e la gestione del rischio.

Un primo elemento sono i meccanismi fisiologici coinvolti in eventi critici per la maturazione dell'individuo quali la pubertà nonché delle complesse interazioni che coinvolgono i sistemi endocrino, immunitario e nervoso; un esempio è il ruolo metabolico del tessuto adiposo, che appare sempre più importante per il mantenimento di una corretta interazione dell'organismo con l'ambiente esterno (8, 35).

È indispensabile che l'analisi del rischio in sicurezza alimentare si arricchisca di nuovi approcci. In primo luogo occorre aumentare i dati scientifici sugli effetti di fattori alimentari (xenobiotici e composti "naturali") nell'età evolutiva attraverso opportuni modelli sperimentali (24-26, 37); in tale modo, ad esempio, la regolamentazione di residui e contaminanti potrà avvenire in maniera più accurata, mirando alle fasce più suscettibili e non solo ad un ipotetico "individuo medio". Un altro aspetto è considerare l'esposizione alimentare nel suo complesso; a tale proposito è importante considerare le possibili interazioni fra xenobiotici che possono essere compresenti nella dieta (39) e, ancora di più, fra sostanze chimiche e nutrienti (28, 40): questo secondo aspetto può contribuire a chiarire come gli stili alimentari possono o meno rappresentare fattori protettivi nei confronti di rischi presenti nella dieta o nell'ambiente. Va poi considerata la necessità di prevedere (almeno per alcuni casi particolari) ulteriori marcatori per la ricerca di residui di antibiotici negli alimenti e metodi di analisi validati per le diverse matrici alimentari. Un ultimo aspetto è lo sviluppo di modelli sperimentali transizionali, che permettano di caratterizzare biomarcatori precoci utilizzabili in programmi di sorveglianza e studi epidemiologici.

Infine, un aspetto conoscitivo importante riguarda lo studio dell'esposizione umana, sia dal punto di vista della reale assunzione di xenobiotici e sostanze bioattive attraverso la dieta, sia incrementando gli studi che mettano in correlazione indicatori di esposizione con indicatori di effetto (es. 6, 18, 36, 38, 43).

Infine, accanto allo sviluppo delle conoscenze, va ricordato che è già possibile attuare efficaci azioni reventive nei confronti di fattori di rischio alimentari per l'età evolutiva. In primo luogo è necessario il controllo dell'applicazione delle buone pratiche nella filiera agrozootecnica, evitando l'uso non necessario di antibiotici e pesticidi; in secondo luogo, l'adozione di corretti comportamenti a partire dalle prime fasi della vita, quali la promozione dell'allattamento al seno (43, 46) e la prevenzione dell'obesità nei bambini e adolescenti (11, 33), può rappresentare un importante fattore per la riduzione dei rischi provenienti dall'ambiente di vita.

Bibliografia

1. Tamburlini G. La vulnerabilità dei bambini ai fattori ambientali. In: Figà-Talamanca I, Mantovani A. (Ed.). *Ambiente e infanzia in Italia* Roma: Verduci; 2004. p. 23-31.
2. Calamandrei G, Scattoni M. Fattori ambientali e sviluppo neuropsicologico. In: Figà-Talamanca I, Mantovani A. (Ed.). *Ambiente e infanzia in Italia* Roma: Verduci; 2004. p. 138-153.
3. Padez C, Rocha MA. Age at menarche in Coimbra (Portugal) school girls: a note on the secular changes. *Ann Hum Biol* 2003;30:622-32.

4. Delemarre-van de Waal HA. Secular trend of timing of puberty. *Endocr Dev* 2005;8:1-14.
5. United Nations Environment Programme (UNEP). Environment for development. *Persistent Organic Pollutants*. Disponibile all'indirizzo: <http://www.chem.unep.ch/pops/>; ultima consultazione 6/12/05.
6. Gladen BC, Ragan NB, Rogan WJ. Pubertal growth and development and prenatal and lactational exposure to polychlorinated biphenyls and dichlorodiphenyl dichloroethene. *J Pediatr* 2000;136:490-6.
7. Vasiliu O, Muttineni J, Karmaus W. In utero exposure to organochlorines and age at menarche. *Hum Reprod* 2004;19:1506-12.
8. Veldhuis JD, Roemmich JN, Richmond EJ, Rogol AD, Lovejoy JC, Sheffield-Moore M, Mauras N, Bowers CY. Endocrine control of body composition in infancy, childhood, and puberty. *Endocrine Reviews* 2005;26:114-46.
9. Sedlmeyer IL, Pearce CL, Trueman JA, Butler JL, Bersaglieri T, Read AP, Clayton PE, Kolonel LN, Henderson BE, Hirschhorn JN, Palmert MR. Determination of sequence variation and haplotype structure for the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor genes: investigation of role in pubertal timing. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:1091-9.
10. De Sanctis V, Corrias A, Rizzo V, Bertelloni S, Urso L, Galluzzi F, Pasquino AM, Pozzan G, Guarneri MP, Cisternino M, De Luca F, Gargantini L, Pilotta A, Sposito M, Tonini G. Etiology of central precocious puberty in males: the results of the Italian Study Group for Physiopathology of Puberty. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000;13:687-93.
11. Neville KA, Walker JL. Precocious pubarche is associated with SGA, prematurity, weight gain, and obesity. *Arch Dis Child* 2005;90:258-61.
12. van Weissenbruch MM, Engelbregt MJ, Veening MA, Delemarre-van de Waal HA. Fetal nutrition and timing of puberty. *Endocr Dev* 2005;8:15-33.
13. Odum J, Tinwell H, Tobin G, Ashby J. Cumulative dietary energy intake determines the onset of puberty in female rats. *Environ Health Perspect* 2004;112:1472-80.
14. Dipartimento Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità. *Interferenti Endocrini*. Disponibile all'indirizzo: <http://progetti.iss.it/inte/>; ultima consultazione 5/12/05.
15. Fara GM, Del Corvo G, Bernuzzi S, Bigatello A, Di Pietro C, Scaglioni S, Chiumello G. Epidemic of breast enlargement in an Italian school. *Lancet* 1979;8137:295-7.
16. Nizzoli G, Del Corno G, Fara GM, Chiumello G. Gynaecomastia and premature thelarche in a schoolchildren population of northern Italy. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 1986;279:227-31.
17. Larriuz-Serrano MC, Perez-Cardona CM, Ramos-Valencia G, Bourdony CJ. Natural history and incidence of premature thelarche in Puerto Rican girls aged 6 months to 8 years diagnosed between 1990 and 1995. *P R Health Sci J* 2001;20:13-8.
18. Colon I, Caro D, Bourdony CJ, Rosario O. Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development. *Environ Health Perspect* 2000;108:895-900.
19. Latini G, De Felice C, Presta G, Del Vecchio A, Paris I, Ruggieri F, Mazzeo P. Exposure to Di(2-ethylhexyl)phthalate in humans during pregnancy. A preliminary report. *Biol Neonate* 2003;83:22-4.
20. Hurst CH, Waxman DJ. Environmental phthalate monoesters activate pregnane X receptor-mediated transcription. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;199:266-74.
21. Parent AS, Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J, Bourguignon JP. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocr Rev* 2003;24:668-93.

22. Krstevska-Konstantinova M, Charlier C, Craen M, Du Caju M, Heinrichs C, de Beaufort C, Plomteux G, Bourguignon JP. Sexual precocity after immigration from developing countries to Belgium: evidence of previous exposure to organochlorine pesticides. *Hum Reprod* 2001;16:1020-6.
23. Den Hond E, Roels HA, Hoppenbrouwers K, Nawrot T, Thijs L, Vandermeulen C, Winneke G, Vanderschueren D, Staessen JA. Sexual maturation in relation to polychlorinated aromatic hydrocarbons: Sharpe and Skakkebaek's hypothesis revisited. *Environ Health Perspect* 2002;110:771-6.
24. Masutomi N, Shibutani M, Takagi H, Uneyama C, Takahashi N, Hirose M. Impact of dietary exposure to methoxychlor, genistein, or diisononyl phthalate during the perinatal period on the development of the rat endocrine/reproductive systems in later life. *Toxicology* 2003;192:149-70.
25. Kim HS, Shin JH, Moon HJ, Kim TS, Kang IH, Seok JH, Kim IY, Park KL, Han SY. Evaluation of the 20-day pubertal female assay in Sprague-Dawley rats treated with DES, tamoxifen, testosterone, and flutamide. *Toxicol Sci* 2002;67:52-62.
26. Grote K, Stahlschmidt B, Talsness CE, Gericke C, Appel KE, Chahoud I. Effects of organotin compounds on pubertal male rats. *Toxicology* 2004;202:145-58.
27. Tou JC, Thompson LU. Exposure to flaxseed or its lignan component during different developmental stages influences rat mammary gland structures. *Carcinogenesis* 1999;20:1831-5.
28. Luijten M, Thomsen AR, van den Berg JA, Wester PW, Verhoef A, Nagelkerke NJ, Adlercreutz H, van Kranen HJ, Piersma AH, Sorensen IK, Rao GN, van Kreijl CF. Effects of soy-derived isoflavones and a high-fat diet on spontaneous mammary tumor development in Tg.NK (MMTV/c-neu) mice. *Nutr Cancer* 2004;50:46-54.
29. European Commission. Environment and Health. *Environment and Health Action Plan*. Disponibile all'indirizzo: http://europa.eu.int/comm/environment/health/index_en.htm; ultima consultazione 6/12/05.
30. Zeiger RS. Dietary aspects of food allergy prevention in infants and children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30(Suppl):S77-86.
31. Sategna Guidetti C, Solerio E, Scaglione N, Aimo G, Mengozzi G. Duration of gluten exposure in adult coeliac disease does not correlate with the risk for autoimmune disorders. *Gut* 2001;49:502-5.
32. Varraso R, Siroux V, Maccario J, Pin I, Kauffmann F. Asthma severity is associated with body mass index and early menarche in women. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:334-9.
33. Irei AV, Takahashi K, Le DS, Ha PT, Hung NT, Kunii D, Sakai T, Matoba T, Yamamoto S. Obesity is associated with increased risk of allergy in Vietnamese adolescents. *Eur J Clin Nutr* 2005;59:571-7.
34. Irei AV, Sato Y, Lin TL, Wang MF, Chan YC, Hung NT, Kunii D, Sakai T, Kaneda M, Yamamoto S. Overweight is associated with allergy in school children of Taiwan and Vietnam but not Japan. *J Med Invest* 2005;52:33-40.
35. Otero M, Lago R, Lago F, Casanueva FF, Dieguez C, Gomez-Reino JJ, Gualillo O. Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. *FEBS Lett* 2005;579(2):295-301. Review.
36. Martindale S, McNeill G, Devereux G, Campbell D, Russell G, Seaton A. Antioxidant intake in pregnancy in relation to wheeze and eczema in the first two years of life. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171(2):121-8.
37. Klein SL, Wisniewski AB, Marson AL, Glass GE, Gearhart JP. Early exposure to genistein exerts long-lasting effects on the endocrine and immune systems in rats. *Mol Med* 2002;8:742-9.
38. Smith LJ, Holbrook JT, Wise R, Blumenthal M, Dozor AJ, Mastronarde J, Williams L; American Lung Association Asthma Clinical Research Centers. Dietary intake of soy genistein is associated with lung function in patients with asthma. *J Asthma* 2004;41:833-43.

39. Institoris L, Siroki O, Undeger U, Basaran N, Desi I. Immunotoxicological investigation in rats dosed repeatedly with combinations of cypermethrin, As(III), and Hg(II). *Toxicology* 2002;172:59-67.
40. Handy RD, Abd-El Samei HA, Bayomy MF, Mahran AM, Abdeen AM, El-Elaimy EA. Chronic diazinon exposure: pathologies of spleen, thymus, blood cells, and lymph nodes are modulated by dietary protein or lipid in the mouse. *Toxicology* 2002;172(1):13-34.
41. Gill U, Chu I, Ryan JJ, Feeley M. Polybrominated diphenyl ethers: human tissue levels and toxicology. *Rev Environ Contam Toxicol* 2004;183:55-97.
42. Tian Y, Rabson AB, Gallo MA. Ah receptor and NF-kappaB interactions: mechanisms and physiological implications. *Chem Biol Interact* 2002;141:97-115.
43. Schoenroth L, Chan S, Fritzler M. Autoantibodies and levels of polychlorinated biphenyls in persons living near a hazardous waste treatment facility. *J Investig Med* 2004;52:170-6.
44. European Food Safety Authority. *Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission to assess the health risks to consumers associated with exposure to organotins in foodstuffs*. (Question N° EFSA-Q-2003-110). Disponibile all'indirizzo: http://www.efsa.eu.int/science/contam/contam_opinions/658_en.html; ultima consultazione 6/12/05.
45. Muraro A, Dreborg S, Halken S, Host A, Niggemann B, Aalberse R, Arshad SH, Berg Av A, Carlsen KH, Duschek K, Eigenmann P, Hill D, Jones C, Mellon M, Oldeus G, Oranje A, Pascual C, Prescott S, Sampson H, Svartengren M, Vandenplas Y, Wahn U, Warner JA, Warner JO, Wickman M, Zeiger RS. Dietary prevention of allergic diseases in infants and small children. Part III: Critical review of published peer-reviewed observational and interventional studies and final recommendations. *Pediatr Allergy Immunol* 2004;15:291-307.
46. Bischoff S, Crowe SE. Food allergy and the gastrointestinal tract. *Curr Opin Gastroenterol* 2004;20:156-61.
47. Bjorksten B. Effects of intestinal microflora and the environment on the development of asthma and allergy. *Springer Semin Immunopathol* 2004;25:257-70.
48. Smith DW, Nagler-Anderson C. Preventing intolerance: the induction of nonresponsiveness to dietary and microbial antigens in the intestinal mucosa. *J Immunol* 2005;174(7):3851-7.
49. Rook GA, Brunet LR. Microbes, immunoregulation, and the gut. *Gut* 2005;54(3):317-20. Review.
50. Macpherson AJ, Uhr T. Compartmentalization of the mucosal immune responses to commensal intestinal bacteria. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1029:36-43.
51. Li Y, Shimizu T, Hosaka A, Kaneko N, Ohtsuka Y, Yamashiro Y. Effects of bifidobacterium breve supplementation on intestinal flora of low birth weight infants. *Pediatr Int* 2004;46(5):509-15.
52. Jump RL, Levine AD. Mechanisms of natural tolerance in the intestine: implications for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2004 Jul;10(4):462-78.
53. Leiva M, Moreno E, Ruiz-Bravo A, Jimenez-Valera M. Immunomodulation by non-absorbable antibiotics given by the intragastric route. *Int J Antimicrob Agents* 2005;25(3):252-5.
54. McGarr SE, Ridlon JM, Hylemon PB. Diet, anaerobic bacterial metabolism, and colon cancer: a review of the literature. *J Clin Gastroenterol* 2005;39(2):98-109.
55. Carman RJ, Simon MA, Fernandez H, Miller MA, Bartholomew MJ. Ciprofloxacin at low levels disrupts colonization resistance of human fecal microflora growing in chemostats. *Regul Toxicol Pharmacol* 2004;40(3):319-26.
56. Kruis W. Review article: antibiotics and probiotics in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20(Suppl 4):75-8.
57. Beaugerie L, Petit JC. Microbial-gut interactions in health and disease. Antibiotic-associated diarrhoea. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18(2):337-52.

58. European Community, Council Regulation (EEC) 2377/90, 26 June 1990. Laying down a Community Procedure for the establishment of maximum residue limits for veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Communities* L224, p. 1.
59. European Community, Council Directive 96/23/EC, 29 April 1996. Measures to monitor certain substances and residue thereof in live animals and animal products and repealing Directive 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decision 89/187/EEC and 91/664/EEC. *Official Journal of the European Communities* L125, p. 10-32.
60. Carney T, Perry JD, Ford M, Majumdar S, Gould FK. Evidence for antibiotic induced *Clostridium perfringens* diarrhoea. *J Clin Pathol* 2002;55(3):240.
61. Threlfall EJ, Ward LR, Frost JA, Willshaw GA. The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. *Int J Food Microbiol* 2000;62(1-2):1-5.
62. Helms M, Simonsen J, Olsen KE, Molbak K. Adverse health events associated with antimicrobial drug resistance in *Campylobacter* species: a registry-based cohort study. *J Infect Dis* 2005;191(7):1050-5. Epub 2005 Mar 1. Erratum in: *J Infect Dis* 2005;191(9):1570.
63. Chopra I. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*: concerns, causes and cures. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2003;1(1):45-55.
64. Klare I, Konstabel C, Badstubner D, Werner G, Witte W. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int J Food Microbiol* 2003;88(2-3):269-90.
65. Bywater RJ. Veterinary use of antimicrobials and emergence of resistance in zoonotic and sentinel bacteria in the EU. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2004;51(8-9):361-3.
66. Kapil A. The challenge of antibiotic resistance: need to contemplate. *Indian J Med Res* 2005;121(2):83-91.

ESPOSIZIONE A SOSTANZE CHIMICHE PRESENTI NELLA DIETA IN ETÀ PEDIATRICA

Catherine Leclercq, Cinzia Le Donne, Davide Arcella, Laura D'Addezio, Aida Turrini
INRAN, Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione, Roma

Il presente capitolo si riferisce all'esposizione in età pediatrica a sostanze potenzialmente tossiche. Non tratteremo né l'esposizione a nutrienti o ad altre sostanze bioattive che possono essere assunte in eccesso nell'età pediatrica mediante il consumo di alimenti fortificati o di supplementi, né l'esposizione a sostanze potenzialmente allergeniche. Ognuno di questi argomenti meriterebbe un'intera trattazione.

Introduzione

Diverse sono le sostanze chimiche che possono essere assunte con la dieta. Ogni sostanza ha una sua tossicità e tutte possono produrre effetti negativi sull'organismo. Ognuna di queste costituisce quindi un cosiddetto "pericolo", poiché sono potenzialmente in grado di causare effetti avversi sulla salute. Tuttavia la loro presenza nella dieta non implica che ci sia un effettivo "rischio" per la nostra salute. Infatti il rischio dipende non solo dalla gravità dell'effetto potenziale ma soprattutto dalla quantità di ogni sostanza presente nella dieta (1). È questa quantità che determina la probabilità di un effetto avverso alla salute.

Nello studiare la tossicità di una sostanza, si possono prendere in considerazione gli effetti di un'esposizione acuta o cronica. Per esposizione acuta si intende un'esposizione o una serie di esposizioni della durata massima di una giornata, mentre per esposizione cronica si intende l'esposizione in un arco temporale che può andare da un giorno a tutta la vita (1).

Lo studio dell'esposizione dalla dieta ha come obiettivo principale quello di stimare l'assunzione delle sostanze chimiche. Mediante confronto con i rispettivi valori soglia, quali ad esempio le Dosi Giornaliere Ammissibili (DGA), permette quindi di distinguere le sostanze per le quali è possibile l'esistenza di un rischio per la salute di una parte significativa della popolazione, da quelle per le quali questo rischio è molto basso.

Per le sostanze chimiche presenti nella dieta, il processo di valutazione del rischio è una procedura standard a livello internazionale. Prevede, nell'ordine, l'identificazione del pericolo (della sostanza tossica e dei suoi effetti), la caratterizzazione del pericolo (cioè la valutazione della tossicità che permette eventualmente di fissare un valore soglia di assunzione), la valutazione dell'esposizione (cioè la stima dell'assunzione dalla dieta e da altre fonti) per poi concludersi con la caratterizzazione del rischio (mediante confronto tra l'esposizione e i valori soglia) cioè con una valutazione di sicurezza d'uso della sostanza negli alimenti.

L'esposizione viene quindi presa in considerazione nell'ambito delle valutazioni di sicurezza d'uso delle sostanze chimiche effettuate da organismi internazionali quali ad esempio l'EFSA, (www.efsa.eu.int) per l'Europa; il *Joint FAO/WHO Meeting on Pesticides Residues* (JMPR, <http://www.inchem.org/pages/jmpr.html>) e il *Joint FAO/WHO Committee on Food Additives* (JECFA, <http://www.inchem.org/pages/jecfa.html>) per le Nazioni Unite.

Una volta completato il processo di valutazione del rischio, le autorità competenti proseguono con la cosiddetta gestione del rischio, vale a dire predisponendo le opportune normative riguardanti i prodotti alimentari. Per quanto riguarda i paesi aderenti all'Unione

Europea la gestione del rischio è compito della Commissione Europea (http://www.europa.eu.int/eur-lex/it/com/wpr/1999/com1999_0719it01.pdf). Il processo di analisi del rischio si conclude con la comunicazione del rischio.

Una volta concluso il processo di analisi del rischio di una sostanza è sicuramente opportuno continuare a sorvegliarne i livelli di esposizione nel tempo. Tale sorveglianza permette infatti di evidenziare se, nonostante le limitazioni imposte dalla legge, sia possibile l'assunzione di sostanze chimiche in dosi che possono comportare un rischio per la salute del consumatore. La sorveglianza dei livelli di assunzione di sostanze chimiche dalla dieta deve essere continuativa dal momento che questi possono cambiare velocemente a seguito di modifiche nelle modalità di produzione, di variazioni nella formulazione dei prodotti trasformati o di un diverso comportamento dei consumatori. Particolare attenzione deve essere sempre rivolta alla stima dell'esposizione nelle fasce di popolazione più sensibili e/o più esposte tra cui i bambini.

Categorie di sostanze chimiche presenti nella dieta

Ai fini della valutazione dell'esposizione è opportuno distinguere le sostanze chimiche presenti negli alimenti in tre grandi gruppi: quelle che residuano negli alimenti, i contaminanti chimico-ambientali e infine gli additivi e gli aromi. Per una trattazione più dettagliata delle sostanze potenzialmente tossiche presenti negli alimenti ci si potrà riferire al trattato di Capuano (2).

Sostanze chimiche che residuano negli alimenti

Appartengono al gruppo delle sostanze che residuano negli alimenti quelle utilizzate intenzionalmente nelle pratiche agricole e zootecniche e per il confezionamento o la trasformazione degli alimenti.

I fitofarmaci, vale a dire pesticidi, erbicidi, fungicidi, ecc., sono generalmente dotati di tossicità elevata e vengono immessi nell'ambiente per il controllo dei parassiti nocivi. Per queste sostanze i livelli massimi di residui negli alimenti sono stabiliti per legge a livello europeo (3).

Anche nell'allevamento di animali, varie sostanze di natura chimica sono utilizzate nell'ambito della profilassi o la cura delle patologie (ad esempio antibiotici) o per il miglioramento sia dei mangimi (come gli antiossidanti) che dell'aspetto dei prodotti animali (come la cantaxantina aggiunta nei mangimi per colorare il rosso delle uova e i salmoni). Tali impieghi hanno come possibile conseguenza la permanenza di residui in tracce nelle derrate alimentari di origine animale. Discorso a parte deve essere fatto per i farmaci a base di ormoni, e in particolare per gli ormoni sessuali. Questi, per legge (4), possono infatti avere un impiego solo con finalità terapeutiche (cura della sterilità, ecc.).

Per quel che riguarda la cessione di sostanze potenzialmente tossiche dai materiali e dagli oggetti all'alimento, la legge (5) stabilisce i requisiti di purezza e le prove di cessione alle quali i materiali e gli oggetti stessi debbono essere sottoposti per determinare l'idoneità d'uso cui sono destinati. La cessione di sostanze chimiche dal contenitore al contenuto dipende infatti da vari fattori. In particolare, la concentrazione di residui nel cibo aumenta con il rapporto tra l'area della superficie di contatto e la massa dell'alimento. Tale concentrazione è quindi potenzialmente più elevata nel caso delle piccole confezioni.

Gli alimenti sono infine anche suscettibili di contenere residui di coadiuvanti tecnologici quali, ad esempio, i residui dei solventi negli oli, di detersivi, di disinfettanti o di sbiancanti. La regolamentazione dell'utilizzo di tali sostanze non è ancora armonizzata a livello europeo.

Contaminanti chimico-ambientali

La contaminazione degli alimenti e delle acque potabili costituisce uno dei principali rischi di esposizione della popolazione agli agenti chimici ambientali. Tra i contaminanti ricordiamo:

- le tossine naturali tra cui, in particolare, le tossine algali e le ittitossine (responsabili ad esempio del mitilismo, che si può verificare a seguito di ingestione di mitili contaminati), le tossine presenti in funghi velenosi, i composti goitrogeni presenti in molte Brassicaceae (cavoli, cavolfiori, ecc.), le lectine (presenti nei legumi se non cotti in maniera appropriata), la solanina (presente nelle parti verdi delle patate);
- le ammine biogene o pressorie di cui possono essere ricchi sia alcuni alimenti e bevande ottenuti mediante processo fermentativo se le condizioni di igiene non sono adeguatamente controllate (es. formaggi erborinati, vino e birra) che pesci avariati appartenenti alla famiglia degli sgombroidi (es. tonni, sgombri, pesce azzurro ecc...);
- le micotossine prodotte naturalmente da muffe che si sviluppano sulle piante, in campo o nelle derrate alimentari durante lo stoccaggio (potenzialmente presenti in particolare nei cereali, nel latte, nel cacao, nelle mele, ecc.);
- le sostanze tossiche che si sviluppano con alcuni processi di cottura quali, ad esempio, l'acrilamide (presente in concentrazioni elevate in alimenti come le patate, i cereali e il caffè che hanno subito un processo di frittura, cottura al forno o tostatura) e gli idrocarburi policiclici aromatici (presenti in particolare sulla superficie di alimenti affumicati o cucinati alla griglia ma la cui fonte principale è l'inquinamento atmosferico);
- i metalli pesanti quali piombo, cadmio e mercurio (questo ultimo è particolarmente concentrato nei pesci predatori e nei frutti di mare);
- altri contaminanti ambientali quali i nitrati (le cui fonti principali sono le verdure e l'acqua da bere);
- alcuni pesticidi non più utilizzati ma che persistono come contaminanti ambientali e quindi presenti nella catena alimentare come il DDT;
- i radionuclidi (quali l'iodio 131, il cesio 134 e 137, lo stronzio 89 e 90, e il bario 140) che raggiungono l'uomo attraverso la catena alimentare;
- le cosiddette "diossine" che, assieme ai PCB (policlorobifenili), sono formate dalla combustione di plastica clorurata negli inceneritori dei rifiuti ed contaminano la catena alimentare.

Per molti contaminanti esistono specifiche normative che fissano i livelli massimi di presenza nei prodotti alimentari. È il caso, ad esempio, dei metalli pesanti e delle micotossine (6).

Additivi e aromi

Gli additivi sono sostanze che possono essere aggiunte agli alimenti nelle diverse fasi del processo produttivo, con finalità tecnologica. Prima di essere autorizzati nell'Unione Europea, sono oggetto di approfonditi studi tossicologici e devono essere valutati dall'EFSA per quel che riguarda la valutazione del rischio. Proprio perché vengono aggiunti intenzionalmente ai cibi e vi permangono, talvolta in quantità elevata, devono presentare una bassa tossicità per essere ammessi. Alcuni additivi rientrano nel normale metabolismo dell'organismo (ad esempio l'acido ascorbico aggiunto nei succhi di frutta come antiossidante), per questi non si fissa quindi una Dose Giornaliera Ammissibile. Per altri, invece, sarebbe bene limitare l'assunzione, ma sono talvolta necessari per assicurare la salubrità di specifici alimenti trasformati. È il caso dei nitriti che hanno una DGA bassa (0,1 mg/kg) ma sono necessari per la produzione di insaccati in quanto impediscono la crescita del botulino.

I limiti massimi di impiego degli additivi in alimenti e bevande sono definiti dalla legge (7). Gli additivi sono vietati in tutti gli alimenti non trasformati quali carne, pesce, frutta, verdura, zucchero, sale, acqua, miele, latte, olio. Molti alimenti trasformati contengono additivi.

Per quanto riguarda gli aromi, ad oggi la situazione è regolamentata in maniera meno restrittiva rispetto a quella degli additivi. È in corso un processo di valutazione della sicurezza d'uso degli oltre 2.700 aromi che l'industria ha dichiarato di utilizzare da parte dell'EFSA, affinché la Commissione Europea possa stilare una lista positiva degli aromi autorizzati (8). Al contrario degli additivi, la normativa relativa all'etichettatura non prevede che siano indicate tra gli ingredienti le specifiche sostanze utilizzate come aromi (9). La loro presenza deve solo essere riportata con la dicitura "aromi" o "aromi naturali". Va ricordato, a questo proposito, che l'origine naturale di una qualsiasi sostanza non implica una minore tossicità rispetto ad una sostanza artificiale.

Specificità dell'età evolutiva in termini di esposizione a sostanze chimiche

La specifica vulnerabilità e suscettibilità del bambino è oggetto di un altro capitolo del presente rapporto. Qui ricordiamo soltanto che, in linea generale, si può assumere che le sostanze tossiche possono interferire con i processi di crescita e di sviluppo tipiche di questa fascia di età e che le funzioni fisiologiche immature del feto e dei bambini rendono questo gruppo maggiormente vulnerabile. Si ipotizza pertanto che una stessa esposizione, sia cronica che acuta ed espressa per kg di peso corporeo, possa avere conseguenze più serie rispetto agli adulti, almeno nella prima infanzia. Così, ad esempio, proprio in considerazione della maggiore vulnerabilità di bambini rispetto agli adulti, il JECFA ha ridotto il Livello di Assunzione Settimanale Provvisorio Tollerabile per il piombo da 50 µg/kg peso corporeo a 25 µg/kg peso corporeo (10).

In linea generale, non vengono stabilite DGA specifiche per i bambini e un eventuale superamento di tali dosi, se limitata all'età pediatrica, non dovrebbe teoricamente destare preoccupazione perché la DGA stabilisce la dose che può essere assunta "per tutta la vita". Tuttavia, proprio in riferimento ad una loro possibile maggiore vulnerabilità, l'esposizione in fascia pediatrica è oggetto di specifici studi finalizzati ad identificare gli additivi per i quali vi è un rischio di superamento della DGA (11). La DGA non è comunque indicativa per soggetti di età inferiore a 12 settimane.

Quello che distingue maggiormente l'esposizione di un bambino rispetto a quella di un adulto è che il suo consumo di alimenti e bevande, riferito al peso corporeo, è molto più elevato. Infatti i suoi fabbisogni sono maggiori in termini sia di calorie che di acqua. Questo implica, a parità di concentrazione di sostanze nella dieta, una maggiore esposizione nel bambino rispetto all'adulto. Il rischio di superamento dei valori soglia di assunzione per kg di peso corporeo, definiti a partire da studi tossicologici, è quindi maggiore.

Nel caso del lattante, le sostanze chimiche potenzialmente presenti nel latte materno, quali metalli pesanti, diossine, pesticidi, micotossine e nitrati, saranno quelle presenti nella dieta della madre che lo allatta, ma anche in questo caso l'esposizione va riferita al peso corporeo del neonato. Inoltre, nel caso di sostanze liposolubili, queste possono essere più concentrate nel latte materno che nella dieta della madre. Così è stato stimato che l'esposizione a diossine e PCB in bambini allattati è da uno a due ordini di grandezza più elevato che nel resto della popolazione (12).

I consumi alimentari di un bambino sono però anche qualitativamente diversi da quelli dell'adulto e cambiano rapidamente a secondo della fascia di età. Questa diversità può implicare una minore esposizione ad alcune sostanze e una maggiore esposizione ad altre.

Fattori che limitano l'esposizione a sostanze chimiche

Prima infanzia (0-3 anni)

Durante i primissimi anni di vita l'alimentazione del bambino è solitamente seguita e regolata dal pediatra, che di mese in mese pianifica lo schema alimentare più adatto a seconda dei fabbisogni nutrizionali e della reazione del bambino all'introduzione di nuovi alimenti. Le indicazioni del pediatra sono riferite sia alla scelta degli alimenti che alle tecniche di cottura e vanno in genere nel senso di un'esposizione minore a sostanze potenzialmente tossiche rispetto all'alimentazione dell'adulto. Così, vi è generalmente una grande attenzione nel dare ai bambini piccoli soprattutto cibi non trasformati (e quindi senza conservanti o altri additivi). Gli alimenti sono bolliti o cotti al vapore e non vengono quindi utilizzate tecniche di cottura che favoriscono lo sviluppo di sostanze tossiche. Vengono scelti prodotti molto freschi con particolare attenzione al pesce e alla carne. Nel gruppo del pesce non vengono somministrati ai bambini piccoli né pesci predatori né frutti di mare, che sono potenzialmente più contaminati. Tra i formaggi, non vengono somministrati quelli erborinati. Si limita quindi l'assunzione potenziale di ammine biogene.

Il consumo di alimenti trasformati si limita in genere a quelli specifici per la prima infanzia (alimenti per lattanti in buona salute, alimenti di proseguimento o per lo svezzamento), per i quali la normativa è più severa in termini sia di contaminanti che di additivi. Ad esempio, il tenore massimo di aflatoxine M1 è di 0,025 µg /kg nel latte per lattanti (13), più basso rispetto al valore di 0,05 µg /kg ammesso nel latte di uso comune (6). Recentemente sono stati revisionati i tenori massimi di idrocarburi aromatici policiclici (IPA) in alcuni prodotti alimentari. Tenori massimi inferiori sono stati fissati separatamente per gli alimenti destinati, che non dovranno contenere più di 1 µg/kg di peso umido di IPA, espressi come benzo(a)pirene (14).

La minore esposizione dei bambini per alcune categorie di additivi è anche assicurata da alcuni divieti di utilizzo nella produzione di alimenti destinati a questa fascia di età. È il caso degli edulcoranti e dei coloranti che "non possono essere utilizzati negli alimenti per l'infanzia", eccetto il carbonato di calcio (E170) ammesso come colorante negli alimenti per lo svezzamento (7). Non sono inoltre ammessi gli esaltatori di sapidità (E620-E625) e tra i conservanti sono esclusi i solfiti (E220-228) che potrebbero scatenare crisi pseudo-allergiche e il BHA (E320) e il BHT (E321) che hanno delle DGA particolarmente basse (rispettivamente 0,5 e 0,05 mg/kg di peso corporeo). Anche i nitrati (E251, E252) e i nitriti (E249-250) non sono autorizzati come additivi negli alimenti per l'infanzia e anche il livello massimo dei nitrati come contaminanti in questi alimenti è stato recentemente abbassato a 200 mg di NO₃/kg di prodotto (15). Gli additivi ammessi sono per lo più emulsionanti, stabilizzanti e agenti addensanti (7). La maggior parte di questi presenta una DGA non specificata, il che significa che "sulla base di dati tossicologici, biochimici e clinici sono sostanze che non presentano un rischio per la salute" (16). Tra gli altri additivi autorizzati, che però presentano una DGA, troviamo la carragenina (E407, DGA 75 mg/kg di peso corporeo), un addensante ammesso negli alimenti di proseguimento, i tartrati (E334-336, DGA 30 mg/kg di peso corporeo) utilizzati nei biscotti e nelle fette biscottate e i fosfati (E339-341, DGA 70 mg/kg di peso corporeo) autorizzati negli alimenti per lo svezzamento, nei cereali e nei dessert a base di frutta. La carragenina va in particolare tenuta sotto controllo poiché, dai dati elaborati nell'ambito dello SCOOP 4.2, rientra nella lista di additivi la cui esposizione potrebbe essere troppo elevata in questa fascia di età (11).

Nella prima infanzia, l'assunzione potenziale di pesticidi può talvolta essere ridotta mediante il ricorso alle linee di alimenti per l'infanzia provenienti da colture e allevamenti che seguono le regole imposte dalla legge relative ai metodi di produzione biologica (17).

Età scolare (da 3 anni in poi)

Dopo i primi tre anni di vita, l'alimentazione del bambino diventa più libera rispecchiando sempre di più quella degli adulti. La concentrazione di sostanze chimiche nella dieta diventa quindi abbastanza simile a quella dell'adulto con alcune eccezioni. Così, ad esempio, l'esposizione a solfiti è minore per l'esclusione delle bevande alcoliche, l'esposizione ad alcune tossine naturali è minore per l'avversione della gran parte dei bambini nei confronti di alcuni sapori amari e l'esposizione a sostanze nervine quali la caffeina viene in genere evitata dai genitori. Una minore esposizione potenziale a residui di pesticidi può avvenire attraverso la fruizione di mense scolastiche che prevedono l'utilizzo dei prodotti biologici, così come avviene spesso in Italia negli ultimi anni.

Fattori che aumentano l'esposizione potenziale

Prima infanzia (0-3 anni)

Nella prima infanzia sono pochi i fattori che possono implicare una maggiore esposizione a sostanze chimiche rispetto a quella dell'adulto. Tra di essi, ad esempio, uno è legato all'elevata fedeltà alle marche e ai singoli prodotti nell'ambito degli alimenti per l'infanzia. Infatti, in caso di contaminazione di alcuni prodotti specifici, l'esposizione potenziale dei consumatori fedeli è più elevata rispetto a quella dei consumatori che variano sia il tipo di prodotto che la marca.

Un altro fattore di rischio è legato ai residui da materiali di contatto. Il rapporto tra superficie di contatto e massa del prodotto è molto elevato negli alimenti in confezioni piccole, tra cui ad esempio gli omogeneizzati. È opportuno comunque sottolineare che vi è comunque un'estrema attenzione nell'identificare e rimuovere tutte le potenziali fonti di contaminazione nei prodotti per l'infanzia. Si può citare a questo proposito l'esempio del semicarbazide, una sostanza recentemente individuata negli omogeneizzati e di cui si è scoperto che derivava dai tappi dei vasetti. La reazione da parte dell'industria e degli organi ufficiali è stata immediata sia in termini di approfondimento degli aspetti tossicologici che in provvedimenti atti a rimuovere, nel frattempo, la fonte della contaminazione e cioè a modificare la composizione dei tappi (18).

Età scolare (da 3 anni in poi)

La scarsa varietà della dieta è uno dei principali fattori di rischio per l'ingestione di quantità eccessive di sostanze chimiche. Molti bambini adottano stili alimentari particolarmente monotoni consumando, con elevata frequenza, un numero limitato di alimenti da loro preferiti. Questo può portare ad un'esposizione potenzialmente elevata per alcune sostanze chimiche. Così il consumo sistematico di dolci industriali, bevande analcoliche, gomme e caramelle può implicare una maggiore esposizione ad aromi, coloranti, edulcoranti intensi e conservanti rispetto all'adulto. Il consumo frequente di insaccati durante i pasti o a merenda può portare invece ad un'assunzione elevata di nitriti. Anche il ricorso alla frittura come modalità di cottura preferita dai bambini, può implicare una maggiore esposizione a sostanze potenzialmente tossiche. In particolare, il consumo molto frequente di patatine fritte o di patatine in sacchetto fa dei bambini e degli adolescenti un gruppo particolarmente a rischio per l'esposizione all'acrilammide (19).

Inoltre, non leggendo sistematicamente le etichette, non sempre i genitori sono consapevoli della presenza di sostanze estranee negli alimenti consumati dai loro figli. Può quindi capitare che bambini, anche piccoli, consumino bevande a base di succo di frutta o yogurt alla frutta che contengono edulcoranti intensi. Infatti, possono trarre in inganno, ad esempio, le bevande a base di succo con la dicitura “senza zucchero aggiunto” per le quali il genitore si aspetta la presenza solo degli zuccheri naturali della frutta e non di edulcoranti intensi, talvolta comunque presenti. Ugualmente, con la dicitura “light” il genitore si può aspettare che lo yogurt sia solo povero di grassi. Per legge, la presenza degli edulcoranti è riportata nella denominazione del prodotto e nella lista degli ingredienti ma questa, spesso, non viene letta e quindi queste due tipologie di prodotti possono facilmente essere somministrati a bambini.

Banche dati di consumo di alimenti nell'età evolutiva

Studi su scala nazionale sui consumi alimentari della popolazione (inclusa l'età evolutiva) sono stati condotti dall'Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (INRAN) (20, 21), con rilevazione a livello individuale solo nel 1994-96. Altri studi quantitativi a carattere nazionale hanno riguardato la popolazione in età scolare (22, 23). Altre rilevazioni per età specifiche, sono realizzate annualmente dall'Istituto Nazionale di Statistica (ISTAT) nel contesto dell'Indagine Multiscopo – Aspetti della vita quotidiana – e prendono in considerazione la frequenza di consumo per gruppi di alimenti (24). Altri studi sulle abitudini alimentari dei bambini, sempre in termini di frequenza, sono stati svolti nel 2002 (25). Diverse sono state le indagini sul tema dell'alimentazione a livello europeo, tra cui quella realizzata dall'European Food Information Council (EUFIC) (26).

In Italia le maggiori difficoltà che si incontrano nel reperire dati utili per la stima dell'esposizione nei bambini a livello nazionale sono dovute alla dispersione dell'informazione. Gli studi sono spesso locali e in periodi di tempo non sempre confrontabili. Varia molto anche l'età presa in considerazione nei diversi studi. Ad esempio, nell'indagine INRAN (21) i risultati sono stati presentati per la classe di età 1-9 anni mentre nell'indagine ISTAT multiscopo 6-10 anni, nell'indagine della COLDIRETTI 7-13 anni (sottoclassi 7-10, 11-13) e nello studio del progetto ARCA 5-11 anni. EUFIC ha pubblicato dati sulla fascia di età 8-15 anni (sottoclassi 8-10, 11-12, 13-15). La principale motivazione di queste differenze risiede nel fatto che i consumi alimentari dei bambini sono molto spesso rilevati in relazione a programmi di sorveglianza nutrizionale (27), sulla refezione scolastica (28) e sull'educazione alimentare nelle scuole.

Sono, infine, da prendere in considerazione le classiche questioni relative ai raggruppamenti alimentari, che riguardano le indagini alimentari in genere: per quali categorie sono espressi i consumi, quali prodotti sono in esse inclusi e come si allineano rispetto alle sostanze obiettivo dell'elaborazione per la stima dell'esposizione.

Tutti argomenti sui quali non si ha, fino ad ora, una risposta teorica definitiva, ma soluzioni “procedurali” che hanno condotto allo sviluppo di diversi sistemi di descrizione (LanguaL) e codifica (EUROCODE 2, DAFNE, EFCOSUM, CODEX ALIMENTARIUS, molti sistemi sviluppati “in casa”) (29). Il profilo alimentare dei bambini italiani considerati nello studio INN-CA 1994-1996 è riportato nella Tabella 1 (21). I raggruppamenti riportati in tabella, ad esempio, non rispondono a tutte le possibili esigenze di analisi rispetto alla stima dell'esposizione. Per questo occorrerà procedere ad una aggregazione diversa a seconda della sostanza obiettivo a partire dalla banca dati delle singole voci rilevate. Gli studi sui consumi condotti con metodi quantitativi (diario e recall) forniscono l'input più adeguato per la stima dell'esposizione a sostanze chimiche (30, 31).

Tabella 1. Profili alimentari di bambini italiani da 1 a 9 anni (g/die/procapite); campione di 179 bambini estratto dallo studio INN-CA 1994-96

Gruppo alimentare	Media ± deviazione standard
<i>Cereali e tuberi</i>	
Pane e pizza	87,4 ± 62,1
Cracker, grissini, fette biscottate, ecc.	4,8 ± 10,0
Pasta di semola	33,4 ± 26,2
Pasta all'uovo	3,4 ± 7,5
Pasta all'uovo ripiena	3,6 ± 9,6
Riso	6,5 ± 9,0
Grani e farine	5,3 ± 10,6
Cereali da prima colazione	1,7 ± 6,1
Patate, crude e cotte (incluse patatine confezionate)	30,2 ± 25,5
<i>Carne, pesce, uova, legumi secchi</i>	
Carne bovina	39,9 ± 35,9
Carne suina	3,8 ± 8,7
Carne ovina	2,1 ± 14,0
Carne equina	1,1 ± 5,6
Pollame	26,2 ± 25,9
Coniglio e altre carni	3,5 ± 11,2
Salumi	16,7 ± 17,4
Carne conservata	0,5 ± 2,6
Frattaglie e carne non specificata	5,0 ± 13,8
Prodotti della pesca freschi e surgelati	20,7 ± 24,2
Prodotti della pesca conservati	3,4 ± 6,9
Uova	10,1 ± 10,0
Legumi secchi e in scatola	4,0 ± 10,2
<i>Latte e prodotti derivati</i>	
Latte	198,0 ± 148,0
Yogurt	33,2 ± 41,8
Panna	0,9 ± 3,9
Formaggi	29,4 ± 19,8
<i>Ortaggi e frutta</i>	
Pomodori freschi	18,7 ± 25,0
Pomodori conservati	26,4 ± 27,3
Ortaggi e verdura freschi e surgelati	51,5 ± 48,2
Ortaggi conservati	0,9 ± 2,6
Legumi freschi e surgelati	6,5 ± 12,5
Agrumi	28,0 ± 52,8
Altra frutta fresca	113,0 ± 90,1
Frutta conservata (incluse olive)	1,0 ± 5,0
Frutta secca e in guscio	1,5 ± 7,9
<i>Oli e grassi</i>	
Olio di oliva	12,3 ± 8,5
Olio di semi	1,4 ± 6,0
Burro	2,5 ± 3,9
Margarina	0,3 ± 1,5
Altri grassi animali	0,0 ± 0,1
<i>Prodotti dolci</i>	
Dolci (esclusi i gelati, incluse merendine)	52,1 ± 41,4
Gelati	17,8 ± 29,6
Zucchero	7,5 ± 9,0
Miele e dolciumi	16,6 ± 24,3

segue

continua

<i>Piatti pronti e prodotti composti</i>	
Primi piatti pronti	57,1 ± 68,1
Secondi piatti pronti	3,4 ± 9,8
Piatti a base di vegetali	1,4 ± 7,0
Piatti a base di frutta	1,7 ± 6,1
Altri cibi composti (inclusi tramezzini, panini, ecc.)	4,3 ± 14,3
Snack salati	0,9 ± 4,7
Aceto, sale, lievito	5,1 ± 3,2
Salse e condimenti	1,7 ± 5,5
Prodotti per infanzia	13,6 ± 29,7
Prodotti dietetici e dolcificanti	0,4 ± 2,9
<i>Bevande</i>	
Acqua corrente	255,4 ± 236,1
Acqua minerale	194,3 ± 227,9
Bevande gassate	34,6 ± 74,6
Succhi di frutta	59,3 ± 87,5
Vino e spumante	1,0 ± 2,6
Birra	1,9 ± 15,3
Liquori	0,0 ± 0,1
Tè, foglie	0,4 ± 0,8
Caffè, polvere	0,3 ± 1,0
Infusi e sostituti del caffè	0,4 ± 1,9

Stima dell'esposizione, metodologie utilizzate e loro applicazione alla fascia pediatrica

Per lo studio dell'assunzione di sostanze chimiche da parte dei consumatori sarebbe teoricamente necessario conoscere, oppure essere in grado di stimare, la concentrazione di ciascuna sostanza nei differenti alimenti e il livello di consumo di questi ultimi. L'attività di sorveglianza si esplica principalmente attraverso la raccolta e l'elaborazione di dati riguardanti i consumi alimentari e la presenza delle diverse sostanze negli stessi prodotti. Le notevoli difficoltà nel reperimento di dati sufficientemente disaggregati e la numerosità delle sostanze in questione impongono, generalmente, un'analisi per passi successivi che prevede l'applicazione di metodologie sofisticate alle sole sostanze per le quali è emerso un rischio di superamento dei valori soglia (es. la DGA) con tecniche grossolane (32, 33). Per motivi precauzionali, in mancanza di dati specifici, le metodologie tendono quindi a sovrastimare i livelli di assunzione (34). Le tecniche di stima che generalmente vengono applicate per prime in un approccio per passi successivi sono quelle che non richiedono dati di consumo.

Praticamente, per ognuna delle categorie di sostanze chimiche, che è possibile trovare negli alimenti, è stata sviluppata una diversa metodologia volta a stimarne, nell'ambito di un sistema di sorveglianza o per la valutazione della loro sicurezza d'uso, l'esposizione per eccesso all'inizio di un'analisi per passi successivi. Tutte queste metodologie vengono utilizzate per stimare, sempre per eccesso, i livelli di assunzione di un ipotetico consumatore adulto. Le ipotesi di base possono comunque essere modificate allo scopo di avere come riferimento gruppi specifici di popolazione come i bambini.

Per quel che riguarda l'assunzione di additivi, un metodo molto semplice ed efficace è il "Budget Danese Inverso" (35, 36). Questa metodologia non prende in considerazione ciò che realmente la popolazione consuma. Infatti, per i consumi utilizza delle ipotetiche quantità di cibo e

di liquidi definite come massimi fisiologici che possono essere ingerite ogni giorno e, per le concentrazioni degli additivi negli alimenti, i livelli massimi consentiti per legge. Si fanno poi ipotesi per eccesso circa la proporzione di cibo e bevande che potrebbero contenere l'additivo sempre sulla base della legislazione. I massimi fisiologici espressi per kg di peso corporeo che sono alla base del metodo (100 mL di liquidi e 100 kcal di cibi solidi cioè 50 g di una dieta mista) sono molto conservativi per l'adulto: corrispondono a 6 litri di bevande e al dispendio energetico di una persona che svolge un'attività lavorativa estremamente pesante. Non lo sono invece per i bambini; infatti 100 mL /kg di peso corporeo è la quantità di liquidi raccomandata in un bambino di 2 anni (35). Questo metodo non è quindi applicabile ai cibi per l'infanzia e deve essere adattato nel caso di bambini più grandi. Nell'ambito del progetto SCOOP 4.2 (11), è stato considerato, come scenario aggiuntivo a quello dell'adulto, quello di un bambino di 3 anni e di 15 kg di peso che consumi ogni giorno 1,5 litri di bevanda che contenga l'additivo. Questo livello di consumo corrisponde ai consumi estremi (97,5^{mo} percentile) di bevande analcoliche osservati nel Regno Unito in questa fasce d'età. Questo scenario aggiuntivo ha permesso di identificare gli additivi per i quali esiste un rischio di superamento della DGA nei bambini, mentre nessun rischio era emerso per l'adulto.

Completamente diverso è il *Maximized Survey-Derived Daily Intake* (MSDI), il metodo finora impiegato dal JECFA per stimare l'esposizione agli aromi nell'ambito della valutazione del rischio (37). In questo caso i dati sui quali si basano le stime di assunzione sono quelli di produzione delle sostanze aromatiche forniti dall'industria (38). L'utilizzo di questi dati non garantisce però che le stime dei livelli di assunzione siano, come necessario all'inizio di un'analisi per passi successivi, conservative, vale a dire per eccesso (8). Per questo motivo la EFSA ha scelto di completare le stime di assunzione con un altro metodo, sviluppato a partire dal TAMDI (*Theoretical Added Maximum Daily Intake*) (39), che si basa su un principio simile a quello del metodo "Budget Danese Inverso" (40). Questi metodi non sono però stati ancora adeguatamente validati, né per l'adulto né per il bambino.

Per quanto riguarda i contaminanti, dal 1976 l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) – Dipartimento per la Sicurezza Alimentare – ha implementato il *Global Environment Monitoring System-Food Contamination Monitoring and Assessment Programme* (GEMS/Food), che fornisce informazioni sui livelli e le tendenze dei contaminanti nei singoli alimenti e per gruppi di alimenti nei vari paesi che mettono i dati a disposizione (www.who.int/foodsafety/chem/gems). Laddove è stata stabilita una dose di riferimento acuta (acute RfD) per una sostanza chimica (ad esempio per i pesticidi), è stato proposto l'utilizzo del metodo IESTI (*International Estimate of Short Term Intake*). Questo metodo stima, in maniera conservativa, i livelli di assunzione di pesticidi ipotizzando il consumo di una porzione grande di ogni alimento, contaminata con il livello massimo permesso (41). Per stabilire il peso delle porzioni, il GEMS Food mette a disposizione anche dati con il 97,5^{mo} percentile dei soli consumatori in una singola giornata per un singolo alimento, espressi per kg di peso corporeo. I dati sono disponibili in riferimento sia ai bambini sotto i 6 anni, considerati popolazione target, che nella popolazione generale e vengono regolarmente aggiornati (42). Per l'esposizione cronica a residui di pesticidi l'OMS propone invece l'utilizzo di diete "regionali" (43). In pratica si tratta di stime dei consumi medi per grandi gruppi alimentari sviluppate a partire dai Bilanci Alimentari Nazionali. Di recente alle 5 grandi diete mondiali, Africa, Europa (comprese Australia, Canada, Nuova Zelanda e Stati Uniti), Estremo Oriente, America Latina e Medio Oriente, sono state aggiunte diete rappresentative di aree geografiche e di modelli di consumo alimentare maggiormente specifiche. In questo ambito l'Italia è stata raggruppata con gli altri paesi europei con dieta di tipo Mediterraneo.

Le stime di assunzione al più alto livello di precisione presuppongono, invece, la disponibilità di dati di consumo individuali e di banche dati di concentrazione delle sostanze ad un elevato livello di disaggregazione (anche a livello della singola marca per gli additivi e i residui di

materiale d'imballaggio). Vi è purtroppo una forte parcellizzazione delle informazioni e una grande disomogeneità delle modalità di presentazione dei dati. Le principali fonti di informazioni sulla presenza e la concentrazione delle sostanze chimiche nei cibi e nelle bevande sono la legislazione, le determinazioni analitiche, le etichette degli alimenti confezionati e i contatti con i produttori. Laddove sono state effettuate analisi, talvolta è purtroppo disponibile solo il dato relativo alla frequenza di superamento dei livelli massimi fissati dalla legge. I livelli massimi permessi dalla legge per additivi e contaminanti possono essere molto utili per effettuare stime per eccesso.

Per quanto riguarda l'assunzione di additivi, un esempio di indagine sui consumi condotta a livello della singola marca è quella che ha riguardato un campione rappresentativo di adolescenti (13-19 anni) della Provincia di Roma. Questi dati sono stati utilizzati per stimare l'assunzione di edulcoranti intensi, con particolare attenzione per i consumatori estremi di prodotti senza zucchero (44).

Un esempio di stima dell'esposizione ad additivi nella fascia pediatrica della popolazione italiana, è stato lo studio riguardante l'assunzione potenziale di solfiti dalla dieta (45). In quel caso sono state effettuate determinazioni analitiche di campioni di alimenti pronti per il consumo e sono stati quindi elaborati scenari di consumo per un ipotetico bambino di 30 kg. I pasti ipotizzati prevedevano l'inserimento di alimenti potenzialmente ricchi di solfiti frequentemente consumati in questa fascia di età. Questo scenario, seppur in mancanza di dati reali sui consumi individuali, ha permesso di identificare il rischio di un superamento della DGA nei bambini che fanno un consumo frequente di frutta secca, mentre lo scenario sviluppato nell'adulto ha identificato come fonte principale il vino.

Nel caso dei contaminanti, per effettuare stime di assunzione raffinate è opportuno utilizzare un approccio completamente diverso da quelli finora prospettati: quello della dieta totale (46, 47). In questo caso si stila una lista di alimenti sulla base dei dati di consumo nazionali (paniere). Gli alimenti vengono acquistati in punti vendita distribuiti sul territorio. Si preparano gli alimenti in modo che siano pronti per il consumo e si prelevano campioni per l'analisi. L'esposizione viene quindi stimata per calcolo moltiplicando, per ogni gruppo di alimenti, la concentrazione della sostanza per il livello di consumo nella popolazione. Il paniere viene generalmente stilato sulla base dei consumi rilevati nella popolazione totale, non viene generalmente preso in considerazione un paniere specifico per la fascia pediatrica. Tuttavia, poiché l'esposizione viene stimata per calcolo i dati potrebbero essere utilizzati combinando i valori di concentrazione con i consumi alimentari nella fascia pediatrica, così com'è stato fatto negli Stati Uniti (48). Fino ad ora, in Italia, le analisi di dieta totale sono state principalmente indirizzate alla stima dell'assunzione di macro e micronutrienti (47).

Un importante aspetto nel campo della stima dell'esposizione dalla dieta di sostanze chimiche è quello riguardante lo sviluppo di metodologie statistiche sempre più efficienti. In questo ambito è in fase di studio lo sviluppo di modelli probabilistici per la stima di assunzione di sostanze chimiche, tra le quali anche gli additivi (49, 50). L'utilizzo di un approccio probabilistico permetterebbe infatti di ottenere stime di assunzioni più realistiche riducendo, allo stesso tempo, il dispendio di risorse nella raccolta delle numerose informazioni necessarie.

Implicazioni in termini di comunicazione del rischio e di educazione alimentare

L'esposizione a sostanze chimiche della popolazione pediatrica merita una grande attenzione sia per le implicazioni in termini di salute sia perché vi è una particolare richiesta di

informazione da parte dei consumatori, giustamente molto sensibili all'argomento. I consumatori tendono a preoccuparsi più dei rischi legati alle sostanze aggiunte intenzionalmente dall'industria alimentare o in agricoltura (in particolare dei conservanti e dei residui dei pesticidi) che di altre sostanze tossiche presenti nei cibi come i contaminanti. In realtà i rischi tossicologici legati all'esposizione ad additivi in età pediatrica sono molto limitati con solo poche sostanze da tenere sotto controllo. L'uso diffuso di additivi, quali gli edulcoranti, i conservanti e i coloranti negli alimenti consumati dai bambini pone problemi in termini di informazione dei consumatori e di trasparenza circa la qualità dei prodotti e la natura dei loro ingredienti, piuttosto che di sicurezza d'uso.

Il problema dei contaminanti ambientali presenti nella dieta dei bambini è invece assai più preoccupante dal punto di vista della salute e richiederebbe un maggiore impegno a livello nazionale e internazionale. L'unica soluzione duratura è quella di ridurre l'inquinamento ambientale con provvedimenti drastici in termini di produzione e smaltimento di rifiuti tossici sia casalinghi che industriali. A breve termine, si tratta di sorvegliare i livelli di contaminazione degli alimenti e, nei casi in cui siano troppo elevati, limitare o sconsigliarne il consumo in particolare per i gruppi di popolazione più vulnerabili. Così, di recente, alcuni organismi hanno richiamato l'attenzione dei consumatori sull'elevato livello di contaminazione in mercurio di alcuni grandi pesci predatori e sull'opportunità di limitarne o evitarne del tutto il consumo nei gruppi più vulnerabili tra cui le donne in gravidanza, in allattamento e i bambini. Così l'Autorità per la Sicurezza Alimentare del Regno Unito consiglia nei bambini al di sotto dei 16 anni di evitare del tutto il consumo di squalo e pesce spada e di limitare il consumo di tonno (51).

Un altro esempio è quello dell'opportuna attenzione nella scelta di un'acqua da bere che abbia un tenore ridotto di nitrati per le madri che allattano e per i bambini piccoli (12). Per quanto riguarda la contaminazione del latte materno e i rischi che ne derivano per i lattanti, l'OMS considera comunque che anche nelle zone del mondo particolarmente contaminate i vantaggi dell'allattamento al seno sono superiori ai rischi legati alla contaminazione del latte (12).

È importante fare sì che la percezione del rischio legato ad una sostanza, da parte della popolazione, sia il più possibile proporzionata al rischio reale in modo che eventuali modifiche dei consumi alimentari finalizzate alla riduzione dell'esposizione abbiano un'efficacia reale in termini di protezione della salute e non portino ad altri tipi di problemi. A questo scopo sono importanti iniziative di educazione alimentare. Per la prima volta, nell'ultima edizione delle Linee Guida per una Sana Alimentazione Italiana dell'INRAN (52), una delle 10 linee guida è dedicata sicurezza alimentare: "La sicurezza dei tuoi alimenti dipende anche da te". Un'altra novità di questa edizione è stata quella di dedicare una linea guida ai gruppi a rischio tra cui i bambini. Così, nella linea guida "Consigli speciali per persone speciali", alcune specifiche indicazioni vengono date anche in merito all'alimentazione nell'età pediatrica.

Per ridurre l'esposizione da sostanze chimiche, il primo consiglio rimane comunque sempre quello di variare la dieta e questo viene ribadito nella linea guida "Varia spesso le tue scelte a tavola". Questo consiglio è rivolto all'intera popolazione e in modo particolare ai bambini.

Bibliografia

1. International Programme on Chemical Safety. *Glossary of exposure assessment-related terms: a compilation*. Geneva: IPCS; 2001.
2. Capuano A, Dugo G, Restani P. *Tossicologia degli alimenti*. Torino: UTET; 1999.
3. Italia. Decreto ministeriale 17 novembre 2004. Prodotti fitosanitari: recepimento della direttiva n. 2004/95/CE della Commissione ed aggiornamento del decreto del Ministro della salute 27 agosto 2004, concernente i limiti massimi di residui delle sostanze attive nei prodotti destinati all'alimentazione. *Gazzetta Ufficiale* n. 30, 7 Febbraio 2005.

4. Italia. Decreto legislativo 4 agosto 1999, n. 336. Attuazione delle direttive 96/22/CE e 96/23/CE concernenti il divieto di utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze (beta)-agoniste nelle produzioni di animali e le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti. *Gazzetta Ufficiale* n. 230, 30 settembre 1999.
5. Italia. Decreto legislativo 25 gennaio 1992a, n. 108. Attuazione della direttiva n. 89/109/CEE concernente i materiali e gli oggetti destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale* n. 39 - *Supplemento Ordinario* n. 3, 17 febbraio 1992.
6. Comunità Europea. Regolamento CE 8 marzo 2001, n. 466 della Commissione delle Comunità Europee che definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari e successive modifiche. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* n. L 077, 16 marzo 2001.
7. Italia. Decreto ministeriale 27 febbraio 1996, n. 209. Regolamento concernente la disciplina degli additivi alimentari consentiti nella preparazione e per la conservazione delle sostanze alimentari in attuazione delle direttive n. 94/34/CE, n. 94/35/CE, n. 95/2/CE e n. 95/31/CE. *Gazzetta Ufficiale - Supplemento Ordinario* n. 96, 24 aprile 1996.
8. Arcella D, Leclercq C. Assessment of dietary intake of flavouring substances within the procedure for their safety evaluation. Advantages and limitations of estimates obtained by means of a per capita method. *Food and Chemical Toxicology* 2005;43(1):105-16.
9. Italia. Decreto legislativo 25 gennaio 1992b, n. 107. Attuazione delle direttive 88/388/CEE e 91/71/CEE relative agli aromi destinati ad essere impiegati nei prodotti alimentari ed ai materiali di base per la loro preparazione. *Gazzetta Ufficiale - S.O.* - n. 39 del 17 febbraio 1992; modificato dall'art. 27, L. 24 aprile 1998, n. 128, dal D.M. 8 maggio 2001 n. 229. *Gazzetta Ufficiale* n. 138, 16 giugno 2001, e dal D.M. 5 marzo 2003 n. 100. *Gazzetta Ufficiale*, n. 105, 8 maggio 2003).
10. WHO. Evaluation of certain food additives and contaminants. Thirty-third Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *World Health Organization Technical Report Series* 1989;776:1-64.
11. Comunità Europea. European Commission. *Report on methodologies for the monitoring of food additive intake across the European Union (Final report submitted by the Task Co-ordinator 16 January 1998), Reports of a working Group on Scientific Co-operation on questions relating to food. Task 4.2. SCOOP/INT/REPORT/2.* Brussels: European Commission Directorate General III Industry; 1998.
12. Michaelsen KF, Weaver L, Branca F, Robertson A. *Feeling and nutrition of infants and young children. Guidelines for the WHO Euroean Region, with emphasis on the former Soviet countries.* WHO, 87. Copenhagen: WHO Regional Publications European Series; 2000.
13. Comunità Europea. Regolamento CE 13 aprile 2004 (a), n. 683 della Commissione delle Comunità Europee che modifica il Regolamento CE n. 466/2001 per quanto riguarda le aflatoossine e l'ocratossina A negli alimenti per lattanti e prima infanzia. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* n. L106, 15 aprile 2004.
14. Comunità Europea. Regolamento CE 4 febbraio 2005, n. 208 della Commissione delle Comunità Europee che modifica il Regolamento CE n. 466/2001 per quanto riguarda gli idrocarburi policiclici aromatici. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L34/3, 8 febbraio 2005.
15. Comunità Europea. Regolamento CE 7 aprile 2004 (b) della Commissione delle Comunità Europee che modifica il Regolamento CE n. 466/2001 per quanto riguarda il nitrato in alimenti destinati ai lattanti e ai bambini. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 104/48, 8 aprile 2004.
16. Comunità Europea. European Commission. Report from the Commission on Dietary Food Additive Intake in the European Union, October 2001. Disponibile all'indirizzo: http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sfp/flav_index_en.html; ultima consultazione 21/12/05.
17. Comunità Europea. Regolamento CE 24 giugno 1991, n. 2092 del Consiglio delle Comunità Europee relativo al metodo di produzione biologico di prodotti agricoli e alla indicazione di tale metodo sui prodotti agricoli e sulle derrate alimentari e successive modifiche *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L198 del 22 luglio 1991.

18. EFSA. Advice of the ad hoc expert group set up to advise the European Food Safety Authority (EFSA) on the possible occurrence of semicarbazide in packaged foods. July 2003. Disponibile all'indirizzo: http://www.efsa.eu.int/science/afc/afc_documents/365/p_afc_doc_0111.pdf; ultima consultazione 21/12/05.
19. WHO. Summary Report of the 64th meeting of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Rome 9-17 February 2005. Disponibile all'indirizzo: <http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2005/np06/en/index.html>; ultima consultazione 21/12/05.
20. Saba A, Turrini A, Mistura G, Cialfa E, Vichi M. Indagine nazionale sui consumi alimentari delle famiglie 1980-84: alcuni principali risultati. *Rivista della Società Italiana di Scienza dell'Alimentazione* 1990;19(4):53-65.
21. Turrini A, Saba A, Perrone D, Cialfa E, D'Amicis A. Food Consumption Patterns in Italy: the INN-CA Study 1994-96. *European Journal of Clinical Nutrition* 2001;55(7):571-88.
22. Bellu R, Riva E, Orsini MT, De Notaris R, Santini I, Banderali G, Giovannini M. Calcium intakes in a sample of 35,000 Italian schoolchildren. *Journal of International Medical Research* 1995;23(3):191-9.
23. D'Amicis A, Intorre F, Maccati F, Pettinelli A, Martines S, Forlani F, Battistini N, Tunfio O, Ponziano M, Carbini L, Lantini T, Nieddu MJ, Peretti M, Podda C, Giacchi M, Gulino M, Corsinovi E, Cuda C, Leonardi F, Calvo GM, Portelli G, Di Bella MG, Sculati O, Villa M, Rosati S, Bertazzoli S, Anelli N. Studio sui consumi alimentari e ripartizione dei pasti degli scolari dell'obbligo in Italia (SCARPS). *Rivista Italiana di Scienza dell'Alimentazione* 2002;31(3):235-48.
24. Turrini A, Martines S, Orsini S, De Carli A, D'Amicis A. Abitudini alimentari: Tendenze evolutive nella popolazione e nei giovani. In: *Atti del Convegno Informazione statistica e politiche per la promozione della salute*. Roma, 10-12 settembre 2002. Roma: ISTAT; 2004. p. 45-60.
25. COLDIRETTI. *Dimmi come mangi e ti dirò come cresci*. 2002. Disponibile all'indirizzo: http://www.coldiretti.it/docindex/cncd/informazioni/241_02.html; ultima consultazione 21/12/05.
26. EUFIC. Children view on food and nutrition. A pan-european survey. 1995. Disponibile all'indirizzo: http://www.eufic.org/site_child_nutrition/index.html; ultima consultazione 21/12/05.
27. Bevilacqua N, Branca F, Cairella G, Censi L, D'Addesa D, D'Amicis A, Leclercq C, Rossi L, Saba A, Sette S, Tabacchi G, Turrini A. *Manuale di sorveglianza nutrizionale*. Roma: INRAN; 2003.
28. Ferrante E, Vania A, Mariani P, Pitzalis G, De Pascale A, Monti S, Falconieri P, Bonamico M, Imperato C. Nutritional epidemiology during school age. *Ann Ist Super Sanita* 1995;31:435-9.
29. Turrini A. Conceptual framework of an integrated databases system for nutritional studies. *Journal of Food Composition and Analysis* 2000;13(4):585-95.
30. Turrini A, Saba A, Lintas C. Study of the Italian reference diet for monitoring food constituents and contaminants. *Nutrition Research* 1991;11(8):861-74.
31. Saba A, Turrini A, Cialfa E. Estimate of intakes: methodology and results of some studies carried out in Italy. *Food Addit Contam* 1992;9(5):527-34.
32. Lawrie CA, Rees NMA. The approach adopted in the UK for the estimation of the intake of food additives. *Food Addit Contam* 1996;13:411-6.
33. Petersen BJ, Chaisson CF, Douglass JS. Use of food-intake surveys to estimate exposures to nonnutrients. *American Journal of Clinical Nutrition* 1994;59(suppl.):240-4.
34. Gibney MJ, Lambe J. Estimation of food additive intake: methodology overview. *Food Addit Contam* 1996;13:405-10.
35. Hansen SC. Conditions for use of food additives based on a Budget for an Acceptable Daily Intake. *Journal Food Protect* 1979;42:429-34.
36. Leclercq C, Arcella D, Turrini A. Estimates of the Theoretical Maximum Daily Intake of erythorbic acid, gallates, BHA and BHT in Italy. A stepwise approach. *Food and Chemical Toxicology* 2000;38:1075-84.

37. JECFA. *Safety evaluations of groups of related flavouring agents: 46th report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. Geneva: Volume IPCS – WHO; 1997. Disponibile all'indirizzo: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_868.pdf; ultima consultazione 27/12/05.
38. Munro IC, Kennepohl E, Kroes R. A procedure for the safety evaluation of flavouring substances. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *Food and Chemical Toxicology* 1999;37:(2-3)207-32.
39. Cadby P. Estimating intakes of flavouring substances. *Food Addit Contam* 1996;13(4):453-60.
40. EFSA. *Statement of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids, and Materials in Contact with Food (AFC Panel) on Estimation of intakes in the course of the safety assessment of chemically defined flavouring*. In: Minutes of the 7th Plenary meeting of the AFC Panel held in Brussels on 12-13 July 2004. Disponibile all'indirizzo: http://www.efsa.eu.int/science/afc/afc_meetings/502/afc_minutes_07_en1.pdf; ultima consultazione 27/12/05.
41. FAO/WHO. *Pesticide residues in food - 2000. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group*. Geneva: FAO Plant Production and Protection Paper (Report No. 163); 2001.
42. WHO. *GEMS/Food data sets used by the Joint FAO/WHO Meeting on Pesticides Residues (JMPR) to assess short-term dietary intake of certain pesticide residues. Revision 2003*. Disponibile all'indirizzo: http://www.who.int/foodsafety/chem/acute_data/en/; ultima consultazione 27/12/05.
43. WHO. *GEMS/Food regional diets. Regional per capita consumption of raw and semi processed agricultural commodities*. Prepared by the Global Environment Monitoring System/Food Contamination Monitoring and Assessment Programme (GEMS/Food). Geneva: Food Safety Department World Health Organization. Disponibile all'indirizzo: <http://www.who.int/foodsafety/chem/gems/en/index1.html>; ultima consultazione 27/12/05.
44. Arcella D, Le Donne C, Piccinelli R, Leclercq C. Dietary estimated intake of intense sweeteners by Italian teenagers. Present levels and projections derived from the INRAN-RM-2001 food survey. *Food and Food and Chemical Toxicology* 2004;42:677-85.
45. Leclercq C, Molinaro MG, Piccinelli R, Baldini M, Arcella D, Stacchini P. Dietary intake exposure to sulphites in Italy - Analytical determination of meals containing potential sulphite vectors. *Food Additives and Contaminants* 2000;17:979-89.
46. Carnovale E, Cappelloni M, Lombardi-Boccia G, Turrini A. Total Diet Studies in Italy. *Journal of Food Composition Analysis* 2000;13(4):551-6.
47. Turrini A, Lombardi-Boccia G. The formulation of the market basket of the Italian total diet 1994-96. *Nutrition Research* 2002;22:1151-62.
48. Egan SK, Tao SS, Pennington JA, Bolger PM. US Food and Drug Administration's Total Diet Study: intake of nutritional and toxic elements, 1991-96. *Food Addit Contam* 2002;19(2):103-25.
49. Comunità Europea. European Commission. *First Report on Harmonisation of Risk Assessment Procedures*. Scientific Steering Committee advising the European Commission in the area of human and environmental health, 26-27 October 2000. Disponibile all'indirizzo: http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/out82_en.html; ultima consultazione 27/12/05.
50. Arcella D, Soggiu ME, Leclercq C. Probabilistic modelling of human exposure to intense sweeteners in Italian teenagers. Validation and sensitivity analysis of a probabilistic model including indicators of market share and brand loyalty. *Food Addit Contam* 2003;20(1):S73-S86.
51. Food Standard Agency. *Agency updates advice to pregnant and breastfeeding women on eating certain fish*. 2003. Disponibile all'indirizzo: http://www.food.gov.uk/news/pressreleases/2003/feb/tuna_mercury; ultima consultazione 27/12/05.
52. INRAN. *Linee guida per una sana alimentazione italiana. Revisione 2003*. Roma: INRAN; 2003. Disponibile all'indirizzo: http://www.inran.it/servizi_cittadino/stare_bene/guida_corretta_alimentazione; ultima consultazione 27/12/05.

ESPOSIZIONE A CONTAMINANTI NEGLI ALIMENTI E NELL'AMBIENTE *INDOOR*

Claudio Minoia, Roberta Turci

Laboratorio di Misure Ambientali e Tossicologiche, Fondazione S. Maugeri, Clinica del Lavoro e della Riabilitazione, IRCCS, Pavia

Introduzione

L'esposizione a microinquinanti ambientali ha ricevuto nel corso degli ultimi venti anni una notevole attenzione per le evidenti implicazioni tossicologiche e gli effetti sulla salute della popolazione generale. Ci si riferisce in particolare all'inquinamento delle aree urbane (*outdoor*), al ruolo delle emissioni veicolari e di altre possibili sorgenti di inquinamento (industriali ma anche impianti di riscaldamento). È indubbio che a partire dagli anni '90, sostanze cancerogene come il benzene e gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sono stati oggetto di un attento e diffuso monitoraggio e, più recentemente, l'attenzione dei ricercatori si è attivata nei confronti delle "polveri sottili", una problematica ancora attuale e per diversi aspetti tuttora caratterizzata da lacune conoscitive (1). Di fatto, quando ci si riferisce alla popolazione generale, la caratterizzazione e la valutazione del rischio espositivo a xenobiotici non possono esaurirsi nell'acquisizione di dati ambientali, e soprattutto non possono essere limitate alla stima della dose inalatoria, in quanto è necessario considerare, e quantificare opportunamente, i microinquinanti introdotti per via alimentare. Questa esigenza nasce sulla base di alcune considerazioni fondamentali:

- a) L'inquinamento dell'aria *indoor* ha progressivamente assunto rilevanza, anche tenendo conto del fatto che la popolazione generale trascorre l'80-85% del tempo in ambienti confinati (ci si riferisce alla permanenza nella propria abitazione, in ufficio, a scuola, a bordo dei mezzi di trasporto ecc.).
- b) La qualità dell'aria *indoor* è influenzata in modo determinante dalla presenza di peculiari sorgenti di inquinamento presenti nell'ambiente confinato. Tra l'altro, le attuali caratteristiche costruttive degli edifici hanno ridotto in modo considerevole i naturali ricambi di aria, contribuendo a elevare in modo significativo le concentrazioni ambientali delle sostanze chimiche aerodisperse.
- c) Le misure *outdoor* degli inquinanti chimici interessano un numero relativamente limitato di analiti e non forniscono dati accurati per una stima realistica dell'esposizione dei cittadini, proprio per la prevalenza della permanenza in ambiente *indoor*. È altresì probabile che la "reale" esposizione *indoor* del soggetto adulto differisca da quella del bambino, con una carenza di informazioni al riguardo che richiede una maggiore disponibilità di dati ambientali. In questo ambito, la "dosimetria individuale", da intendersi come monitoraggio ambientale di gruppi di popolazione generale (adulti, bambini), che si avvale del campionamento personale come strategia di prelievo, sembra essere una tecnica promettente (2, 3).
- d) Per diverse categorie di xenobiotici di interesse tossicologico, l'introduzione alimentare rappresenta sicuramente la principale via di apporto all'organismo umano. È quindi opportuno, per problematiche ambientali e di sicurezza alimentare che interessano in

particolar modo la popolazione infantile, acquisire dati di “esposizione totale” attraverso le diverse vie (inalatoria, alimentare, cutanea). Per esempio, se si considera l’esposizione inalatoria *outdoor* della popolazione generale a policlorobifenili (PCB) l’ordine di grandezza può risultare dell’ordine di qualche ng/m^3 . Ne deriva che in assenza di particolari situazioni, quale la permanenza in ambienti confinati caratterizzati da contaminazione residua, l’esposizione *indoor* è da ritenersi trascurabile in termini di valutazione di rischio espositivo. Se si considerano invece i dati di *intake* alimentare di PCB riferibili alla popolazione italiana, le quantità stimate sono dell’ordine di qualche $\mu\text{g}/\text{die}$. Evidentemente, si tratta di valori sensibilmente più elevati. In letteratura sono presenti tra l’altro numerosi studi che associano l’esposizione a PCB attraverso la dieta a effetti avversi per la salute. Si ricorda al riguardo che i policlorobifenili (209 diversi congeneri dei quali 12 sono classificati diossino-simili) appartengono alla categoria degli interferenti endocrini (*Endocrine Disrupting Compounds*, EDCs) (4). Analoghe considerazioni valgono per numerosi altri composti, ad esempio gli antiparassitari. Ciò significa che la dieta del soggetto adulto, così come quella del bambino, può contenere microquantità residue di xenobiotici sensibilmente superiori rispetto a quelle misurabili in atmosfera urbana o in ambienti confinati. In linea teorica, per specifici microinquinanti potrebbe anche verificarsi la situazione opposta (ci si riferisce al benzene e ad altri composti organici volatili), cioè la quantità inalata può essere superiore alla quantità ingerita. Relativamente all’ambiente *indoor*, tenendo conto delle caratteristiche dell’immobile, della zona di residenza, delle abitudini di vita (esposizione a fumo attivo o passivo), si potrebbero determinare, per specifiche sostanze, condizioni espositive ancora diverse.

- e) In considerazione dell’elevato numero di sostanze microinquinanti presenti nell’ambiente, alle quali la popolazione generale è esposta quotidianamente, è evidente che la caratterizzazione del rischio dovrà essere orientata su xenobiotici di elevato interesse scientifico per quanto attiene ai possibili effetti negativi sulla salute umana. Ciò significa predisporre un elenco di priorità: a parte le sostanze cancerogene, per le quali l’attenzione deve essere massima, si deve porre l’accento sugli EDCs, in particolare alla luce di un recente documento pubblicato dalla International Union of Pure and Applied Chemistry (5). A questa categoria di sostanze chimiche, alla quale appartengono, oltre ai già citati PCB, DDT, linuron, vinclozolin, diossine, dibenzofurani, fitoestrogeni, composti organostannici ecc. sarà dedicato il presente lavoro. Ciò per l’estrema attualità di questa tematica, ma anche per evidenziare la possibilità di impiegare specifici biomarcatori per valutare l’esposizione della popolazione generale a EDCs.

Esposizione a PCB

Per quanto riguarda l’esposizione *indoor*, studi recenti hanno evidenziato che le concentrazioni di PCB in ambienti confinati sono più elevate di quelle rilevabili in atmosfera esterna. Già nel 1984 studi condotti nel Minnesota in 7 edifici pubblici avevano dimostrato che in tre edifici dove si utilizzavano trasformatori contenenti PCB i livelli aerodispersi di *Aroclor* erano pari a $457 \pm 223 \text{ ng}/\text{m}^3$ (6). Questo valore era significativamente più elevato rispetto a quanto rilevabile in quattro edifici nei quali non venivano impiegati trasformatori contenenti PCB, con livelli aerodispersi di *Aroclor* pressoché dimezzati e pari a $229 \pm 106 \text{ ng}/\text{m}^3$.

Il lavoro citato evidenzia un limite nell’informazione analitica acquisita, in quanto non vengono forniti dati relativi a specifici congeneri di PCB. In un successivo lavoro, condotto nel Massachusetts negli anni 1994-1995, sono state misurate le concentrazioni *indoor* in 34

abitazioni durante il dragaggio di sedimenti fluviali contaminati (6). Nelle case più vicine alle operazioni di dragaggio la concentrazione di PCB totali variava da 7,9 a 61 ng/m³, mentre in quelle più distanti i livelli *indoor* erano di oltre trenta volte inferiori. Un terzo esempio è fornito da un lavoro di Drexler pubblicato nel 2004 (7), che riporta i livelli *indoor* di PCB rilevati alla fine degli anni '90 in una scuola di Nuremberg, in Germania, con valori anche superiori a 3000 ng/m³. Questa ricerca ha inoltre valutato i livelli plasmatici di PCB nei bambini e negli insegnanti, rilevando con maggiore frequenza e in quantità più elevate i tre congeneri CB28, CB52 e CB101. Per quanto riguarda i congeneri a più elevato grado di clorurazione, quali CB138, CB153 e CB180, i livelli plasmatici nei bambini esposti non risultavano significativamente differenti rispetto al gruppo di controllo. Sulla base di questo riscontro, gli autori hanno stimato che l'inalazione di aria contaminata non determinava un rischio addizionale per i soggetti accidentalmente esposti a PCB.

I tre studi sui livelli *indoor* di PCB totali si riferiscono a differenti periodi temporali e quindi risentono inevitabilmente dei limiti delle procedure di analisi e delle tecniche strumentali utilizzate. Ciò permette comunque di verificare come, nell'arco di un ventennio, la qualità dell'informazione analitica e tossicologica sia andata evolvendosi, passando da misure relative a una miscela di PCB (*Aroclor*) alla caratterizzazione dei singoli congeneri (anche se in numero limitato), non solo per la matrice "aria" ma anche per la matrice biologica (siero) considerata nello studio più recente (7). In questo contesto di qualità del dato e del tipo di informazione tossicologica che è possibile derivare dalle misure effettuate, è interessante considerare i dati di Schade ed Heinzow (8), relativi all'analisi di 3560 campioni di latte materno prelevati nell'arco di oltre un decennio (1986-1997) in donne residenti nella Germania del Nord. Sono stati determinati 6 congeneri (CB28, CB52, CB101, CB138, CB153, CB180) considerati *markers* rappresentativi dei PCB totali. Se ci si limita alla concentrazione dei PCB totali (lo studio ha valutato anche altre sostanze organoclorurate, tra cui DDT) nell'arco temporale oggetto di valutazione, si evidenzia una significativa riduzione dei livelli sierici di policlorobifenili, stimata in circa il 61% (da un valore medio iniziale di 1,28 µg/g lipidi la concentrazione media nel 1997 è risultata pari a 0,47 µg/g lipidi).

Un ulteriore studio sul contenuto di PCB in campioni di sangue materno e del cordone ombelicale è stato pubblicato da Covaci *et al.* (9). La casistica considerata era costituita da 44 donne belghe e gli autori hanno valutato in dettaglio i valori relativi a 6 congeneri di PCB. I congeneri CB28, CB52 e CB101 erano inferiori al limite di quantificazione del metodo (LOQ) sia nel campione di siero materno sia in quello del cordone ombelicale, mentre i congeneri CB138, CB153 e CB180 sono risultati sempre superiori al LOQ nelle due tipologie di campioni e CB99 e CB170 non erano dosabili (concentrazione inferiore al limite di rilevabilità del metodo) in 5 campioni di sangue del cordone ombelicale. Per lo stesso motivo il congenere 118 non è stato quantificato in tutti i campioni ematici ottenuti dal cordone ombelicale. Nel loro complesso i dati ottenuti da Covaci *et al.* (9) hanno evidenziato che la concentrazione media di PCB totali rilevata nel sangue materno era quattro volte superiore a quella misurata nei campioni di sangue ombelicale. Considerando che in quest'ultima matrice la concentrazione dei lipidi totali era due volte inferiore rispetto a quella materna, se i dati venivano corretti tenendo conto di questa differenza il valore medio di PCB rilevato per la madre era circa il doppio di quello ottenuto per il cordone ombelicale.

Presso il Laboratorio di Misure Ambientali e Tossicologiche della Fondazione Salvatore Maugeri, è stato sviluppato e validato un metodo per la determinazione dei livelli sierici di PCB nella popolazione generale (10-12) e attualmente sono in fase di studio i valori di riferimento di 60 congeneri di PCB. La Tabella 1 riporta, a titolo esemplificativo, i dati ottenuti per un gruppo di popolazione generale residente a Novafeltria (Pesaro) (164 soggetti). Per ciascun congenere

presente a livelli analiticamente rilevabili sono riportati i livelli sierici prima e dopo la correzione per il contenuto lipidico totale del siero (13).

Tabella 1. Analisi dei singoli congeneri in 164 campioni ottenuti da altrettanti soggetti non esposti a PCB

Congenere	n.	n. (%)	Media		Media ristretta***		Massimo		95° percentile	
			µg/L*	ng/g lipidi**	µg/L	ng/g lipidi	µg/L	ng/g lipidi	µg/L	ng/g lipidi
31	75	46	0,0792	13,1	0,167	28,7	0,609	86,6	0,286	58,6
28	70	43	0,0683	11,3	0,153	26,5	0,594	90,9	0,255	48,5
52	150	91	0,150	26,1	0,164	28,6	0,602	120	0,463	85,1
49	66	40	0,0727	12,0	0,173	29,7	0,304	73,1	0,260	52,1
47	136	83	0,0627	11,4	0,075	13,7	0,237	39,4	0,121	26,6
44	65	40	0,0748	12,2	0,181	30,8	0,31	70,1	0,263	50,7
74	156	95	0,101	18,5	0,106	19,4	0,345	74,4	0,222	44,7
70	118	71	0,0797	13,5	0,110	18,8	0,314	67,7	0,234	45,5
61	4	2	0,0059	0,216	0,042	8,46	0,063	11,0	0,005	0,010
66	105	62	0,0652	10,8	0,102	16,9	0,368	51,7	0,196	37,9
77	2	1	0,0057	0,150	0,065	11,5	0,70	14,4	0,005	0,010
99	3	2	0,0104	1,39	0,299	75,5	0,370	107	0,005	0,010
118	36	22	0,0812	14,2	0,352	64,6	0,953	276	0,464	72,1
105	3	2	0,0082	0,878	0,178	47,5	0,232	67,2	0,050	0,010
149	152	93	0,166	30,9	0,179	33,3	0,688	149	0,451	97,7
146	117	71	0,0686	12,6	0,094	17,7	0,571	127	0,167	32,6
153	164	100	0,904	170	0,904	170	2,125	615	1,843	387
138	164	100	0,675	128	0,675	128	1,526	441	1,334	277
167	58	35	0,0524	9,17	0,139	25,9	0,317	67,4	0,201	42,0
156	139	84	0,0731	13,6	0,086	16,1	0,220	51,6	0,187	36,4
157	1	1	0,0057	0,234	0,127	36,8	0,127	36,8	0,005	0,010
169	2	1	0,0061	0,206	0,095	16,1	0,110	16,5	0,005	0,010
187	140	85	0,0784	14,5	0,091	17,0	0,346	58,6	0,190	35,7
183	103	59	0,0350	6,21	0,056	9,88	0,169	33,0	0,104	18,6
177	86	52	0,0429	7,70	0,077	14,7	0,216	46,0	0,151	30,5
171	60	37	0,0256	4,23	0,061	11,4	0,186	27,6	0,100	19,0
172	37	23	0,0136	1,86	0,043	8,20	0,105	18,3	0,062	12,0
180	164	100	0,643	121	0,643	121	2,075	504	1,523	298
193	52	32	0,0254	4,17	0,070	13,1	0,152	36,8	0,102	20,4
170	164	100	0,226	42,7	0,226	42,7	0,583	140	0,536	109
190	42	26	0,0218	3,48	0,071	13,6	0,189	40,8	0,095	18,9

N = numero di campioni positivi; N (%) = percentuale di positività

(*) i valori inferiori al limite di rilevabilità sono stati computati come 0,005 µg/L; (**) i valori inferiori al limite di rilevabilità sono stati computati come 0,01 ng/g lipidi; (***) ristretta ai campioni con concentrazioni superiori al limite di rilevabilità.

Questo lavoro rappresenta un approccio diverso rispetto alle modalità convenzionali di studio dei valori di riferimento nel compartimento sierico, in quanto non si ritiene sufficientemente rappresentativo ricorrere a congeneri *markers*, ma si vuole estendere l'informazione analitica e tossicologica ai congeneri di interesse ambientale, inclusi i 12 congeneri classificati diossino-simili. Questa modalità di definizione dei valori di riferimento origina anche dall'intenzione di valutare, oltre alla concentrazione dei PCB totali, anche i profili qualitativi e quantitativi che caratterizzano differenti gruppi di popolazione. Differenze in tal senso sono già emerse da uno studio di confronto tra la popolazione residente a Novafeltria e quella della provincia di Pavia, come riportato in un lavoro attualmente in corso di stampa (14).

I dati di letteratura sino a qui discussi sui livelli di PCB *indoor*, *outdoor* e in matrici biologiche, lasciano chiaramente intuire che per la popolazione generale, in assenza di significativi fenomeni di inquinamento accidentale da policlorobifenili, la via inalatoria non sembra rappresentare una significativa modalità di assorbimento. Di seguito verranno commentati in modo più dettagliato valori sull'*intake* alimentare di PCB in Italia e ciò permetterà di stabilire il ruolo delle diverse vie di introduzione nell'organismo. Per quanto riguarda il "latte materno", i dati relativi alla popolazione tedesca testimoniano il dimezzamento del contenuto di PCB totali nell'arco di poco più di un decennio.

Si sottolinea in particolare l'importanza di disporre, anche per la popolazione italiana, di valori di riferimento di singoli congeneri, tra cui i diossino-simili, ritenuti di prevalente interesse tossicologico. Il confronto tra valori di riferimento ottenuti per diversi gruppi di popolazione è certamente in grado di individuare gruppi di popolazione generale maggiormente a rischio. Informazioni più puntuali possono derivare, come in precedenza accennato, dal diverso profilo dei congeneri presenti nel siero e negli alimenti. I dati relativi all'*intake* alimentare di PCB possono infatti essere ottenuti mediante studi di dieta totale.

Interessanti al riguardo risultano quindi le conclusioni di uno studio condotto su un gruppo di popolazione italiana da Zuccato *et al.* (15) attraverso misure su campioni di dieta *pooled* di 24 h ripetute in tre giorni non consecutivi. Il profilo degli analiti interessava sia i congeneri tossici non-orto (planari) sia i congeneri di-orto per complessivi 31 congeneri. L'*intake* medio di PCB totali è risultato pari a $3,72 \pm 1,51$ µg/persona/giorno. Da rilevare che i triclorobifenili rappresentavano il 28% dei PCB totali mentre la percentuale di tetraclorobifenili, di pentaclorofenili e di esaclorofenili era stimata pari al 20,21%. Gli eptaclorobifenili fornivano un contributo pari al 9% dei PCB totali introdotti con la dieta. Relativamente ai singoli congeneri il contributo prevalente era riferibile al CB153 (13,8%), al CB138 (10,9%) e al CB18 (11,4%).

Purtroppo gli studi di *Total Diet* condotti in Italia sono ancora limitati e ciò determina conoscenze limitate per quanto riguarda l'*intake* alimentare di PCB, laddove differenti abitudini alimentari, ma soprattutto particolari fenomeni antropici possono contribuire a determinare variazioni significative. Nel caso dei PCB, i dati disponibili hanno permesso di ricostruire la "reale" esposizione della popolazione generale. La via inalatoria, come già ipotizzato, fornisce sicuramente un contributo minimo rispetto all'apporto con la dieta, mentre l'assorbimento per via cutanea è da considerarsi più che altro riconducibile a eventi accidentali e occasionali. È altresì indubbio che la disponibilità di un biomarcatore come i PCB nel siero fornisce un dato utile per quando riguarda l'esposizione e rappresenta quindi un indicatore biologico in grado di identificare eventuali esposizioni anomale di PCB, a patto di disporre di valori di riferimento affidabili. Quest'ultimo termine coinvolge anche la qualità del dato ovvero l'impiego di una tecnica strumentale idonea e altamente specifica. L'obiettivo è di utilizzare tecniche strumentali di impiego routinario per effettuare determinazioni accurate di un numero sufficientemente significativo di congeneri (ci si riferisce alla gascromatografia abbinata alla spettrometria di massa a bassa risoluzione, HRGC-LRMS). Ciò è particolarmente utile come tecnica di *screening* per dosare i congeneri con un livello di incertezza estesa accettabile ai valori caratteristici dell'intervallo di riferimento della popolazione generale. Più complesso appare invece lo studio del contenuto di PCB in campioni di dieta totale, sia per i diversi criteri utilizzati nel campionamento degli alimenti, sia per le differenti procedure a cui si fa ricorso nella preparazione della dieta *pooled*.

Esposizione ambientale ad altre sostanze di interesse tossicologico

In una ricerca pubblicata nel 2003 da Rudel *et al.* (16) sono stati determinati 89 composti in campioni di aria *indoor* e in polveri domestiche (per complessive 120 abitazioni). Tra gli analiti considerati vi erano ftalati, PCB, IPA, alchilfenoli, antiparassitari, polibromodifenileteri e altre sostanze classificabili come ECDs. Da rilevare che 52 sostanze erano analiticamente rilevabili in aria, mentre 66 composti erano presenti in campioni di polveri domestiche. Nelle Tabelle 2 e 3 si riportano alcuni dei dati (modificati da Rudel *et al.*, 2003) ritenuti più significativi. Il dietilftalato è risultato l'analita presente a valori più elevati nel particolato ambientale *indoor* (90° percentile = 1600 ng/L). Per 6 sostanze (dietilftalato, *o*-fenilfenolo, di-*n*-butilftalato, benzilbutilftalato, 4-nonilfenolo e 4-*ter*-butilfenolo) la positività dei campionamenti è risultata pari al 100%.

Per quanto attiene ai campioni di polvere domestica è da rilevare in particolare la presenza di bis(2-etilesilftalato) con un 90° percentile pari a 850 µg/g e una positività del campionamento del 100%. Di interesse anche la concentrazione di piperonil butossido, che notoriamente è un sinergizzante utilizzato in combinazione con gli insetticidi piretroidi, con un 90° percentile pari a 15,1 µg/g. Il lavoro citato appare molto suggestivo per l'elevato numero di sostanze monitorate in atmosfera *indoor* e sicuramente fornisce indicazioni e spunti interessanti per ulteriori approfondimenti, soprattutto in rapporto a un'esauriente identificazione delle possibili sorgenti dei fenomeni di microinquinamento osservati.

Tabella 2. Livelli *indoor* di microinquinanti rilevati in 120 abitazioni (valori espressi in ng/m³)

Composto	90° percentile	% campioni positivi
Dietilftalato	1600	100
<i>o</i> -fenilfenolo	440	100
di- <i>n</i> -butilftalato	430	100
4-nonilfenolo	230	100
Bis(2-etilesilftalato)	210	68
Di- <i>iso</i> -butilftalato	150	100
Benzilbutilftalato	58	44
4- <i>ter</i> -butilfenolo	43	100
Nonilfenolo monoetossilato	41	95
Bis(2-etilesil)adipato	22	99

Tabella 3. Livelli di microinquinanti in campioni di polvere domestica rilevati in 120 abitazioni (valori espressi in µg/g)

Composto	90° percentile	% campioni positivi
Bis(2-etilesil)ftalato	854	100
Benzilbutilftalato	277	100
di- <i>n</i> -butilftalato	43,9	98
Nonilfenolo dietossilato	18,9	86
Bis(2-etilesil)adipato	16,5	100
<i>Trans</i> -permetrina	16,5	53
Piperonil butossido	15,1	66
Dietilftalato	10,8	89
Nonilfenolo monoetossilato	8,5	86
<i>Cis</i> -permetrina	7,04	45

Rispetto alla tematica sempre più emergente degli ftalati, Sottani *et al.* (17) hanno recentemente pubblicato dati relativi a 6 metaboliti urinari, riportati in Tabella 4. Lo studio, ancora a carattere preliminare, si riferisce a un gruppo di popolazione generale di popolazione residente in Lombardia.

In uno studio di Barisano *et al.* (18), sono stati determinati mediante GC-MS, i valori di riferimento di 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA) e 3,5-dicloroanilina (3,5-DCA) in un gruppo di popolazione generale residente a Novafeltria. Il primo metabolita può essere utilizzato come bioindicatore per valutare l'esposizione a erbicidi come *diuron*, *linuron*, *neburon* e *propanil*. La 3,5-DCA urinaria è invece un metabolita che può essere impiegato per monitorare l'esposizione a *vinclozolin*, *procimidone* e *iprodione* che sono i fungicidi più frequentemente rilevati in alimenti come lattuga, pomodori, uva, fragole, mele, pesche e carote. I valori ottenuti da Barisano *et al.* e riportati in Tabella 5 evidenziano una positività del 99% per la 3,5-DCA e del 75% per la 3,4-DCA, con valori medi rispettivamente pari a 0,72 µg/L e 0,291 µg/L. Anche questo esempio di monitoraggio biologico conferma come la disponibilità di biomarcatori può risultare estremamente utile per valutare l'esposizione ambientale, ma anche alimentare, agli antiparassitari summenzionati.

Tabella 4. Livelli urinari (µg/L) di 6 metaboliti rivelati in un gruppo di popolazione non professionalmente esposta a ftalati residente nella provincia di Pavia (il limite di rilevabilità del metodo era compreso tra 0,7 e 1,5 µg/L)

Metabolita	Gruppo di popolazione	Media geometrica (IC 95%)	Percentili selezionati	
			5°	95°
Mono-etil ftalato	n = 60	150	12 (10,03-14,97)	1368 (998,5-1578,1)
Mono-butil ftalato	n = 60	18	6 (4,77-7,1)	72 (57,4-85,7)
Mono-benzil ftalato	n = 60	14	1,7 (1,54-3,9)	46 (35,0-54,4)
Mono-2-etilesil ftalato	n = 60	1,8	<LR	7,2 (5,6-9,1)
Mono-octil ftalato	n = 60	<LR	<LR	<LR
Mono-isononil ftalato	n = 60	<LR	<LR	<LR

Tabella 5. Concentrazioni (µg/L) di 3,5-DCA e 3,4-DCA nei campioni urinari di 72 soggetti non professionalmente esposti

Concentrazioni (µg/L)	N. campioni positivi (%)	Intervallo	Media ± DS	Mediana	95% percentile
3,5-DCA	71 (99%)	0,019 – 4,532	0,701 ± 0,945	0,316	2,539
3,4-DCA	54 (75%)	0,011 – 2,243	0,291 ± 0,490	0,072	1,16

Conclusioni

Nel gennaio 2003, il *Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention* ha pubblicato il *Second National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals*. In questo rapporto vengono riportati i dati di biomonitoraggio della popolazione generale americana relativi a 116 sostanze chimiche presenti in ambiente. Lo studio si riferisce a

soggetti con età superiore a 2 anni e a campionamenti effettuati nel 1999-2000. Tra gli scopi citati nel rapporto, almeno tre meritano una citazione particolare: a) “la definizione di intervalli di riferimento (...) che possono essere impiegati (...) per evidenziare (...) i motivi per cui un soggetto o un gruppo di popolazione presentano un’elevata esposizione”; b) la verifica dell’efficacia di sforzi condotti in termini di salute pubblica per ridurre l’esposizione della popolazione americana a specifici microinquinanti”; c) “orientare le priorità di ricerca sugli effetti per la salute umana”.

È inevitabile, a questo punto, un confronto tra la situazione americana e quella italiana e in merito alla popolazione infantile non si può non rilevare la scarsa disponibilità di dati relativamente ai biomarcatori oggi disponibili e utilizzabili per valutare l’esposizione integrata (ambientale e alimentare). Nel rapporto americano, inoltre, i Valori di Riferimento sono noti anche per il bambino, rendendo quindi disponibile una raccolta di dati che viene periodicamente aggiornata impiegando nuovi bioindicatori, con la possibilità di valutare gli andamenti temporali. Si ritiene infine opportuno citare che nel Rapporto 2003 sono disponibili dati relativi a oltre 2500 soggetti in età infantile (età > 6 anni) per i seguenti composti di origine vegetale ad attività endocrina (fitoestrogeni) e loro metaboliti urinari: daidzeina, enterodiolo, enterolattone, genisteina, equolo e *o*-desmetilangolensina.

Si può quindi ipotizzare, sulla base dell’esperienza americana, che l’avvio nel nostro paese di un progetto analogo, eventualmente attivato inizialmente per sostanze di interesse prioritario e possibilmente esteso al versante alimentare utilizzando studi di *Total Diet*, può rappresentare uno strumento operativo di importanza notevole per la messa a fuoco di problematiche esistenti ed emergenti, come quella degli Interferenti Endocrini.

Bibliografia

1. Minoia C, Valerio F, Spezia S, Turci R (Ed.). *Benzene, IPA e Polveri Sottili* Como: New Press Edizioni; 2004.
2. Minoia C, Magnaghi S, Micoli G, Fiorentino ML, Turci R, Angeleri S, Berri A. Determination of environmental reference concentration of six PAH in urban areas (Pavia, Italy), *Sci Tot Environ* 1997;198(1):33-41.
3. Minoia C, Meroni G, Oppezzo MC, Aprea C, Magnaghi S, Sciarpa G, Barisano A, Fiorentino ML, Berri A, Bellinzona M, Robustelli della Cuna FS, Frigerio F, Schiavi A, Di Gregorio L. Environmental and urinary reference values as markers of exposure to hydrocarbons in urban areas. *Sci Total Environ* 1996;192(2):907-13.
4. Iwasaki T, Miyazachi W, Takeshita A, Kuroda Y, Koibuchi N. Polychlorinated biphenyls suppress thyroid hormone induced transactivation. *Biochem. Biophys Res Com* 2002;299(3):384-8.
5. International Union of Pure and Applied Chemistry. Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem* 2003;75(5):631-81.
6. Sagunsky H, Roskamp E, Heinrich-Hirsch B. Polychlorinated biphenyls indoors: attempt an assessment. *Gesundheitswesen* 1997;56(9):391-9.
7. Drexler R, Kerscher G, Liebl B, Angerer J. PCB in interiors-a relevant health risk? *Gesundheitswesen* 2004;66(1):847-51.
8. Schade G, Heinzow B. Organochlorine pesticides and polichlorinated biphenyls in human milk of mothers living in northern Germany: current extent of contamination, time trend from 1986 to 1997 and factors that influence the levels of contaminants. *Sci Tot Environ* 1998;215(1-2):31-9.
9. Covaci A, Jorens P, Jacquemyin Y, Schepens P. Distribution of PCBs and organochlorine pesticides in umbilical cord and maternal serum. *Sci Tot Environ* 2002;293(1-3):45-53.

10. Turci R, Mariani G, Marinaccio A, Balducci C, Bettinelli M, Fanelli R, Nichetti S, Minoia C. Critical evaluation of a high-throughput analytical method for polychlorinated biphenyls in human serum: which detector for the establishment of the reference values? *Rapid Comm Mass Spectrom* 2004;18(4):421-34.
11. Turci R, Bruno F, Minoia C. Determination of coplanar and non-coplanar polychlorinated biphenyls in human serum by gas chromatography with mass spectrometry detection: electroimpact or electron-capture negative ionization? *Rapid Comm Mass Spectrom* 2003;17(16):1881-8.
12. Turci R, Angeleri F, Minoia C. A rapid screening method for routine congener-specific analysis of polychlorinated biphenyls in human serum by high resolution gas chromatography with mass spectrometry detection. *Rapid Comm Mass Spectrom* 2002;16(20):1957-64.
13. Turci R, Catenacci G, Marinaccio A, Finozzi E, Minoia C. Valori di riferimento di 60 congeni di PCB in un gruppo di popolazione generale residente nella provincia di Pavia. Atti dell'11° Convegno di Igiene Industriale "Le Giornate di Corvara", AIDII, 21-23 marzo, Corvara (BZ); 2000 (in press).
14. Turci R, Finozzi E, Catenacci G, Marinaccio A, Balducci C, Minoia C. Reference values of coplanar and non-coplanar PCBs in serum samples from two Italian subjects. *Toxicol Lett* (in press).
15. Zuccato E, Calvarese S, Mariani G, Mangiapan S, Grasso P, Guzzi A, Fanelli R. Level, sources and toxicity of polychlorinated biphenyls in the Italian diet. *Chemosphere* 1999;38(12):2753-65.
16. Rudel RA, Camann DE, Splengler JD, Korn LR, Brody JG. Phthalates, alkylphenols, polibrominated diphenyl esters, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dusts. *Environ Sci Technol* 2003;37(2):4543-53.
17. Sottani C, Minoia C. Determinazione di 6 metaboliti di ftalati in urina: validazione del metodo e valori di riferimento in una popolazione del nord Italia. In: *Atti del 23° Congresso Nazionale AIDII, Bologna 22-24 giugno 2005*. Pavia: PIME Ed.; 2005. p. 173-176.
18. Barisano A, Turci R, Aprea C, Colosso C, Minoia C. Determinazione dei valori di riferimento di 3,4-dicloroanilina e 3,5-dicloroanilina in urina. In: *Atti del 23° Congresso Nazionale A.I.D.I.I., Bologna 22-24 giugno 2005*. Pavia: PIME Ed.; 2005. p. 173-176.
19. National Center for Environmental Health, Division of Laboratory Sciences. *Second National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals*. Atlanta, Georgia: NCEH 30341-3724; Pub. No. 02-0716, Revised March 2003.

ESPOSIZIONE A XENOBIOTICI ATTRAVERSO IL LATTE MATERNO

Cinzia La Rocca, Vittorio Abate, Silvia Alivernini, Chiara Laura Battistelli, Marialuisa Casella,
Luigi Turrio Baldassarri

Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Il termine “xenobiotici” comprende molte classi di sostanze chimiche esogene che possono essere rilevate anche nel latte materno quali medicinali, metalli pesanti, composti organici volatili e sostanze tossiche, persistenti e bioaccumulabili come le policlorodibenzodiossine (PCDD), policlorodibenzofurani (PCDF) e policlorobifenili (PCB).

PCDD/PCDF e PCB sono contaminanti ambientali ubiquitari, diffusi in tutto il mondo e ben noti per la loro tossicità, tra cui dermatossicità, immunotossicità, disturbi della funzionalità riproduttiva, teratogenicità, alterazioni del sistema endocrino ed effetti cancerogeni.

Profilo chimico-fisico di PCDD, PCDF e PCB

I PCDD e PCDF, comprendenti rispettivamente 75 e 135 congeneri la cui formula di struttura è riportata in Figura 1, sono composti eteroaromatici tricyclici a struttura quasi planare, inodori, termostabili, insolubili in acqua, fortemente liposolubili, non biodegradabili (1).

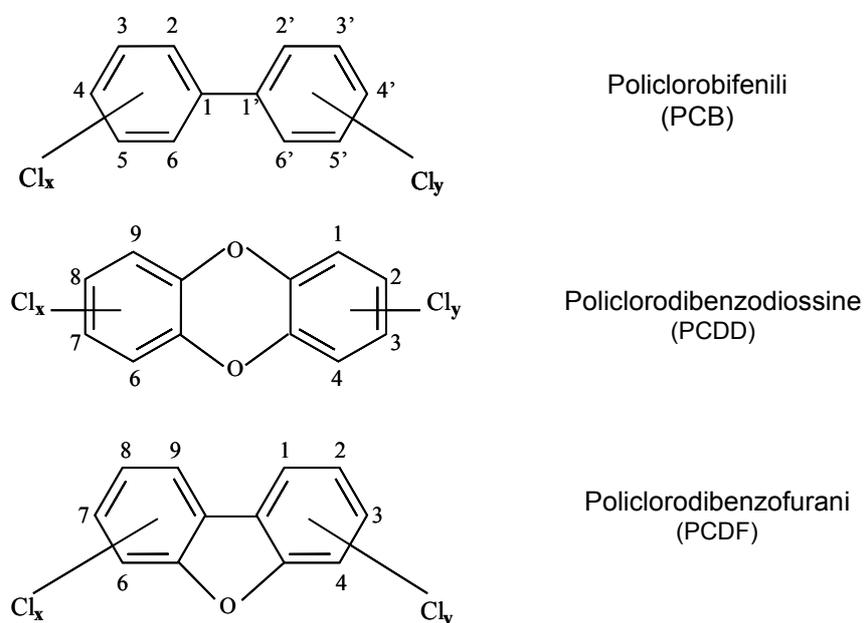


Figura 1. Formule di struttura dei PCB, PCDD e PCDF

Le diossine e i furani si formano come sottoprodotti indesiderati nella preparazione industriale di composti chimici, ad esempio l'acido 2,4,5 triclorofenossiacetico, (noto anche come "Agente Orange", diserbante usato a fini bellici in Vietnam) o il triclorofenolo (prodotto presso l'ICMESA di Seveso), oppure durante i processi termici di tipo industriale, quali:

- incenerimento e combustione es. inceneritori per rifiuti solidi urbani e rifiuti ospedalieri non costruiti con requisiti specifici;
- fonderie, cementifici, processi di lavorazione di materiali ferrosi e non;
- produzioni chimiche legate al ciclo di lavorazione del cloro e di prodotti clorurati;
- processi di sbianca e trattamenti a base di ossidanti clorurati;
- trasformazioni biologiche o fotochimiche di altri composti clorurati.

I PCB sono un gruppo di 209 congeneri di idrocarburi aromatici policlorurati che vengono sintetizzati con la clorurazione diretta dei bifenili (Figura 1); sono liquidi con caratteristiche di viscosità variabile in dipendenza del contenuto di cloro (42-60%), non infiammabilità, alta stabilità chimica, alto punto di fusione, bassa conduttività del calore, alta costante dielettrica (potere isolante). Per le loro caratteristiche di stabilità chimica e fisica, i PCB stati sviluppati per scopi industriali e utilizzati come fluidi dielettrici nei trasformatori e nei condensatori elettrici; inoltre, sono stati largamente impiegati come fluidi idraulici, veicolanti dei pesticidi, plastificanti, ritardanti di fiamma, fungicidi nelle vernici.

Negli ultimi venti anni la produzione e l'uso di PCB nell'elettronica e nell'industria manifatturiera sono diminuiti in molti paesi e il loro utilizzo è stato limitato a sistemi chiusi, proibendo il loro rilascio nell'ambiente. Miscele industriali di PCB sono ancora presenti in tutto il mondo e si trovano ancor oggi nei trasformatori, nei materiali da costruzione, negli oli lubrificanti, nei preservanti del legno, negli impregnanti e inchiostri. In generale, la produzione globale è stata superiore al milione di tonnellate. A causa di un così vasto impiego, di un frequente improprio smaltimento e per la loro elevata stabilità chimica, i PCB, rilevati nell'ambiente per la prima volta negli anni '60 (2, 3), sono ormai contaminanti ubiquitari. In particolare, i PCB tendono a concentrarsi nell'ambiente marino, specificatamente nei sedimenti, perché questo è il bacino finale di raccolta sia del carico inquinante presente nell'aria come vapore, che di quello portato dai reflui liquidi e dai corsi d'acqua come particolato sospeso.

Meritano particolare attenzione 12 congeneri di PCB che hanno proprietà tossicologiche simili ai PCDD e ai PCDF e che vengono chiamati "PCB diossina-simili" o "*dioxin-like PCB*". La tossicità di questi ultimi, dipende infatti dalla loro capacità di adottare una configurazione planare simile a quella della 2,3,7,8- tetracloro-dibenzo-*para*-diossina. Tale configurazione può essere assunta dai congeneri non-*orto* e, in misura minore, dai mono-*orto* sostituiti che presentano un ingombro sterico minimo rispetto alla rotazione intorno al legame tra i due fenili. Di seguito vengono elencati i congeneri tossicologicamente rilevanti:

- PCB diossina-simili

PCB mono-orto

p5cb 105
 p5cb 114
 p5cb 118
 p5cb 123
 h6cb 156
 h6cb 157
 h6cb 167
 h7cb 189

PCB non-ortho

t4cb 77

t4cb 81

p5cb 126

h6cb 169

– Diossine e furani

2,3,7,8-TCDD

1,2,3,7,8-PeCDD

1,2,3,4,7,8-HxCDD

1,2,3,6,7,8-HxCDD

1,2,3,7,8,9-HxCDD

1,2,3,4,6,7,8-HpCDD

OCDD

2,3,7,8-TCDF

1,2,3,7,8-PeCDF

2,3,4,7,8-PeCDF

1,2,3,4,7,8-HxCDF

1,2,3,6,7,8-HxCDF

1,2,3,7,8,9-HxCDF

2,3,4,6,7,8-HxCDF

1,2,3,4,6,7,8-HpCDF

1,2,3,4,7,8,9-HpCDF

OCDF

Tossicità

Tra le diossine, la 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-para-diossina (2,3,7,8-TCDD) è la molecola dotata di più spiccata tossicità, esplicando una ampia gamma di effetti specie- e tessuto-specifici come, ad esempio, induzione a trasformazione neoplastica; tossicità a carico del sistema immunitario, del fegato, della pelle; azione mutagenica ed embriotossica. L'*International Agency for Research on Cancer* (IARC), nel 1987 ha inserito la 2,3,7,8-TCDD nel Gruppo 1 come "accertato cancerogeno umano" (4, 5). Le conoscenze più recenti sul meccanismo d'azione della 2,3,7,8-TCDD hanno chiarito il ruolo di interferente endocrino di questa sostanza che, attraverso la mediazione del recettore arilico (recettore-Ah), determina l'attivazione o la repressione di vari geni, interferendo con l'azione degli ormoni endogeni (6-9).

L'azione della "diossina" dipende dalla natura e dalla quantità dei recettori, che variano in relazione al sesso, all'età e al patrimonio ereditario dei soggetti esposti, come pure dallo stato fisiologico dei tessuti bersaglio (es. tessuti fetali in differenziazione estremamente sensibili a variazioni dell'equilibrio ormonale).

I congeneri PCDD e PCDF clorurosostituiti contemporaneamente nelle posizioni C2, C3, C7, C8 e i PCB aventi configurazione planare con atomi di cloro preferibilmente in posizioni meta e para (Tabella 1) si legano al recettore arilico come la 2,3,7,8-TCDD, ma con differente intensità a seconda della affinità di legame determinata dalla struttura della molecola.

Per ottenere un'informazione sulla tossicità della matrice esaminata al fine della valutazione del rischio, si utilizza, per i congeneri riportati, il concetto di Fattore di Tossicità Equivalente

(TEF) basato su due fondamentali concetti: lo stesso meccanismo di azione e l'additività di risposta (10).

Alla 2,3,7,8-TCDD, che è la più tossica, viene attribuito convenzionalmente un TEF=1, mentre agli altri congeneri un valore in funzione della loro tossicità. I risultati analitici vengono moltiplicati per il loro relativo TEF e sommati. In questo modo si ottiene un unico valore espresso come concentrazione di TCDD tossicità-equivalente (TEQ). Questo valore può essere espresso in due diverse scale: la prima (I-TEQ, International Toxicity Equivalents NATO-CCMS) considera solo PCDD e PCDF, la seconda (WHO-TEQ, espressa dall'OMS) considera anche i PCB diossina-simili (10).

I PCB presentano diversi tipi di tossicità che variano da congenere a congenere. La loro tossicità è stata dimostrata su animali di laboratorio, sia pure con marcate variazioni da specie a specie. Tuttavia in una stessa specie essi risultano meno tossici dei PCDD e PCDF (11). La risposta tossica si evidenzia con varie manifestazioni, quali disordini cutanei (tra cui la cloracne), perdita di peso, danni epatici, disfunzioni endocrine e riproduttive, cancerogenesi (epatocarcinoma), ecc.

Come potenziali cancerogeni, i PCB sono stati sottoposti a numerosi studi sperimentali a lungo termine dai quali si è messo in evidenza il loro scarso potere genotossico. I PCB non vengono considerati iniziatori ma, piuttosto, cancerogeni promotori (epatocarcinoma nei roditori), inoltre sembra accertato che l'attività cancerogena sia da attribuirsi prevalentemente ai PCB coplanari la cui struttura è simile a quella della TCDD. I PCB diossina-simili rivelano effetti sul sistema riproduttivo e immunitario. In particolare, al congenere PCB 126, con tossicità più elevata rispetto agli altri, è stato attribuito un fattore di tossicità equivalente pari a 0,1.

Bucholski *et al.* (12) hanno dimostrato che durante la gravidanza i PCB vengono trasferiti dalla madre al feto attraverso la placenta, e dopo la nascita al neonato attraverso il latte, inoltre hanno riscontrato che il periodo di gestazione di donne con alti livelli di PCB è minore. Lo sviluppo del feto è influenzato da questi contaminanti che agiscono da interferenti endocrini e questa tipologia di donne presenta un maggior tasso di interruzione di gravidanze (13).

Altri studi hanno evidenziato che i bambini nati da madri abituali consumatrici di pesce contaminato del lago Michigan, presentano una minore circonferenza cranica rispetto ad un gruppo di controllo (14). È stata rilevata una dipendenza lineare tra i livelli di concentrazione dei PCB nel sangue e i livelli di concentrazione nel latte materno di lavoratrici esposte (15).

Contaminazione degli alimenti

Generalmente la contaminazione ambientale osservata ad esempio in campioni di sedimento marino o di aria urbana è attribuibile al contributo di varie miscele commerciali di PCB, caratterizzate ciascuna da una distribuzione di congeneri in relazione al contenuto di cloro, centrata su una singola classe isomerica (16). I profili di contaminazione da PCB delle matrici ambientali ripropongono con percentuale diversa l'intera gamma di congeneri, dai più volatili, prevalenti nell'aria (17), a quelli più pesanti, prevalenti nei sedimenti (18).

L'elevata persistenza ambientale dei composti in esame dovuta alle loro caratteristiche chimico-fisiche, determina l'esposizione degli organismi viventi, con conseguente accumulo nei tessuti adiposi, a causa della lipofilia delle sostanze e della mancanza di adeguati meccanismi di degradazione metabolica, seppur presenti in misura tale da modificare comunque i profili delle matrici ambientali (19, 20).

Diretta conseguenza del bioaccumulo è il processo di biomagnificazione lungo la catena trofica, per cui un organismo che occupa posizioni più elevate nella piramide alimentare si trova esposto non solo alla concentrazione presente nell'ambiente ma anche a quella presente negli alimenti che ingerisce. Infatti gli alimenti rappresentano la maggiore via di esposizione umana (1, 21).

Da uno studio su campioni di dieta totale effettuato in Italia, è stato calcolato che l'assunzione giornaliera di PCB totali varia da 2147 a 4679 ng/pro capite/die, in relazione alla macro area geografica esaminata, cui corrisponde un differente consumo di tipologie alimentari (22).

In Italia è in atto il Piano Nazionale per la ricerca dei Residui (PNR) negli animali e in alcuni alimenti di origine animale con lo scopo di sorvegliare su qualsiasi trattamento illecito, sul rispetto dei limiti massimi di residui di farmaci veterinari e sulle quantità massime di antiparassitari e di contaminanti ambientali, fissate dalla normativa nazionale e comunitaria (23).

In questo ambito, l'unità operativa per il rilevamento di PCB, PCDD/F del Laboratorio Nazionale di Riferimento, presso l'Istituto Superiore di Sanità, ha raccolto ed elaborato i dati relativi a PCB, ottenuti dalle analisi effettuate dai laboratori di controllo delle matrici alimentari indicate dal PNR.

Sebbene la maggioranza dei campioni risulti avere una concentrazione di PCB inferiore al limite fissato di 100 ng/g grasso, nella Tabella 1, dove sono riportati i valori relativi al congenere più abbondante (H6CB-153), è evidente come il pesce abbia una concentrazione più elevata, a dimostrazione dell'effetto della contaminazione marina, e che il numero dei valori determinati sia basso rispetto al numero di analisi effettuate (24). Comunque lo sviluppo di una banca dati permette di fornire alla Comunità Europea dati aggiornati sui livelli di contaminazione presenti negli alimenti italiani (25).

Tabella 1. PNR 2001: livelli del PCB-153 in alimenti di origine animale, espressi in ng/g grasso

Alimenti	Min	Max	Media	N. analisi effettuate	N. valori determinati
Carne Bovina	3,30	5,70	4,42	89	13
Carne Suina	2,10	5,21	3,22	168	4
Pollo	3,90	10,0	6,38	88	9
Tacchino	3,96	12,2	5,97	13	6
Trote	6,30	60,5	25,8	37	25
Anguille	8,80	163	38,9	7	7
Spigole	7,20	360	53,3	19	18
Latte Bovino	1,50	17,8	4,28	67	14
Latte Ovi-Caprino				16	0
Uova	2,72	23,3	8,15	102	7
Mangimi per Bovine da latte	3,40	7,90	5,68	29	4
Mangimi per Suini	0,00	0,00		15	0
Mangimi per acquacoltura	2,70	39,0	12,6	18	16
Miele				12	0
Altro (specificare in nota)	6,19	4500	615	63	8
N° totale di analisi				743	131

La Tabella 2 riporta dati disponibili in vari paesi europei (26) sui livelli attuali di PCDD/F e PCB diossina-simili in diversi gruppi di alimenti: il contributo in tossicità equivalente (Total TEQ) spesso risulta superiore al limite finora espresso solo per PCDD/F.

È da notare come il pesce del Mar Baltico abbia livelli molto elevati, analogamente a quanto avviene per i PCB.

Tabella 2. Livelli attuali di diossine e PCB diossina simile in Europa espressi in pgTE/g grasso

Alimenti	N. campioni	Diossine	PCB diossina-simili	TEQ totale	Limiti attuali per diossine
Ruminanti	25	1,11	1,66	2,32	3
Pollame	12	1,16	3,8	4,72	2
Maiali	17	0,4	0,56	0,75	1
Fegato	5	-	-	-	6
Pesce	157	1,22	3,66	4,63	4
– salmone	74	1,25	3,75	4,63	-
– frutti di mare	22	0,5	0,5	1	-
– pesce baltico	273	17,88	9,87	27,05	-
– aringa	159	20,1	8,68	28,87	-
Latte	152	1,6	3,62	5,14	3
– latte commerciale	61	1,1	2,07	2,83	-
– prodotti caseari	38	1,15	2,44	3,29	-
– latte proveniente da azienda agricola	52	2,03	6,43	7,74	-
Uova	68	1,16	1,77	2,77	3
Grasso animale	10	-	-	-	1,2 o 3
Olio vegetale	12	0,32	0,61	0,84	0,75
Olio di pesce	87	5,72	21,06	26,66	2
– 2000-1	35	7,03	25,72	33,19	-
– 2002-3	52	1,91	7,03	8,81	-

Latte materno

Entrati nell'organismo umano, i contaminanti organoclorurati possono essere escreti come tali o trasportati dal sangue nel fegato, sede di processi metabolici possibili per alcuni congeneri, e nei tessuti adiposi dove vengono accumulati (27). Il latte materno, ricco tra l'altro di grassi, rappresenta una delle sedi di accumulo e l'allattamento in tal modo rappresenta una delle principali vie di eliminazione di tali composti per l'organismo femminile. Particolarmente interessante è il confronto tra i profili di contaminazione da PCB nella dieta nazionale con quello in un pool di campioni di latte umano italiano (Figura 2): la dieta è ricca in congeneri e rappresenta ciò che "entra" nell'organismo, mentre il latte mostra la presenza solo di alcuni congeneri ed è ciò che "esce" dall'organismo, questa differenza può dare delle indicazioni sull'azione del metabolismo sui vari congeneri (28).

Diversi fattori influenzano i livelli di contaminazione del latte materno, tra cui (a) l'età della madre, (b) la condizione di primipara e (c) la durata del precedente allattamento: Albers *et al.* (29) evidenziano una correlazione positiva tra l'età della madre e livelli di organoclorurati nel latte, in quanto all'aumentare del tempo di esposizione corrisponde un aumento del carico corporeo; analogamente dopo il primo evento di allattamento, il carico corporeo di contaminanti nella madre diminuisce, cosicché i figli successivi verranno esposti a concentrazioni inferiori.

Alcock *et al.* (27) hanno sviluppato un modello predittivo per i PCB ma applicabile anche ad altri composti lipofili, che, tenendo conto dell'esposizione, del metabolismo, della dieta e dei cambiamenti dei livelli ambientali, simula l'andamento della concentrazione del tossico durante il ciclo vitale di un individuo. Applicato al caso di una donna nata nel 1950, nell'ipotesi (a) che

partorisca tre volte e (b) che non abbia figli, il modello offre informazione sui livelli, sull'andamento e sulle modifiche del suo carico corporeo in relazione al numero delle gravidanze, e, in ultima analisi, sul livello di esposizione dei neonati.

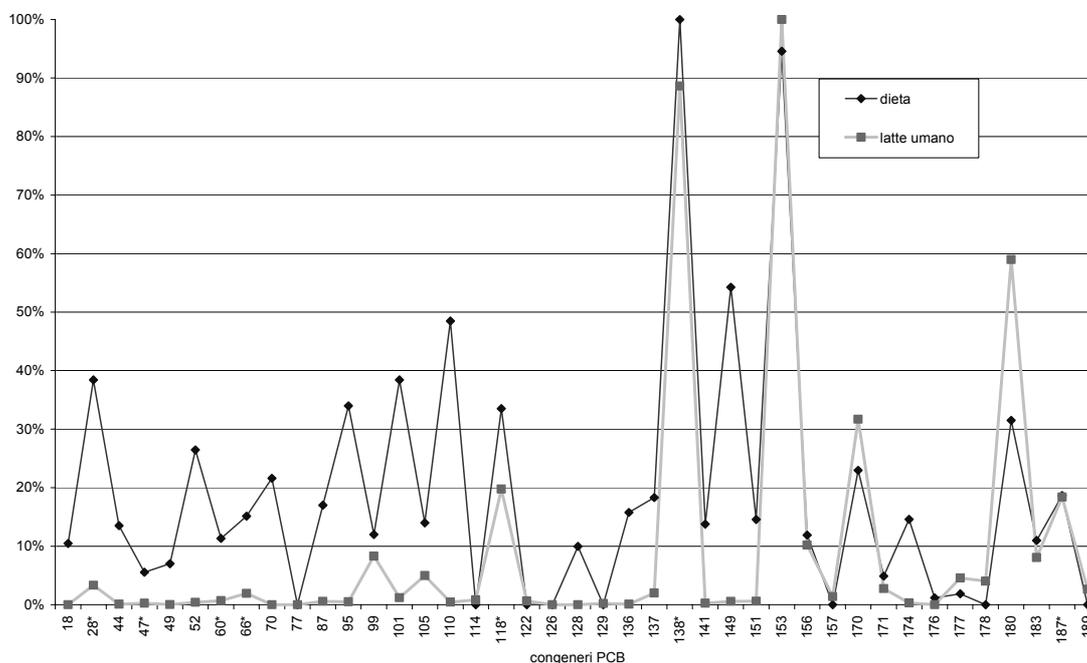


Figura 2. Confronto di profili di contaminazione da PCB tra dieta italiana e un pool di latte materno italiano

Inoltre altri eventi quali trattamenti dimagranti, che favoriscono una diminuzione del contenuto lipidico, e la dieta, ad esempio troppo ricca di grassi animali o di pesce fortemente contaminato, rivestono una particolare importanza nel determinare il contenuto di contaminanti nel latte: il caso delle donne Inuit (30), o delle popolazioni che consumano pesce del Lago Ontario (31) o comunque proveniente da luoghi contaminati (32) ne rappresentano degli esempi.

Päpke (33) mostra l'andamento dei livelli di PCDD e PCDF nel sangue, nel tessuto adiposo e nel latte materno analizzati nell'arco di dieci anni in Germania (1986-1996). Tra la fine degli anni ottanta e la metà degli anni '90 si osserva una riduzione della concentrazione di PCDD/F nel latte umano nella misura del 50-70%. Questi risultati indicano che gli sforzi mirati a ridurre la presenza di microcontaminanti nell'ambiente possono ottenere notevoli effetti.

Il terzo studio sull'esposizione a PCDD/F e PCB nel latte materno coordinato dall'OMS negli anni 2000-2002 fornisce dati e andamento significativi. Tra i paesi europei partecipanti, quelli più industrializzati quali Paesi Bassi, Italia e Spagna mostrano livelli di PCDD/F più elevati (12-18 pgWHO-TEQ/g grasso) rispetto a quelli riscontrati in Bulgaria, Croazia Ungheria e Irlanda (6-7 pgWHO-TEQ/g grasso). Per quanto riguarda i PCB diossina-simili i livelli nel latte materno sono alti e variano da 4 a 20 pgWHO-TEQ/g grasso (l'Italia si attesta intorno ai 16 pgWHO-TEQ/g grasso) (33).

L'andamento discendente della concentrazione dei contaminanti negli ultimi decenni è stato riscontrato nei vari paesi europei coinvolti nello studio, in analogia con quanto visto in

Germania: dal confronto dei dati relativi al 1988, 1993 e 2002 si conferma anche la misura della diminuzione del 40% (34).

Nonostante il trend discendente dei livelli di PCDD/F e PCB indichi una continua diminuzione dell'esposizione della popolazione generale, è indubbio che l'esposizione neonatale attraverso il latte materno è ancora critica. Stime dell'esposizione dei neonati attraverso il latte materno in varie coorti sono riportate in Focant *et al.* (35): mediamente i livelli si aggirano intorno a 50-100 pgTE/kg peso corporeo/die che risulta essere molto più elevata del valore giornaliero tollerabile di esposizione attraverso la dieta (*Tolerable Daily Intake*, TDI), raccomandata dall'OMS di 1-4 pg TEQ/kg peso corporeo/die. Tuttavia poiché il TDI è stato stimato per gli adulti per la durata della vita (in media 70 anni) potrebbe essere poco significativo rapportarlo ad una esposizione elevata ma di breve durata, quale è il periodo dell'allattamento; mentre invece si dovrebbe valutare il significato di una tale esposizione sullo sviluppo del neonato e poi del bambino.

Per sopperire alla scarsità di dati sui livelli di contaminanti nei neonati, vengono sviluppati modelli che forniscono una stima del carico corporeo (*body burden*) nel bambino utilizzando variabili tempo-dipendenti. Una rassegna di questi modelli è presente in LaKind *et al.* (36).

In particolare, Lorber e Phillips (37) hanno sviluppato e validato un modello farmacocinetico per stimare il carico corporeo in termini di tossicità equivalente del neonato quando viene alimentato con latte materno e con latte artificiale. Da questo modello si può notare come inizialmente l'esposizione sia più elevata per i bambini allattati al seno, seppure con ampie differenze in relazione alla durata dell'allattamento, rispetto a quelli alimentati con latte artificiale; ma dopo i sei anni di vita il livello corporeo si attesta su concentrazioni simili a quelle di un adulto, a prescindere dalla modalità di allattamento.

Quando si considerano i potenziali rischi associati alla presenza di contaminanti ambientali nel latte materno è ugualmente importante considerare i benefici associati con l'allattamento stesso. In tal modo si può fornire un quadro più equilibrato dei rischi e benefici, in quanto in assenza di prove certe, acquista sempre più valore e importanza il contributo apportato da tutte le sostanze presenti nel latte materno (lipidi, carboidrati, proteine, vitamine, ormoni, fattori della crescita, enzimi, immunoglobuline), che garantiscono benefici nutrizionali per una normale crescita e sviluppo a livello cognitivo e psicologico (36).

A promozione e supporto dell'allattamento materno si è espresso anche il gruppo di lavoro dell'OMS nel 1995 che, sulla base di dati sperimentali ed epidemiologici recenti, conclude che non ci sono comunque presupposti scientifici consistenti per modificare la precedente raccomandazione del 1987, che già incoraggiava l'allattamento materno, anche se tuttavia occorre continuare a identificare e controllare sorgenti ambientali di questi contaminanti (38).

Conclusioni

L'allattamento materno rimane la fonte principale di nutrimento del neonato per la sua importanza a livello nutrizionale e psicologico.

Per quanto riguarda la presenza di contaminanti ambientali nel latte materno, l'OMS favorisce e promuove questa pratica, in assenza di evidenze scientifiche sufficienti, ma ulteriori impegni devono essere presi per garantire che il declino delle concentrazioni di fondo iniziato negli anni '90 prosegua nel tempo.

Bibliografia

1. Liem ADK, Theelen RMC. *Dioxins: Chemical Analysis, Exposure and Risk Assessment. PhD dissertation*. Utrecht: Utrecht University; 1997.
2. Risebrough RW, Rieche P, Peakall DB, Herman SG, Kirwen MN. Polychlorinated biphenyls in the global ecosystem *Nature* 1968 (Lond.);220:1098-102.
3. Jensen S, Johnels AG, Olsson M, Otterlind G. DDT and PCB in marine animals from swedish waters *Nature* 1969 (Lond.);224:247-50.
4. World Health Organisation. *Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans*. Environmental health criteria 88. International Program on Chemical Safety (ICPS9). Geneva: WHO; 1989.
5. World Health Organization (WHO) and International Agency for Research on Cancer (IARC). *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans - Polychlorinated dibenzo-para-dioxins and Polychlorinated dibenzofurans*. Vol. 69, 1997.
6. Poland A, Knutson JC. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1982;22:517-54.
7. Hoffmann EC, Reyes H, Chu FF, Sander F, Conley LH, Brooks BA, Hankinson O. Cloning of a factor required for the activity of the Ah (dioxin receptor). *Science* 1991;252:4-958.
8. Perdew GH. Chemical cross-linking of the cytosolic and nuclear forms of the Ah receptor in hepatoma line 1c1c7. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1992;182:55-62.
9. Dolwick KM, Schmidt JV, Carver LA, Swanson HI, Bradfield CA. Cloning and expression of human Ah receptor cDNA. *Molecular Pharmacology* 1993;44:911-7.
10. Van den Berg M, Birnbaum L, Bosveld ATC, Bruström B, Cook P, Feeley M, Giesy JP, Hanberg A, Hasegawa R, Kennedy SW, Kubiak T, Larsen JC, van Leeuwen A, Liem AKD, Nolt C, Peterson RE, Poellinger L, Safe S, Schrenk D, Tillitt D, Tysklind M, Younes M, Wærn F, Zacharewski T. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for human and wildlife. *Environmental Health Perspectives* 1998;106(12):775-92.
11. Parkinson A, Safe S. Mammalian and toxic effects of PCBs. In: Safe S, Hutzinger O. (Ed.). *Environmental Toxin Series 1-Polychlorinated biphenyls (PCBs): Mammalian and environmental toxicology*. Berlin: Springer-Verlag; 1987.
12. Bucholski KA, Begeron J, Winneke G, Dunemann L. Determination of polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in human body fluids and tissues *Journal of Chromatography A*. 1996;754:479-85.
13. Chevrier J, Dewailly E, Ayotte P, Mauriège P, Després JP, Tremblay A. Body weight loss increases plasma and adipose tissue concentrations of potentially toxic pollutants in obese individuals. *International Journal of Obesity* 2000;24:1272-8.
14. Fein GG, Jacobson JL, Jacobson SW, Schwartz PM, Dowler JK. Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls: effects on birth size and gestational age. *The Journal of Pediatrics* 1994;105:315-20.
15. Kuwabara K, Yakushiji T, Watanabe I, Yoshida S, Koyama K, Kunita N, Hara I. Relationship between breast feeding and PCB residues in blood of the children whose mothers were occupationally exposed to PCBs. *Occupational Environmental Health* 1978;41:189.
16. Schulz E, Petrick G, Duinker JC. Complete characterization of Polychlorinated Biphenyl congeners in commercial Aroclor and Clophen mixtures by multidimensional gas chromatography electron capture detection. *Environmental Science and Technology* 1989;23:852-9.
17. Turrio-Baldassarri L, Abate V, di Domenico A, Iacovella N, La Rocca C, Menichini E. Difference in levels and profiles of PCBs and PAHs between indoor and outdoor samples simultaneously collected in Rome. *Organohalogen Compounds* 2003;61:486-9.

18. di Domenico A, Turrio-Baldassarri L, Ziemacki G, De Felip E, La Rocca C, Ferrari G, Cardelli M, Volpi F, Ferri F, Iacovella N, Lupi C, Rodriguez F, D'Agostino O, Sansoni R, Settimo G. Priority microcontaminants in sediment samples from the Venice lagoon: a selection of concentration data and predominant analytical features. *Organohalogen Compounds* 1998;39:205-10;
19. Turrio Baldassarri L, Bocca A, di Domenico A, Fulgenzi A, Iacovella N, La Rocca C. PCB contamination in samples from the Italian diet, dairy products, and agricultural soil. *Microchemical Journal* 1995;51:191-197.
20. Turrio Baldassarri L, di Domenico A, Fulgenzi AR, Iacovella N, La Rocca C. Differences in polychlorobiphenyl (PCB) contamination patterns in various environmental matrices. *The Science of the Total Environment*, 1993 Supplement;1439-51.
21. Scientific Committee on Food. *Opinion of the SCF on the Risk Assessment of Dioxins and Dioxin-like PCBs in Food*. European Commission, Health Consumer Protection Directorate General, SFC/CS/CNMT/DIOXIN/8, Bruxelles: SCF; 2000.
22. Turrio Baldassarri L, di Domenico A, Fulgenzi A, Iacovella N, La Rocca C. Levels of polychlorobiphenyls congeners in mean diet samples from different Italian areas. *Organohalogen Compounds* 1998;38:195-8.
23. Comunità Europea. Modifica del regolamento n. 466/2001/CE della Commissione che definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari. Consiglio del 29 novembre 2001 2375/2001/CE.
24. Turrio Baldassarri L, Alivernini S, Iacovella N, La Rocca C, Quattrocchi W. Presenza, livelli e profili dei PCB negli alimenti di origine animale. In: Marchelli R. (Ed.). *Qualità e sicurezza degli alimenti*. Parma: Morgani Edizioni Tecniche; 2003. p 132-6.
25. Turrio Baldassarri L, Iacovella N, La Rocca C, Quattrocchi W. Control of PCB levels in food of animal origin in Italy: analytical quality control, organization and results. *Organohalogen Compounds* 2004;66:1981-8.
26. Gallani B, Boix A. European Commission: Dioxins and PCBs in food and feed: data available to DG SANCO. *Join report DG SANCO/DG-JRC-IRMM*. February 2004.
27. Alcock RE, Sweetman AJ, Juan C-Y, Jones KC. The intake and clearance of PCBs in humans a generic model of lifetime exposure. *Organohalogen Compounds* 1999;44:61-5.
28. Turrio Baldassarri L, di Domenico A, Fulgenzi A, La Rocca C, Iacovella N, Rodriguez F, Volpi F. Influence of relative response factor in the determination of organic microcontaminants with isotopically labeled standards. *Mikrochimica Acta* 1996;123:45-53.
29. Albers JMC, Kreis IA, Liem ADK, van Zoonem P. Factors that influence the level of contamination of human milk with polychlorinated organic compounds. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 1996;30:285-91.
30. Dewailly E, Ryan JJ, Laliberte C, Bruneau S, Weber JP, Gingras S, Carrier G. Exposure of remote maritime populations to coplanar PCBs. *Environmental Health Perspectives* 1994 Supplement 1;205-9.
31. Kostyniak PJ, Stinson C, Greizerstein HB, Vena J, Buck G, Mendola P. Relation of Lake Ontario fish consumption, lifetime lactation, and parity to breast milk polychlorobiphenyl and pesticide concentration *Environmental Research* 1999 Section A;80:S166-S174.
32. Fitzgerald EF, Hwang SA, Deres DA, Bush B, Cook K, Warswick P. The association between local fish consumption and DDE, mirex, and HCB concentrations in the breast milk of Mohawk women at Akwesasne. *Journal of exposure analysis and environmental epidemiology* 2001;11:33-7.
33. Pöpke O. PCDD/PCDF: human background data for Germany, a 10-Year experience. *Environmental Health Perspectives* 1998 Supplement 1;106:723-31.

34. Van Leeuwen FXR, Malisch R. Result of the third round of the WHO-coordinated exposure study on the levels of PCBs, PCDDs and PCDFs in human milk. *Organohalogen Compounds* 2002;56:311-6.
35. Focant JF, Pirard C, Thielen C, De Pauw. Levels and profiles of PCDDs, PCDFs and cPCBs in Belgian breast milk. Estimation of infant intake. *Chemosphere* 2002;48:763-70.
36. LaKind J, Wilkins AA, Berlin CB Jr. Environmental chemicals in human milk: a review of levels, infant exposure and health, and guidance for future reserch. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2004;198:184-208.
37. Lorber M, Phillips L. Infant exposure to dioxin-like compounds in breast milk. *Environmental Health Perspectives* 2002;110:A325-A332.
38. Brouwer A, Ahlborg UG, van Leeuwen R, Feeley M. Report of the who working group on the assessment of health risks for human infants from exposure to PCDDs, PCDFs and PCBs. *Chemosphere* 1998;37(9-12):1627-43.

CONTAMINANTI E ALLATTAMENTO AL SENO: RISCHI E BENEFICI PER LO SVILUPPO NEUROPSICOLOGICO

Gemma Calamandrei, Simona Sermoneta, Aldina Venerosi
Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Nel 2001 l'Assemblea Mondiale della Sanità ha emanato un'importante risoluzione sulla nutrizione dei lattanti e dei bambini, nella quale viene raccomandato l'allattamento esclusivo per i primi sei mesi di vita del bambino e l'allattamento complementare alla somministrazione di altri cibi fino ai due anni di vita (1). Secondo l'OMS sono circa 1,5 milioni i bambini che ogni anno muoiono perché non sono stati allattati con latte materno. Ovviamente tale condizione di emergenza si riferisce soprattutto ai paesi in via di sviluppo dove l'acqua può essere fortemente inquinata, per cui bambini che assumono latte artificiale hanno il 25 per cento di probabilità in più di morire di diarrea rispetto ai bambini allattati al seno. Se in questi paesi ai problemi legati alla salubrità dell'acqua si aggiunge la malnutrizione durante la prima infanzia, si comprende l'impegno dell'OMS nell'incoraggiare l'allattamento prolungato al seno. Ma anche nei paesi dell'occidente industrializzato, il latte materno resta senza dubbio alcuna la migliore scelta nutrizionale per il neonato. Il latte materno è l'alimento più completo per un lattante: è facilmente digeribile, fornisce un apporto bilanciato di grassi, proteine e carboidrati necessari all'organismo in sviluppo e conferisce benefici a lungo termine per la crescita e lo sviluppo della risposta immunitaria ai patogeni, nonché per lo sviluppo cerebrale e la resistenza a patologie croniche quali le allergie e il diabete. Infine l'allattamento al seno favorisce lo stabilirsi del legame madre-neonato, aumentando le probabilità di uno stato di benessere psicologico della madre e del bambino nei primi anni di vita, condizione che a sua volta influenzerà positivamente la crescita psicofisica del bambino.

A fronte dei benefici indiscutibili dell'allattamento al seno, vanno però considerati alcuni potenziali rischi. Il latte materno non è indenne dalle contaminazioni, in particolare da parte di sostanze tossiche che nel recente passato sono state immesse dall'uomo in modo incontrollato nell'ambiente. La presenza di agenti tossici nel latte materno è legata ad esposizioni occupazionali e a particolari emergenze ambientali, ma anche in larga misura all'esposizione involontaria, prolungata e a basse dosi ad ambienti e/o cibi contaminati. Questo dato apre questioni inedite per le politiche sanitarie: si rendono necessari programmi sistematici di monitoraggio della qualità del latte anche ai fini dell'aggiornamento dei protocolli di valutazione del rischio per le fasce di popolazione più vulnerabili.

Benefici dell'allattamento al seno

Il latte materno è una completa alimentazione per il neonato, perfetta non solo per le sostanze che contiene, ma anche per la sua capacità di "adattarsi" alle esigenze del neonato: la composizione del latte materno cambia nel corso dell'allattamento assicurando una nutrizione

ottimale in ogni fase della crescita. Negli ultimi anni si è dedicata molta attenzione al ruolo degli acidi grassi poliinsaturi a catena lunga (LCPUFA), presenti in concentrazioni più elevate nel latte materno durante le prime settimane dopo il parto e assenti dal normale latte in formula (2). I LCPUFA avrebbero un ruolo importante nella maturazione del sistema nervoso (3). Il latte delle madri di bambini nati pretermine mantiene livelli più elevati di sostanze nutritive quali i LCPUFA nel corso dei primi sei mesi di allattamento, in questo modo sostenendo per un periodo più lungo la maturazione (2).

Il sistema immunitario del neonato umano non è ancora del tutto sviluppato al momento della nascita. È tramite l'allattamento che la madre trasferisce al neonato anticorpi (IgA) 'mirati', poiché diretti contro i microorganismi incontrati dalla madre, che saranno proprio quelli necessari per contrastare i patogeni che lo circonda (4). Il latte materno contiene inoltre enzimi con funzioni anti-infettive, agenti anti-infiammatori, citochine, antiossidanti, enzimi antiproteasici e prostaglandine (4). Studi epidemiologici hanno evidenziato come, rispetto a neonati allattati artificialmente, i neonati alimentati con latte materno abbiano tassi di mortalità e di morbilità minori, e una ridotta severità di una vasta gamma di malattie infettive (5). Ciò è significativo per i bambini nati nei paesi in via di sviluppo. Si tratta particolarmente di infezioni respiratorie (6) e gastrointestinali (7), ma sono stati osservati benefici anche per quanto riguarda altre malattie infettive, come l'otite media (8, 9), infezioni alle vie urinarie (10), la meningite batterica (11), e l'enterocolite necrotizzante (12), nonché per malattie atopiche (13), e malattie croniche quali l'ipercolesterolemia (14), l'obesità (15). Tali effetti protettivi sono stati riscontrati anche nei paesi industrializzati, nonostante le incidenze di base di molte malattie infettive siano relativamente ridotte (6, 8, 9, 11, 12). Tali effetti tendono a seguire una relazione dose-risposta (più latte materno, più protezione) (8, 9, 11), e a persistere oltre lo stesso periodo di allattamento (4, 7, 10, 11).

Il latte materno contiene inoltre ormoni, quali cortisolo, tiroxina e prolattina, e fattori di crescita che hanno una funzione fondamentale per lo sviluppo armonico dell'organismo. I fattori di crescita sono agenti proteici multifunzionali che regolano la crescita e il differenziamento di diversi tipi cellulari (16). Il più noto è il fattore di crescita delle cellule nervose, o *Nerve Growth Factor* (NGF) che promuove il differenziamento e la crescita non solo dei neuroni del sistema nervoso periferico, ma anche di popolazioni di neuroni nel SNC, di cellule della porzione midollare delle ghiandole surrenali, e di cellule del sistema immunitario, quali linfociti T e B (17). Molti dei fattori di crescita originariamente caratterizzati per il loro effetto sul tessuto epiteliale (*Epidermal Growth Factor*, EGF), connettivo (*Fibroblast Growth Factor*, FGF) o per l'attività insulino-simile (*Insulin-like Growth Factor*, IGF) sono poi stati successivamente identificati anche nel sistema nervoso centrale, con importanti proprietà di modulazione della crescita neuronale e gliale. Il latte materno, per la sua complessa composizione che include agenti proteici attivi in diversi distretti funzionali dell'organismo, è un vero e proprio sistema biologico integrato, che contribuisce significativamente all'omeostasi neuroimmunoendocrina.

Allattamento al seno e sviluppo neuropsicologico

Molti dei componenti nutrizionali del latte materno hanno un effetto importante sulla maturazione del sistema nervoso, e potrebbero quindi influenzare favorevolmente lo sviluppo comportamentale del bambino (18). Studi epidemiologici condotti su larga scala sembrano indicare che i neonati allattati al seno abbiano prestazioni neuropsicologiche migliori durante l'infanzia e l'adolescenza di neonati allattati artificialmente (19). Ciononostante, due recenti rassegne critiche sugli effetti dell'allattamento al seno sullo sviluppo cognitivo (20, 21)

evidenziano importanti limitazioni metodologiche nei numerosi studi condotti sui neonati a termine, in particolare la mancata considerazione di variabili confondenti quali fattori genetici, o il grado di stimolazione del bambino nell'ambiente domestico. Laddove tali variabili vengono inserite nelle analisi, i vantaggi osservati tendono ad attenuarsi, o addirittura ad annullarsi (20-22).

È possibile che i nutrienti presenti nel latte materno possano avere un impatto diretto sullo sviluppo neuropsicologico. Tuttavia, alcuni studi suggeriscono che l'allattamento al seno, soprattutto se prolungato, sia associato a una migliore qualità della relazione parentale, e che quindi l'allattamento influisca indirettamente sullo sviluppo neurologico e cognitivo del bambino. Eventuali vantaggi nello sviluppo neurocognitivo del neonato potrebbero essere quindi dovuti non solo a fattori nutrizionali nel latte materno, ma anche all'allattamento stesso. Parte dell'effetto sarebbe dovuto a una migliore interazione tra madre e neonato, sostenuta da un maggior contatto fisico e psicologico. Un'ipotesi psicobiologica in tal senso spiega che la suzione, ma anche il contatto fisico tra madre e neonato stimolano il rilascio di ossitocina e prolattina dall'ipofisi posteriore. Oltre a stimolare la produzione di latte l'ossitocina ha effetti positivi sul comportamento materno, riducendo il rischio della depressione postparto (23-24).

Evidenze più solide sul ruolo dell'allattamento al seno sullo sviluppo neuropsicologico si riferiscono ai neonati nati prematuramente o di peso molto basso. La separazione degli effetti dell'alimentazione da quelli dell'ambiente domestico e dell'interazione tra madre e neonato è infatti meno problematica nei neonati prematuri. In questa popolazione, almeno inizialmente, il cibo (es. latte materno, latte umano a termine da banca latte, vari tipi di latte in formula) viene somministrato artificialmente a tutti i neonati, e l'ambiente ospedaliero è uguale per tutti. Rimane il problema della scelta materna di fornire o meno il proprio latte al neonato, visto che esistono importanti differenze tra madri che scelgono di allattare e non (livello socioeconomico, scolarizzazione, intelligenza) ma è possibile randomizzare gli altri gruppi di alimentazione.

I primi studi di questo tipo sono stati effettuati da un gruppo di ricerca inglese nei primi anni '80. In una serie di esperimenti randomizzati sono stati confrontati a 18 mesi di età esiti di sviluppo cognitivo (*Bayley Scales, Psychomotor and Mental Development Indexes*) in neonati prematuri. Il gruppo alimentato con latte umano a termine da banca latte (relativamente povero in nutrienti rispetto a latte pretermine) ha ottenuto risultati migliori rispetto ad un gruppo allattato con normale latte in formula, e analoghi ai risultati ottenuti da un gruppo alimentato con latte in formula, fortificato in modo da imitare il latte pretermine (25).

Alcuni esperimenti su larga scala hanno, poi, confrontato neonati prematuri allattati con normale latte in formula ad altri allattati con latte in formula arricchito di LCPUFA (gruppi randomizzati) e un gruppo allattato con il latte della propria madre (26, 27). Uno di questi studi, ha evidenziato una maturazione neurologica migliore nel gruppo alimentato con latte in formula arricchito (e anche in quello alimentato con latte materno, ma in un confronto non randomizzato), misurata in indici di acutezza visiva - potenziali evocati visivi (PEV) a 6 mesi, e miglioramento in PEV tra il quarto e il sesto mese di età. Gli effetti su test di sviluppo psicomotorio e cognitivo (*Bayley Scales* a 12 mesi; *Fagan Intelligence Test* a 6 e 9 mesi; *vocabulary checklist* del McArthur CDI a 9 mesi) sono stati meno conclusivi (26). Un altro studio – dopo correzione per alcune variabili confondenti di rilievo – ha riscontrato migliori risultati sia in indici cognitivi (*Bayley Scales*) che neurologici a 9 e a 18 mesi tra i neonati alimentati con latte della propria madre, rispetto a quelli alimentati con latte in formula normale o arricchita (27). Interessante è il recente studio di Feldman e Eidelman (28) poiché rappresenta un tentativo di esplorare il modello sopracitato sugli effetti indiretti dell'allattamento, effettuando osservazioni dirette dell'interazione tra madre e neonato. Questo studio utilizzava 86 neonati pretermine, sottoposti a regimi diversi di allattamento (proporzione di latte materno vs. latte in formula). Gli autori hanno osservato che i punteggi ottenuti da questi stessi bambini a 6 mesi nella batteria di Bailey erano direttamente proporzionali sia alla quantità di latte materno ricevuto che alla qualità della relazione con la

madre, valutata in base a una serie di indici comportamentali, che includevano il contatto fisico tra la madre e il bambino, le vocalizzazioni reciproche, ecc. Nel complesso quindi, almeno nel caso dei neonati pretermine, le proprietà nutritive del latte materno sembrano riflettersi in un miglioramento della maturazione neuropsicologica del bambino, ma soprattutto se integrate con una stretta relazione con la figura materna.

Xenobiotici nel latte materno

Nel latte materno oltre a sostanze con effetti benefici sullo sviluppo del neonato, sono presenti xenobiotici di diversa natura con potenziali effetti avversi sullo sviluppo di organi e sistemi. Ciò è in parte dovuto all'assunzione volontaria da parte della donna in gravidanza e allattamento di agenti farmacologici, sostanze ricreative o di abuso, ma anche dall'esposizione involontaria attraverso la dieta e l'ambiente. In generale la concentrazione di queste sostanze nel latte materno è molto inferiore a quella misurabile nel sangue circolante della donna che allatta: per la maggioranza dei farmaci ad esempio, la percentuale di dose materna che viene trasferita al latte varia tra lo 0,5 e l'1%, ma tale percentuale cresce notevolmente nel caso di sostanze lipofile (29). Altri composti chimici quali i metalli pesanti, e i composti organici volatili, derivano in massima parte dalla esposizione involontaria, così come i contaminanti organici persistenti. È proprio su queste sostanze, introdotte principalmente con la dieta e che si accumulano nel tessuto adiposo degli organismi viventi, che si sono focalizzate le ricerche sui potenziali effetti degli xenobiotici ambientali presenti nel latte materno. I contaminanti organici persistenti includono molti pesticidi organoclorurati, i policlorobifenili (PCB), le diossine, i furani e i polibromodifenil eteri (ritardanti di fiamma, PBDE). Nel corso della vita, l'esposizione a basse dosi ma prolungata ai contaminanti organici persistenti attraverso l'introduzione di cibo contaminato, assieme al ridotto tasso di degradazione metabolica caratteristico di queste sostanze, può condurre a un accumulo considerevole di questi contaminanti nel tessuto adiposo di una donna in età fertile. Queste sostanze vengono poi rilasciate al feto attraverso il circolo e la placenta nella fase prenatale, e al neonato attraverso il latte (30). Tutti questi agenti vengono ritrovati nel latte materno in quantità significative, e in popolazioni residenti in aree geografiche estremamente diversificate. In uno studio del 1999 condotto sulla popolazione generale in Olanda, è stato stimato che l'allattamento al seno per 6 mesi contribuirebbe con una percentuale compresa tra il 12 e il 14% alla esposizione cumulativa ai composti diossino-simili nei primi 25 anni di vita (31). Nel latte materno sono anche presenti in quantità misurabile metalli, solventi e pesticidi organofosfati e carbammati, tra i più utilizzati in agricoltura e come insetticidi per uso domestico. Per quanto riguarda i metalli quali piombo, cadmio, mercurio, questi sono stati ritrovati nel latte materno, sia in funzione della dieta (p.e. pesce contaminato con mercurio) che dell'esposizione ambientale (es. fumo di sigaretta, esposizione a scarichi di motori che utilizzano benzine ad alta concentrazione di piombo). Tuttavia poiché i metalli non sono lipofili, la massima concentrazione di questi agenti si ritrova nel sangue materno piuttosto che nel latte, ed è quindi probabile che l'esposizione prenatale a questi tossici sia più rilevante di quella neonatale attraverso l'allattamento. Sui solventi e i pesticidi organofosfati e carbammati vi è ancora scarsa informazione, ma vale per questi, data la loro scarsa lipofilità, quanto detto per i metalli.

Vulnerabilità del sistema nervoso all'esposizione a contaminanti durante lo sviluppo

Un aspetto rilevante dei potenziali rischi per la salute del bambino associati ai contaminanti presenti nel latte si riferisce alla maturazione del sistema nervoso. L'organogenesi del sistema nervoso centrale (SNC) inizia a poche settimane dal concepimento con la formazione del tubo neurale, si protrae per tutto il periodo fetale e continua in quello postnatale per terminare solo durante l'adolescenza. Tale protratta organogenesi è alla base dell'estrema vulnerabilità del cervello agli agenti tossici durante lo sviluppo (32). Lo sviluppo del SNC consiste di una sequenza di eventi tra loro intimamente connessi, per cui un disturbo nel processo di migrazione cellulare nelle fasi precoci dello sviluppo embrionale potrà influenzare la crescita dendritica e assonale e lo stabilirsi dei contatti sinaptici nella corteccia nel corso del primo anno di vita postnatale (33). Un agente tossico può influenzare lo sviluppo cerebrale interferendo direttamente con il processo di proliferazione, migrazione, sinaptogenesi o mielinizzazione. Se l'esposizione avviene nel corso di tutta la gravidanza e continua poi nella fase postnatale con l'allattamento, sono ipotizzabili effetti cumulativi, anche nel caso di dosi estremamente basse. Effetti specifici su neurotrasmettitori, e sistemi recettoriali di membrana o citoplasmatici sono stati caratterizzati per alcuni inquinanti ambientali. Agli effetti diretti si possono sommare quelli indiretti, che consistono nell'interferenza con l'azione di molecole modulatorie della plasticità cerebrale, quali i fattori neurotrofici o gli ormoni steroidi, che hanno un ruolo fisiologico determinante nella differenziazione sessuale di particolari aree cerebrali.

In generale, mentre l'esposizione a un agente tossico nelle prime fasi dello sviluppo cerebrale, ossia prima della chiusura del tubo neurale, può provocare anomalie morfologiche evidenti del SNC (spina bifida, meningocele, microcefalia), l'interferenza con i successivi processi di sviluppo pre e/o neonatale ha un'elevata probabilità di indurre effetti di tipo "funzionale" ossia del comportamento successivo dei soggetti esposti. Di regola, gli effetti funzionali di un tossico si verificano alle dosi più basse, molto spesso in assenza di effetti somatici e/o ponderali (34).

La maggioranza dei contaminanti ambientali misurabili nel latte umano sono sostanze che esercitano effetti avversi sul sistema nervoso in sviluppo, come evidenziato da studi sperimentali su modelli animali o *in vitro*. Per alcuni di questi composti (es. metalli pesanti quali piombo e mercurio) è stata ampiamente dimostrata una relazione significativa fra esposizione durante lo sviluppo, maturazione neurologica e prestazioni neuropsicologiche dei bambini esposti (35-37), anche se tali effetti non sembrerebbero legati all'allattamento al seno. La sospetta neurotossicità dei composti diossino-simili, quali i policlorobifenili (PCB) che sono presenti nel latte materno in concentrazioni significative, ha stimolato numerosi studi sia di laboratorio che epidemiologici sui potenziali effetti sullo sviluppo neurocomportamentale. Come descritto più avanti, esistono dati consistenti che ne indicherebbero un effetto sullo sviluppo neuropsicologico, verosimilmente anche mediati dalle proprietà di "interferenti endocrini" di queste molecole. Tuttavia quanto l'allattamento al seno contribuisca agli effetti avversi sullo sviluppo neurologico e cognitivo dei bambini è ancora materia di discussione, anche per la difficoltà di costruire modelli appropriati che consentano di analizzare separatamente tutte le variabili coinvolte.

Aspetti metodologici nella valutazione degli effetti di contaminanti ambientali sul neurosviluppo

Per verificare la presenza di effetti sul neurosviluppo legati agli inquinanti presenti nel latte materno, occorre effettuare studi epidemiologici longitudinali su popolazioni umane, confrontando esiti neuropsicologici in individui esposti e non esposti. Tali studi, però, presentano una serie di sfide e limitazioni a livello metodologico, dovute alla natura osservazionale piuttosto che sperimentale degli studi, e ad alcune caratteristiche delle esposizioni e degli effetti d'interesse. Nei paragrafi seguenti saranno presentate alcune di queste problematiche, da considerare nell'interpretazione di studi epidemiologici in materia.

Valutazione degli effetti

Nella maggioranza dei casi, esposizioni neurotossiche a basse dosi in età evolutiva non causano malformazioni cerebrali evidenti o disturbi comportamentali clinicamente rilevanti, ma lievi alterazioni neurocognitive e neurocomportamentali, che spesso rimangono nell'ambito di una prestazione normale (38) ampiamente variabile. Tali effetti possono inoltre manifestarsi in fasi successive della vita, per esempio durante la pubertà, o anche in età adulta (39). La lunga latenza dei possibili effetti neuropsicologici rende necessari studi di follow-up a lungo termine, con inerenti rischi di *bias* di selezione legati all'attrito delle coorti (38), e implicazioni sulla misurazione delle variabili (v. sotto).

Inoltre, le funzioni neurocognitive che potrebbero essere alterate da un insulto neurotossico sono molte, e includono la motricità, il linguaggio, la percezione visuo-spaziale, l'attenzione, la memoria e l'apprendimento. È dunque importante un'accurata scelta:

delle funzioni da controllare (38), evitando, per esempio, di tralasciare effetti pertinenti concentrandosi su funzioni sulle quali l'agente d'interesse non agisce;

dei test da utilizzare: sufficientemente sensibili da poter rilevare lievi alterazioni comportamentali, e nello stesso tempo abbastanza specifici da permettere di individuare, in caso di ridotta performance, quale facoltà neurocognitiva sia stata colpita, visto che i compiti da eseguire, anche nei test ideati per controllare particolari aspetti neurocognitivi, spesso richiedono l'applicazione simultanea di numerose facoltà (40);

del momento nello sviluppo nel quale si procede alla misurazione degli effetti, che va eseguita non prima che l'effetto d'interesse si possa riscontrare (38).

Valutazione dell'esposizione

L'esposizione ad alcuni contaminanti, tra cui i PCB, è talmente diffusa da rendere difficile il confronto con un gruppo non esposto. Il confronto viene quindi effettuato tra gruppi con differenti livelli di esposizione, ma la variabilità necessaria per evidenziare eventuali differenze tra i gruppi esposti è a volte difficile da ottenere viste le basse dosi di esposizione che caratterizzano questi tipi di studio;

Le caratteristiche dell'esposizione – fonti d'esposizione (*in utero*, latte materno, altri alimenti, bevande, polvere, terra, ecc.), vie d'esposizione (transplacentare, orale, respiratoria, o cutanea), frequenza e durata – possono incidere sulle dosi e sugli effetti d'interesse (41).

Durante la crescita, poi, con frequenti cambiamenti di alimentazione, comportamenti, attività, e ambienti, le caratteristiche dell'esposizione variano. È quindi spesso necessario misurare e caratterizzare l'esposizione più volte durante il periodo di follow-up (41). Negli studi

su effetti di sostanze presenti nel latte materno, tali informazioni sono essenziali per poter distinguere tra effetti dovuti all'esposizione durante l'allattamento da quelli dovuti ad esposizioni precedenti o successive.

Ma anche individui che abbiano subito esposizioni comparabili non necessariamente avranno dosi interne comparabili. La dose interna è infatti determinata anche da processi fisiologici – assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione - che possono variare da un individuo all'altro, e nel corso della vita dello stesso individuo, soprattutto durante l'infanzia (39, 41). L'uso corretto di indicatori biologici di esposizione può fornire informazioni più valide rispetto a valutazioni di esposizione basate su dosi esterne.

Molteplici misurazioni dell'esposizione lungo il follow-up fornirebbero anche essenziali informazioni sulle fasi vulnerabili: trattandosi di un periodo di sviluppo e maturazione di numerosi sistemi (nervoso, immunitario, endocrino, riproduttivo) che dura fino alla pubertà, la stessa esposizione può avere effetti diversi, a seconda del momento evolutivo nel quale avviene l'insulto (39, 41).

Altre variabili

Andrebbe poi considerata l'inclusione di una lunga serie di fattori legati al neurosviluppo, che potrebbero agire come modificatori di effetti, o – se associate anche all'esposizione – come fattori confondenti, tra i quali: esposizioni ad altri agenti neurotossici, esposizioni a sostanze protettive, fattori genetici (es. intelligenza dei genitori), fattori socioculturali e socioeconomici.

Effetti dell'esposizione ai PCB sullo sviluppo neuropsicologico

Come precedentemente menzionato, esiste un'ampia letteratura epidemiologica su differenti classi di contaminanti ambientali, che dimostrano un'influenza dell'esposizione in corso di sviluppo sulla maturazione neurocomportamentale dei soggetti esposti. Si è scelto in questo contesto di riassumere brevemente gli studi condotti sui PCB, composti diossino-simili che rappresentano al momento attuale i contaminanti organici persistenti più diffusamente presenti nel latte materno.

I policlorobifenili (PCB) sono una classe di composti idrocarburi alogenati largamente impiegati in passato in molti prodotti industriali, quali fluidi dielettrici, fluidi idraulici, plastificanti e adesivi. Per la loro marcata tossicità la loro produzione è stata proibita negli Stati Uniti e in seguito negli altri paesi industrializzati a partire dalla fine degli anni '70. Tuttavia, grazie all'elevata stabilità chimica e termica, i PCB si accumulano nell'ambiente, contaminando il terreno e le acque, e residui di queste sostanze si ritrovano tuttora in quantità significative nei liquidi biologici e nel tessuto adiposo degli animali e dell'uomo. Gli effetti tossici di questi composti sono quelli sospettati per i cosiddetti "interferenti endocrini" (sviluppo sessuale anomalo, aumentato rischio di tumore alla mammella e alla prostata, riduzione della fertilità, alterazioni delle funzioni tiroidee e immunitarie), e sembrano conseguenti al legame con il recettore citosolico per gli idrocarburi arilici, con un meccanismo di azione analogo a quanto riportato per il 2,3,7,8-tetraclorobenzo-p-diossina (TCDD). Esistono tuttavia notevoli differenze fra i diversi PCB in conseguenza della loro struttura chimica: alcuni congeneri (es. 153) sono particolarmente persistenti, alcuni congeneri coplanari (es. 126) hanno una chiara attività diossino-simile attraverso il recettore arilico, mentre i congeneri non coplanari e orto-sostituiti

sembrano avere effetti diretti sul sistema nervoso interferendo con il metabolismo intracellulare del calcio.

Vi sono sostanziali indicazioni di un'elevata neurotossicità dei PCB nell'organismo in sviluppo (42). Studi sperimentali condotti su roditori di laboratorio hanno infatti evidenziato in animali esposti in fase prenatale ai PCB un aumento non fisiologico dei livelli di calcio intracellulare, con un conseguente effetto a cascata sui meccanismi di funzionalità sinaptica (43). È ipotizzabile perciò che in fasi critiche dello sviluppo cerebrale, tali interferenze con il normale metabolismo delle cellule nervose possano avere ripercussioni a lungo termine sull'organizzazione di circuiti neurali implicati nei comportamenti complessi. Viene inoltre suggerito che i PCB, interferendo con il metabolismo degli steroidi e con altre regolazioni neuroendocrine, inducano anche indirettamente effetti neurocomportamentali (44). Studi epidemiologici prospettici, mirati a correlare marcatori di esposizione pre e/o postnatale ai PCB con il successivo sviluppo neuropsicologico dei soggetti esposti, sono stati condotti sia negli Stati Uniti che in Europa. Gli studi statunitensi hanno incluso coorti di bambini nati nelle aree del Lago Michigan e del Lago Ontario, dove il grande consumo di pesce contaminato da parte di donne in età fertile o in gravidanza e allattamento espone il feto e il neonato ad elevate concentrazioni di PCB (45). Uno studio prospettico condotto su 212 bambini nati da madri che avevano consumato nel corso della gravidanza e durante l'allattamento pesce contaminato con PCB ha riscontrato un'incidenza più elevata di alterazioni del comportamento a 11 anni di età. Tali alterazioni includevano difficoltà cognitive, attenzionali e nella lettura, che correlavano significativamente con i livelli di PCB misurati nel sangue del cordone ombelicale alla nascita ma non con quelli misurati nel latte materno (46). Il secondo studio è stato condotto successivamente su una coorte di 309 madri e dei loro bambini nati nell'area del Lago Ontario tra il 1991 e il 1994. La misura di esposizione usata era la concentrazione di PCB nel sangue del cordone ombelicale alla nascita, e nel latte materno durante i primi sei mesi dopo la nascita. Utilizzando tecniche di analisi particolarmente fini è stato possibile quantificare in questi campioni 68 differenti congeneri. L'analisi dello sviluppo comportamentale e cognitivo includeva la valutazione dello sviluppo sensorimotorio attraverso la scala di valutazione di Brazelton (NBAS) nei primi due giorni dopo la nascita: utilizzando come variabile di esposizione il consumo di pesce contaminato da parte delle madri gravide, i neonati esposti alle concentrazioni maggiori di PCB mostravano punteggi inferiori nella scala dei riflessi (47, 48). A 6 e 12 mesi di vita, i bambini venivano valutati attraverso il test di Fagan, che misura le capacità di memoria visiva nella preferenza del bambino per uno stimolo visivo nuovo rispetto a uno familiare. Utilizzando come misura di esposizione la concentrazione totale dei diversi congeneri di PCB nel sangue del cordone e nel latte materno, è stato osservato che prestazioni basse di memoria visiva correlavano significativamente con le concentrazioni di PCB nel sangue del cordone ma non con quelle nel latte materno (49).

Nel 1990 il governo olandese avviò uno studio prospettico longitudinale per valutare i potenziali effetti avversi di elevate esposizioni a PCB e diossine sulla crescita e lo sviluppo di bambini nati tra il 1990 e il 1992 e in due aree geografiche dell'Olanda, l'una ad elevata industrializzazione, l'altra rurale. Gli indici di esposizione includevano i livelli ematici materni di PCB nel corso dell'ultimo mese di gravidanza, i livelli di PCB nel sangue del cordone, e, per il gruppo di bambini allattati al seno, la concentrazione di PCB, diossine e furani nel latte materno. I parametri neurocomportamentali (sviluppo neurologico e posturale, maturazione psicomotoria, cognitiva e sviluppo del linguaggio) sono stati valutati a 3, 7, 18, 42 e 84 mesi di età. In generale, i risultati di questo studio prospettico sembrano confermare anche per la coorte olandese un impatto negativo di elevate esposizioni pre e/o postnatali ai PCB e/o diossine su parametri di sviluppo neurologico e cognitivo. Tuttavia, va sottolineato come gli effetti osservati variassero con l'età di valutazione. In particolare mentre alle età più precoci

risultavano negativamente influenzati dall'esposizione a PCB/diossine soprattutto parametri di sviluppo neurologico e psicomotorio (50), più avanti nello sviluppo erano le funzioni più propriamente cognitive ad essere influenzate (51) mentre le funzioni neurologiche erano nella norma (52). Inoltre la correlazione tra effetti comportamentali e indici di esposizione pre o postnatale per le diverse classi di sostanze non risultava di facile interpretazione, se si esclude un chiaro effetto dei soli PCB prenatali (ossia misurati nel sangue materno e in quello del cordone) su parametri più specificamente cognitivi.

Sulla base dei primi risultati dello studio danese, nel 1993 l'Unione Europea ha finanziato uno studio multicentrico transnazionale che includeva una coorte di 171 madri e dei loro neonati reclutati in tre ospedali ostetrici di Dusseldorf in Germania (53). L'esposizione ai PCB veniva valutata misurando i livelli di tre congeneri nel sangue del cordone alla nascita e in campioni di latte materno a due e quattro settimane dalla nascita. Lo studio tedesco ha evidenziato una correlazione negativa tra livelli di PCB e punteggi riportati dai bambini a 7, 18 e 30 mesi di età nella batteria di valutazione dello sviluppo infantile di Bailey. I risultati dello studio tedesco erano in pieno accordo con quelli degli studi sopramenzionati nell'evidenziare un impatto negativo sullo sviluppo cognitivo e motorio dei bambini esposti alle più elevate concentrazioni di PCB. Tuttavia, al contrario di quanto osservato negli studi statunitensi e in quello olandese, nella coorte tedesca è stato evidenziato un effetto significativo dell'esposizione ai PCB attraverso il latte materno (54).

Nel complesso, quindi, le evidenze epidemiologiche raccolte fino ad oggi indicano un'associazione significativa tra esposizione ai PCB (soprattutto se in associazione con le diossine) e sviluppo neuropsicologico, *ma gli effetti sono in generale significativamente associati all'esposizione in utero e non all'esposizione attraverso l'allattamento*. Ciò si verifica nonostante il bambino riceva attraverso il latte una quota maggiore di questi contaminanti di quanto avvenga nella fase fetale.

Uno studio recente suggerisce che, a parità di esposizione prenatale, i bambini allattati al seno siano meno vulnerabili agli effetti dei PCB. Ciò potrebbe dipendere dal ruolo neuroprotettivo di alcune delle sostanze neurotrofiche presenti nel latte materno sul sistema nervoso centrale in sviluppo. Tuttavia, le analisi effettuate indicano che questo fenomeno, più che alle sostanze contenute nel latte, sia legato alla qualità della relazione parentale (55). A tale effetto si sommerebbe la particolare stimolazione fornita dalla relazione madre-neonato nel corso dell'allattamento al seno che potrebbe compensare nelle prime fasi neonatali i deficit cognitivi associati all'esposizione ai PCB.

Conclusioni

I dati epidemiologici fino ad oggi raccolti indicano che la presenza di contaminanti ambientali nel latte umano è un fenomeno globale. Data la specifica vulnerabilità dei bambini alle influenze ambientali, i rischi di effetti avversi dell'esposizione attraverso l'allattamento non possono essere esclusi, soprattutto quando si considerino i potenziali effetti additivi con l'esposizione transplacentare. Come si è visto, gli studi condotti su diverse coorti di bambini sia negli Stati Uniti che in Europa, considerando sia l'esposizione prenatale che l'esposizione durante l'allattamento e la loro combinazione, sembrano univocamente indicare che il rischio sia significativamente associato all'esposizione *in utero*, almeno per quanto riguarda lo sviluppo neuropsicologico. Al contrario, l'allattamento prolungato al seno sembra favorire il recupero dai deficit comportamentali e cognitivi indotti dai composti diossino-simili, anche quando il latte contribuisce in proporzione significativa all'esposizione agli stessi.

I dati sui contaminanti presenti nel latte materno sono ancora scarsi e limitati ad alcune classi di composti, mentre altri agenti chimici quali i PBDE, finora non considerati rischiosi, potrebbero rappresentare un pericolo per la salute dei bambini (56). Tuttavia questi stessi dati, indicativi di popolazioni da differenti aree geografiche del mondo, dimostrano che laddove l'uso di pesticidi organoclorurati, PCB e diossine è stato ristretto o addirittura vietato, la concentrazione di queste sostanze nel latte materno è significativamente diminuita (57).

I rischi per la salute dei bambini, associati all'esposizione prenatale e/o postnatale ai contaminanti ambientali sono diventati un tema prioritario di intervento, come dimostra la recente Strategia Ambiente e Salute varata nel 2004 dalla Comunità Europea (http://www.europa.eu.int/comm/environment/health/index_en.htm). In questo quadro, è importante la promozione di strategie mirate a ridurre l'esposizione delle donne in età fertile sia ai contaminanti organici persistenti che ad altri xenobiotici potenzialmente avversi per la salute del feto e del neonato.

I benefici dell'allattamento al seno sono sostanziali, e il miglior modo di massimizzare tali benefici è ridurre l'esposizione materna, sia con politiche volte ad educare le donne sui rischi di un'alimentazione scorretta (evitare o ridurre l'assunzione di cibi potenzialmente fonti di contaminanti), sia con l'adozione di provvedimenti di messa al bando (sia della produzione che della vendita) di sostanze chimiche dannose per la salute umana, in accordo con la convenzione di Stoccolma. Dovrebbero infine essere implementati programmi di monitoraggio dell'esposizione interna attraverso l'analisi, in popolazioni rappresentative di diversi gradi di rischio ambientale, sia del latte materno che del sangue del cordone ombelicale, per una stima affidabile dell'esposizione reale ai contaminanti nelle diverse fasi dello sviluppo.

Ringraziamenti

Questo lavoro è stato realizzato nell'ambito del progetto Ministero della Sanità/ISPESL/ISS "Studio multicentrico sul rapporto tra patologia endocrina ed esposizione ambientale e occupazionale a inquinanti, finalizzato alla costituzione di un registro di malattia attraverso l'istituzione di un centro di riferimento nazionale sui distruttori endocrini". Si ringraziano Nadia Francia e Giovanni Dominici per il supporto tecnico fornito.

Bibliografia

1. Fifty-four World Health Assembly. *Global strategy for infant and young child feeding. The optimal duration of exclusive breastfeeding*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2001.
2. Hamosh M. Breastfeeding: unraveling the mysteries of mother's milk. *Medscape Womens Health*. 1996;1(9):4.
3. Wainwright PE. Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms. *Proc Nutr Soc* 2002;61(1):61-9.
4. Hanson LA. Breastfeeding provides passive and likely long-lasting active immunity. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998;81(6):523-33; quiz 533-524, 537.
5. WHO CSTotRoBotPoIM. Effect of breastfeeding on infant and child mortality due to infectious diseases in less developed countries: a pooled analysis. *Lancet* 2000;355(9202):451-5.
6. Oddy WH, Sly PD, de Klerk NH, et al. Breast feeding and respiratory morbidity in infancy: a birth cohort study. *Arch Dis Child* 2003;88(3):224-8.
7. Howie PW, Forsyth JS, Ogston SA, Clark A, Florey CD. Protective effect of breast feeding against infection. *BMJ* 1990;300(6716):11-6.

8. Duffy LC, Faden H, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D. Exclusive breastfeeding protects against bacterial colonization and day care exposure to otitis media. *Pediatrics* 1997;100(4):E7.
9. Scariati PD, Grummer-Strawn LM, Fein SB. A longitudinal analysis of infant morbidity and the extent of breastfeeding in the United States. *Pediatrics* 1997;99(6):E5.
10. Marild S, Hansson S, Jodal U, Oden A, Svedberg K. Protective effect of breastfeeding against urinary tract infection. *Acta Paediatr* 2004;93(2):164-8.
11. Silfverdal SA, Bodin L, Hugosson S, et al. Protective effect of breastfeeding on invasive *Haemophilus influenzae* infection: a case-control study in Swedish preschool children. *Int J Epidemiol* 1997;26(2):443-50.
12. McGuire W, Anthony MY. Donor human milk versus formula for preventing necrotising enterocolitis in preterm infants: systematic review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88(1):F11-14.
13. van Odijk J, Kull I, Borres MP, et al. Breastfeeding and allergic disease: a multidisciplinary review of the literature (1966-2001) on the mode of early feeding in infancy and its impact on later atopic manifestations. *Allergy* 2003;58(9):833-43.
14. Owen CG, Whincup PH, Odoki K, Gilg JA, Cook DG. Infant feeding and blood cholesterol: a study in adolescents and a systematic review. *Pediatrics* 2002;110(3):597-608.
15. Arenz S, Ruckerl R, Koletzko B, von Kries R. Breast-feeding and childhood obesity--a systematic review. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004;28(10):1247-56.
16. Sporn MB, Roberts AB. Peptide growth factors are multifunctional. *Nature* 1988;332(6161):217-9.
17. Levi-Montalcini R, Aloe L, Alleva E. A role for nerve growth factor in nervous, endocrine and immune systems. *Progress in NeuroEndocrinImmunology* 1990;3:1-10.
18. Uauy R, De Andraca I. Human milk and breast feeding for optimal mental development. *J Nutr* 1995;125(8 Suppl):2278S-2280S.
19. Quinn PJ, O'Callaghan M, Williams GM, Najman JM, Andersen MJ, Bor W. The effect of breastfeeding on child development at 5 years: a cohort study. *J Paediatr Child Health* 2001;37(5):465-9.
20. Jain A, Concato J, Leventhal JM. How good is the evidence linking breastfeeding and intelligence? *Pediatrics* 2002;109(6):1044-53.
21. Rey J. Breastfeeding and cognitive development. *Acta Paediatr Suppl* 2003;92(442):11-8.
22. Jacobson SW, Chiodo LM, Jacobson JL. Breastfeeding effects on intelligence quotient in 4- and 11-year-old children. *Pediatrics* 1999;103(5):e71.
23. Carter CS, Altemus M. Integrative functions of lactational hormones in social behavior and stress management. *Ann N Y Acad Sci* 1997;807:164-74.
24. Uvnas-Moberg K, Arn I, Magnusson D. The psychobiology of emotion: the role of the oxytocinergic system. *Int J Behav Med* 2005;12(2):59-65.
25. Lucas A, Morley R, Cole TJ, Gore SM. A randomised multicentre study of human milk versus formula and later development in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1994;70(2):F141-146.
26. O'Connor DL, Hall R, Adamkin D, et al. Growth and development in preterm infants fed long-chain polyunsaturated fatty acids: a prospective, randomized controlled trial. *Pediatrics* 2001;108(2):359-71.
27. Fewtrell MS, Abbott RA, Kennedy K, et al. Randomized, double-blind trial of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation with fish oil and borage oil in preterm infants. *J Paediatr* 2004;144(4):471-9.

28. Feldman R, Eidelman AI. Direct and indirect effects of breast milk on the neurobehavioral and cognitive development of premature infants. *Dev Psychobiol* 2003;43(2):109-19.
29. Anderson HA, Wolff MS. Environmental contaminants in human milk. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2000;10(6 Pt 2):755-60.
30. Lanting CI, Huisman M, Muskiet FA, van der Paauw CG, Essed CE, Boersma ER. Polychlorinated biphenyls in adipose tissue, liver, and brain from nine stillborns of varying gestational ages. *Pediatr Res* 1998;44(2):222-5.
31. Patandin S, Dagnelie PC, Mulder PG, et al. Dietary exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins from infancy until adulthood: A comparison between breast-feeding, toddler, and long-term exposure. *Environ Health Perspect* 1999;107(1):45-51.
32. Rice D, Barone S, Jr. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect* 2000;108(Suppl 3):511-33.
33. Rodier PM. Developing brain as a target of toxicity. *Environ Health Perspect* 1995;103(Suppl 6):73-6.
34. Riley E, Vorhees C. *Handbook of Behavioral Teratology*. New York: Plenum Press; 1986.
35. Pocock SJ, Smith M, Baghurst P. Environmental lead and children's intelligence: a systematic review of the epidemiological evidence. *BMJ* 1994;309(6963):1189-97.
36. Needleman HL, Gatsonis CA. Low-level lead exposure and the IQ of children. A meta-analysis of modern studies. *Jama* 1990;263(5):673-8.
37. National Research Council. *Toxicological Effects of Methylmercury*. Washington DC: National Academy Press; 2000.
38. Grandjean P, White RF, Weihe P. Neurobehavioral epidemiology: application in risk assessment. *Environ Health Perspect* 1996;104(Suppl 2):397-400.
39. Selevan SG, Kimmel CA, Mendola P. Identifying critical windows of exposure for children's health. *Environ Health Perspect* 2000;108(Suppl 3):451-5.
40. Slikker W, Jr, Beck BD, Cory-Slechta DA, Paule MG, Anger WK, Bellinger D. Cognitive tests: interpretation for neurotoxicity? (Workshop summary). *Toxicol Sci* 2000;58(2):222-34.
41. Rice C, Birnbaum LS, Cogliano J, et al. Exposure assessment for endocrine disruptors: some considerations in the design of studies. *Environ Health Perspect* 2003;111(13):1683-90.
42. Tilson HA. *Developmental Neurotoxicology of Polychlorinated Biphenyls and Related Compounds*. New York: Raven Press; 1994.
43. Tilson HA, Kodavanti PR. The neurotoxicity of polychlorinated biphenyls. *Neurotoxicology* 1998;19(4-5):517-25.
44. Tilson HA, Jacobson JL, Rogan WJ. Polychlorinated biphenyls and the developing nervous system: cross-species comparisons. *Neurotoxicol Teratol* 1990;12(3):239-48.
45. Schwartz PM, Jacobson SW, Fein G, Jacobson JL, Price HA. Lake Michigan fish consumption as a source of polychlorinated biphenyls in human cord serum, maternal serum, and milk. *Am J Public Health* 1983;73(3):293-6.
46. Jacobson JL, Jacobson SW. Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero. *N Engl J Med* 1996;335(11):783-9.
47. Lonky E, Reihman J, Darvill R, et al. Neonatal behavioral assessment scale performance in humans influenced by maternal consumption of environmentally contaminated Lake Ontario fish. *Journal Great Lakes Res* 1996(22):198.
48. Stewart P, Reihman J, Lonky E, Darvill T, Pagano J. Prenatal PCB exposure and neonatal behavioral assessment scale (NBAS) performance. *Neurotoxicol Teratol* 2000;22(1):21-9.

49. Darvill T, Lonky E, Reihman J, Stewart P, Pagano J. Prenatal exposure to PCBs and infant performance on the fagan test of infant intelligence. *Neurotoxicology* 2000;21(6):1029-38.
50. Koopman-Esseboom C, Weisglas-Kuperus N, de Ridder MA, Van der Paauw CG, Tuinstra LG, Sauer PJ. Effects of polychlorinated biphenyl/dioxin exposure and feeding type on infants' mental and psychomotor development. *Pediatrics* 1996;97(5):700-6.
51. Patandin S, Lanting CI, Mulder PG, Boersma ER, Sauer PJ, Weisglas-Kuperus N. Effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on cognitive abilities in Dutch children at 42 months of age. *J Pediatr* 1999;134(1):33-41.
52. Lanting CI, Patandin S, Fidler V, et al. Neurological condition in 42-month-old children in relation to pre- and postnatal exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins. *Early Hum Dev* 1998;50(3):283-92.
53. Winneke G, Bucholski A, Heinzow B, et al. Developmental neurotoxicity of polychlorinated biphenyls (PCBS): cognitive and psychomotor functions in 7-month old children. *Toxicol Lett* 1998;102-103:423-8.
54. Walkowiak J, Wiener JA, Fastabend A, et al. Environmental exposure to polychlorinated biphenyls and quality of the home environment: effects on psychodevelopment in early childhood. *Lancet* 2001;358(9293):1602-7.
55. Jacobson JL, Jacobson SW. Breast-feeding and gender as moderators of teratogenic effects on cognitive development. *Neurotoxicol Teratol* 2002;24(3):349-58.
56. Hooper K, McDonald TA. The PBDEs: an emerging environmental challenge and another reason for breast-milk monitoring programs. *Environ Health Perspect* 2000;108(5):387-92.
57. Solomon GM, Weiss PM. Chemical contaminants in breast milk: time trends and regional variability. *Environ Health Perspect* 2002;110(6):A339-347.

ESPOSIZIONE AGLI FTALATI ATTRAVERSO GLI ALIMENTI PER L'INFANZIA

Giuseppe Latini (a) (b), Antonio Del Vecchio (a), Giuseppe Presta (c), Alberto Verrotti (d), Claudio De Felice (e).

(a) *Divisione di Neonatologia, Unità di Terapia Intensiva Neonatale, Ospedale Perrino, Brindisi*

(b) *Istituto di Fisiologia Clinica, Centro Nazionale delle Ricerche, Sezione di Lecce*

(c) *Divisione di Pediatria, Ospedale Panico, Tricase (Lecce)*

(d) *Dipartimento di Medicina, Clinica Pediatrica, Università di Chieti*

(e) *Unità di Terapia Intensiva Neonatale, Azienda Universitaria Ospedaliera Senese, Siena*

Il Polivinilcloruro (PVC) è un polimero rigido che per essere utilizzato nei manufatti in cui è richiesta flessibilità, quali dispositivi medicali, giocattoli e articoli per bambini (massaggiagengive, succhiotti, altro), pellicole per alimenti, guanti, materiali per edifici, vestiario, cosmetici, prodotti per l'auto, ha bisogno di essere mescolato con altri composti denominati plasticizzanti (o plastificanti) che si inseriscono nella catena polimerica, rendendola libera di muoversi, e conferiscono al PVC la flessibilità necessaria ai differenti usi. Il dietilesilftalato (DEHP) è il plastificante più comunemente utilizzato. Il diffuso utilizzo di questi polimeri è legato alla loro grande adattabilità, praticità e basso costo. Tuttavia, il DEHP non rimane stabilmente legato al PVC, ma, nel tempo, viene rilasciato gradualmente nell'ambiente esterno, contaminando acqua, suolo e perfino alimenti, ed è compreso, per questo motivo, tra i contaminanti ambientali ubiquitari. Gli alimenti rappresentano la fonte principale di esposizione al DEHP per ogni essere umano, anche se altre vie, come l'inalatoria, la via transcutanea e quella endovenosa rivestono un ruolo rilevante. Per la loro lipofilia, gli ftalati sono presenti in tutti i prodotti alimentari ricchi di grassi come ad esempio latte fresco e derivati, carne, pollame e uova e sono, pertanto, parte integrante della nostra dieta quotidiana. Recenti ricerche condotte presso la nostra divisione hanno dimostrato che l'esposizione al DEHP inizia già durante la vita fetale e che il DEHP è presente perfino nel latte materno. La presenza di ftalati è stata ben documentata anche negli alimenti per l'infanzia (1-10). Dopo assunzione orale, il DEHP è rapidamente assorbito nel primo tratto delle vie digestive attraverso una idrolisi lipidica (lipasi) e rapidamente metabolizzato nel tratto gastrointestinale a mono-2-etilesilftalato (MEHP) (11) che, a sua volta, viene eliminato dopo coniugazione con l'acido glicuronico (12).

Nei bambini, la digestione dei grassi contenuti nel latte è favorita da un'attività della lipasi gastrica maggiore rispetto a quella degli adulti (13), raggiungendo un picco intorno a 28-33 settimane di vita (14). Al contrario, la capacità di glicuronoconiugazione è ridotta. Per questi motivi i bambini rappresentano una categoria a più alto rischio di effetti avversi rispetto al resto della popolazione. Essi presentano, inoltre, altri fattori di maggior rischio rispetto agli adulti:

- esposizione a dosi maggiori di ftalato (in mg/kg)
- differente farmacocinetica che può determinare un maggiore assorbimento intestinale del DEHP, una maggiore conversione dello stesso in MEHP e una minore escrezione del MEHP
- maggiore permeabilità intestinale con conseguente più intensa capacità di assorbimento intestinale
- maggiore permeabilità in epoca infantile della barriera tra compartimento vascolare e testicolo, che si forma in epoca prepubere (15)

Tuttavia, gli unici dati certi riguardanti la tossicità, dei plastificanti presenti negli alimenti, sono stati riportati solo su modelli animali. Particolarmente preoccupanti sono quelli a carico del sistema riproduttivo.

Gli alimenti per l'infanzia nei quali è stata maggiormente testata l'esposizione al DEHP sono il latte materno e il latte formulato.

Latti formulati

La presenza di ftalati nei latti formulati è stata documentata in vari studi(1, 2). In uno di questi la concentrazione di ftalati è stata compresa tra 0,004-0,06 mg/kg. La più elevata quantità di DEHP riportata è di 0,015 mg/kg/die. Anche un'indagine effettuata nel 1998 dal *Ministry of Agriculture, Fisheries and Food* inglese (MAFF) ha stimato le quantità individuali e totali di ftalati per bambino nei latti formulati (16). Sono stati analizzati 39 campioni di 14 differenti latti formulati (in polvere e pronti all'uso). Il DEHP è risultato essere lo ftalato presente in maggiore concentrazione (0,05-0,44 mg/kg di polvere). Il massimo livello riscontrato di DEHP nei campioni analizzati è stato di 440 µg/kg di polvere (Tabelle 1 e 2).

Tabella 1. Esposizione al DEHP attraverso il latte formulato a sei differenti età.

Età	Concentrazione di DEHP (µg/kg)	Peso corporeo (kg)	Quantità totale nei latti in polvere (g)	Esposizione in mg/kg/die
0-1 settimane	440	2,5	81	0,014
2-4 settimane	440	3,5	108	0,014
1-2 mesi	440	4,5	135	0,013
2-3 mesi	440	5,5	135	0,011
3-4 mesi	440	6,5	158	0,011
4-6 mesi	440	-	-	-
> 6 mesi	440	8	144	0,008
0-3 mesi	440	4,4	124	0,013

Da cui deriva che:

Tabella 2. Esposizione attraverso il latte in polvere

Latte in polvere	(µg/kg/die)
0-3 mesi	13
> 6 mesi	8

Una forma particolarmente rischiosa di esposizione al DEHP attraverso il latte formulato può realizzarsi nei neonati ricoverati in reparti di terapia intensiva. In questo caso, infatti, il DEHP può rilasciarsi sia dalle sacche in PVC utilizzate per conservare le soluzioni per la nutrizione enterale che dal sondino nasogastrico. Sin dal 1976 Stetson *et al.* ipotizzarono che il rilascio degli ftalati dai sondini per alimentazione potesse essere uno dei fattori in causa nel determinismo della enterocolite necrotizzante (17). Anche se a tutt'oggi non vi sono dati sul rilascio di ftalati dalle sacche per la nutrizione enterale, si può presumere che tale rilascio non

differisca da quello documentato nelle sacche per la nutrizione parenterale totale. La quantità totale di DEHP assunta da un bambino in nutrizione enterale può essere stimata dalla somma delle quantità rilasciate dalla sacca e dal sondino nasogastrico. Utilizzando i dati riportati da Mazur *et al.* (1989) e assumendo che la soluzione per nutrizione enterale contenga una quantità di lipidi simile a quella presente nella parenterale, la quantità di ftalato potrebbe essere stimata di 9,47 mg/die (range; 0,04-0,14 mg/kg/die) (18).

Va sottolineato, inoltre, che questi neonati costituiscono una popolazione a rischio particolarmente elevato (19-22), poiché vengono a contatto con fonti accertate di esposizione al DEHP come numerosi dispositivi medicali (tubi endotracheali, sacche di plasma e di sangue, cateteri per infusione, altro).

Latte materno

La quantità media giornaliera di DEHP assunta attraverso il latte materno viene stimata intorno a 0,021 mg/kg/die per bambini da 0-3 mesi e 0,008 mg/kg/die per bambini da 3 a 12 mesi (Tabella 3). Il DEHP è stato trovato nel latte materno, in concentrazioni variabili da 10 a 160 µg/kg (23). Anche studi condotti recentemente dal nostro gruppo hanno confermato che il latte materno rappresenta una rilevante fonte di esposizione al DEHP (9). Solo in modelli animali, sono stati riportati effetti tossici a seguito di ingestione di ftalati attraverso il latte materno (24-25).

Tabella 3. Esposizione attraverso il latte materno

Latte materno	(µg/kg/die)
0-3 mesi	21
1-12 mesi	8

In conclusione, anche se i dati sulla tossicità degli ftalati, soprattutto a carico del sistema riproduttivo, riguardano modelli animali, quelli, limitati, ma suggestivi, attualmente disponibili sulla esposizione al DEHP attraverso gli alimenti per l'infanzia, rendono non procrastinabili studi più approfonditi in questo settore affiancati dalla ricerca di soluzioni alternative al DEHP per i materiali in plastica.

Bibliografia

1. Petersen JH, Breindahl T. Plasticizers in total diet samples, baby food and infant formulae. *Food Addit Contam* 2000;17:133-41.
2. Bradbury J. UK panics over phthalates in babymilk formulae. *Lancet* 1996;347:1541.
3. Tsumura Y, Ishimitsu S, Kaihara A, Yoshii K, Nakamura Y, Tonogai Y. Di(2-ethylhexyl) phthalate contamination of retail packed lunches caused by PVC gloves used in the preparation of foods. *Food Addit Contam* 2001;18:569-79.
4. Tsumura Y, Ishimitsu S, Saito I, Sakai H, Kobayashi Y, Tonogai Y. Eleven phthalate esters and di(2-ethylhexyl) adipate in one-week duplicate diet samples obtained from hospitals and their estimated daily intake. *Food Addit Contam* 2001;18:449-60.

5. Weidenhoffer Z, Turek B, Mitera J. Xenobiotics in food. I. Metabolic phthalate degradation. *Cent Eur J Public Health* 1996;4:11-5.
6. Sharman M, Read WA, Castle L, Gilbert J. Levels of di-(2-ethylhexyl)phthalate and total phthalate esters in milk, cream, butter and cheese. *Food Addit Contam* 1994;11:375-85.
7. Latini G, De Felice C, Presta G, Del Vecchio A, Paris I, Ruggieri F, Mazzeo P. Exposure to Di-(2-Ethylhexyl)- Phthalate in Humans during pregnancy: a preliminary report. *Biol Neonate* 2003;83:22-4.
8. Latini G, De Felice C, Presta G, Del Vecchio A, Paris I, Ruggieri F, Mazzeo P. In Utero exposure to Di-(2-Ethylhexyl)-Phthalate and Duration of Human Pregnancy. *Environ Health Perspect* 2003;111:1783-5.
9. Latini G, De Felice C, Del Vecchio A, Presta G, De Mitri B, Ruggieri F, Mazzeo P. Lactational Exposure to Di-(2-Ethylhexyl)- Phthalate. European Society for Pediatric Research-Annual Meeting. *Pediatr Res* 2003;54:56A.
10. Latini G, Verrotti A, De Felice C. Plasticisers, Infant Nutrition and Reproductive Health. *Reprod Toxicol* 2004;19:27-33.
11. Albro PW, Thomas R, Fishbein L. Metabolism of Di-ethylhexyl phthalate by rats: isolation and characterization of the urinary metabolites. *J Chromatogr* 1973;76:321.
12. Sjoberg P, Egestad B, Klasson-Wehler E, Gustafsson J. Glucuronidation of mono(2-ethylhexyl)phthalate. Some enzyme characteristics and inhibition by bilirubin. *Biochem Pharmacol* 1991;41:1493-96.
13. Hamosh M. Digestion in the newborn. *Clin Perinatol* 1996;23:191-209.
14. Lee PC, Borysewicz R, Struve M, Raab K, Werlin SL. Development of lipolytic activity in gastric aspirates from premature infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993;17:291-7.
15. Furuya S, Kumamoto Y, Sugiyama S. Fine structure and development of Sertoli junctions in human testis. *Arch Androl* 1978;1(3):211-9.
16. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Food surveillance information sheet N. 168. Phthalates in infant formulae- Follow-up survey. Londra: MAFF; 1998.
17. Stetson JB, Autian J. Necrotizing enterocolitis and plastic catheters. In: Stern L, Friis Hansen B, Kildeberg P. (Ed.). *Intensive care in the newborn*. New York. Masson; 1976.
18. Mazur HI, Stennett DJ, Egging PK. Extraction of diethylhexylphthalate from total nutrient solution-containing polyvinyl chloride bags. *J Parenter Enteral Nutr* 1989;13:59-62.
19. Center for Devices and Radiological Health, U.S. Food and Drug Administration. *Safety Assessment of Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) Released from PVC Medical Devices*. Disponibile all'indirizzo: <http://www.fda.gov/cdrh/ost/dehp-pvc.pdf>; ultima consultazione 16/12/05.
20. Barrett JR. New risk for newborns. *Environ Health Perspect* 2001;109:A524.
21. Latini G, Avery GB. Materials degradation in endotracheal tubes: a potential contributor to bronchopulmonary dysplasia. *Acta Ped* 1999;88:1174-5.
22. Latini G. The Potential Hazards of Exposure to Di-(2-Ethylhexyl)-Phthalate in Babies: A Review. *Biol Neonate* 2000;78(4):269-76.
23. KemI 2003. Risk reduction strategy Bis(2-ethylhexyl)phthalate. National Chemicals Inspectorate. Solna, Sweden. *DEHP Draft* January 2003. Disponibile all'indirizzo: <http://www.noharm.org/details.cfm?type=document&id=709>; ultima consultazione 27/12/05.
24. Cimini AM, Sulli A, Stefanini S, Serafini B, Moreno S, Rossi L, Giorgi M, Ceru MP. Effects of Di-(2-ethylhexyl)phthalate on peroxisomes of liver, kidney and brain of lactating rats and their pups. *Cell Mol Biol* 1994;40:1063-76.
25. Stefanini S, Serafini B, Nardacci R, Vecchioli SF, Moreno S, and Sartori C. Morphometric analysis of liver and kidney peroxisomes in lactating rats and their pups after treatment with the peroxisomal proliferator di-(2-ethylhexyl)phthalate. *Biol Cell* 1995;85:167-76.

BIOMARKER DI ESPOSIZIONE E DI DOSE EFFICACE NELLE PRIME FASI DELLA VITA

Antonio Menditto, Ilaria Altieri, Marco Castelli, Ferdinando Chiodo, Marina Patriarca
Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

I contaminanti presenti negli alimenti e nell'ambiente sono potenzialmente dannosi per la salute umana. I rischi per la salute possono essere particolarmente elevati in presenza di esposizione *in utero* e nei primi anni di vita, poiché durante l'accrescimento gli organismi hanno un rischio più elevato di subire danni permanenti. Inoltre, in queste fasi della vita, sia l'assorbimento che l'accumulo delle sostanze tossiche possono essere notevolmente maggiori che nell'età adulta.

Per stimare il rischio negli esseri umani, le informazioni sui livelli delle sostanze contaminanti, ottenute mediante il monitoraggio degli alimenti e il monitoraggio ambientale, dovrebbero essere integrate con informazioni sui livelli di dose interna, sulla presenza di effetti precoci preclinici e sulla presenza di suscettibilità su base individuale. Queste informazioni possono essere ottenute con il ricorso a *biomarker* di esposizione, di effetto o di suscettibilità il cui dosaggio viene effettuato nei fluidi biologici o, in particolari situazioni, nei tessuti (monitoraggio biologico).

L'obiettivo è quello di trovare *biomarker* appropriati per specifiche tipologie espositive nelle diverse fasi dello sviluppo.

Specificità biologica nelle prime fasi della vita ed esposizione a sostanze chimiche

In accordo con la *World Health Organization* (WHO), l'essere umano viene definito: *neonato* nelle prime quattro settimane di vita, *lattante* nel periodo compreso fra 1 e 12 mesi e *bambino* fra 1 e 5 anni di età. L'uso di termini diversi scaturisce dal fatto che la crescita e lo sviluppo nei primi anni di vita comportano grandi e rapide variazioni morfofunzionali (1, 2). In questo lavoro ci si riferirà alle tre classi con l'espressione "età pediatrica". Il termine "accrescimento" comprende due classi di fenomeni: in senso quantitativo, la *crescita* propriamente detta, consistente nella moltiplicazione cellulare e nell'aumento delle masse scheletriche e protoplasmatiche, e in senso sia funzionale che biochimico, il processo di *differenziazione* e di *sviluppo* (2). Tali processi non avvengono in modo uniforme e graduale; esistono infatti dei periodi (es. l'età del lattante e quella prepuberale) in cui si svolgono con velocità superiore. Durante l'accrescimento pre- e post-natale, inoltre, gli organi e i tessuti non si accrescono tutti contemporaneamente e con la stessa velocità.

Durante le prime fasi della vita, come durante lo sviluppo prenatale, gli esseri umani sono potenzialmente più vulnerabili agli effetti dannosi delle sostanze chimiche, anche a livelli di esposizione considerati "sicuri" per la popolazione adulta. I danni alla salute possono manifestarsi anche dopo un lungo periodo di latenza e avere riflessi negativi perfino sul

benessere e sulla salute delle generazioni future (per esempio, a causa di danni al patrimonio genetico o di alterazioni della funzione riproduttiva) (1, 3).

Lo sviluppo del feto, il suo accrescimento e la successiva capacità di adattarsi alla vita extrauterina sono condizionati dall'interazione reciproca di fattori materni, placentari e fetali. L'organismo materno controlla il rifornimento di substrati nutrizionali e di ormoni (per esempio, quelli tiroidei) al feto e influenza il flusso ematico-placentare. La placenta svolge una notevole attività di sintesi e media il trasferimento al compartimento fetale delle sostanze provenienti dal compartimento materno. Infine, il feto controlla la propria attività metabolica mediante lo sviluppo di sistemi enzimatici e ormonali e modifica i suoi organi e apparati progressivamente nel tempo, adattandoli alle esigenze della vita extrauterina. Durante la vita intrauterina, le interazioni tra i diversi fattori provvedono allo scambio dei gas respiratori, all'approvvigionamento dei nutrienti e alla rimozione dei prodotti di metabolismo/catabolismo. I sistemi respiratorio, gastrointestinale, endocrino, immunitario e riproduttivo e la funzionalità renale sono immaturi alla nascita ed evolvono verso la piena maturazione a differenti velocità. Anche molte vie metaboliche, per es. il metabolismo epatico di metalli essenziali come rame, ferro e zinco (4), cambiano bruscamente dopo la transizione all'esistenza indipendente. Questi fattori, che sono in grado di condizionare sia l'entità dell'esposizione che la cinetica degli xenobiotici pervenuti nell'organismo fetale, possono comportare effetti sulla salute più gravi di quelli possibili negli adulti.

Dopo la nascita, l'esposizione ai contaminanti ambientali avviene, come negli adulti, tramite l'inalazione, l'ingestione e l'assorbimento percutaneo. Tuttavia, alcune caratteristiche strutturali e fisiologiche possono aumentare la vulnerabilità degli organismi, negli stadi iniziali della vita extrauterina, agli effetti nocivi delle sostanze chimiche. L'accrescimento somatico, assai intenso durante il primo anno, tende in seguito a diminuire, per riprendere solo in età prepuberale e fino al raggiungimento della maturità sessuale. Rispetto all'adulto, nel neonato, nel lattante e nel bambino, l'inalazione di aria per unità di peso corporeo è più alta, e sono maggiori il consumo di cibo per unità di peso corporeo, il metabolismo a riposo e l'area di superficie per unità di peso corporeo. Anche le variazioni nella composizione degli organi possono influenzare l'assorbimento, la distribuzione e l'accumulo di sostanze chimiche specifiche negli organi bersaglio (per esempio, piombo nel tessuto osseo). La diminuzione con l'età della percentuale del contenuto di acqua nei vari organi, che varia con la loro maturazione, si accompagna a un progressivo aumento ponderale. Rispetto all'adulto, nel lattante la percentuale di acqua nell'organismo, negli organi e nei tessuti è maggiore e ne consegue che il contenuto di acqua nel compartimento extracellulare è approssimativamente due volte più grande.

L'incremento ponderale nei primi mesi di vita extrauterina, dopo il breve periodo del calo fisiologico, è compreso tra 150 e 200 g di peso corporeo per settimana durante il primo trimestre. Ciò comporta un raddoppio e una triplicazione del peso rispettivamente verso il 5°-6° mese e al 12° mese, il che può favorire un accumulo di xenobiotici nei tessuti più elevato rispetto all'adulto.

Nel neonato, sia la quantità di albumina plasmatica che la capacità legante dell'albumina sono minori rispetto a quanto si osserva nell'adulto. Questa situazione può condizionare, anche a causa della competizione delle sostanze endogene per i siti di legame dell'albumina, un aumento della quota libera di composti esogeni quali farmaci – penicilline, fenitoina, fenobarbitale (5, 6, 7) – e sostanze tossiche. L'aumento delle sostanze tossiche non coniugate può non dar luogo a una più veloce escrezione urinaria a causa dell'immaturità della funzione renale. Infatti la funzione renale nel neonato e nel lattante, se da un lato è adeguata alle loro particolari necessità – condizionando una maggiore ritenzione di sostanze azotate e di sali minerali rispetto al bambino e all'adulto – dall'altro si estrinseca in una riduzione sia della velocità di filtrazione glomerulare che dell'attività tubulare (8, 9). Nel neonato la funzionalità

renale è circa il 30-40% inferiore a quella dell'adulto e tale differenza viene colmata nell'arco di 2-3 mesi.

Un quadro funzionale di questo tipo può comportare la presenza di sostanze tossiche libere nel plasma e quindi un loro maggior accumulo in tessuti in rapido accrescimento. Tale maggior accumulo, per particolari classi di xenobiotici, può essere ulteriormente favorito dal maggior peso relativo di specifici organi. Un esempio è quello del cervello, organo per il quale il rischio è amplificato dall'imaturità della barriera emato-encefalica, il cui pieno sviluppo non viene raggiunto se non intorno a sei mesi dalla nascita (10).

Nel bambino, lo sviluppo fisiologico di molti sistemi – tra cui, i sistemi: nervoso, immunitario, endocrino e riproduttivo – continua per molto tempo dopo la nascita e giunge alla piena maturazione solamente nel corso dell'adolescenza (10).

L'assorbimento gastrointestinale di numerose sostanze chimiche, inclusi alcuni metalli, è più alto rispetto a quanto si osserva negli adulti, a causa delle caratteristiche sia della funzione che della struttura intestinale, così come del tipo di dieta e della più alta assunzione di cibo per unità di peso corporeo. Per esempio per quanto riguarda il piombo, l'assorbimento attraverso il tratto gastrointestinale è dell'ordine del 40-50% nei bambini mentre nell'adulto non supera il 5-15% (11-14).

La definizione di limiti di accettabilità – quali la Dose Giornaliera Accettabile (*Acceptable Daily Intake*, ADI) – o dei limiti di tollerabilità – quali la TDI, la Dose Massima Giornaliera Provvisoria Tollerabile (*Provisional Maximum Tolerable Daily Intake* PMTDI) e la Dose Settimanale Provvisoria Tollerabile (*Provisional Tolerable Weekly Intake* PTWI) – per le sostanze chimiche presenti negli alimenti e nell'ambiente, sono elementi qualificanti del processo di analisi del rischio. Il processo di definizione ed eventualmente di riduzione del rischio deve tenere conto della necessità di proteggere le popolazioni in età pediatrica. Recentemente l'*Health Council* dei paesi Bassi ha proposto, ai fini del calcolo dell'ADI per i pesticidi nei cibi, l'utilizzazione di un ulteriore fattore di incertezza (per un valore pari a 10) nel caso in cui le evidenze scientifiche facciano supporre che gli organismi in via di sviluppo siano più vulnerabili rispetto agli adulti (15).

Modalità di esposizione prenatale, durante l'allattamento e nella prima infanzia

L'esposizione a sostanze chimiche tossiche, inclusi i contaminanti, si verifica anche prima della nascita attraverso la circolazione feto-placentare. Per esempio, alcuni elementi in traccia, assunti dalla madre con gli alimenti o per inalazione, possono attraversare la placenta, essere trasferiti al feto in via di sviluppo e contribuire così al carico corporeo (dose interna totale) del bambino. Il trasferimento transplacentare è stato dimostrato, nel caso del piombo, oltre che dai risultati di studi sperimentali su animali, dal confronto fra i livelli di piombo nel sangue materno e quelli nel sangue del cordone ombelicale alla nascita (16, 17). Viceversa, la barriera placentare è più efficace nel proteggere il feto dal cadmio, e le concentrazioni ematiche e tissutali nei neonati sono molto basse (18, 19).

Dopo la nascita, le vie di esposizione, pur non essendo differenti da quelle degli adulti (inalazione, ingestione e assorbimento percutaneo), hanno caratteristiche specifiche nei diversi gruppi di età. Infatti, la dieta, le caratteristiche ambientali, i comportamenti e le attività differiscono sostanzialmente allorché siano presi in considerazione i neonati, i lattanti e i bambini. In particolare, debbono essere prese in considerazione le differenze nella dieta, per i neonati e i lattanti (allattamento al seno o con latte artificiale, e alimentazione nel corso dello svezzamento) e, nei bambini, l'ulteriore assunzione di contaminanti presenti nella polvere e nel

suolo e portati alla bocca attraverso le attività di esplorazione orale. L'ambiente in generale e le abitudini e gli stili di vita, come l'abitudine al fumo di tabacco da parte della madre, possono modificare, agendo da fattori di confondimento rispetto alla dieta, i livelli di esposizione del feto alle sostanze contaminanti (es. Cd, idrocarburi aromatici policiclici, nitrosammine).

Dopo la nascita, l'abitudine al fumo dei genitori contribuisce, direttamente durante l'allattamento e indirettamente attraverso il fumo passivo, ad aumentare l'esposizione alle sostanze nocive. Per esempio, alcuni metalli, soprattutto il cadmio, sono presenti nel tabacco e sono rilasciati sia nel fumo inalato che nell'ambiente. Il cadmio aerotrasportato, un marcatore del fumo di tabacco ambientale, è significativamente più alto (fino a 30 volte nei casi estremi) nelle abitazioni in cui vivono dei fumatori (20) rispetto ai limiti di 5 e 10 ng/m³ raccomandati dal WHO rispettivamente per le aree rurali e per quelle urbane/industriali (21, 22).

Un elemento essenziale, ai fini della definizione del rischio, è la valutazione dell'esposizione in termini sia di dose esterna che di dose interna. In merito alle sostanze contaminanti, per le quali l'introduzione attraverso la dieta costituisce una parte rilevante dell'assunzione totale, il WHO, nell'ambito del *Global Environment Monitoring System-Food Contamination Monitoring and Assessment Programme* (Programma GEMS/Food), ha stabilito un elenco di sostanze contaminanti e di alimenti, e/o categorie di alimenti, per i quali sono prioritari la valutazione dei livelli e dei trend di contaminazione, la valutazione dell'esposizione totale nell'uomo e il loro significato in relazione alla salute pubblica e al commercio (Tabella 1) (23).

Per la valutazione del rischio, le quantità di sostanze chimiche assunte con la dieta possono essere confrontate con limiti (ADI/TDI, PMTDI, PTWI) raccomandati, e periodicamente aggiornati, dal *Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, per numerose sostanze, sulla base dell'esame delle informazioni scientifiche disponibili. Per esempio, il PTWI per il metilmercurio è stato recentemente ridotto da 3,3 a 1,6 µg/kg di peso corporeo, in considerazione della necessità di proteggere il feto dagli effetti nocivi del metilmercurio, che può essere presente come contaminante nel pesce (24).

Durante i primi mesi della vita, la dieta consiste principalmente di latte materno, vaccino o artificiale. Il latte, secreto dalla ghiandola mammaria, può essere considerata anche una via di escrezione supplementare per le sostanze dannose. L'entità e il tasso di trasporto delle sostanze tossiche dal sangue al latte dipendono da molti fattori, come per es. la solubilità nei lipidi, il peso molecolare e la forza di legame con le proteine plasmatiche. Gli studi sul trasporto degli xenobiotici nel latte, sia umano che animale, anche se numerosi, non forniscono dati per tutte le potenziali sostanze inquinanti ambientali. L'analisi di campioni di latte umano nel corso di specifici studi, ha messo in evidenza la presenza di alcune sostanze tossiche, come conseguenza dell'esposizione materna, tra cui alcuni pesticidi, bifenili policlorurati (PCB) e diossine, piombo e altri elementi in traccia. Il contenuto degli elementi in traccia nel latte umano è stato oggetto di un esteso studio collaborativo *WHO/International Atomic Energy Agency* (IAEA) che ha coinvolto soggetti di sei diversi paesi (25).

La validazione del metodo e l'assicurazione di qualità sono state documentate in dettaglio e hanno costituito gran parte delle procedure dello studio. Le concentrazioni di cadmio nel latte umano (<1 µg/L) sono risultate largamente compatibili col PTWI pari a 6,4 µg/kg di peso corporeo, presumendo un'assunzione giornaliera media di 800 mL in un lattante di 6 kg. I livelli di piombo nel latte umano (tra 2 e 5 µg/L) sono quantitativamente più variabili e possono comportare assunzioni dietetiche, da parte di lattanti nutriti al seno, maggiori del PTWI pari a 25 µg/kg di peso corporeo. Altri componenti della dieta dei neonati e dei lattanti, come il latte vaccino e quello artificiale, contengono meno di 1 ng/g di Cd, mentre le concentrazioni di piombo sono lievemente più alte (approssimativamente 2 ng/g) (26, 27).

Tabella 1. Elenco delle sostanze contaminanti e degli alimenti di interesse prioritario in accordo all'elenco completo formulato nell'ambito del programma GEMS/Food

Sostanza	Alimento
Aldrina Dieldrina DDT (p, p'- e o, p'-) TDE (p, p'-) DDE (p, p'- e p, o'-) Endosulfan (a, β e solfato) Endrina Esaclorocicloesano (α e β e γ) Esaclorobenzene Eptacloro Eptacloro epossido Clordano Bifenili policlorurati (PCB) (congeneri n. 28, 52, 77, 101, 105, 114, 118, 123, 126, 138, 153, 156, 167, 169, 180 e 189) Diossine (PCDD e PCDF)	Latte intero, latte in polvere, burro, uova, grassi animali e oli, pesci, cereali *, grassi vegetali e oli, latte umano, dieta totale, acqua potabile
Piombo	Latte, carne fresca/in scatola, rene, pesce molluschi, crostacei, cereali *, legumi, frutta fresca/in scatola, succo di frutta, spezie, alimenti per l'infanzia, dieta totale, acqua potabile
Cadmio	Rene, molluschi, crostacei, cereali *, farine, vegetali, dieta totale
Mercurio	Pesci, prodotti ittici, funghi, dieta totale
Aflatossine	Latte, latticini, granturco, cereali *, arachidi, noci, spezie, fichi secchi, dieta totale
Ocratossina A	Grano, cereali, vino
Deossinivalenolo	Grano, cereali
Patulina	Succo di mela
Fumonisine	Granturco, grano
Diazinone Fenitrotione Malatione Parathon Parathon metile Pirimifos metile Clorpirifos	Cereali *, vegetali, frutta, dieta totale
Aldicarb Captan Dimetoato Folpet Fosalone	Cereali *, vegetali, frutta, dieta totale
Ditiocarbammati	Cereali *, vegetali, frutta, dieta totale, acqua potabile
Radionuclidi (Cs-137, Sr-90, I-131, Pu-239)	Cereali *, vegetali, frutta, dieta totale, acqua potabile
Nitrati/nitriti	Acqua potabile
Arsenico inorganico	Acqua potabile

* o gli altri alimenti di prima necessità

Per i bambini più grandi, si può assumere che l'assunzione di contaminanti attraverso l'alimentazione sia simile a quella degli adulti. I risultati, pubblicati nel 2004, ottenuti nell'ambito di una cooperazione scientifica a livello dell'Unione Europea (SCOOP) indicano che in molti paesi europei l'assunzione media di piombo attraverso i cibi è inferiore, per gli adulti, al 25% del PTWI, con un valore medio per l'Italia di 30 µg/giorno; per quanto riguarda i bambini, l'assunzione media in Danimarca corrisponde rispettivamente al 35% e 24% del PTWI nelle classi di età 4-6 anni e 10-12 anni, mentre in Francia, nella fascia di età 3-14 anni, l'assunzione media corrisponde al 35% del PTWI. Per quanto riguarda il cadmio i risultati ottenuti nei paesi europei nel corso della stessa ricerca indicano come l'assunzione media con gli alimenti sia inferiore, per gli adulti, al 30% del PTWI, con un valore medio cumulativo di 14,4 µg/giorno (20,2 µg/giorno per l'Italia); per quanto riguarda i bambini, l'assunzione media di Cd in Danimarca corrisponde rispettivamente al 65% e 42,4% del PTWI nelle classi di età 4-6 anni e 10-12 anni, mentre in Francia, nella fascia di età 3-14 anni, l'assunzione media corrisponde al 24,8% del PTWI (28). Nei bambini allattati artificialmente, la stessa acqua può essere una ulteriore fonte di esposizione. In confronto agli adulti o ai bambini più grandi, a parità di qualità dell'approvvigionamento idrico, i lattanti hanno bisogno di una maggiore quantità di liquidi per unità di peso corporeo, equivalente, su base giornaliera, a un settimo del peso corporeo; tali differenze trovano la propria motivazione nella necessità di sostituire l'acqua persa attraverso la maggiore area di superficie, nel più alto tasso metabolico e nella minore efficienza dell'apparato renale nel concentrare le urine.

L'attività di esplorazione orale svolge un ruolo importante nello sviluppo normale tra i 6 e i 36 mesi di età. L'ingestione di terra e/o polvere dal suolo che si è depositata nelle abitazioni o sulle strade (in genere 100 mg/giorno) (29) costituisce un'importante fonte di esposizione nei bambini di età inferiore a 5 anni. Per quanto riguarda il piombo, questa è stata riconosciuta come la più importante fonte di esposizione nei bambini, dando conto del 65-75% dell'assunzione complessiva di questo metallo nei bambini di due anni di età (1, 30). Il contenuto in piombo della polvere e del suolo varia estesamente da 100 a più di 2000 µg/g (31). In un vasto studio eseguito nel Regno Unito su oltre 4500 campioni di polvere di casa o di suolo prelevato dai giardini, è stata rilevata una concentrazione media di 6,4 µg Cd/g, in confronto alla concentrazione media di meno che 0,1 µg Cd /g nella crosta terrestre. Sulla base di questi valori medi, l'assunzione giornaliera di Cd e Pb in un bambino che ingerisca circa 100 mg di polvere aggiungerebbe approssimativamente 0,6 µg di Cd, e da 10 a 200 µg di Pb, superando largamente l'assunzione media di piombo con la dieta e il PTWI delle linee guida FAO/WHO (24). È possibile che simili situazioni si verifichino anche per altri contaminanti ambientali.

Nei bambini, sempre per quanto riguarda l'ingestione, l'esposizione può avvenire attraverso gli alimenti, le bevande e l'acqua potabile. I contaminanti ambientali possono essere trasferiti dall'aria al suolo e all'acqua, e da qui possono entrare nella catena alimentare. La velocità del trasferimento dal suolo alle piante dipende da molti fattori, come il tipo di suolo, la pianta, il pH, l'uso di fertilizzanti e le condizioni meteorologiche. I trattamenti degli alimenti, la conservazione e la loro preparazione possono a loro volta aumentare il livello dei contaminanti.

L'esposizione alle sostanze inquinanti atmosferiche attraverso l'inalazione è sostanzialmente la stessa degli adulti, ma nei bambini il volume di aria inalata per unità di peso corporeo è maggiore. Inoltre l'esposizione può aumentare allorché la concentrazione delle sostanze inquinanti sia maggiore in vicinanza del suolo, come nel caso delle sostanze provenienti dai tubi di scappamento delle automobili. Per esempio, le assunzioni giornaliere di cadmio e piombo inalati dall'aria circostante sono trascurabili negli adulti (tipicamente circa 0,2 µg di Cd e 50 µg di Pb), ipotizzando che siano inalati in media 20 m³ di aria al giorno e che le concentrazioni negli ambienti confinati siano simili alle concentrazioni all'esterno. L'assorbimento polmonare varia da circa 15% per il cadmio a circa il 50% per il piombo, ma dipende anche dalle

dimensioni delle particelle atmosferiche inalate e dalla solubilità dei composti dell'elemento. Tuttavia, nei bambini al di sotto dei 5 anni di età, oltre che essere inalate maggiori quantità di aria per unità di peso corporeo, anche l'assorbimento di metalli a livello polmonare potrebbe essere più alto.

Ruolo dei *biomarker* nella valutazione del rischio

La valutazione del rischio per la salute umana derivante dall'esposizione ai composti chimici prevede quattro distinte fasi: l'identificazione dei pericoli, la valutazione della relazione dose-risposta, la valutazione e la stima dell'esposizione connessa con l'uso della sostanza e infine la caratterizzazione del rischio (32). A sua volta, la valutazione dell'esposizione si avvale dell'informazione ottenuta dalla misurazione dei livelli di esposizione sia esterna, in varie matrici ambientali quali alimenti, aria, acqua e suolo (monitoraggio ambientale), che interna (monitoraggio biologico).

Il monitoraggio biologico consiste nella misurazione, continua o ripetuta, di sostanze potenzialmente tossiche, o dei loro metaboliti, o degli effetti biochimici – nei tessuti, nelle secrezioni, nelle escrezioni o nell'aria espirata, o loro combinazioni – al fine di valutare l'esposizione e i rischi per la salute attraverso un confronto con appropriati valori di riferimento sulla base della conoscenza della probabile relazione causale tra l'esposizione e i risultanti effetti dannosi sulla salute (33). Per quanto riguarda i bambini, il monitoraggio biologico può essere effettuato, oltre che nel periodo prenatale, anche dopo la nascita fino all'età di 18 anni; le attività di monitoraggio possono continuare nell'ambito di attività di follow-up volte a monitorare i soggetti anche nella loro età adulta. In alcuni casi, laddove l'esposizione prenatale si configuri rilevante, può essere utile estendere la raccolta delle informazioni sull'esposizione ai genitori del bambino. A tali aspetti viene dato ampio rilievo in un documento prodotto per conto della Commissione Europea (COM(2003)338FINAL) dal technical working group Biomonitoring of children nell'ambito di un'iniziativa della stessa Commissione volta a sviluppare una Strategia Europea per l'Ambiente e la Salute (*European Environment and Health Strategy*) SCALE (*Scientific evidence, focused on Children, meant to rise Awareness, improved situation by use of Legal instruments and ensure a continual Evaluation of the progress made*). L'iniziativa, che ha l'obiettivo di valutare e minimizzare gli effetti avversi per la salute dovuti all'inquinamento ambientale, prevede la costruzione di un sistema informativo e la formulazione di adeguate misure di carattere politico (34).

I parametri oggetto delle misurazioni nell'ambito del monitoraggio biologico sono indicati con il nome di *biomarker* o indicatori biologici. Tali indicatori includono parametri di natura chimica, biochimica, fisiologica o comportamentale, misurabili nella specie umana. La loro funzione è quella di rilevare un evento che può influenzare o predire l'insorgenza e/o l'evoluzione di una malattia, e sono fondamentali al fine di stabilire un nesso causale tra l'esposizione umana a sostanze tossiche e il manifestarsi di alterazioni funzionali o morfologiche. I *biomarker* sono classificati in *biomarker* di esposizione (indicatori di dose interna e indicatori di dose biologicamente efficace), *biomarker* di effetto e *biomarker* di suscettibilità.

Per quanto riguarda i *biomarker* di pertinenza laboratoristica, la loro misurazione viene effettuata in una ampia gamma di matrici biologiche di provenienza umana (es. urine, sangue intero, siero, capelli, unghie, denti decidui, latte materno, saliva, meconio, aria espirata, sangue dal cordone ombelicale, ecc.). Per ogni *biomarker* e per ogni matrice, i risultati della misura

ottenuti dovrebbero essere confrontati con degli appropriati valori di riferimento, derivati in genere da studi eseguiti su campioni tratti da popolazioni di soggetti non esposti.

Un *biomarker* dovrebbe essere: *stabile*, per consentire la conservazione del campione biologico, sufficientemente *sensibile* (bassa probabilità di falsi negativi) e *specifico* (bassa probabilità di falsi positivi); inoltre, per ogni indicatore, i livelli di riferimento determinati nella matrice biologica d'interesse non dovrebbero sovrapporsi ai livelli associati con esposizioni significative.

I *biomarker* di esposizione, i primi a essere stati utilizzati nell'ambito degli studi di monitoraggio biologico, sono in genere rappresentati dai composti chimici come tali o dai loro metaboliti (indicatori di dose); fra i *biomarker* di esposizione devono essere compresi anche gli indicatori che riflettono, a livello molecolare, gli effetti indotti dagli stessi composti chimici o dai loro metaboliti (indicatori di dose biologicamente efficace). Questi ultimi indicatori sono particolarmente importanti in quanto riflettono la frazione biologicamente attiva degli xenobiotici, ossia la frazione in grado di interagire con le macromolecole a livello dell'organo bersaglio. Sono rappresentati soprattutto dagli addotti che si vengono a formare tra un agente chimico e gli acidi nucleici o le proteine, quali per esempio emoglobina, albumina, istoni o collagene (35).

I *biomarker* di effetto si riferiscono ad alterazioni biochimiche o funzionali misurabili e reversibili a carico degli organi bersaglio. Sono in genere degli indicatori preclinici di condizioni patologiche. Possono essere specifici o aspecifici. Gli indicatori non specifici integrano l'effetto dovuto all'esposizione a più composti chimici (36, 37). Tra i *biomarker* di effetto i più utilizzati sono quelli relativi alla funzione dei vari organi (per esempio beta2-microglobulina e cistatina C per la funzionalità renale; enzimi epatici per la funzione epatica) e delle ghiandole endocrine (dosaggio degli ormoni tiroidei, dosaggio degli ormoni steroidei e degli ormoni che ne regolano la secrezione) quelli collegati al danno citogenetico (es. 8-ossi-deossi-guanosina nelle urine; il test COMET, le rotture e le aberrazioni cromosomiche). Sono considerati *biomarker* di effetto anche le alterazioni del normale sviluppo fisiologico (es. le alterazioni dello sviluppo sessuale quali il ridotto volume dei testicoli, la ritardata o anticipata comparsa dei caratteri sessuali secondari, ecc.).

I *biomarker* di suscettibilità sono un indice della predisposizione, ereditaria o acquisita, di un singolo individuo a subire gli effetti di uno xenobiotico o di un gruppo di composti chimici. A differenza dei geni associati a malattie ereditarie, i geni di suscettibilità sono in grado di modificare il rischio per un effetto avverso allorché vi sia esposizione ad agenti chimici pericolosi; ma di per sé non sono né necessari né sufficienti nel determinare la patologia (38).

I *biomarker* sono stati ampiamente utilizzati per la caratterizzazione dell'esposizione, e degli effetti, al Pb. Un elenco dei *biomarker* di dose, effetto e suscettibilità utilizzati, è riportato nella Tabella 2.

In generale, gli studi epidemiologici che utilizzano i *biomarker* rientrano nell'ambito degli studi appartenenti all'epidemiologia molecolare (39), la cui finalità è quella di stabilire un nesso tra il manifestarsi di patologie e l'esposizione a sostanze tossiche. Gli studi di epidemiologia molecolare che utilizzano i *biomarker* sono simili agli studi epidemiologici tradizionali per quanto riguarda il disegno, l'analisi e l'interpretazione. Necessitano tuttavia, in una fase preliminare, di studi volti allo sviluppo e alla validazione dei *biomarker* stessi (studi transizionali), il cui scopo è quello di caratterizzare il *biomarker* piuttosto che il fenomeno biologico di cui il *biomarker* stesso è espressione (40). Gli studi transizionali a loro volta si dividono in studi di sviluppo, studi di caratterizzazione e studi applicati.

Gli studi di sviluppo consistono in studi che prevedono la valutazione delle caratteristiche di affidabilità del metodo – specificità, limiti di rivelabilità e quantificazione, esattezza, precisione, sensibilità, intervallo di linearità, robustezza, incertezza di misura (41, 42) – quando applicato a

campioni di origine umana (validazione analitica sul campo), e in studi di valutazione delle procedure per la raccolta, il trattamento, l'analisi e la conservazione dei campioni.

Tabella 2. Biomarker utilizzati nella stima del rischio per la salute associato con l'esposizione al Pb

Tipo di Biomarker	Esempi	
<i>Esposizione</i> dose interna	concentrazione in fluidi e tessuti biologici	<ul style="list-style-type: none"> - concentrazione di pb nel sangue - concentrazione di pb nelle urine - concentrazione di pb nelle urine (dopo carico con EDTA) - concentrazione di pb nell'osso - concentrazione di pb nella dentina
	dose biologicamente efficace	<ul style="list-style-type: none"> - concentrazione di pb nel plasma - concentrazione di pb nelle urine (dopo carico con EDTA)
<i>Effetto</i> effetti biologici precoci	enzimi coinvolti nel metabolismo dell'eme	<ul style="list-style-type: none"> - inibizione dell'attività dell'enzima acido-δ-aminolevulinico deidratasi (ALAD) eritrocitaria - inibizione dell'attività della pirimidina-5'-nucleotidasi eritrocitaria - inibizione della diidrobiopterina reduttasi - inibizione dell'attività dell'ATPasi eritrocitaria
	variazioni nei livelli di metaboliti conseguenti all'alterazione di vie metaboliche	<ul style="list-style-type: none"> - aumento dell'escrezione dell'ALA urinario - aumento dell'escrezione delle coproporfirine urinarie - aumento delle zincoproporfirine eritrocitarie
	alterazione di strutture e/o funzioni	<ul style="list-style-type: none"> - diminuzione della vita media eritrocitaria - aumento dei livelli di eritropoietina sierica - diminuita concentrazione dell'emoglobina - anemia
		alterazioni del sistema nervoso
	alterazioni del sistema riproduttivo	<ul style="list-style-type: none"> - diminuzione dei livelli sierici della 1,25(OH)₂D - effetti su morfologia e funzione spermatica
<i>Suscettibilità</i> polimorfismo genico		<ul style="list-style-type: none"> - gene ALAD che codifica l'enzima ALAD (genotipo ALAD-2) - gene del recettore della vitamina D (genotipo BB)

Gli studi di caratterizzazione prevedono il dosaggio del *biomarker* in campioni di popolazioni umane per lo studio della variabilità biologica (inter- e intra- individuale) e la definizione dei valori di riferimento, dei fattori di confondimento (endogeni ed esogeni) e dei modificatori di effetto.

La validazione sul campo (*field validation*) avviene attraverso l'esecuzione di studi transizionali applicati di tipo epidemiologico che possono permettere la valutazione delle relazioni tra livelli di esposizione (attraverso *biomarker* di dose), dose biologica efficace, effetto biologico precoce, alterazioni strutturali o funzionali (attraverso *biomarker* di effetto) e infine l'occorrenza di esiti e patologie conclamate. Per quanto riguarda i *biomarker* di effetto, il

disegno di uno studio transizionale sul campo, volto a validare un *biomarker* come predittivo di esiti, è più complicato rispetto a quelli volti a validare i *biomarker* di esposizione. Nel caso dei *biomarker* di effetto una risposta precede la comparsa di un esito che può essere raro nella popolazione oggetto dello studio. Il più efficace disegno sperimentale è uno studio longitudinale di coorte, ma spesso l'esito – che costituisce la variabile indipendente – oltre a essere raro ha luogo molto tempo dopo la risposta del *biomarker*. Per questo motivo, gli studi di questo tipo devono essere ampi e devono durare per un lungo periodo di tempo, cosa che molto spesso può risultare impossibile. Un valido compromesso per la validazione dei marcatori di effetto è l'esecuzione di studi caso-controllo nidificati. In questo caso i campioni biologici vengono raccolti in momenti appropriati dopo l'esposizione e conservati fino al manifestarsi, nei soggetti dello studio, degli esiti di interesse. Nell'ambito degli studi transizionali applicati trovano un loro specifico utilizzo i *biomarker* di suscettibilità.

Conclusa la fase di validazione, i *biomarker* trovano applicazione nelle diverse tipologie di studi epidemiologici a carattere osservazionale, siano essi di coorte o longitudinali, trasversali o di prevalenza, oppure studi di tipo caso-controllo.

Attualmente le nuove discipline “-omiche” (genomica e proteomica, tossicogenomica), quando applicate a studi di epidemiologia molecolare, permettono di stimare direttamente (utilizzando il DNA) o indirettamente (utilizzando l'RNA) e in singoli esperimenti i cambiamenti nell'espressione in un gran numero di geni/proteine indotti da xenobiotici. Per esempio, tali discipline permettono di studiare la variabilità interindividuale nei geni (polimorfismo) codificanti gli enzimi coinvolti nel metabolismo (di prima e seconda fase) sulla dose biologicamente attiva degli xenobiotici. La presenza di geni che codificano enzimi con funzionalità ridotta o aumentata possono, a parità di dose assorbita, modificare il rischio di comparsa di effetti avversi per la salute associati alla presenza, nel singolo soggetto, di polimorfismi che comportano una aumentata suscettibilità individuale (43, 44).

La metodica dei DNA microarray è una nuova tecnica di biologia molecolare che sta rapidamente trovando applicazione negli studi di tossicogenomica. Si tratta di una tecnologia ad alta capacità che permette l'analisi d'espressione di molti geni in maniera simultanea e in uno stesso esperimento (45, 46); il confronto contemporaneo dell'espressione genica tra campioni di controllo (*in vitro*) o sani (*in vivo*) e campioni trattati o esposti a xenobiotici, potrebbe permettere l'identificazione e la definizione di prodotti d'espressione candidati come nuovi *biomarker*.

Applicazione di *biomarker* per la valutazione dell'esposizione in età prenatale e pediatrica

Sebbene i *biomarker* abbiano un ruolo essenziale nella valutazione dell'entità, e degli effetti, dell'esposizione umana alle sostanze chimiche (47, 48), le differenze nella fisiologia, nel metabolismo e nel comportamento limitano la possibilità di estendere i risultati relativi ai *biomarker* ottenuti nell'ambito di studi su popolazioni di adulti alle popolazioni in età pediatrica.

La possibilità di applicazione di un *biomarker*, validato nel contesto di studi su popolazioni di adulti, per lo studio dell'esposizione prenatale e pediatrica deve essere confermata valutando se: a) le differenze morfologiche, fisiologiche, metaboliche e comportamentali tra adulto e bambino possano modificare il significato e l'utilità del *biomarker* o, a parità di *biomarker*, condizionare l'utilizzazione di matrici diverse; b) le concentrazioni attese rientrino nell'intervallo di applicazione dei metodi analitici disponibili; c) siano disponibili o possano

essere ottenuti valori di riferimento per una popolazione non esposta nella stessa fascia di età; d) le procedure di prelievo non provochino disagi o effetti avversi per il singolo soggetto dello studio. Attualmente è in corso una iniziativa dell'Unione Europea volta a definire il ruolo del monitoraggio biologico ai fini della valutazione degli effetti avversi dovuti all'inquinamento ambientale nei bambini, e ad implementare un sistema informativo (34). Maggiori informazioni possono essere reperite al sito http://europa.eu.int/comm/environment/health/index_en.htm.

Uno dei punti critici, nelle popolazioni in età pediatrica, è la raccolta dei campioni, che deve tener conto sia di problemi di tipo etico che di difficoltà tecniche e concettuali. Queste difficoltà hanno reso, e rendono, di difficile attuazione gli studi volti a documentare i livelli di esposizione in età pediatrica attraverso la misura delle concentrazioni di xenobiotici nei fluidi biologici o nei tessuti. Non stupisce quindi che gli studi su popolazioni di età pediatrica siano, in proporzione agli studi su popolazioni adulte e in riferimento a particolari tipologie espositive, scarsi e talvolta di difficile interpretazione.

Tra gli elementi che meritano una particolare considerazione vanno citati: la stima dell'esposizione prenatale, la scelta e analisi dei campioni biologici, la definizione dei valori di riferimento e dei valori limite, i problemi sociali, etici e legali relativi al trattamento e all'utilizzo dei dati.

Stima dell'esposizione prenatale

Nella fase prenatale la valutazione del rischio presenta maggiori problemi per la difficoltà di ottenere dati obiettivi sia sull'effettiva esposizione del feto – condizionata dall'esposizione materna e dall'azione delle strutture metabolicamente attive che regolano gli scambi materno-fetali – sia sui possibili rischi per la salute. A fronte delle informazioni ottenute da studi tossicologici e sperimentali, non sempre trasferibili direttamente al feto umano, è necessario sviluppare *biomarker* dell'esposizione fetale e utilizzarli nell'ambito di studi di popolazione. A questo scopo possono essere utilizzati *biomarker* “indiretti”, basati su misurazioni del contenuto di uno xenobiotico in campioni biologici prelevati dalla madre o nel sangue cordonale, che tuttavia in genere riflettono per lo più l'esposizione a breve termine. Altri *biomarker* sono in grado di fornire una misura più diretta dell'esposizione fetale. In particolare, a seguito della intensa ricerca in questo campo (49), sono stati proposti il dosaggio di xenobiotici nel liquido amniotico e nel meconio, prodotti dal feto. Le sostanze chimiche presenti nel meconio e nel liquido amniotico possono fornire una misura dell'esposizione cumulativa in periodi differenti della vita fetale. Infatti il liquido amniotico raccolto durante l'amniocentesi è l'unico fluido biologico che può essere usato per caratterizzare le esposizioni fetali nelle prime 15-20 settimane di gestazione, mentre il meconio può essere utilizzato per caratterizzare esposizioni che hanno luogo a partire dal secondo trimestre di gravidanza fino al concepimento (49). Per quanto riguarda l'amniocentesi va tenuto presente che, a causa dei possibili rischi per il feto, questa indagine invasiva dovrebbe essere eseguita solo quando vi sia un elevato rischio di difetti congeniti, quindi il campione in esame potrebbe essere distorto e non rappresentativo della popolazione delle gestanti. D'altro canto, nel nostro paese, a causa del declino della natalità e dell'aumentata età media delle donne alla nascita dei figli, il 23,4% delle donne italiane che hanno partorito nel periodo 1995-2000 sono state sottoposte ad amniocentesi (50).

Scelta e analisi dei campioni biologici

Data la necessità di utilizzare procedure di prelievo, per quanto possibile, non invasive, e tenendo conto delle caratteristiche peculiari delle popolazioni in età pediatrica, la scelta delle

matrici biologiche su cui effettuare le determinazioni analitiche potrà essere diversa da quella adottata per il monitoraggio dei soggetti adulti. Tranne che nei casi in cui il prelievo di sangue sia fortemente giustificato dalla maggiore affidabilità dell'indicatore e dalla gravità del rischio associato con l'esposizione, come nel caso dell'esposizione a Pb, nei soggetti in età pediatrica sono adottati di preferenza altri tipi di campioni biologici, per esempio capelli e altri annessi cutanei, urine, saliva o denti decidui. Per la valutazione dell'esposizione prenatale, oltre al sangue del cordone ombelicale, potranno essere analizzate altre matrici biologiche, quali placenta, meconio o liquido amniotico.

Alla scelta delle diverse tipologie di matrici sono associate problematiche relative alle modalità di prelievo, di conservazione, di analisi, di standardizzazione e di interpretazione dei dati. Alcuni dei vantaggi e degli svantaggi associati con l'utilizzo di questi campioni biologici nello studio delle coppie madre-feto/neonato sono sintetizzati nella Tabella 3 e 4.

Tabella 3. Matrice biologica materna utilizzata per la stima dell'esposizione fetale e neonatale

Matrice biologica materna	Pro	Contro
<i>Urine</i>	<ul style="list-style-type: none"> - matrice disponibile in quantità adeguata - relativamente facile da ottenere 	<ul style="list-style-type: none"> - la raccolta richiede cooperazione - necessita di standardizzazione
<i>Capelli</i>	<ul style="list-style-type: none"> - relativamente facile da ottenere - può dare indicazioni sulla finestra di esposizione - rappresenta una misura dell'esposizione integrata a lungo termine 	<ul style="list-style-type: none"> - la raccolta richiede cooperazione - il prelievo può essere non gradito - richiede speciali tecniche di prelievo - può richiedere speciali tecniche analitiche
<i>Latte</i>	<ul style="list-style-type: none"> - relativamente facile da ottenere - può dare indicazioni sull'esposizione pregressa materna e su quella potenziale neonatale - rappresenta una misura della dose interna e di tutte le vie e le sorgenti di esposizione 	<ul style="list-style-type: none"> - la raccolta richiede cooperazione - richiede precauzioni durante il prelievo
<i>Sangue/Siero/Plasma</i>	<ul style="list-style-type: none"> - matrice più facile da analizzare per alcune tipologie di contaminanti (es metalli) - è in equilibrio con i compartimenti dove la "dose" raggiunge la sua efficacia biologica 	<ul style="list-style-type: none"> - la raccolta del sangue è un atto medico invasivo; comporta dolore; può comportare effetti avversi (emorragia, abrasione, infezione, ematoma)
<i>Saliva</i>	<ul style="list-style-type: none"> - matrice relativamente facile da ottenere in quantità adeguata 	<ul style="list-style-type: none"> - richiede cooperazione - la concentrazione dei contaminanti può fluttuare nell'arco del giorno - la matrice deve essere congelata prima dell'analisi per ridurre la viscosità dovuta alle proteine

Tabella 4. Matrice biologica neonatale utilizzata per la stima dell'esposizione fetale e neonatale

Matrice biologica neonatale	Pro	Contro
Sangue cordonale	<ul style="list-style-type: none"> - matrice disponibile in quantità adeguata - è in equilibrio con i compartimenti dove la "dose" raggiunge la sua efficacia biologica 	<ul style="list-style-type: none"> - intervallo temporale utile per la raccolta del campione molto breve - per alcune sostanze chimiche fornisce in larga misura una stima dell'esposizione nella seconda metà del terzo trimestre di gravidanza (es hg)
Placenta	<ul style="list-style-type: none"> - matrice disponibile in quantità adeguata 	<ul style="list-style-type: none"> - intervallo temporale utile per la raccolta del campione molto breve - per alcune sostanze chimiche (sostanze trattenute, per es cd) fornisce in larga misura una stima dell'esposizione materna in gravidanza; per altre, per es pb e mercurio organico, fornisce una misura dell'esposizione materno/fetale, a partire dal primo trimestre di gravidanza
Liquido amniotico	<ul style="list-style-type: none"> - matrice disponibile in quantità adeguata - rappresenta una risorsa unica per la misura dell'esposizione cumulativa durante una fase critica per lo sviluppo fetale 	<ul style="list-style-type: none"> - la raccolta è un atto medico invasivo - intervallo temporale utile per la raccolta del campione relativamente breve (tra la 15a e la 20a settimana)
Urine	<ul style="list-style-type: none"> - esame non invasivo 	<ul style="list-style-type: none"> - il prelievo richiede l'uso di bustine monouso autoadesive applicate previo lavaggio genitale - necessita di standardizzazione
Capelli	<ul style="list-style-type: none"> - rappresenta una misura dell'esposizione integrata a lungo termine - può dare indicazioni sulla finestra di esposizione 	<ul style="list-style-type: none"> - può non essere disponibile - il prelievo può essere non gradito dai genitori - richiede speciali tecniche di prelievo - può richiedere speciali tecniche analitiche
Meconio	<ul style="list-style-type: none"> - facile da ottenere - fornisce informazioni sull'esposizione cumulativa del feto 	<ul style="list-style-type: none"> - necessita di standardizzazione
Sangue/Siero/Plasma	<ul style="list-style-type: none"> - matrice più facile da analizzare per alcune tipologie di contaminanti (es metalli) - è in equilibrio con i compartimenti dove la "dose" raggiunge la sua efficacia biologica 	<ul style="list-style-type: none"> - la raccolta del sangue è un atto medico invasivo; comporta dolore e stress; può comportare effetti avversi (emorragia, abrasione, infezione, ematoma)

Nei punti seguenti viene discusso in dettaglio l'utilizzo di alcuni tipi di matrice.

– *Urine*

Rappresentano un materiale ideale per la relativa facilità della raccolta dei campioni, l'alta concentrazione di analiti e la quantità di campione disponibile. D'altro canto la raccolta delle urine di soggetti in età pediatrica, che non abbiano ancora raggiunto il pieno controllo della funzione vescicale, richiede dispositivi speciali. Un altro svantaggio è la variabilità della minzione. I fattori che influenzano l'emissione di urine sono numerosi, per es. acqua, urea, sali, peso specifico e osmolalità. Pertanto la concentrazione di sostanze tossiche o di metaboliti può variare anche quando la dose interna rimane costante. Per questa ragione, o vengono eseguite analisi sulle urine delle 24 ore, oppure, nel caso in cui siano raccolte urine estemporanee o urine del primo mattino (per campioni più concentrati), occorre correggerne la concentrazione utilizzando il peso specifico o la concentrazione della creatinina. Tuttavia, in età pediatrica l'escrezione di creatinina, oltre che essere minore, in quanto correlata alla massa muscolare, è soggetta a una più ampia variabilità che nei soggetti adulti. Di conseguenza, il confronto fra le concentrazioni urinarie di sostanze tossiche nei soggetti adulti e nei soggetti in età pediatrica può dar luogo a stime erranee o suscettibili di errori a causa dell'iper-correzione dei campioni provenienti da questi ultimi. I dati della letteratura scientifica indicano che le urine sono state utilizzate, in associazione con altre matrici, anche in studi su soggetti in età neonatale (51) ai fini dell'esposizione a metalli (51, 52), idrocarburi policiclici aromatici (52), fumo di tabacco (52) insetticidi organofosforici (52-54), ftalati (52, 55, 56), fitoestrogeni (52), pesticidi organoclorurati (52), carbammati (52), erbicidi (52), repellenti per insetti e disinfettanti (52).

– *Denti decidui*

L'impiego dei denti decidui come materiale per il monitoraggio biologico è un esempio di utilizzo specifico per l'età pediatrica. Il campione può essere ottenuto senza disagi per il soggetto, ma è limitato a una fascia di età definita e richiede la pianificazione dell'attività. Numerosi studi hanno dimostrato l'utilità di questo *biomarker* per la valutazione dell'esposizione al Pb nei bambini (57-60). Il dosaggio del Pb, che si accumula nella dentina, rappresenta un *biomarker* di esposizione cumulativa. Il contenuto di Pb nei denti decidui è proporzionale direttamente con i livelli di Pb nel sangue (60), ma allorché l'esposizione al Pb della popolazione sia stabile nel tempo (57), e inversamente agli indicatori di sviluppo intellettuale, per es. il quoziente di intelligenza (57) (60).

– *Meconio*

Recentemente il meconio è stato utilizzato come matrice per potenziali *biomarker* di esposizione prenatale a sostanze di abuso o contaminanti ambientali persistenti quali metalli pesanti, pesticidi organoclorurati e organofosforici (61-63). Il meconio comincia ad accumularsi nell'intestino distale del feto a partire dalla sedicesima settimana di gestazione e in condizioni fisiologiche viene escreto dopo la nascita; si ritiene che i livelli di sostanze esogene misurati nel meconio riflettano l'esposizione fetale a partire dal secondo trimestre di gestazione e fino al parto. Il maggiore vantaggio di questo tipo di matrice è la facilità del prelievo e la totale assenza di invasività nella raccolta del campione. Il livello di metaboliti nel meconio è di molti ordini di grandezza superiore a quelli che generalmente si rilevano nel sangue del cordone ombelicale (in genere nanogrammi per litro) e prossimo a quelli rilevabili nelle urine degli adulti (64). Tuttavia, come nel caso delle urine, è necessario chiarire i meccanismi di escrezione delle sostanze esogene e/o di loro metaboliti nel meconio, per poter risalire al livello di esposizione, ed è

necessario standardizzare i risultati per il contenuto di acqua e definire i valori di riferimento.

– *Latte materno*

La raccolta del latte materno, oltre ad essere di gran lunga meno invasiva rispetto alla raccolta di campioni ematici o tissutali, generalmente non riduce significativamente la quantità di nutrimento da fornire al lattante (65). Il prelievo necessita della cooperazione materna e può richiedere il ricorso a pompe tiralatte manuali o, ancor meglio, elettriche. Nel latte si accumulano soprattutto sostanze liposolubili e/o persistenti nell'ambiente. Alcuni classi di composti sono ritenute prioritarie ai fini della sorveglianza e della ricerca sul latte umano: metalli pesanti, insetticidi, erbicidi, idrocarburi aromatici alogenati, ritardanti di fiamma, idrocarburi aromatici e alifatici, composti rilevanti ai fini dell'esposizione occupazionale (metotrexate, aflatoxina, glutaraldeide, alotano), ormoni (estrogeni, inclusi i fitoestrogeni, androgeni), antibiotici, prodotti per la cura della persona (idrossitoluene butilato, squalene, siliconi, Triclosan, composti dello Zn, ftalati) (66). Il latte fornisce pertanto un indice biologico di esposizione in quanto riflette la dose interna relativa a tutte le vie e le sorgenti di esposizione. Caratteristica unica del latte è quella di permettere la valutazione del rischio di due individui, la madre e il neonato. Inoltre il latte materno permette di determinare contemporaneamente sia l'esposizione a contaminanti, sia – attraverso la misura di potenziali *biomarker* di effetto (es. Lisozima, α -Lattalbumina, Catepsina-D – gli effetti conseguenti all'esposizione (65).

– *Liquido amniotico*

Di recente è stata valutata la possibilità di dosare sostanze chimiche potenzialmente tossiche nel liquido prelevato durante l'amniocentesi. Gli studi effettuati su varie sostanze – pesticidi organoclorurati e organofosforici, farmaci, sostanze d'abuso, fumo di tabacco attivo e passivo e metalli (49), PCB (67) e fitoestrogeni (68) – indicano che queste sostanze chimiche sono presenti nel liquido amniotico in quantità rivelabili, che confermano l'esposizione fetale. Questa matrice rappresenta una risorsa unica per valutare l'esposizione del feto in una fase precoce dello sviluppo (tra le 15 e le 20 settimane). Nel corso della gravidanza la composizione e il volume del liquido amniotico variano, a seguito dello sviluppo e della maturazione del feto e dei singoli organi. Si stabilisce anche un ricircolo delle sostanze escrete nel liquido amniotico, dovuto alla continua ingestione ed inalazione di liquido amniotico da parte del feto. Questo meccanismo costituisce anche una fonte di continua riesposizione del feto alle sostanze che hanno attraversato la placenta, anche a seguito di singole esposizioni puntuali.

– *Capelli*

L'analisi dei capelli (69, 57) è stata utilizzata in particolare per la determinazione degli elementi in traccia. Il vantaggio principale risiede nella semplicità e non invasività della raccolta del campione; inoltre l'analisi dei capelli con tecniche idonee può fornire informazioni temporali sull'esposizione. Il principale problema di questo tipo di matrice è tuttavia la difficoltà di distinguere tra le sorgenti endogene e quelle esogene delle sostanze chimiche di interesse (es. metalli tossici). Inoltre, tranne che per il metilmercurio, non sono stati fissati livelli critici per le concentrazioni di sostanze tossiche nei capelli, e sono pochi i dati disponibili come valori di riferimento per le popolazioni pediatriche (es. alcuni metalli) (70). Per quanto riguarda i metalli, le evidenze finora raccolte indicano che la determinazione del contenuto di Al nei capelli non fornisce informazioni utili, mentre quella di As inorganico e Cd può essere utile solo come metodo di screening per larghe fasce di popolazione. Viceversa, il dosaggio del Pb nei capelli si è

dimostrato un indicatore più affidabile, come metodo di screening, anche in piccoli gruppi di bambini. La concentrazione di Hg nei capelli è considerata il migliore *biomarker* di esposizione a metilmercurio, tenendo conto sia della tossicocinetica che di considerazioni pratiche, mentre ha minore rilevanza per l'esposizione ad altri composti del mercurio. L'esposizione al fumo passivo può essere stimata in modo affidabile attraverso la determinazione della nicotina e/o della cotinina nei capelli (71-73).

– *Saliva*

Rappresenta una matrice facile da raccogliere, anche se la sua raccolta richiede collaborazione; si tratta di un fluido biologico di composizione relativamente semplice rispetto ad altri fluidi quali urine e sangue. Le quantità ottenibili nei soggetti in età pediatrica possono essere relativamente modeste. Il suo impiego è stato validato per il dosaggio di indicatori di esposizione al fumo (cotinina). Al contrario, l'applicazione dell'analisi della saliva in alcuni studi su popolazioni pediatriche per la valutazione dell'esposizione a Hg (74) e Pb (75), in confronto con le determinazioni degli stessi metalli eseguite su campioni di urina, sangue e capelli, ha indicato che nella saliva le concentrazioni di Hg e di Pb erano troppo basse per essere utili (al di sotto del limite di rivelazione rispettivamente nel 70% e nell'89% dei campioni).

– *Sangue cordonale*

L'esame del sangue cordonale è stato utilizzato in una serie di studi volti a caratterizzare l'esposizione a vari contaminanti tra cui Bisfenolo A (76, 77), metilmercurio (78), Pb (79), e PCB (79, 80). Il prelievo costituisce un'operazione semplice e rapida, che non procura alcun rischio e sofferenza al neonato, perché avviene quando il cordone è già stato reciso. Il prelievo consiste nell'aspirare il sangue dal cordone ombelicale per poi raccogliarlo in contenitori idonei. In genere i campioni sono raccolti in sacche sterili in quanto il sangue del cordone è ricco di cellule staminali, le stesse del midollo osseo, che stanno trovando largo impiego nella clinica. Per alcune sostanze chimiche, per es. Hg, l'esame del sangue cordonale fornisce in larga misura una stima dell'esposizione materna nella seconda metà del terzo trimestre di gravidanza (79).

– *Sangue e derivati*

Il prelievo del sangue venoso è un atto medico invasivo, che comporta dolore e può comportare effetti avversi (emorragia, abrasione, infezione, ematoma). Tuttavia quasi ogni neonato nei paesi sviluppati viene sottoposto a prelievo di sangue, attraverso la puntura del tallone, per lo screening delle malattie metaboliche (es. fenilchetonuria). Nei bambini il dolore causato dal prelievo del sangue può essere associato a un brusco peggioramento comportamentale e fisiologico (81). La matrice sangue, nonché il siero e il plasma, risultano essere più facili da analizzare per alcune tipologie di contaminanti (es. metalli). Inoltre, in generale il fluido biologico sangue è in equilibrio con i compartimenti dove la "dose" raggiunge la sua efficacia biologica. Per alcune tipologie espositive – quali l'esposizione a diossine e PCB – il sangue e i suoi derivati rappresentano i fluidi biologici di elezione (52).

– *Placenta*

La placenta viene largamente utilizzata ai fini del monitoraggio dell'esposizione a sostanze tossiche organiche e inorganiche (51, 82-85). Al momento del parto, la placenta – un organo temporaneo formato da tessuti di origine sia materna che fetale, e che nello stesso tempo connette e separa due organismi geneticamente distinti (85) – è disponibile in quantità adeguata: il suo peso medio è infatti circa 500 g (82). Per alcune sostanze chimiche (sostanze trattenute, per esempio Cd) fornisce in larga misura una stima

dell'esposizione materna in gravidanza; per altre, per esempio Pb e mercurio organico, fornisce una misura dell'esposizione materno/fetale, a partire dal primo trimestre di gravidanza (83, 86).

Valori di riferimento e valori limite

La definizione degli intervalli di riferimento, per qualsiasi *biomarker* utilizzato nelle prime fasi della vita, pone problemi particolari associati con: a) la grande variabilità interindividuale nelle varie fasce di età comprese tra il periodo prenatale e i 18 anni di età; b) le difficoltà legali ed etiche di ottenere campioni biologici da popolazioni sane e non esposte che possano costituire un valido riferimento. Indipendentemente dalla tipologia espositiva, mentre sono stati ottenuti dati sull'esposizione della popolazione generale di età pediatrica negli USA per molte classi di composti chimici (metalli, idrocarburi policiclici aromatici, fumo di tabacco, insetticidi organofosforici, ftalati, fitoestrogeni, pesticidi organoclorurati, carbammati, erbicidi, repellenti per insetti e disinfettanti) (52), i dati disponibili per l'Italia sono relativi solo ad alcune classi di contaminanti, quali per esempio pesticidi nelle urine (87), benzene nelle urine (88), e metalli pesanti quali il piombo nel sangue (89). Molti degli studi eseguiti in Italia, in popolazioni di età pediatrica, riguardano campioni di popolazione rappresentativi di realtà locali o con differenti livelli di esposizione ambientale a contaminanti quali il piombo (90).

La definizione dei valori di riferimento deve tener conto delle variazioni temporali nei livelli di esposizione. Per esempio, in Italia, in concomitanza con la diminuzione dell'esposizione al piombo, tra il 1985 e il 1996 è stata osservata una diminuzione tra il 46,8% e il 48,2% nei livelli di piombemia fra i soggetti di età inferiore a 15 anni (89).

Anche quando i valori di riferimento possono essere stabiliti, per un'effettiva gestione del rischio è necessario disporre di valori soglia di allarme e di valori limite, definiti in base al rischio stimato di conseguenze dannose per la salute. Tali valori, non ancora stabiliti per la maggior parte dei contaminanti, sono stati invece definiti per quanto riguarda l'esposizione al piombo. Il *Center for Disease Control and Prevention* USA (CDC) ha stabilito dei precisi criteri, fondati sul dosaggio del piombo nel sangue, in base ai quali: a) seguire nel tempo i soggetti esposti (soggetti con livelli di Pb nel sangue >10 µg/dl) anche effettuando controlli ripetuti dei livelli ematici del piombo; b) effettuare delle bonifiche degli ambienti di vita; c) mettere in atto dei veri e propri interventi terapeutici (91). Nella Repubblica Federale Tedesca, la *Commission on Human Biological Monitoring* (HBM) ha stabilito dei livelli di allarme (HBM 1 value) e dei livelli di azione (HBM 2 value) nei bambini per il piombo nel sangue, il mercurio nelle urine e nel sangue e il pentaclorofenolo nel siero e nelle urine (92). L'HBM 1 corrisponde alla concentrazione di una sostanza tossica in un campione di origine umana al di sotto della quale non vi è il rischio di effetti negativi per la salute nei soggetti della popolazione generale; l'HBM 2 rappresenta la concentrazione di una sostanza tossica in un campione di origine umana al di sopra della quale vi è un rischio aumentato per la salute in individui suscettibili della popolazione generale (92).

Problemi etici relativi al trattamento e all'utilizzo dei dati

I programmi di monitoraggio biologico e gli studi di epidemiologia ambientale presentano implicazioni di tipo sociale, etico e legale che richiedono cautela nella pianificazione e

nell'esecuzione delle attività. A tali aspetti connessi con il monitoraggio biologico nei soggetti in età pediatrica, ampio spazio è dedicato nel Progetto SCALE sopra descritto. Uno degli obiettivi finali del progetto è quello di stabilire uno standard europeo su come gestire, nell'ambito degli studi di biomonitoraggio, gli aspetti sociali, etici e legali. In particolare i temi di maggiore rilevanza sono: il consenso informato, la gestione dei campioni biologici, il trattamento dei dati e la comunicazione dei risultati (34). Gli studi epidemiologici, valutativi e medico sociali che richiedono la raccolta di dati personali devono essere approvati da un comitato etico. Anche l'ISS è dotato di un Comitato etico che ha il compito di fornire consulenze e pareri sugli aspetti etici delle attività dell'ISS (<http://www.iss.it/sitp/coet/>).

Per quanto concerne il consenso informato, l'arruolamento dei soggetti in studi di epidemiologia molecolare deve essere libero e basato sul consenso scritto da parte del titolare del diritto: nel caso dei minori, del genitore o del tutore. Deve essere garantita la possibilità che il titolare del diritto decida per la non partecipazione o per il ritiro dallo studio anche dopo che lo studio sia iniziato.

Per quanto riguarda la gestione dei campioni, devono essere utilizzate delle rigorose procedure, adeguatamente documentate, in merito alla raccolta, al trasporto, alla conservazione, all'analisi e all'eliminazione dei campioni biologici di origine umana. Durante tutte le fasi del processo deve essere attuata una adeguata "catena di custodia" che garantisca la tracciabilità del campione all'individuo donatore dello stesso.

Nella cultura giuridica italiana l'assunto secondo cui la privacy costituisce un diritto e come tale debba essere tutelato dall'ordinamento, è piuttosto recente. Dopo un lungo dibattito, l'Italia dapprima con la legge 31 dicembre 1996 n. 675 sulla "Tutela delle persone e di altri soggetti rispetto al trattamento dei dati personali" (93) e successivamente col DL.vo 30 giugno 2003, n. 196 (94) (che ha abrogato tutta la normativa precedente) ha ribadito e dato concreta attuazione, per quanto concerne il problema della protezione dei dati personali, ai principi di uguaglianza e dignità sociale alla base della nostra Costituzione permettendo ai cittadini il diritto di controllare i propri dati personali e imponendo regole di comportamento a tutti coloro che effettuano operazioni sui medesimi dati. Nello specifico, i dati personali idonei a rivelare lo stato di salute di un individuo sono definiti, nell'art. 4 del DL.vo 196/2003 "dati sensibili" e come tali, nel successivo art. 26 ("Garanzie per i dati sensibili") "possono essere oggetto di trattamento solo con il consenso scritto dell'interessato e previa autorizzazione del Garante, nell'osservanza dei presupposti e dei limiti stabiliti dal presente codice, nonché dalla legge e dai regolamenti" (94). La giusta imposizione di norme e regole, atte a tutelare la riservatezza della persona umana, parvero ad alcuni nella prima fase di entrata in vigore della legge 675/1996 in contrasto con le esigenze di celerità, di urgenza, di garanzia di salute del paziente e quasi una inutile aggiunta alle già numerose incombenze di carattere burocratico che toccavano agli operatori sanitari. Gradualmente il senso della legge sulla privacy è stato, tuttavia, compreso e sono state attuate importanti modifiche. Per quanto riguarda la "previa autorizzazione del Garante", con successivo dispositivo emanato in data 30 giugno 2004 (95), il Garante per la protezione dei dati personali ha autorizzato una serie di soggetti, tra cui "gli organismi sanitari pubblici, istituiti anche presso università", al trattamento dei dati idonei a rivelare lo stato di salute. In merito al consenso informato – nell'ambito delle "ricerche scientifiche finalizzate alla tutela della salute della collettività in campo, medico, biomedico ed epidemiologico" (95) – esso deve essere necessariamente acquisito e il "trattamento successivo alla raccolta dei dati non deve permettere di identificare gli interessati anche indirettamente, salvo che l'abbinamento al materiale di ricerca dei dati identificativi dell'interessato sia temporaneo ed essenziale per il risultato della ricerca, e sia motivato, altresì, per iscritto" (95). Nel Codice di deontologia e di buona condotta per i trattamenti di dati personali per scopi statistici e scientifici sottoscritto il 13 maggio 2004 dalla Conferenza dei Rettori delle Università Italiane e da numerose società scientifiche italiane,

è precisato che i risultati della ricerca non possono essere diffusi se non in forma anonima (<http://www.garanteprivacy.it/garante/doc.jsp?ID=1002448>). Le regole generali per il trattamento dei dati sono elencate nel Titolo III del DL.vo 196/2003 (94). Considerazioni etiche devono essere tenute presenti in particolare quando non possa essere definita chiaramente una relazione tra il *biomarker* e l'effettivo rischio per la salute. Tali considerazioni valgono in particolare nel caso di studi su popolazioni pediatriche, se le relazioni stabilite tra i *biomarker* e gli effetti sulla salute per le popolazioni di adulti non siano state confermate e specialmente nei casi in cui gli effetti negativi possano manifestarsi dopo un lungo periodo di latenza (96). Particolare attenzione deve essere posta alla gestione dei dati ottenuti in studi correlati a *biomarker* di suscettibilità in età pre- e postnatale, per la possibilità che l'esito di tali studi possa comportare discriminazioni nei confronti del soggetto esaminato o dei suoi familiari.

Conclusioni

Al fine della definizione di limiti di accettabilità o di tollerabilità per le sostanze chimiche presenti negli alimenti e nell'ambiente, la valutazione del rischio deve tenere conto della necessità di proteggere in primo luogo i gruppi di popolazione più vulnerabili e suscettibili di danni permanenti alla salute.

L'impiego di *biomarker*, opportunamente caratterizzati e validati, è un potente strumento per acquisire informazioni obiettive sull'entità dell'esposizione e sui suoi possibili effetti.

Lo sviluppo di strategie di monitoraggio biologico, anche nell'ambito di studi di epidemiologia molecolare, e la ricerca di nuovi *biomarker* applicabili nelle prime fasi della vita è attualmente oggetto di un'intensa ricerca e armonizzazione a livello europeo (34). L'esperienza acquisita in Italia e in Europa nel campo della Medicina del lavoro è un patrimonio che dovrebbe trovare una giusta collocazione nell'ambito delle attività di biomonitoraggio in età neonatale e infantile.

Tra gli aspetti che necessitano di ulteriore approfondimento vanno segnalati:

1. la creazione di una banca dati, possibilmente di dimensione europea, in merito alle attività di biomonitoraggio in età pediatrica già svolte e in corso;
2. la valutazione, da parte di gruppi di esperti indipendenti, delle evidenze scientifiche al fine di stabilire: a) il legame fra l'esposizione a contaminanti e il verificarsi di alterazioni dello sviluppo o di condizioni patologiche conclamate; b) identificare le popolazioni di bambini che presentano livelli di esposizione elevati e stabilire raccomandazioni sulla valutazione e la gestione del rischio;
3. la definizione, per contaminanti critici, di programmi di biomonitoraggio da applicare a coorti di coppie madre-neonato; tali programmi devono essere basati, per quanto possibile, su metodiche non invasive;
4. stabilire a livello europeo delle linee guida in merito agli aspetti sociali, etici e legali connessi col monitoraggio biologico nell'infanzia;
5. la necessità di prevedere attività di formazione specifica, sui temi della prevenzione e dell'analisi del rischio, da rivolgere agli operatori sanitari che svolgono la loro attività a stretto contatto con i soggetti in età pediatrica; tale attività potrebbe favorire lo sviluppo di un approccio multidisciplinare alla valutazione dell'effetto dei contaminanti sulla salute.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano il dott. Carlo Petrini, responsabile dell'Unità di Bioetica del Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute, per la fattiva collaborazione nella revisione del testo.

Bibliografia

1. International Programme on Chemical Safety (IPCS). Commission of The European Communities. *Principles for evaluating health risks from chemicals during infancy and early childhood: the need for a special approach*. Geneva: WHO; 1986. Disponibile all'indirizzo: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc59.htm>; ultima consultazione 22/12/05.
2. Careddu P, Chiumello G, Marini A, Sereni F (Ed.). *Schwarz-Tiene Manuale di Pediatria*. Milano: CEA Casa Editrice Ambrosiana; 1993.
3. Oskarsson A, Palminger Hallén I, Sundberg J, Petersson Grawé K. Risk assessment in relation to neonatal metal exposure. *Analyst* 1998;123:19-23.
4. Aggett PJ. Aspects of neonatal metabolism of trace elements. *Acta Paediatr Suppl* 1994;402:75-82.
5. Kurz H, Mauser-Ganshorn A, Stickel HH. Differences in the binding of drugs to plasma proteins from newborn and adult man. I. *Eur J Clin Pharmacol* 1977;11:463-7.
6. Kurz H, Mickels H, Stickel HH. Differences in the binding of drugs to plasma proteins from newborn and adult man. II. *Eur J Clin Pharmacol* 1977;11:469-72.
7. Notarianni LJ. Plasma protein binding of drugs in pregnancy and in neonates. *Clin Pharmacokinet* 1990;18:20-36.
8. Besunder JB, Reed MD, Blumer JL. Principles of drug biodisposition in the neonate: a critical evaluation of the pharmacokinetic-pharmacodynamic interface (Part I). *Clin Pharmacokinet* 1988;14:189-216.
9. Besunder JB, Reed MD, Blumer JL. Principles of drug biodisposition in the neonate: a critical evaluation of the pharmacokinetic-pharmacodynamic interface (Part II). *Clin Pharmacokinet* 1988;14:261-86.
10. Nielsen E, Thorup I, Schnipper A, Hass U, Meyer O, Ladefoged O, Larsen J, Østergaard G, Larsen PB. *Children and unborn child. Exposure and susceptibility to chemical substances, an evaluation*. Danish Environmental Protection Agency. Environmental Project No. 589, Miljøstyrelsen, 2001.
11. Marcus AH. Testing alternative nonlinear kinetic models in compartmental analysis. In: Eisenfeld J, DeLisi C. (Ed.). *Mathematics and Computers in Biomedical Applications*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland; 1985. p. 259-67.
12. EPA. *Guidance manual for site-specific use of the USEPA lead model*. Washington DC: Environmental Protection Agency; 1991.
13. O'Flaherty EJ. Physiologically based models for bone-seeking elements. IV. Kinetics of lead disposition in humans. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993;118:16-29.
14. Leggett RW. An age-specific kinetic model for lead metabolism in humans. *Environ Health Perspect* 1993;101:598-616.
15. Health Council of the Netherlands. *Pesticides in food: assessing the risk to children*. The Hague: Health Council of the Netherlands (publication n. 2004/11); 2004;.

16. Lauwerys R, Buchet JP, Roels H, Hubermont G. Placental transfer of lead, mercury, cadmium, and carbon monoxide in women. I. Comparison of the frequency distributions of the biological indices in maternal and umbilical cord blood. *Environ Res* 1978;15(2):278-90.
17. Rabinowitz MB, Needleman HL. Temporal trends in the lead concentrations of umbilical cord blood. *Science* 1982;216(4553):1429-31.
18. International Programme on Chemical Safety (IPCS). *Cadmium. Environmental Health Criteria 134*. Geneva: WHO; 1992.
19. Lyon TD, Patriarca M, Howatson G, Fleming PJ, Blair PS, Fell GS. Age dependence of potentially toxic elements (Sb, Cd, Pb, Ag) in human liver tissue from paediatric subjects. *J Environ Monit* 2002;4(6):1034-9.
20. Landsberger S, Larson S, Wu D. Determination of airborne cadmium in environmental tobacco smoke by instrumental neutron activation analysis with a compton suppression system. *Anal Chem* 1993;65(11):1506-9.
21. World Health Organization. *Air quality guidelines for Europe*. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 1987.
22. World Health Organization. *Updating and revision of quality guidelines for Europe*. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 1994.
23. GEMS/Food. Global Environment Monitoring System-Food Contamination Monitoring and Assessment Programme. *Lists of priority contaminants and commodity combinations* Geneva: WHO, Food Safety Department; 2003. Disponibile all'indirizzo: http://euro.who.int/foodsafety/chemical/20020816_7; ultima consultazione 19/12/05.
24. Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization. *Summary of Evaluations Performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA 1956-2003) (First through sixty-first meetings)*. Internet Edition, FAO/WHO; 2004. Disponibile all'indirizzo: <http://jecfa.ilsa.org/index.htm>; ultima consultazione 19/12/05.
25. World Health Organization/International Atomic Energy Agency. *Minor and trace elements in breast milk*. Geneva: WHO; 1989.
26. Krachler M, Rossipal E, Irgolic KJ. Trace elements in formulas based on cow and soy milk and in Austrian cow milk determined by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Biol Trace Elem Res* 1998;65:53-74.
27. Garg AN, Weginwar RG, Chutke NL. Radiochemical neutron activation analysis of Fe, Co, Zn, Sb and Se in biomedical and environmental samples. *Sci Total Environ* 1993;139-140:421-30.
28. Directorate-General Health and Consumer Protection. *Assessment of the dietary exposure to arsenic, cadmium, lead and mercury of the population of the EU Member States*. Reports on tasks for scientific cooperation. March 2004. Disponibile all'indirizzo: http://europa.eu.int/comm/food/food/chemicalsafety/contaminants/scoop_3-2-11_heavy_metals_report_en.pdf; ultima consultazione 19/12/05.
29. Lepow ML, Bruckman L, Rubino RA, Markowitz S, Gillette M, Kapish J. Role of airborne lead in increased body burden of lead in Hartford children. *Environ Health Perspect* 1974;7:99-102.
30. Davies DJA, Thornton I, Watt JM, Culbard EB, Harvey PG, Delves HT, Sherlock JC, Smart GA, Thomas JFA, Quinn MJ. Lead intake and blood lead in two-year-old U.K. urban children. *Sci Total Environ* 1990;90:13-29.
31. Hunt A, Johnson DL, Thornton I, Watt JM. Apportioning the sources of lead in house dusts in the London borough of Richmond, England. *Sci Total Environ* 1993;138(1-3):183-206.

32. Menditto A, Chiodo F, Palleschi S, Rossi B, Minoprio A, Mosca M e Patriarca M. Il ruolo del monitoraggio biologico nella valutazione del rischio da composti chimici. *Ann Ist Super San* 1999;35(2):145-51.
33. Nordberg M, Duffus JH, Templeton DM. Glossary of terms used in toxicokinetics. *Pure Appl Chem* 2004;76(5):1033-82.
34. Technical Working Group on Integrated Monitoring, subgroup "Biomonitoring of children". *Report on an Action Plan and Options for Action for "Biomonitoring of Children" in the framework of the European Environment and Health Strategy*. (COM(2003)338 final), 30 March 2004. Disponibile all'indirizzo: http://europa.eu.int/comm/environment/health/c_forum_march2004/biomonitoring.pdf; ultima consultazione 19/12/05.
35. Miraglia N, Assennato G, Clonfero E, Fustanoni S, Cannolo N. Indicatori di dose biologicamente efficace. *G Ital Med Lav Erg* 2004;26(4):298-301.
36. Grandjean P. Biomarkers in Epidemiology. *Clin Chem* 1995;41:1800-3.
37. Donato F, Gelatti U. L'impiego dei marcatori biologici per lo studio e la prevenzione delle malattie cronico degenerative. Pt. 1. Definizione, ambito di studio e classificazione. *Ann Ig* 1998;10:235-47.
38. Costa LG, Lovreglio P, Vitalone A, Soleo L. Ruolo del polimorfismo genetico nella valutazione del rischio. *G Ital Med Lav Erg* 2003;25(3):320-27.
39. Boffetta P. Molecular epidemiology. *J Intern Med* 2000;248:447-54.
40. International Programme on Chemical Safety (IPCS). *Biomarkers in risks assessment: Validity and Validation. Environmental Health Criteria 222*. Geneva: WHO; 2001.
41. EURACHEM. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. 1998. Disponibile all'indirizzo: <http://www.eurachem.ul.pt/guides/valid.pdf>; ultima consultazione 19/12/05.
42. Traduzione italiana a cura di Patriarca M, Chiodo F, Corsetti F, Rossi B, Menditto A, Segà M, Plassa M. *Quantificazione dell'incertezza nelle misure analitiche. Seconda edizione (2000) della Guida EURACHEM / CITAC CG4*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2003. (Rapporti ISTISAN 03/30).
43. Fustinoni S, Soleo L, Warholm M, Begemann P, Rannug A, Neumann HG, Swenberg JA, Vimercati L, Foà V, Colombi A. Influence of metabolic genotypes on biomarkers of exposure to 1,3-butadiene in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:1082-90.
44. Colombi A, Buratti M, Rubino FM, Giampiccolo R, Pulvirenti S, Brambilla G. Evoluzione della tossicologia industriale tra dosi effimere e genoma umano. *La Medicina del Lavoro* 2003;94(1):69-82.
45. De Risi J, Iyer V, Brown P. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 1997;278:680-6.
46. Heller RA, Schena M, Chai A, Shalon D, Bedilion T, Gilmore J, Woolley DE, Davis RW. Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. *Proc Nat Acad Sci USA* 1997;94:2150-5.
47. International Programme on Chemical Safety (IPCS). *Biomarkers and risks assessment: Concepts and Principles. Environmental Health Criteria 155*. Geneva: WHO; 1993. Disponibile all'indirizzo: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc155.htm>; ultima consultazione 22/12/05.
48. Menditto A, Palleschi S, Minoprio A, Rossi B, Calibotti A, Chiodo F, Patriarca M. Quality assurance of biological monitoring of urban pollutants: from reference materials to external quality assessment schemes. *Microchemical Journal* 2000;67:313-31.

49. Bradman A, Barr DB, Henn BGC, Drumheller T, Curry C, Eskenazi B. Measurement of pesticides and other toxicants in amniotic fluid as a potential biomarker of prenatal exposure: a validation study. *Environ Health Perspect* 2003;111(14):1779-82.
50. Istituto Nazionale di Statistica. *Indagine multiscopio sulle famiglie "Condizioni di salute e ricorso ai servizi sanitari", anni 1999-2000*. Roma: ISTAT; 2002.
51. Odland JO, Nieboer E, Romanova N, Thomassen Y. Elements in placenta and pregnancy outcome in arctic and subarctic areas. *Int J Circumpolar Health* 2004;63(2):169-87.
52. Centers for Disease Control. *CDC's Third National Report on human exposure to environmental chemicals: Background*. Disponibile all'indirizzo: <http://www.cdc.gov/exposurereport>; ultima consultazione 27/12/05.
53. Clark JM, Bing-Canar J, Renninger S, Dollhopf R, El-Zein J, Star D, Zimmerman D, Anisuzzaman A, Boylan K, Tomaszewski T, Pearce K, Yacovac R, Erlwein B, Ward J. Methyl parathion in residential properties: relocation and decontamination methodology. *Environ Health Perspect* 2002;110(Suppl 6):1061-70
54. Lambert WE, Lasarev M, Muniz J, Scherer J, Rothlein J, Santana J, McCauley L. Variation in organophosphate pesticide metabolites in urine of children living in agricultural communities. *Environ Health Perspect* 2005;113(4):504-8.
55. Koch HM, Preuss R, Drexler H, Angerer J. Exposure of nursery school children and their parents and teachers to di-n-butylphthalate and butylbenzylphthalate. *Int Arch Occup Environ Health* 2005;78(3):223-9.
56. Silva MJ, Barr DB, Reidy JA, Malek NA, Hodge CC, Caudill SP, Brock JW, Needham LL, Calafat AM. Urinary levels of seven phthalate metabolites in the U.S. population from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2000. *Environ Health Perspect* 2004;112(3):331-8.
57. Borella P, Sturloni N, Rovesti S, Vivoli R, Bargellini A, Vivoli G. Valutazione del rischio di danno neuropsicologico per esposizione al piombo nell'infanzia. *Ann Ist Super Sanità* 1998;34(1):97-104.
58. Gomes VE, Rosario de Sousa Mda L, Barbosa F Jr, Krug FJ, Pereira Saraiva Mda C, Cury JA, Gerlach RF. In vivo studies on lead content of deciduous teeth superficial enamel of preschool children. *Sci Total Environ* 2004;320(1):25-35.
59. Rahman A, Yousuf FA. Lead levels in primary teeth of children in Karachi. *Ann Trop Paediatr* 2002;22(1):79-83.
60. McMichael AJ, Baghurst PA, Vimpani GV, Wigg NR, Robertson EF, Tong S. Tooth lead levels and IQ in school-age children: the Port Pirie Cohort Study. *Am J Epidemiol* 1994;140(6):489-99.
61. Wessels D, Barr DB, Mendola P. Use of biomarkers to indicate exposure of children to organophosphate pesticides: implications for a longitudinal study of children's environmental health. *Environ Health Perspect* 2003;111(16):1939-46.
62. Chan D, Caprara D, Blanchette P, Klein J, Koren G. Recent developments in meconium and hair testing methods for the confirmation of gestational exposures to alcohol and tobacco smoke. *Clin Biochem* 2004;37(6):429-38.
63. Whyatt RM, Barr DB. Measurement of organophosphate metabolites in postpartum meconium as a potential biomarker of prenatal exposure: a validation study. *Environ Health Perspect* 2001;109(4):417-20.
64. Ostrea EM, Morales V, Ngoumgna E, Prescilla R, Tan E, Hernandez E, Baens Ramirez G, Cifra HL, Manlapaz ML. Prevalence of Fetal Exposure to Environmental Toxins as Determined by Meconium Analysis. *NeuroToxicology* 2002;23:329-339.

65. Diehl-Jones WL, Bols NC. Use of response biomarkers in milk for assessing exposure to environmental contaminants: the case for dioxin-like compounds. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2000;3(2):79-107.
66. Berlin CM Jr, Kacew S, Lawrence R, LaKind JS, Campbell R. Criteria for chemical selection for programs on human milk surveillance and research for environmental chemicals. *J Toxicol Environ Health A* 2002;65(22):1839-51.
67. Foster W, Chan S, Platt L, Hughes C. Detection of endocrine disrupting chemicals in samples of second trimester human amniotic fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(8):2954-7.
68. Foster WG, Chan S, Platt L, Hughes CL Jr. Detection of phytoestrogens in samples of second trimester human amniotic fluid. *Toxicol Lett* 2002;129(3):199-205.
69. Wilhelm M, Idel H. Hair analysis in environmental medicine. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 1996;198(6):485-501.
70. Hoffmann K, Becker K, Friedrich C, Helm D, Krause C, Seifert B. The German Environmental Survey 1990/1992 (GerES II): cadmium in blood, urine and hair of adults and children. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2000;10(2):126-35.
71. Al-Delaimy WK, Crane J, Woodward A. Passive smoking in children: effect of avoidance strategies, at home as measured by hair nicotine levels. *Arch Environ Health* 2001;56(2):117-22.
72. Groner J, Wadwa P, Hoshaw-Woodard S, Hayes J, Klein J, Koren G, Castile RG. Active and passive tobacco smoke exposure: a comparison of maternal and child hair cotinine levels. *Nicotine Tob Res* 2004;6(5):789-95.
73. Klein J, Koren G. Hair analysis, a biological marker for passive smoking in pregnancy and childhood. *Hum Exp Toxicol* 1999;18(4):279-82.
74. Pesch A, Wilhelm M, Rostek U, Schmitz N, Weishoff-Houben M, Ranft U, Idel H. Mercury concentrations in urine, scalp hair, and saliva in children from Germany. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2002;12(4):252-8.
75. Wilhelm M, Pesch A, Rostek U, Begerow J, Schmitz N, Idel H, Ranft U. Concentrations of lead in blood, hair and saliva of German children living in three different areas of traffic density. *Sci Total Environ* 2002;297(1-3):109-18.
76. Schönfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, Chahoud I. Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ Health Perspect* 2002;110(11):A703-7.
77. Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y, Taketani Y. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod* 2002;17(11):2839-41.
78. Grandjean P, Budtz-Jorgensen E, Keiding N, Weihe P. Underestimation of risk due to exposure misclassification. *Int J Occup Med Environ Health* 2004;17(1):131-6.
79. Dallaire F, Dewailly E, Muckle G, Ayotte P. Time trends of persistent organic pollutants and heavy metals in umbilical cord blood of inuit infants born in nunavik (Québec, Canada) between 1994 and 2000. *Environ Health Perspect* 2003;111(13):1660-4.
80. Soechitram SD, Athanasiadou M, Hovander L, Bergman A, Sauer PJJ. Fetal Exposure to PCBs and their hydroxylated metabolites in a Dutch cohort. *Environ Health Perspect* 2004;112(11):1208-13.
81. Franck L, Gilbert R. Reducing pain during blood sampling in infants. *Clin Evid* 2002;(7):352-66.
82. Iyengar GV, Rapp A. Human placenta as a 'dual' biomarker for monitoring fetal and maternal environment with special reference to potentially toxic trace elements. Part 1: physiology, function and sampling of placenta for elemental characterisation. *Sci Total Environ* 2001;280(1-3):195-206.

83. Iyengar GV, Rapp A. Human placenta as a 'dual' biomarker for monitoring fetal and maternal environment with special reference to potentially toxic trace elements. Part 3: toxic trace elements in placenta and placenta as a biomarker for these elements. *Sci Total Environ* 2001;280(1-3):221-38.
84. Wang SL, Lin CY, Guo YL, Lin YY, Chou WL, Chang LW. Infant exposure to polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and biphenyls (PCDD/Fs, PCBs), correlation between prenatal and postnatal exposure. *Chemosphere* 2004;54(10):1459-73.
85. Myllynen P, Pasanen M, Pelkonen O. Human placenta: a human organ for developmental toxicology research and biomonitoring. *Placenta* 2005;26(5):361-71.
86. Kantola M, Purkunen R, Kroger P, Tooming A, Juravskaja J, Pasanen M, Saarikoski S, Vartiainen T. Accumulation of cadmium, zinc, and copper in maternal blood and developmental placental tissue: differences between Finland, Estonia, and St. Petersburg. *Environ Res* 2000;83(1):54-66.
87. Aprea C, Catenacci G. Valori di riferimento ambientali e biologici dei fitofarmaci. *G Ital Med Lav Ergon* 2003;25(1):37-60.
88. Minoia C, Apostoli P. 1^a lista SIVR dei valori di riferimento: definizioni, criteri metodologici e strategie analitiche. *G Ital Med Lav Erg* 2003;25(1):15-21.
89. Menditto A, Chiodo F, Patriarca M. e Morisi G. Esposizione al piombo: valutazione del rischio per la popolazione generale italiana negli anni '90. *Ann Ist Super Sanità* 1998;34(1):27-39.
90. Sanna E, Liguori A, Palmas L, Soro MR, Floris G. Blood and hair lead levels in boys and girls living in two Sardinian town at different risks of lead pollution. *Ecotoxicol Environ Saf* 2003;55(3): 293-99.
91. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Managing elevated blood lead levels among young children: Recommendations from the Advisory Committee on childhood lead poisoning prevention*. March 2002. Disponibile all'indirizzo: http://www.cdc.gov/nceh/lead/CaseManagement/caseManage_main.htm; ultima consultazione 19/12/05.
92. Ewers U, Krause C, Schulz C, Wilhelm M. Reference values and human biological monitoring values for environmental toxins. Report on the work and recommendations of the Commission on Human Biological Monitoring of the German Federal Environmental Agency. *Int Arch Occup Environ Health* 1999;72(4):255-60.
93. Italia. Legge 31 dicembre 1996, n. 675. Tutela delle persone e di altri soggetti rispetto al trattamento dei dati personali. *Gazzetta Ufficiale - Supplemento Ordinario* n. 5, 8 gennaio 1997.
94. Italia. Decreto legislativo 30 giugno 2003, n. 196. Codice in materia di protezione dei dati personali *Gazzetta Ufficiale - Supplemento Ordinario* n. 174, 29 luglio 2003.
95. Italia. Provv. Garante protezz. dati pers. 30 giugno 2004, n. 2/2004. Autorizzazione al trattamento dei dati idonei a rivelare lo stato di salute e la vita sessuale. *Gazzetta Ufficiale- Supplemento Ordinario* n. 190, 14 agosto 2004.
96. Deck W, Kosatsky T. Communicating Their Individual Results to Participants in an Environmental Exposure Study: Insights from Clinical Ethics. *Environmental Research Section A* 1999;80(2):S223-S229.

SUSCETTIBILITÀ DEI BAMBINI AD EFFETTI ASSOCIATI AD ESPOSIZIONE A XENOBIOTICI: IL RUOLO DELLA TOSSICOCINETICA E POSSIBILI CONSEGUENZE PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO

Tiziana Catone, Emma Di Consiglio, Emanuela Testai

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Il compito del tossicologo consiste nel formulare dei giudizi quantitativi relativamente agli effetti avversi e/o tossici potenzialmente conseguenti all'esposizione a sostanze chimiche e di valutare il rischio che ne deriva per la salute della popolazione, inclusi i gruppi potenzialmente più suscettibili. Tra questi, i bambini costituiscono uno dei gruppi di maggiore interesse, in considerazione delle loro specifiche caratteristiche fisiologiche e/o peculiari condizioni di esposizione ai diversi agenti chimici (1).

Il destino di una sostanza all'interno di un organismo, una volta che quest'ultimo ne sia venuto a contatto (fase di esposizione) è determinato da un insieme di fenomeni indicati come fase tossicocinetica (ADME, Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo ed Escrezione). Tali processi determinano la permanenza nel tempo e la concentrazione dello xenobiotico e dei suoi metaboliti nel suo sito di azione. L'eventuale effetto prodotto è il risultato di una seconda serie di eventi (i processi tossicodinamici), che prevedono l'interazione tra il tossico e il suo bersaglio. L'interazione con molecole endogene, quali recettori, enzimi o proteine determina un'alterazione della loro funzionalità che nel caso di proteine e lipidi strutturali comporta una modifica della architettura cellulare; quando ad essere coinvolti in tale interazione sono gli acidi nucleici il risultato può essere una modulazione dell'espressione genica o l'induzione di mutazioni, con successiva possibile trasformazione cellulare. A complicare questo complesso quadro si deve aggiungere l'intervento dei diversi processi di protezione che la cellula mette in atto per proteggersi, a cominciare dai sistemi di scavenging (sistemi antiossidanti, glutazione ridotto), in grado di intercettare le molecole reattive elettrofile prima che colpiscano i siti nucleofili dei componenti cellulari, sino ad arrivare agli enzimi del riparo del DNA.

Molti dei fenomeni tossicocinetici e di protezione sono regolati da enzimi, che mostrano una elevata variabilità responsabile della maggior parte delle differenze non solo tra specie animali (interspecifiche), ma anche tra individui (intraspecifiche) (2).

La complessità dei fenomeni legati alla induzione di un effetto tossico impedisce l'identificazione di una condizione di assoluta sicurezza, ma è possibile condurre, attraverso una procedura internazionalmente accettata, una valutazione di rischio (definito come probabilità che si verifichi un effetto avverso) associato all'esposizione ad uno xenobiotico. Tale procedura prevede che si determini il livello di esposizione, la tossicità intrinseca della sostanza (*hazard*) e la relazione dose/risposta e che si combinino queste informazioni con l'identificazione di gruppi di popolazione più vulnerabili (*caratterizzazione del rischio*). Attraverso una serie di test tossicologici, in genere condotti su animali da laboratorio, si identifica una dose alla quale non si osserva alcun effetto avverso (*No Observe adverse Effect Level*, NOAEL). Al valore del NOAEL si applicano dei fattori di sicurezza, che tengono conto della natura dell'effetto tossico indotto, della qualità dei dati tossicologici disponibili, della entità della popolazione esposta e della variabilità inter- e intra-specifica. Il valore che ne deriva (ADI e TDI *Acceptable/Tolerable Daily Intake*) permette di stabilire condizioni di impiego, corrispondenti ad una esposizione

probabilisticamente priva di rischio. Il fattore di sicurezza potrebbe più correttamente essere considerato un fattore di incertezza, dovendo ovviare ai problemi inerenti l'estrapolazione di dati sperimentali ottenuti su specie diverse, a dosi più elevate di quelle di reale esposizione e alla necessità di proteggere anche quei gruppi di popolazione che presentano una maggiore suscettibilità agli effetti tossici.

È quindi evidente che la conoscenza dei fattori che possono influenzare l'insorgenza di effetti tossici diventa un elemento cruciale per la conduzione di una accurata valutazione del rischio; tra questi le differenze nella fase tossicocinetica e in particolare nel metabolismo rappresentano di gran lunga la principale causa di variabilità inter- e intraspecifica.

Le differenze nei livelli e nell'attività degli enzimi che metabolizzano gli xenobiotici sono dovute a fattori sia genetici che socio/fisiologico/ambientali. I primi caratterizzano stabilmente ciascun individuo, facendo parte del suo patrimonio genetico, mentre i secondi possono modificarsi nel tempo e quindi influenzano solo temporaneamente i livelli di espressione dell'enzima.

I fattori genetici sono dovuti al polimorfismo degli enzimi del metabolismo, per il quale uno stesso gene può presentarsi in diverse forme alleliche che codificano per uno stesso enzima, con frequenza nella popolazione >1%. La presenza di forme varianti di uno stesso gene determina genotipi diversi, corrispondenti a proteine strutturalmente diverse; se la differenza strutturale si traduce in una diversa funzionalità si manifesteranno anche fenotipi diversi. Le forme varianti di un enzima possono presentare livelli di attività enzimatica ridotta o aumentata rispetto alla forma *wild type*, in modo tale che all'interno di una popolazione possano essere identificati gruppi di individui con distinte caratteristiche metaboliche, dando luogo ad una distribuzione bi- o pluri-modale (Figura 1)

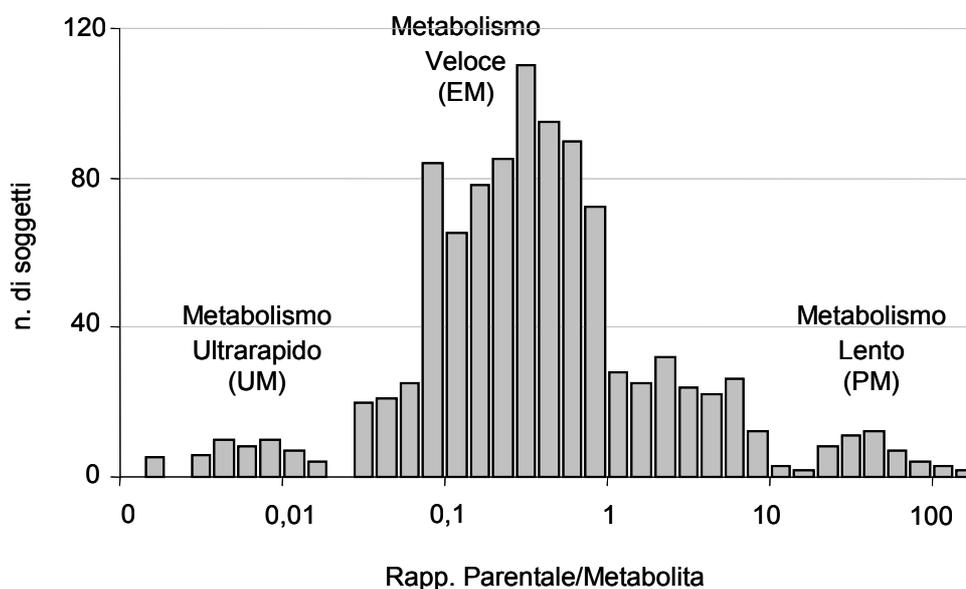


Figura 1. Rappresentazione schematica della distribuzione polimodale del metabolismo di uno xenobiotico detossificato dal CYP2D6

Si possono quindi distinguere metabolizzatori lenti (*Poor Metabolizers*, PM), con una ridotta o assente attività enzimatica rispetto ai metabolizzatori veloci (*Extensive Metabolizers*, EM); la

capacità metabolica particolarmente elevata dei metabolizzatori ultrarapidi (*Ultrarapid Metabolizers*, UM) è causata dalla duplicazione del gene in un numero n di copie.

La maggior parte dei polimorfismi metabolici conosciuti è stata studiata nella popolazione umana, per le notevoli conseguenze cliniche nell'uso terapeutico dei farmaci che tali polimorfismi comportano. Nell'uomo è noto che la distribuzione complessiva dei principali alleli relativi alle diverse forme enzimatiche differisce notevolmente tra gruppi etnici. Ad esempio gli alleli del CYP2D6 responsabili del fenotipo PM rappresentano il 7-8% della popolazione Caucasica, ma soltanto lo 0,5-0,9% nelle popolazioni Orientali; analogamente circa il 60% dei Caucasici è classificabile come acetilatore lento, rispetto alla attività della N-acetiltransferasi, mentre solo l'8% dei Giapponesi presenta queste caratteristiche.

La variabilità della risposta ad un agente chimico (sia esso benefico, come nel caso di un farmaco, o avverso nel caso di una sostanza tossica) può quindi essere estremamente diversa tra gli individui per le loro diverse caratteristiche tossicocinetiche. Supponendo che la molecola F farmacologicamente attiva venga trasformata dal CYP2D6 nel metabolita inattivo M, si potranno verificare 3 diverse situazioni nei tre fenotipi identificabili dal polimorfismo genetico dell'enzima (Figura 2).

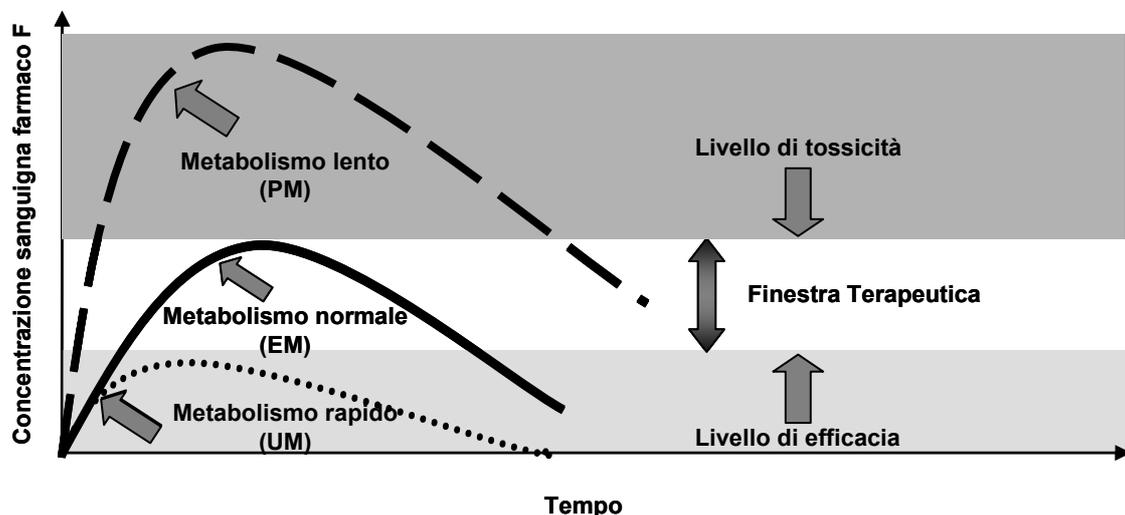


Figura 2. Esempio delle conseguenze del polimorfismo degli enzimi del metabolismo sull'efficacia e/o possibili effetti tossici di un farmaco.

Nei soggetti *wild type* (o EM) in seguito alla somministrazione di una dose standard di F, la sua concentrazione sanguigna supererà la soglia di efficacia, attestandosi all'interno della finestra terapeutica e producendo l'effetto desiderato, per poi decrescere in seguito alla formazione di M, fino a livelli trascurabili (quando presumibilmente si avrà una eventuale seconda somministrazione). In risposta alla stessa dose terapeutica, i PM che metabolizzano F molto lentamente avranno concentrazioni ematiche superiori alla soglia di tossicità, con comparsa di effetti collaterali, ulteriormente aggravati dalla seconda somministrazione, che avviene quando la concentrazione di F è ancora elevata. Al contrario, gli UM che producono il metabolita M molto efficientemente, avranno concentrazioni di F circolante al di sotto della soglia di efficacia, con conseguente assenza di terapia. Gli stessi individui si troverebbero ad

affrontare conseguenze opposte se la molecola somministrata dovesse essere biotrasformata in una specie farmacologicamente attiva dagli enzimi del metabolismo.

Analogamente alla risposta ai farmaci, è facile prevedere che anche l'insorgenza degli effetti tossici sia variabile nella popolazione in dipendenza del polimorfismo degli enzimi del metabolismo, per cui è possibile identificare gruppi di individui a maggior rischio di contrarre una patologia ad eziologia ambientale. L'identificazione di tali gruppi è subordinata alla conoscenza di un opportuno biomarcatore di suscettibilità metabolica individuale, che è costituito generalmente dall'enzima che catalizza i passaggi più rilevanti nella biotrasformazione dello xenobiotico responsabile dell'effetto tossico nella specie umana. Il biomarcatore può essere identificato attraverso un approccio sperimentale integrato, che utilizzi test *in vitro*, i quali prevedono l'uso di sistemi di espressione eterologa di singoli enzimi umani (es. CYP c-DNA-espressi in cellule di insetto) e di frazioni subcellulari ottenute da biopsie epatiche umane. In questo modo è possibile determinare e caratterizzare i parametri cinetici della reazione di biotrasformazione (3, 4). Il passo successivo consiste nella genotipizzazione (e/o fenotipizzazione) di gruppi di popolazione esposti e soggetti alla patologia (casi) e individui sani (controlli) in un tipico disegno di epidemiologia molecolare, per stabilire o meno una correlazione tra la presenza di una determinata variante allelica e l'insorgenza della patologia.

I fattori non genetici che possono contribuire significativamente alla variabilità individuale nella capacità metabolica comprendono: esposizione a inquinanti ambientali, esposizioni legate allo stile di vita (alimentazione, uso di farmaci, uso di prodotti voluttuari come alcool e sigarette), esposizioni professionali che possono alterare la regolazione dell'espressione genica (attraverso fenomeni di induzione e/o inibizione enzimatica), la presenza di patologie che alterino parametri tossicocinetici (es. disfunzioni epatiche e renali) e infine particolari condizioni fisiologiche che caratterizzano l'individuo stabilmente (es. sesso) o temporaneamente (età, stato di gravidanza).

I potenziali effetti sulla salute associati all'esposizione a contaminanti ambientali e alimentari nei bambini, considerati una sotto-popolazione particolarmente vulnerabile, rappresentano crescente motivo di preoccupazione. Specifica attenzione al problema è stata data ai farmaci per uso pediatrico (che al momento non sono sviluppati specificamente) (5, 6) e per l'esposizione a pesticidi, ai quali i bambini possono essere esposti attraverso la dieta per la presenza di residui in cibi, bevande e nell'ambiente domestico, nel quale spesso i prodotti per il controllo dei parassiti sono spesso utilizzati senza particolari precauzioni.

La limitatezza dei dati disponibili sui meccanismi che regolano la suscettibilità correlata all'età è stata evidenziata per la prima volta in un documento del *National Research Council* negli USA (*Pesticides in the Diets of Infants and Children*, NRC, 1993). Successivamente il *Food Quality Protection Act* (FQPA) ha considerato insufficiente la quota (pari a 3,2) che all'interno del fattore 10 utilizzato per tener conto della variabilità intraspecifica, dovrebbe coprire la suscettibilità età-correlata (7). Per enfatizzare la necessità di una protezione addizionale per le fasce di età potenzialmente più suscettibili, il FQPA ha proposto un fattore 10 addizionale, che può essere ridotto o eliminato a fronte della disponibilità di dati attendibili, che ne dimostrino l'inutilità. Purtroppo però i dati scientifici su cui basare il processo di valutazione del rischio per i bambini continuano ad essere molto scarsi, per cui l'applicazione (o meno) di fattori di protezione addizionali appare al momento del tutto arbitraria.

I bambini possono essere diversamente suscettibili rispetto all'adulto sia per differenze di esposizione che per variabilità tossicocinetiche (non completa funzionalità del metabolismo degli xenobiotici) e tossicodinamiche (incompleto grado di maturazione di alcuni organi interni e tessuti in continua proliferazione). Inoltre va sempre considerato il rischio aggiuntivo dovuto alla esposizione in "periodi critici" per lo sviluppo, con possibili alterazioni permanenti di sistemi e apparati diversi (8).

La diversità nell'esposizione esterna tra il bambino e l'adulto è essenzialmente caratterizzata dalle differenti abitudini e attitudini di vita: in relazione al loro peso, i bambini mangiano più degli adulti e hanno una dieta meno diversificata; si trovano generalmente più vicini al livello terra (dove si concentrano gas e vapori più pesanti) sia per la loro altezza che per l'abitudine di gattonare e stazionare a terra durante il gioco; hanno inoltre pattern di esposizione specifici, dovuti alla maggior frequenza di introduzione in bocca di mani, cibo e altri oggetti potenzialmente contaminati per contatto con superfici diverse. Ma ancor più diversa può risultare, a parità di esposizione esterna, la dose interna di esposizione, che è fortemente influenzata da differenze tossicocinetiche tra bambino e adulto (9).

L'assorbimento di sostanze introdotte attraverso la via orale dipende, oltre che dalle caratteristiche chimico-fisiche della sostanza, dalla fisiologia del tratto gastro-intestinale. Nonostante le capacità assorbenti dello stomaco siano limitate nel bambino come nell'adulto, è interessante notare come, avendo lo stomaco dei neonati un pH più elevato rispetto alle successive fasi dello sviluppo, le basi deboli (come la caffeina) sono assorbite più efficientemente, mentre gli acidi deboli (es. il farmaco rifampicina) lo sono di meno. (10) Inoltre, la presenza quasi costante di latte nello stomaco dei neonati limita l'assorbimento di composti liposolubili o che si legano facilmente alla componente proteica. L'intestino tenue, principale organo deputato all'assorbimento delle sostanze assunte per via orale, alla nascita ha funzionalità paragonabili a quelle dell'adulto, ma la superficie assorbente è circa 40 volte inferiore e anche la densità di recettori e proteine di trasporto per unità di superficie è più bassa. Questo determina una diminuzione nella velocità di assorbimento. La immaturità nella secrezione e nella attività dei fluidi pancreatici e biliari e l'assenza di una adeguata flora intestinale (fattori che cominciano a svilupparsi e a funzionare a partire dall'ottavo mese postnatale) determina una diminuita capacità di assorbimento dei grassi, e conseguentemente di tutte le sostanze altamente liposolubili. Al contrario è maggiore l'assorbimento di sostanze che utilizzano gli stessi sistemi di trasporto di nutrienti o altri composti essenziali alla crescita, che durante le varie fasi dello sviluppo hanno livelli di espressione e di attività più elevati.

Relativamente all'assorbimento cutaneo, ciò che maggiormente differenzia il bambino dall'adulto è il maggior rapporto superficie corporea/peso. Su questa base, è stato calcolato che la dose interna di esposizione (espressa per unità di peso corporeo) è del 40-50% più elevata nel bambino, se la sostanza si assorbe per via cutanea. Anche l'esposizione attraverso la via inalatoria presenta delle differenze età-correlate, legate alla funzionalità del sistema polmonare: in relazione alla superficie polmonare la velocità di ventilazione è infatti significativamente più elevata durante l'infanzia, per cui il bambino è potenzialmente esposto a livelli più alti di gas e vapori, se la dose è espressa in base al peso corporeo.

Una volta penetrati all'interno dell'organismo, gli xenobiotici si distribuiscono nei vari distretti corporei. Nel bambino fino ad un anno di età la minore concentrazione di proteine plasmatiche (alle quali le sostanze si legano per essere veicolate attraverso il circolo) e la presenza di albumina fetale (che ha una capacità di ligando minore rispetto alla forma adulta) determinano maggior concentrazione plasmatica della forma libera della sostanza in esame, che può distribuirsi diversamente a causa della composizione corporea in H₂O e lipidi. L'acqua corrisponde a circa l'80% del peso alla nascita, circa il 65% a due anni di età per attestarsi sui valori tipici dell'adulto (50%) a circa 12 anni. La massa grassa invece costituisce il 18% alla nascita, è pari al 30% a un anno (dando luogo al caratteristico pannicolo adiposo) per poi decrescere progressivamente fino alla pubertà, quando si attesta ad un valore del 15-17% che resta costante per tutta l'adolescenza e riprende a crescere in età più avanzate. Il più elevato contenuto in acqua tipico del neonato e del bambino, fa sì che le sostanze idrosolubili abbiano un maggior volume di distribuzione rispetto all'adulto e ovviamente il contrario è valido per le sostanze liposolubili.

Anche la biotrasformazione, che avviene principalmente a livello epatico, mostra delle differenze notevoli nelle varie fasi dello sviluppo. Già nel periodo prenatale il fegato umano è in grado di metabolizzare a livelli significativi vari xenobiotici a differenza di quanto mostrato negli studi sui roditori (11): questa caratteristica rende l'esposizione *in utero*, dovuta al trasporto trans-placentare degli xenobiotici, particolarmente pericolosa.

L'organismo umano in via di sviluppo presenta un profilo metabolico in costante cambiamento, poiché vari sistemi enzimatici vengono progressivamente attivati o repressi (Tabella 1) (12).

Tabella 1. Ontogenesi degli enzimi di Fase I

Fasce d'età	Attività enzimatica						
	CYP1A2	CYP1B1	CYP2A6	CYP2B	CYP2D6	CYP3A4	CYP3A7
Neonato	+/-	+	?	?	+/-	+/-	++
Prima infanzia	+	+	+	++	+	++	+
Bambino	+++	+	++	?	+	+++	-
Adulto	+++	+	++	+	+	+++	-
Attività uguale al livello adulto	5-6 mesi	?	6-13 anni	più alta nella prima infanzia	3-5* anni	1 anno	calo nel I anno**

* 20% del livello adulto a 1 mese

** Attività alta nel feto, con un picco nella prima settimana dalla nascita. Sostituito successivamente dal CYP3A4

I processi di maturazione del sistema di metabolismo degli xenobiotici sono stati indicati come il principale fattore di variabilità correlata all'età nella clearance di farmaci e contaminanti (13). Le informazioni disponibili sulle capacità metaboliche in età perinatale per la specie umana sono tuttavia limitate per ovvi problemi di natura etica, connessi alla reperibilità del materiale biologico. D'altra parte non sembra appropriato estrapolare direttamente i dati ottenuti sui roditori, per le possibili differenze di specie nella ontogenesi dei sistemi enzimatici preposti. La maggior parte dei dati disponibili è relativa ai CYP epatici (12), anche in considerazione del loro ruolo nel mantenimento dell'omeostasi durante il differenziamento tissutale e lo sviluppo dell'organismo.

Durante il periodo compreso tra la vita fetale e il primo anno postatale, il contenuto epatico totale di CYP varia tra il 30 e il 60% di quello della vita adulta, ma il profilo del contenuto relativo e della attività catalitica correlata a ciascun isoenzima è molto variabile. L'espressione del CYP1A2 e la relativa attività catalitica (deputata al metabolismo di molti idrocarburi policiclici aromatici, di ammine aromatiche e anche di altri composti come la caffeina) compaiono lentamente dopo la nascita e non sono completi fino al primo anno di vita (11, 14, 15). Il CYP2A6 invece ha una maturazione molto più lenta e il metabolismo della cumarina (substrato specifico di questa isoforma) non è paragonabile a quello dell'adulto, se non nel periodo che va tra il 6° e il 13° anno di età (16).

La famiglia di CYP sicuramente più studiata è la 3: il CYP3A7 è stato identificato come la principale isoforma espressa costitutivamente nel fegato del feto umano (corrispondente a più del 30% del contenuto totale) a partire dal 50-60° giorno di gestazione. La presenza del CYP3A7 durante le fasi dell'embriogenesi è importante, perché questo enzima è responsabile del metabolismo non solo di xenobiotici ma anche di composti endogeni come gli ormoni steroidei (17). I livelli più elevati di CYP3A7 sono stati misurati nella prima settimana dopo la nascita; successivamente la sua espressione decresce molto rapidamente a livelli trascurabili o nulli tipici della vita adulta. Al contrario il CYP3A4, non espresso nell'embrione e presente a livelli molto bassi nel feto, diventa la isoforma quantitativamente più importante del fegato e

dell'intestino nell'adulto. Ciò accade perché alla nascita (indipendentemente dalla lunghezza del periodo di gestazione) si osserva una transizione tra le due isoforme, che cambia sostanzialmente il profilo metabolico dell'organismo. Nonostante la loro somiglianza strutturale, CYP3A7 e 3A4 hanno attività catalitiche diverse, particolarmente nei confronti dei substrati endogeni di tipo steroideo (17).

Relativamente agli enzimi di coniugazione le informazioni sono ancor più parziali, anche se è chiaro che i pattern di sviluppo possono essere molto diversi: alcuni sono virtualmente assenti nel periodo fetale e compaiono solo nel primo anno di vita (come le UDPGT), mentre altri sono espressi a livelli paragonabili a quelli dell'adulto già nel periodo prenatale (come le sulfotransferasi).

Questo quadro fa sì che non si possa stabilire a priori l'età in cui non si osservano differenze tra bambini (nelle varie fasi) e adulti, poiché la maturazione dei vari sistemi enzimatici è diversa e la situazione cambia a seconda della sostanza chimica considerata (Tabella 2).

Tabella 2. Ontogenesi degli enzimi di Fase II

Fasce d'età	Attività enzimatica			
	UGT1A1	UGT1A3	NAT	Sulfotransferasi
Neonato	+/-	?	+/-	+
Prima infanzia	+	?	+/-	+
Bambino	+	?	+	+
Adulto	+	-	+	+
Attività uguale al livello adulto	3-6 mesi	?	10-12 mesi	dalla nascita

Nonostante le suddette difficoltà nella generalizzazione dei fenomeni, la acquisizione di informazioni tossicocinetiche e meccanicistiche relative alle singole sostanze permette una valutazione quantitativamente più accurata del rischio associato alla esposizione ad una sostanza chimica, fornendo indicazioni importanti sulla correttezza dei fattori di sicurezza applicati. Inoltre, l'uso di modelli predittivi avanzati, elaborati sulla base di conoscenze di anatomia, biologia cellulare, biochimica e fisiologia della specie in esame e caratterizzati dall'incorporazione dei parametri relativi (PB-PK *Physiologically Based-Pharmacokinetic model* e PB-PD *Physiologically Based-Pharmacodynamic model*), permette di estrapolare i risultati degli studi tossicologici e di simulare diversi scenari di esposizione. Durante la caratterizzazione del rischio l'applicazione di tali modelli, che tengono conto dei parametri relativi alle varie fasi dello sviluppo, permette di verificare le eventuali differenze nella biocinetica, predire possibili differenze nella suscettibilità dei bambini rispetto agli adulti. e conseguentemente stabilire i fattori di sicurezza più appropriati da utilizzare.

Bibliografia

1. Ginsberg G, Hattis D, Sonawane B, Russ A, Banati P, Kozlak M, Smolenski S, Golbe R. Evaluation of child/adult pharmacokinetic differences from a database derived from the therapeutic drug literature. *Toxicological Sciences* 2002;66:185-200.
2. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T. *et al.* P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996; 6: 1-42.

3. Buratti FM., Volpe MT, Fabrizi L, Meneguz A, Vittozzi L, Testai E. Kinetic parameters of OPT pesticide desulfuration by c-DNA expressed human CYPs. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2002;11:181-90.
4. Buratti FM, Volpe MT, Meneguz A, Vittozzi L, Testai E. CYP-specific bioactivation of four organophosphorothioate pesticides by human liver microsomes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2003;186:143-54.
5. European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations (EFPIA). Position Paper *Promotion of Paediatric Research in the European Union*. Gennaio 2002. Disponibile all'indirizzo: http://www.efpia.org/4_pos/sci_regu/Paeds020123.pdf; ultima consultazione 19/12/05.
6. European Medicines Agency. Guidance document: note for guidance on clinical investigation of medicinal products in the paediatric population (CPMP/ICH/2711/99). EMEA; Gennaio 2001.
7. IPCS. Guidance document for the use of data in development of chemical-specific adjustment factor (CSAFs) for interspecies differences and human variability in dose/concentration response assessment. *WHO/PCS/01.4*. Luglio 2001. Disponibile all'indirizzo: http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241546786_eng.pdf; ultima consultazione 27/12/05.
8. Faustman EM, Silbernagel SM, Fenske RA, Burbacher TM, Ponche RA. Mechanisms underlying children's susceptibility to environmental toxicants. *Environmental Health Perspective* 2000;Suppl.108(1):13-21.
9. Bearer CF. how are children different from adults? *Environmental Health Perspective* 1995;Suppl. 103(6):7-12.
10. Radde IC. Mechanisms of drug absorption and their development. In: McLeod SM, Radde IC (Ed.). *Text book of Pediatric Clinical Pharmacology*. Littleton: PSG Publishing Co Inc.; 1985. p. 43-7.
11. Juchau MR, Boutelet-Bochan H, Huang Y. Cytochrome-P450-dependent biotransformation of xenobiotics in human and rodent embryonic tissues. *Drug Metabolism Reviews* 1998;30:541-68.
12. Miller MS, Juchau MR, Guengerich FP, Nebert DW, Raucy JL. Drug metabolic enzymes in developmental toxicology. *Fundamental and Applied Toxicology* 1996;34:165-75.
13. Klinger W. Biotransformation of drugs and other xenobiotics during postnatal development. *Experimental Toxicology and Pathology* 1996;48:1-88.
14. Hakkola J, Tanaka E, Pelkonen O. Developmental Expression of Cytochrome P450 Enzymes in human liver. *Pharmacology and Toxicology* 1998;82:209-17.
15. Rich KJ, Boobis AR. Expression and inducibility of P450 enzymes during liver ontogeny. *Microscopy Research and Technique* 1997;39:424-35.
16. Pelkonen O, Raunio H, Rautio A, Pasanen M, Lang MO. The metabolism of coumarin. In: O'Kennedy R, Thornes RD (Ed.). *Coumarins Biology, Application and Mode of Action*. Wiley: New York; 1997. p.67-92.
17. Lacroix D, Sonnier M, Moncion A, Cheron G, Cresteil T. Expression of CYP3A in the human liver. Evidence that the shift between CYP3A7 and CYP3A4 occurs immediately after birth. *European Journal of Biochemistry* 1997;247:625-34.

BOTULISMO INFANTILE

Lucia Fenicia, Fabrizio Anniballi, Paolo Aureli

Centro Nazionale per la *Qualità degli Alimenti ed i Rischi Alimentari*, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Il botulismo è una sindrome neuroparalitica conseguente l'azione di neurotossine che agiscono bloccando il rilascio dell'acetilcolina a livello delle giunzioni neuromuscolari.

La malattia attualmente si può presentare in 5 differenti forme, due di natura tossica, quale il classico botulismo alimentare e il più recente botulismo iatrogeno (da errato uso della tossina per scopi terapeutici), e tre forme infettive conseguenti la moltiplicazione del microrganismo *in vivo* in tessuti animali (botulismo da ferita), o nel lume intestinale di neonati e adulti (botulismo infantile o intestinale dell'adulto)

La malattia: patogenesi e spettro clinico

Il botulismo infantile è la forma intestinale di botulismo che colpisce i neonati al di sotto di anno di età. Tale sindrome, riconosciuta per la prima volta in California nel 1976 è causata da clostridi neurotossigeni che vengono ingeriti sotto forma di spora, sopravvivono all'acidità gastrica e raggiungono l'intestino (1). In conseguenza dell'immaturità della flora intestinale dell'ospite e quindi della competizione batterica, le spore possono germinare, moltiplicarsi, colonizzare temporaneamente il lume intestinale a livello del colon e produrre *in situ* la neurotossina. La tossina viene quindi assorbita dalla mucosa e, attraverso il circolo sanguigno, raggiunge le terminazioni nervose periferiche, dove taglia per via enzimatica specifiche proteine target implicate nel processo di neuroesocitosi (2). Viene quindi bloccata la trasmissione nervosa che si manifesta con una paralisi flaccida simmetrica discendente, caratteristica di tutte le forme di botulismo. La mucosa intestinale non viene interessata all'infezione e la sindrome è stata definita una "tossiemia intestinale"(3).

I primi sintomi ad apparire sono la costipazione, la letargia, la difficoltà di suzione e il tono del pianto alterato. Possono poi presentarsi ipotonia, difficoltà a mantenere il busto eretto (*floppy babies*) e perdita del controllo del capo, fino al coma e all'arresto respiratorio (1). La gravità della paralisi dipende dal numero di terminazioni nervose interessate. Lo spettro clinico della malattia può andare da forme molto lievi e inapparenti a forme fatali quali la *Sudden Infant Death Syndrome* (SIDS) (4).

Vi è sicuramente una sottostima delle forme molto lievi e subcliniche che non necessitano del ricovero ospedaliero; il trattamento terapeutico inoltre non prevede l'uso del siero antibotulinico come nella forma alimentare e si limita a trattamenti di supporto. Nel trattamento del botulismo infantile non è previsto l'uso di antibiotici, che vengono eventualmente usati con prudenza per curare complicanze della malattia, in considerazione del fatto che la lisi della cellula batterica libera ulteriore tossina che può aggravare la sintomatologia neurologica.

La durata della malattia varia da pochi giorni a mesi e la guarigione dipende dal tempo necessario a formare nuove giunzioni neuromuscolari a livello della piastra motrice.

Le possibili complicanze sono soprattutto a livello respiratorio, infezioni secondarie del tratto urinario o di natura nosocomiale. Una complicanza riscontrata nella casistica americana e in quella italiana sono gravi coliti da *Clostridium difficile* che, presente in maniera asintomatica nel lume intestinale dei neonati, riesce a moltiplicarsi proprio in seguito alla paralisi causata dalla tossina botulinica (5, 6).

Diagnosi

Il botulismo infantile è stato diagnosticato in tutti i continenti tranne l'Africa ma con incidenze molto diverse. La maggior incidenza si è riscontrata negli USA, dove è al primo posto tra le forme di botulismo con circa 100 casi l'anno e una incidenza di circa 2 per 100.000 nati vivi; in Argentina e in Italia con 22 casi dal 1984 ad oggi e un'incidenza dello 0,2 per 100.000 nati vivi.

Benché la malattia sia stata identificata da circa 30 anni, in considerazione della sua rarità è ancora sicuramente sottostimata e confusa con altre patologie. Infatti la diagnosi clinica del botulismo infantile dipende da un accurato esame dei sintomi neurologici e da evidenze caratteristiche come l'assenza di febbre e il sensorio intatto. Anche l'elettromiografia è caratteristica ma soprattutto è il sospetto diagnostico che porta nella maggior parte dei casi ad una diagnosi esatta.

La conferma di laboratorio prevede la presenza di tossina botulinica nel siero e/o nelle feci del paziente, o la presenza delle spore di *Clostridium botulinum*, o altri clostridi neurotossigeni, nelle feci.

Il Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo dell'ISS effettua la diagnosi di Laboratorio dei casi sospetti, nonché fornisce un supporto tecnico scientifico alle strutture periferiche del Servizio Sanitario Nazionale sui diversi aspetti della malattia.

Caratterizzazione dell'agente etiologico

L'agente etiologico del botulismo umano è classicamente il *C. botulinum* produttore di tossine tipo A, B, E e molto raramente F.

Dati epidemiologici indicano che la maggior parte dei casi di botulismo infantile nel mondo sono causati da *C. botulinum* tipo A e tipo B mentre il *C. botulinum* tipo E ed F sono molto rari.

Dal 1979 però, sono state isolate altre specie di clostridi in grado di sintetizzare tossine botuliniche. In particolare il *Clostridium baratii* produttore di tossina tipo F isolato in 10 casi di botulismo infettivo intestinale (3 neonati e 6 adulti negli US, un neonato in Ungheria ed 1 possibile caso di botulismo alimentare in California) e il *Clostridium butyricum* produttore di tossina tipo E isolato in 6 casi di botulismo infettivo intestinale (4 neonati, 2 ragazzi) in Italia e da 3 episodi di botulismo alimentare, che hanno interessato 6 persone in Cina (alcuni dei quali associati a colonizzazione intestinale), 34 in India, e 1 in Italia.

Fattori di rischio

L'età è l'unico fattore predisponente per il botulismo infantile; infatti la maggior parte dei casi interessa bambini inferiori a 6 mesi di età (il più piccolo aveva 58 ore) e tutti meno di un

anno. Adulti sani e ragazzi normalmente ingeriscono spore di *C. botulinum* senza sviluppare la malattia.

Ciò è correlato alla maturazione della microflora intestinale che è quantitativamente e qualitativamente più semplice nei neonati e può non essere in grado, come dimostrato da prove effettuate su modelli animali, di prevenire la colonizzazione dell'intestino da parte di spore di clostridi neurotossigeni (7). Lo studio dei fattori che possono influenzare la composizione della microflora ha naturalmente individuato il ruolo centrale della dieta. La microflora dei neonati è costituita da un minor numero di specie batteriche e la prevalenza dei vari microrganismi dipende in parte dal tipo di allattamento del neonato: solo materno, solo artificiale o misto. Inoltre la composizione della flora si modifica nel tempo soprattutto quando alimenti solidi, come i cereali, sono aggiunti alla dieta del bambino. La maggior incidenza dei casi infatti è concentrata proprio all'inizio dello svezzamento quando appunto si verificano i cambiamenti maggiori e condizioni di disturbo.

La normale microflora del neonato contiene alcune specie di batteri, principalmente *Bifidobacterium* e *Bacteroides* che, *in vitro* possono inibire la moltiplicazione del *C. botulinum*. Tuttavia studi epidemiologici non hanno potuto dimostrare una chiara relazione causa effetto tra il tipo di dieta e l'insorgere della malattia.

Infatti, benché la maggior parte dei pazienti era stata allattata al seno, la malattia avviene più precocemente nei neonati allattati con latte di formula (7,6 settimane contro 13,7 settimane). Questo probabilmente a causa della presenza, nel latte in polvere, di nicchie ecologiche favorevoli e della mancanza di fattori immunitari (come IgA secretorie e lattoferrina) presenti nel latte materno e quindi come conseguenza di uno stato immunitario o di una microflora intestinale più debole o non bilanciata. Studi comparativi dello stato immunitario dei bambini rilevano una relazione tra ambiente e nutrizione (1).

Un altro fattore predisponente l'infezione botulinica nei neonati, indipendente dal tipo di allattamento, è la ridotta motilità intestinale che può favorire la colonizzazione di spore di clostridi.

Recentemente, in seguito all'identificazione del *C. butyricum* produttore di tossina tipo E in 6 casi di botulismo intestinale del neonato e dell'adulto in Italia, è stata rilevata la presenza in alcuni pazienti sottoposti ad intervento chirurgico per una iniziale sospetta appendicite, del diverticolo di Meckel. Tale formazione è una forma residua del canale ombelicale che potrebbe costituire una nicchia favorevole alla persistenza e colonizzazione microbica (8).

Un ulteriore fattore predisponente è stato sospettato in una concomitante infezione virale intestinale. Tale evenienza, studiata in un bambino che ha presentato una coinfezione da *C. botulinum* tipo A e da enterovirus, potrebbe essere spiegata con una maggiore suscettibilità alla colonizzazione del *C. botulinum* in seguito alla alterazione della mucosa intestinale, indotta dagli enterovirus (9).

Veicolo delle spore

Le spore dei clostridi neurotossigeni sono presenti normalmente in tutti i tipi di ambiente, sia terrestre che acquatico. Pertanto il suolo e la polvere giocano sicuramente un ruolo critico quale sorgente di clostridi per i neonati, di qui le spore ingerite o inalate raggiungono l'intestino.

Lo studio dei casi di botulismo infantile, ha permesso di correlare l'insorgenza della malattia con l'inalazione di spore presenti nell'ambiente circostante il neonato. Spore tossigene dello stesso tipo di quelle identificate nelle feci del paziente sono state infatti identificate nel suolo e nella polvere dell'aspirapolvere (1, 10) dimostrando la possibilità di contaminazione

ambientale. Questa via è stata sospettata anche per quanto riguarda i casi italiani. Nel corso dello studio degli ultimi casi è emerso che nella abitazione erano stati effettuati, nei giorni precedenti l'inizio della sintomatologia, lavori di ristrutturazione con evidente aumento della polvere, anche se, indagini di laboratorio al fine di individuare il veicolo ambientale delle spore, avevano dato esito negativo.

Invece il miele è il solo veicolo alimentare sicuramente correlato, da evidenze epidemiologiche e di laboratorio, al botulismo infantile (11), con l'eccezione di un caso in Inghilterra correlato al consumo di latte in polvere (12).

Altri alimenti infatti sono stati considerati, come sciroppo di mais, cereali e vegetali disidratati, alimenti per l'infanzia convenzionali e non convenzionali, ma le analisi su tali alimenti effettuate negli USA e in Italia nel corso dello studio dei casi di botulismo infantile non hanno mai evidenziato spore di *C. botulinum*.

I neonati sono esposti al miele principalmente quando:

- viene posto sul succhiotto per tranquillizzare il bambino
- viene addizionato come dolcificante nel latte in polvere e negli infusi.

Il miele può essere contaminato da spore di clostridi di origine ambientale, probabilmente da polline e nettare inquinati trasportati dalle api bottinatrici.

Indagini effettuate in diversi paesi su campioni di miele del commercio, hanno evidenziato la presenza di spore di *C. botulinum* nel 2-7 % dei campioni esaminati con una notevole variazione tra le differenti aree geografiche (16, 17). Indagini su campioni di miele prelevati alla vendita al dettaglio, ha rilevato la presenza di spore di *C. botulinum* nel 10% dei campioni analizzati negli USA, nell'8,5% in Giappone e del 7,5% in Brasile, con un range di contaminazione di 5 -80 spore/g di prodotto (18). Per quanto riguarda l'Italia, indagini effettuate in anni e regioni differenti hanno dato risultati discordanti andando da assenza in tutti i campioni esaminati (indagine del 1983 su 107 campioni) (19) al 6,5 % di campioni positivi in una ulteriore indagine fino al 13% di campioni positivi in una recente indagine, tutt'ora in corso, effettuata su 212 campioni di miele prodotti in Italia.

Per quanto riguarda ancora la UE, un'indagine effettuata nel 2002 in Finlandia su campioni di miele nazionale e di importazione ha permesso di evidenziare il 7 % (su 114 analizzati) di campioni nazionali positivi e il 16% (su 76 analizzati) tra quelli di importazione. Il livello di contaminazione è risultato essere di 18-140 spore/kg (20).

Ricerche effettuate, invece, su campioni di miele associati a casi di botulismo infantile, ha rilevato cariche in *C. botulinum* notevolmente più elevate, fino a circa 10^4 spore/kg, anche se la ragione di questo non è chiara (21, 22).

Infatti, i livelli di pH (3,4-5,5) e di Aw (0,5-0,6) nel prodotto finale sono sicuramente inibenti la crescita e tossinogenesi di *C. botulinum*, benché le spore rimangano vitali. Inoltre, i trattamenti convenzionali utilizzati per distruggere le spore non possono essere usati nel caso del miele perché altererebbero le caratteristiche organolettiche del prodotto, rendendolo non idoneo al consumo umano.

Botulismo infantile in Europa

La definizione di caso di botulismo infantile adottata dal CDC e da alcuni paesi europei tra cui l'Italia è la seguente: "Un caso clinicamente compatibile confermato in laboratorio, che interessa un bambino al di sotto di un anno di età".

I criteri per la diagnosi di laboratorio sono:

- presenza di tossine botuliniche nelle feci o nel siero

oppure:

- isolamento di un Clostridio produttore di tossine botuliniche dalle feci.

Per quanto riguarda l'UE, i dati epidemiologici e le indagini di laboratorio indicano che su 55 neonati affetti da botulismo infantile 34 avevano ingerito miele nei giorni precedenti l'inizio della sintomatologia. In 7 casi sono state isolate da residui di miele utilizzato dal bambino spore di *C. botulinum* dello stesso sierotipo di quelle isolate dalle feci del paziente (13).

La probabilità che questa concordanza sia casuale è minore di 1 a 10¹² (1). A tale riguardo però bisogna sottolineare un dato che si riferisce proprio alla epidemiologia del nostro paese.

In Italia dal 1984 si sono verificati 22 casi di botulismo infantile dei quali uno di SIDS. In Tabella 1 sono riportati alcuni dati riguardanti il ceppo di clostridio neurotossigeno isolato dalle feci del paziente, l'età, il tipo di allattamento e l'eventuale storia di ingestione di miele.

Su 22 casi, 14 avevano utilizzato il miele e in 13 casi è stato possibile analizzare residui dell'alimento reperiti nell'abitazione del bambino. In 4 casi sono state isolate spore di *C. botulinum* ma solo in un caso si trattava dello stesso sierotipo di quello delle spore isolate dalle feci (tipo B) (14). Invece in un caso *C. botulinum* tipo A era isolato dal miele, mentre un ceppo di *C. butyricum*, produttore di tossina tipo E, era isolato dalle feci (15), in un altro *C. botulinum* tipo B era isolato dal miele e *C. botulinum* tipo A dalle feci (9), e in un quarto caso *C. botulinum* tipo A e tipo B sono stati isolati rispettivamente dal miele e dalle feci. Negli altri casi erano isolate dai campioni di miele esaminato solo specie non neurotossigene di *Clostridia*.

Tabella 1. Casi di botulismo infantile diagnosticati presso il Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo dal 1984 al 2004

Agente etiologico	Età	Allattamento	Consumo di miele
<i>C. butyricum</i> tipo E	16	artificiale	sì
<i>C. butyricum</i> tipo E	16	materno	sì
<i>C. botulinum</i> tipo B	32	artificiale	sì
<i>C. botulinum</i> tipo B	6	materno	sì
<i>C. botulinum</i> tipo A	12	materno	sì
<i>C. botulinum</i> tipo B	8	materno	sì
<i>C. botulinum</i> tipo B	9	materno	sì*
<i>C. botulinum</i> tipo B	12	materno	sì
<i>C. botulinum</i> tipo B	8	materno	n.s.
<i>C. botulinum</i> tipo B	28	materno	no
<i>C. butyricum</i> tipo E	20	materno	sì **
<i>C. botulinum</i> tipo B	4	materno	no
<i>C. botulinum</i> tipo A	8	materno	sì
<i>C. butyricum</i> tipo E	28	materno	no
<i>C. botulinum</i> tipo B	20	materno	no
<i>C. botulinum</i> tipo B	8	materno	sì
<i>C. botulinum</i> tipo B	8	materno	no
<i>C. botulinum</i> tipo B	10	materno	no
<i>C. butyricum</i> tipo E	28	misto	sì
<i>C. botulinum</i> tipo A	23	misto	sì**
<i>C. botulinum</i> tipo B	11	materno	no
<i>C. botulinum</i> tipo B	15	misto	sì**

* ceppo isolato dal miele dello stesso sierotipo del ceppo isolato dalle feci

**ceppo isolato dal miele di sierotipo diverso da quello isolato dalle feci

n.s. = non specificato

Conclusioni

Il botulismo infantile è una sindrome neuroparalitica molto seria ma con una bassa mortalità.

I dati epidemiologici indicano che il 90% dei casi si verificano negli USA.

Il motivo di ciò non è chiaro ma potrebbe essere legato ad una maggiore conoscenza della malattia da parte dei medici. Questo trova riscontro nella epidemiologia nazionale che è la più numerosa a livello europeo (e la terza dopo USA e Argentina) e dove la maggior parte dei casi è stata diagnosticata in pochi ospedali, dimostrando che dopo la prima esperienza i medici sono maggiormente sensibilizzati verso un adeguato sospetto diagnostico. Si reputa quindi che, soprattutto nelle forme lievi la malattia, anche nel nostro paese, sia sottostimata.

La malattia, diversamente dal classico botulismo alimentare, non è una intossicazione (ingestione di tossina preformata in un alimento) ma una tossiemia causata dalla tossina botulinica prodotta nel lume intestinale da spore neurotossigene ingerite che hanno avuto la possibilità di germinare e moltiplicarsi.

La fonte delle spore è ambientale, e i veicoli finora individuati tramite indagini epidemiologiche e di laboratorio sono il miele e in rarissimi casi, la polvere di casa.

Il miele, come prodotto naturale, può veicolare spore che le api raccolgono durante la loro attività e che residuano nel miele. Le spore possono sopravvivere ma non moltiplicarsi e produrre tossina nel miele in dipendenza delle sue caratteristiche chimico fisiche, in particolare l'Aw strettamente correlata alla concentrazione in zuccheri.

Indagini effettuate su campioni di miele del commercio al fine di verificare la presenza di spore di *C. botulinum* hanno dimostrato la presenza di queste con percentuali differenti.

La correlazione tra ingestione di miele e botulismo è dimostrata dal fatto che una notevole percentuale dei bambini malati aveva consumato miele nei giorni precedenti l'inizio della sintomatologia, in particolare circa il 20% negli USA e circa il 60% in Europa. Inoltre sia in USA che in Europa, in relazione allo studio di casi di botulismo infantile, sono state individuate spore neurotossigene in campioni residui di miele utilizzati dai bambini.

Indagine effettuata nel nostro paese, con l'ausilio di un questionario preparato *ad hoc* e sottoposto a pediatri e a 250 madri presso i Reparti pediatrici di alcuni ospedali italiani, ha rilevato che il 30% dei pediatri e il 100 % delle madri non conosceva la malattia, e che il 25 % delle madri somministrava il miele al proprio bambino e aveva avuto questa abitudine anche con altri figli. Ciò sta ad indicare che il dato che correla l'uso del miele all'insorgere della malattia è anche da valutare nel senso che una elevata percentuale di bambini, in genere, viene a contatto con tale alimento mentre la sindrome è effettivamente molto rara.

Recentemente si è dimostrato che anche la polvere di casa può costituire un veicolo di spore di clostridi neurotossigeni, in seguito all'isolamento di due ceppi, risultati identici in seguito a subtipizzazione molecolare. In Italia si sono correlati i casi più recenti a lavori di ristrutturazione domestica e, anche se non dimostrati, si sospetta questa via di inalazione.

Indagini effettuate in Italia in occasione dello studio di casi di botulismo infantile, ha rilevato che 14 su 22 bambini avevano consumato miele, su 13 campioni analizzati 4 hanno permesso di isolare ceppi di *C. botulinum* dai residui prelevati presso l'abitazione. Di questi solo 1 era dello stesso sierotipo di quello del ceppo isolato dalle feci del neonato, in tre casi era di tipo differente (Tabella 1).

Raccomandazioni

Il botulismo infantile è una malattia ancora poco conosciuta ed è indispensabile una informazione indirizzata ai pediatri, neurologi e infettivologi sui vari aspetti della sindrome al fine di indirizzarne eventualmente il sospetto diagnostico.

Il miele è l'unico alimento correlato al botulismo infantile e che può essere eliminato dalla dieta dei neonati senza particolari problemi ed evitato come dolcificante su succhiotti. Tale precauzione necessita nello stesso tempo di una campagna di informazione presso genitori, pediatri e presidi ospedalieri, sulla malattia e i fattori di rischio ad essa correlati.

D'altra parte, nell'indirizzare le madri in tal senso i pediatri dovrebbero illustrare con chiarezza il significato di questa restrizione eliminando dubbi sulla intrinseca tossicità o pericolosità del miele circoscrivendo chiaramente il problema a bambini al di sotto di un anno di età.

Anche la reale correlazione consumo di miele/insorgere della malattia andrebbe meglio valutata mediante prove di subtipizzazione molecolare dei ceppi isolati dal miele e dalle feci per stabilirne l'identità, qualora si tratti naturalmente di ceppi appartenenti allo stesso sierotipo.

Si potrebbe promuovere eventualmente lo sviluppo di tecniche di sterilizzazione del miele (es. alte pressioni) destinato a bambini al di sotto di un anno di età, che non alterino le caratteristiche nutrizionali, biologiche e organolettiche del prodotto.

Bibliografia

1. Arnon SS. Infant botulism. In: Feigen RD, Cherry JD (Ed.). *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*. 4th ed. Philadelphia: Saunders; 1998. p. 1570-7.
2. Montecucco C, Schiavo G. Tetanus and botulism neurotoxins: a new group of zinc proteases. *Trends Biochem Sci* 1993;18:324-7.
3. Arnon SS. Botulism as an intestinal toxemia. In: Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL (Ed.). *Infections of the Gastrointestinal Tract*. New York: Raven Press; 1995. p. 257-71.
4. Arnon SS, Damus K, Chin J. Infant botulism: epidemiology and relation to sudden infant death syndrome. *Epidem Rev* 1981;3:45-66.
5. Schechter R, Peterson B, McGee J, Idowu G, Brandley J. *Clostridium difficile* colitis associated with infant botulism: near-fatal case analogous to Hirschsprung's enterocolitis. *Clin Infect Dis* 1999;29:143-6.
6. Fenicia L, Da Dalt L, Anniballi F, Franciosa G, Zanconato S, Aureli P. A case of infant botulism due to neurotoxigenic *Clostridium butyricum* type E associated with *Clostridium difficile* colitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:736-38.
7. Burr DH, Sugiyama H. Susceptibility to enteric botulinum colonisation of antibiotic-treated adult mice. *Infect Immun* 1982;36:103-6.
8. Fenicia L, Franciosa G, Pourshaban M, Aureli P. Intestinal toxemia botulism in two young people caused by *Clostridium butyricum* type E. *Clin Infect Dis* 1999;29:1381-7.
9. Fenicia L, Anniballi F, Pulitanò S, Genovese O, Polidori G, Aureli P. A severe case of infant botulism caused by *Clostridium botulinum* type A with concomitant intestinal viral infections. *Eur J Pediatr* 2004;163:501-2.
10. Nevas M, Lindstrom M, Virtanen A. Infant botulism acquired from household dust presenting as Sudden Infant Death Syndrome. *J Clin Microbiol* 2005;43:511-3.

11. Arnon SS, Midura TF, Damus K, Honey and other environmental risk factors for infant botulism. *J Pediatr* 1979;94:331-6.
12. O'Brien S. Case of infant botulism in the United Kingdom. *EuroSurveillance* 2001;33(5):16.
13. Aureli P, Franciosa G, Fenicia L. Infant botulism and honey in Europe. A commentary. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:866-8.
14. Fenicia L, Ferrini AM, Aureli P, Pocecco M. A case of infant botulism associated with honey feeding in Italy. *Eur J Epidemiol* 1993;9:671-3.
15. Franciosa G, Anniballi F, Fenicia L, Aureli P. New recovery of neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* type E from a case of infant botulism. In: Institut de veille sanitaire (Ed.). *Diagnosis and prevention of clostridiosis*. 1st International conference on identification and immunology of Clostridia. Teistungen, Germany, 4-7 October 1998. Saint-Maurice (France): Euro Surveill; 1999. p. 7-9.
16. Kautter D A, Lilly T, Solomon HM, Lynt RK. *Clostridium botulinum* spores in infant foods: A survey. *J Food Protec* 1982;45:1028-9.
17. Schocken-Iturrino RP, Carneiro MC, Kato E, Sorbara JOB, Rossi OD, Gerbasi LER. Studies of the presence of the spores of *Clostridium botulinum* in honey in Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999;24:379-82.
18. Nakano H, Sakaguchi G. An unusual heavy contamination of honey products by *Clostridium botulinum* type F and *Bacillus alvei*. *FEMS Microbiol Letters* 1991;63:171-7.
19. Aureli P, Ferrini AM, Negri S. Ricerca di spore di *C. botulinum* nel miele. *Riv Soc It Sci Alim* 1983;6:457-60.
20. Nevas M, Hielm S, Lindstrom M, Horn H, Koivulehto K, Korkeala H. High prevalence of *Clostridium botulinum* types A and B in honey samples detected by polymerase chain reaction. *Int J Food Microbiol* 2002;72:45-52.
21. Dodds KL, Worldwide incidence and ecology of infant botulism In: Hauschild AHW, Dodds KL (Ed.). *Clostridium botulinum, Ecology and Control in Foods*. New York: Marcel Dekker Inc.; 1993. p. 105-120.
22. Austin J. Botulism in Canada-Summary for 1995. *Canadian Communicable Diseases Report* 1996;22:182-3.

INTOLLERANZE ALIMENTARI IN ETÀ PEDIATRICA

Marco Silano, Massimo De Vincenzi

Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Con il termine di intolleranze alimentari si intende qualsiasi reazione avversa causata dall'ingestione di un alimento. Si tratta di un gruppo molto ampio di patologie, che comprende le reazioni su base allergica Ig E mediate e cellulo-mediate, i deficit enzimatici fino alle reazioni tossiche indotte da sostanze contenute negli alimenti.

La più frequente intolleranza alimentare in Italia è la malattia celiaca o intolleranza al glutine, di cui risulta affetto 1 individuo su 180 circa.

La malattia celiaca

La malattia celiaca è un'enteropatia autoimmune scatenata, in soggetti geneticamente determinati, dall'ingestione delle prolamine, cioè la frazione proteica alcool-solubile di cereali quali grano (gliadina), orzo (ordina) e segale (secalina) (1). È una malattia multifattoriale, per la comparsa della quale sono necessari entrambi i fattori predisponenti, quello ambientale, la dieta contenente i cereali citati, e quello genetico, cioè la presenza di determinati aplotipi dell'MHC di II classe.

La prima descrizione della MC risale al primo secolo a.C., quando Areteo di Cappadocia descrisse una malattia caratterizzata da diarrea cronica e difficoltà digestive. Si dovette comunque aspettare il dopoguerra affinché si individuasse nel grano l'agente responsabile della MC, allorché Dicke, un pediatra olandese, notò un importante miglioramento clinico nei bambini affetti da MC durante la carestia che interessò il Nord Europa in quegli anni e un repentino peggioramento quando la distribuzione dei cereali riprese. Fino alla fine degli anni '80 si pensava che la MC interessasse solo i paesi Europei, in particolare Irlanda, Svezia e Austria, e da ciò è originata l'immagine del bambino celiaco con occhi azzurri e capelli biondi (2). In realtà, la maggior consapevolezza e conoscenza della malattia unitamente allo sviluppo di test serologici economici, efficaci e di facile lettura hanno portato a realizzare che la MC è diffusa in tutto il mondo.

Epidemiologia

La MC si può presentare con un'ampia variabilità di quadri clinici o addirittura, nelle forme silenti, non essere accompagnata da alcuna sintomatologia. Per tale motivo, l'esatta epidemiologia della MC è tuttora incerta. Si stima che per ogni caso diagnosticato, ne esistano almeno sette non diagnosticati. Questo fenomeno è stato efficacemente descritto con l'immagine dell'iceberg (1), secondo il quale la maggior parte degli individui affetti sarebbe ancora nascosta. La linea di galleggiamento dell'iceberg, cioè il rapporto tra casi diagnosticati e quelli nascosti, dipende dalla consapevolezza della malattia da parte del personale medico, dalla disponibilità dei test serologici di screening e dalle modalità di assunzione del glutine; le

dimensioni dell'iceberg dipendono, a loro volta, dalla distribuzione nella popolazione degli alleli del HLA di II tipo correlati alla malattia celiaca.

In Europa, una delle regioni più "a rischio" di MC e per la quale esiste il maggior numero di studi epidemiologici, la prevalenza è stimata intorno a 1/180. Riguardo gli Stati Uniti, non esistono studi epidemiologici fino alla fine degli anni '90 quando ancora si stimava che nel continente americano la MC fosse rara nella popolazione anglo-sassone e riguardasse solamente le popolazioni immigrate da regioni ad alta prevalenza. Studi su larga scala condotti recentemente invece hanno ribaltato tale considerazione, evidenziando come la prevalenza fosse sovrapponibile a quella europea, anche nella popolazione generale (3). La MC è anche presente in Sud America, in Nord Africa, India e Australia, regioni dove è probabile che sia tuttora sottostimata. È considerata rara solamente tra le popolazioni afro-caraibiche, Sud-est asiatico e Giappone. Un paragone tra la prevalenza stimata (basata sui sintomi tipici gastro-intestinali) e quella reale (basata sui risultati di test serologici) mostra che la MC è frequente, anche se la presentazione gastro-intestinale è infrequente, è che questa differenza è ancora più marcata nelle zone dove è considerata una malattia rara.

La popolazione con la più alta frequenza di MC (5,6%, più di 5 volte quella osservata in Europa) è la Saharawi, localizzata nel Sahara Occidentale. Si tratta di individui con occhi e capelli scuri, considerazione che sottolinea ulteriormente come fossero errate le considerazioni sul fenotipo bianco e biondo della malattia celiaca (4). Le ragioni per cui presso tale popolazione la MC sia così frequente ancora non sono chiare, il background genetico è sicuramente responsabile, ma non sufficiente da solo a giustificare tale numeri. Catassi ha recentemente supposto che la MC si sia diffusa dal momento che offre un vantaggio nei confronti delle malattie infettive intestinali (3).

Eziopatogenesi

Pur essendo definita come un'intolleranza alimentare, la MC è caratterizzata da una risposta autoimmune che non riguarda solo l'intestino, ma che coinvolge organi e apparati diversi, tra cui in particolar modo l'endocrino. La risposta immune inizia nel momento in cui i peptidi derivati dalla digestione gastro-intestinale del glutine arrivano in contatto con la mucosa intestinale. I meccanismi che permettono a questi peptidi di superare gli enterociti ancora non sono del tutto noti. Secondo una delle teorie più accreditate, sarebbero necessari dei fattori concomitanti in grado di interrompere l'integrità della membrana enterocitaria, quali per esempio un'infezione intestinale (5) o il divezzamento precoce. I peptidi derivati dalla digestione del glutine sono caratterizzati dal possedere un elevato numero di residui di glutammina e prolina. Nella mucosa intestinale dei soggetti celiaci, è stato dimostrato che esiste una maggiore concentrazione di transglutaminasi tissutale, che in condizioni di eccesso di substrato e di pH acido catalizza la deaminazione della glutammina in acido glutammico (6). I PT-GI così modificati hanno una conformazione e una distribuzione delle cariche elettriche negative tali da essere legati agli alleli DQ2 o DQ8 del MHC di II classe, per essere poi presentati ai T-linfociti CD4 positivi. Questi attivano la produzione di due patterns di citochine, il primo Th1 orientato, che a sua volta determina la distruzione della mucosa intestinale e l'apoptosi degli enterociti; il secondo Th2 orientato, con attivazione dei B linfociti in plasmacellule, responsabili della produzione di autoanticorpi (7).

Accanto a questi meccanismi, recenti evidenze sperimentali supportano l'ipotesi che alcuni dei peptidi derivati dalla digestione del glutine attivano le cellule e le molecole effettrici dell'immunità innata, tra cui IL-15, macrofagi e cellule dendritiche (8). Quindi l'immunità

innata e quella adattiva collaborano alla realizzazione del quadro istologico intestinale caratteristico della MC: atrofia dei villi, iperplasia delle cripte e infiltrazione linfocitaria della lamina propria.

Sintomatologia

La sintomatologia della MC è estremamente varia e polimorfa. La *forma classica* prevale nei bambini che giungono alla diagnosi nei primi anni di vita. Il quadro sintomatologico è dominato da disturbi gastro-intestinali: diarrea cronica con steatorrea e sintomi di malassorbimento, anemia tra tutti, arresto della crescita, magrezza contrastata da addome globoso e meteorico, ipotonia muscolare, pallore cutaneo ed edemi periferici.

Accanto a questa modalità di insorgenza esistono forme con sintomatologia gastro-intestinale molto lieve e sfumata, dominata da alvo alterno, diarrea saltuaria, dolori addominali e meteorismo transitori, anoressia, nausea e vomito. Queste forme, *dette subcliniche*, spesso non arrivano all'attenzione del medico, dal momento che non modificano in maniera importante la qualità della vita del paziente. Alcune volte vengono addirittura misdiagnosticate come infezioni gastro-intestinali o colon irritabile. È solo da alcuni anni che queste forme, grazie alla maggior consapevolezza della malattia e alla disponibilità di metodi serologici di screening adeguati, vengono diagnosticate come MC, anche se in età adulta o addirittura durante la terza età.

Si definiscono, invece, *forma atipica*, la MC che si presenta con quadri sintomatologici e obiettivi in cui è del tutto assente il coinvolgimento gastro-intestinale e invece sono presenti sintomi extra-intestinali quali ipo/ipertiroidismo, anemia, ipertransaminasemia, disturbi di carattere ostetrico-ginecologico (amenorrea, dismenorrea, menopausa precoce, poliabortività), disturbi neurologici (convulsioni con calcificazioni occipitali, atassia, polineuropatie periferiche), alopecia, ipoplasia dello smalto dentale e afosi ricorrente.

La dermatite erpetiforme attualmente non è più considerata come una manifestazione di MC, ma una forma di celiachia in cui le lesioni cutanee sono presenti, ma l'interessamento intestinale è molto spesso minimo. Tutte queste manifestazioni regrediscono all'instaurarsi di una dieta priva di glutine.

Per terminare lo spetto clinico della MC, è doveroso citare *la forma silente*, senza alcuna sintomatologia, che arrivano alla diagnosi o perché parenti di I grado di soggetti affetti o in maniera del tutto casuale e *la forma potenziale*, in cui sono presenti delle alterazioni immunologiche e/o sierologiche di malattia, senza però il quadro istologico intestinale caratteristico di malattia (1).

Infine vanno ricordate quelle manifestazioni che rientrano nella definizione di *complicanze* della MC. Si tratta di patologie e non di sintomi che si associano alla MC, che addirittura la cui comparsa spesso precede la comparsa della stessa MC e che non regrediscono durante la dieta priva di glutine. La più frequente e la più studiata tra queste è il diabete mellito di I tipo, ma ormai sempre più frequentemente vengono riscontrati casi di tiroidine autoimmune, sindrome di Sjogren, morbo di Addison, sindrome di Down, deficit di IgA e difetti cardiaci congeniti. Inoltre, la comparsa di neoplasie è sempre più frequente riportata in pazienti che consapevolmente o non, pur affetti da MC hanno assunto glutine per lunghi periodi. Le patologie più frequenti in questo ambito sono i linfomi gastro-intestinali non Hodking, i carcinomi della tiroide ed epatici e gli adenocarcinomi del tenue (9, 10).

Diagnosi e terapia

Nonostante la disponibilità di test serologici economici, facilmente effettuabili, ad alta sensibilità e specificità (anticorpi antiendomio e anti-transglutaminasi), il golden standard per la diagnosi di MC resta la gastroduodenoscopia con biopsia che metta in evidenza la presenza del quadro istologico caratteristico. Fino a qualche anno fa, l'esame endoscopico veniva ripetuto dopo sei mesi di dieta senza glutine per verificare la normalità della mucosa intestinale. Attualmente è sufficiente eseguire questo accertamento una sola volta, durante la dieta contenete glutine in soggetti per i quali esista un sospetto clinico o test serologici positivi. L'esame endoscopico, soprattutto nei bambini, non viene ripetuto una seconda volta a meno che non ci siano esigenze particolari, quali permanenza della sintomatologia anche dopo aver intrapreso la dieta.

Non esiste ancora a livello internazionale uniformità di vedute sulla possibilità di screening per la malattia celiaca sulla popolazione generale.

L'unica terapia oggi disponibile per la MC resta la dieta priva di glutine per tutta la vita. Questa infatti è l'unica terapia che permetta la scomparsa dei sintomi e soprattutto eviti la comparsa delle complicanze a lungo termine, soprattutto neoplastiche.

Bibliografia

1. Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology* 2001;120(3):636-51.
2. Catassi C. Where is celiac disease coming from and why? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40(3):279-82.
3. Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, Elitsur Y, Green PH, Guandalini S, Hill ID, Pietzak M, Ventura A, Thorpe M, Kryszak D, Fornaroli F, Wasserman SS, Murray JA, Horvath K. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med* 2003;163(3):286-92.
4. Catassi C, Ratsch IM, Gandolfi L, Pratesi R, Fabiani E, El Asmar R, Frijia M, Bearzi I, Vizzoni L. Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara? *Lancet* 1999;354(9179):647-8.
5. Fasano A, Not T, Wang W, Uzzau S, Berti I, Tommasini A, Goldblum SE. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet* 2000;355(9214):1518-9.
6. Esposito C, Paparo F, Caputo I, Porta R, Salvati VM, Mazzarella G, Auricchio S, Troncone R. Expression and enzymatic activity of small intestinal tissue transglutaminase in celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2003;98(8):1813-20.
7. Sollid LM. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol* 2002;2(9):647-55.
8. Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, Picard J, Osman M, Quarantino S, Londei M. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet* 2003;362(9377):30-7.
9. Silano M, De Vincenzi M. Small bowel malignancy at diagnosis of coeliac disease. *Gut* 2005;54(4):565-6.
10. Silano M, De Vincenzi M. Risk of gastrointestinal non-hodgkin's lymphoma at diagnosis of celiac disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20(4):657.

NUTRIZIONE, AMBIENTE E FUNZIONALITÀ TIROIDEA NELL'INFANZIA

Simona De Angelis, Mariella Sorcini, Antonella Olivieri
Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Ruolo degli ormoni tiroidei

L'attività degli ormoni tiroidei, la triiodotironina (T3) e la tetraiodotironina o tiroxina (T4), interessa tutte le fasi della vita di un individuo dal momento che tali ormoni svolgono un ruolo critico sul differenziamento cellulare durante lo sviluppo e, nella vita adulta, contribuiscono al mantenimento dell'omeostasi metabolica. Infatti, non vi è cellula, tessuto o sistema che si sottragga all'influenza degli ormoni tiroidei e che pertanto, non risenta delle conseguenze della ipo- o della iper-secrezione di questi con il conseguente coinvolgimento di tutti i processi metabolici. Vi sono poi alcune fasi della vita particolarmente sensibili, quali la gravidanza o la prima infanzia, in cui un'alterata funzione tiroidea può determinare gravi conseguenze soprattutto a carico del sistema nervoso (1). Gli ormoni tiroidei infatti, sono indispensabili per il normale sviluppo del sistema nervoso centrale e poiché la tiroide fetale comincia ad essere funzionante soltanto intorno alla dodicesima settimana di gestazione, appare evidente il ruolo fondamentale degli ormoni tiroidei materni durante le prime fasi dello sviluppo (2). È stata dimostrata infatti la presenza di recettori per gli ormoni tiroidei sui tessuti fetali prima ancora che la tiroide fetale inizi la propria attività secretoria (3). Pertanto, la condizione di eutiroidismo materno risulta indispensabile per garantire un adeguato trasferimento materno-fetale di ormoni tiroidei. È stata anche riportata la presenza di recettori per gli ormoni tiroidei su oociti maturi (4) indicando, in tal modo, che tali ormoni influenzano lo sviluppo embrionale fin dalle primissime fasi a cominciare dal concepimento. Come è ben noto però, lo sviluppo del sistema nervoso nell'uomo non si esaurisce con la vita fetale ma si completa nei primi 2-3 anni di vita (5, 6). Ciò implica l'indispensabile condizione di eutiroidismo in epoca neonatale e nella prima infanzia affinché sia garantito un normale sviluppo neuropsichico dell'individuo. In tale ottica lo screening neonatale di massa per la diagnosi precoce dell'ipotiroidismo congenito, la più frequente endocrinopatia dell'infanzia, risulta uno dei principali successi della medicina pediatrica dal momento che l'istituzione della terapia sostitutiva entro il primo mese di vita consente di prevenire in maniera efficace le sequele neuropsichiche dell'ipofunzione tiroidea in epoca neonatale (7, 8).

Lo iodio, micronutriente essenziale per l'attività tiroidea

Lo iodio è il componente essenziale per la sintesi degli ormoni tiroidei e, poiché è scarsamente presente nell'ambiente, la tiroide dispone di efficaci meccanismi che ne rendono possibile la concentrazione e la conservazione al suo interno. In natura la fonte principale di questo micronutriente è rappresentata dagli alimenti in cui il contenuto in iodio dipende dalla concentrazione di quest'ultimo nel suolo. Lo iodio introdotto con la dieta viene ridotto a ioduro (I⁻) nel tratto gastroenterico e rapidamente assorbito dal circolo per concentrarsi nelle cellule

follicolari tiroidee dove viene ossidato a I_2 . La tireoglobulina (Tg), una glicoproteina sintetizzata dai tireociti e presente nel lume dei follicoli tiroidei, è in grado di legare lo I_2 ai suoi residui tirosinici per formare i due precursori inattivi, la *monoiodotirosina* (MIT) e la *diiodotirosina* (DIT). I processi di ossidazione e organificazione dello iodio avvengono interamente sulla Tg e sono catalizzati da una perossidasi tiroidea. Dalla condensazione di due molecole di DIT si forma la T4, mentre dall'unione di una molecola di DIT e una di MIT si forma la T3. Infine, in seguito alla proteolisi della Tg, si ha la liberazione di T3 e T4 e la loro secrezione in circolo (9).

Il normale funzionamento dell'attività secretoria tiroidea è regolato da una struttura in cui la secrezione ormonale dei vari organi implicati è funzionalmente integrata. Tale struttura è rappresentata dall'asse "ipotalamo-ipofisi-tiroide". In condizioni fisiologiche l'ormone di rilascio della tireotropina (TRH, *Thyroid Releasing Hormone*), di origine ipotalamica, stimola la secrezione dell'ormone ipofisario tireostimolante (TSH, *Thyroid Stimulating Hormone*) che, a sua volta, promuove la sintesi e la secrezione degli ormoni tiroidei. I livelli sierici di questi ultimi a loro volta, regolano il rilascio di TRH e soprattutto del TSH attraverso un meccanismo di *feed-back* negativo. Una riduzione (*ipotiroidismo primario*) o un aumento (*ipertiroidismo classico*) dei livelli ematici di ormoni tiroidei, legati a patologie intrinseche della ghiandola, provocano attraverso il suddetto meccanismo rispettivamente un aumento o una riduzione del TRH e del TSH.

Poiché la ghiandola tiroidea dipende dall'ambiente esterno per l'apporto di iodio, è facile comprendere come un insufficiente apporto nutrizionale di questo microelemento possa influenzare fortemente la normale funzione tiroidea. In condizioni di insufficiente apporto iodico ambientale, la riduzione del pool intratiroideo dello iodio determina una iniziale riduzione della sintesi di ormoni tiroidei e ciò induce un aumento della secrezione di TSH che determina, a sua volta, la stimolazione delle diverse tappe della ormonogenesi tiroidea a partire dalla captazione dello iodio. Accanto a queste modificazioni della funzionalità tiroidea, la cronica stimolazione della ghiandola da parte del TSH induce iperplasia e ipertrofia diffusa della tiroide (*gozzo*). L'aumento risultante della massa tiroidea funzionante compensa quindi, la lieve riduzione di sintesi ormonale e i soggetti risultano per lo più eutiroidei seppure con gozzo. Se l'insufficiente apporto nutrizionale di iodio non viene corretto, l'evoluzione nodulare è una eventualità molto frequente e si verifica quasi costantemente nella storia naturale del gozzo endemico.

Carenza iodica ambientale

In molti paesi del mondo, compresi molti paesi europei tra cui l'Italia, lo iodio è presente in quantità così esigue nel suolo, nelle acque e negli alimenti che il fabbisogno minimo giornaliero necessario per una normale attività tiroidea non può essere soddisfatto (10). Nel nostro paese è stato accertato che la massima parte del territorio nazionale è, sia pure con un'ampia variabilità da zona a zona, tuttora caratterizzata da carenza iodica e che tutta la popolazione italiana è esposta agli effetti della carenza di iodio (11). La carenza nutrizionale di questo microelemento pur essendo più frequente e più grave nelle aree collinari e montagnose, è presente anche in zone di pianura e in alcune località costiere. Tuttavia anche aree urbane, ove è maggiore l'interscambio alimentare, non sono esenti da tale condizione ambientale. (12).

La carenza nutrizionale di iodio è in grado di compromettere la funzione tiroidea e si traduce in quadri morbosi le cui manifestazioni variano in funzione del periodo della vita interessato da questo deficit. La carenza iodica grave durante la gravidanza provoca un'aumentata frequenza di aborti, di parti prematuri, di anomalie fetali e di mortalità perinatale (13). In ogni caso la

conseguenza più temibile della carenza iodica grave durante la gravidanza e dell'ipotiroidismo materno-fetale che ne consegue è il cretinismo endemico, una condizione caratterizzata da grave ritardo mentale, sordomutismo e gravi deficit neuromotori (14). Tale problema non è più attuale in Italia, tuttavia una carenza iodica di grado lieve o moderato continua a creare dei problemi soprattutto nelle condizioni fisiologiche in cui è necessario un superiore apporto di iodio con la dieta e la ghiandola tiroidea è sottoposta ad un maggiore lavoro. Queste condizioni sono rappresentate proprio dalla gravidanza e dalle prime fasi di sviluppo infantile e le conseguenze di un insufficiente apporto di iodio in queste fasi si esplica in una esagerata prevalenza del gozzo in età pediatrica, in difetti auxologici di vario grado e nel raggiungimento di un quoziente intellettivo inferiore a quello ottenibile in condizioni di ottimale apporto di iodio. Tale situazione esita poi nell'adulto in una indesiderata prevalenza di gozzo nodulare e neoplasie tiroidee (10).

Le conseguenze della carenza nutrizionale di iodio costituiscono pertanto ancora oggi un grave problema sanitario e sociale che interessa oltre un miliardo di persone nel mondo (10). In Italia è stato stimato che circa 6 milioni di persone si ammalano di gozzo, ovvero più del 10% della popolazione del nostro paese (11). Studi condotti negli ultimi 20 anni hanno messo in evidenza che, considerando la sola popolazione giovanile italiana, il gozzo può raggiungere in alcune aree una prevalenza del 20%. Inoltre, dai dati ISTAT sui ricoveri ospedalieri del 2000, si rileva che ci sono quasi 30 mila ricoveri ordinari con diagnosi di gozzo semplice, cioè quasi 50 ricoveri ogni 100 mila abitanti. È stato anche stimato che l'impatto economico di questa malattia è di oltre 150 milioni di euro all'anno (www.epicentro.iss.it).

Esposizione a carenza iodica in gravidanza e funzione tiroidea nel neonato

La gravidanza, l'età neonatale e le fasi iniziali di crescita infantile sono le condizioni in cui la richiesta tissutale di ormone tiroideo è massima. Per questo motivo il fabbisogno di iodio e il turnover dello iodio intratiroideo sono molto superiori rispetto alle altre fasi della vita. Alcuni studi eseguiti su vaste popolazioni di gravide hanno anche dimostrato che fasi di ipotiroidismo anche lieve soprattutto nelle prime fasi della gravidanza determinano una riduzione significativa del QI del nascituro rispetto all'atteso (15). Per ciò che riguarda la vita neonatale, in condizioni di carenza nutrizionale di iodio alcuni neonati, e soprattutto quelli pretermine che hanno un minore contenuto intratiroideo di iodio, mostrano una difficoltà funzionale nella produzione giornaliera di tiroxina. Tale difficoltà si traduce, a seconda dell'entità della carenza iodica, in un aumento di dimensioni della tiroide, in una ipertireotropinemia transitoria associata a livelli sierici normali di tiroxina, o a vero e proprio ipotiroidismo neonatale prevalentemente transitorio (16). Nonostante il carattere transitorio di tali forme di ipotiroidismo, è necessario comunque sottoporre questi neonati a una tempestiva terapia sostitutiva, al fine di evitare le conseguenze neuropsichiche che si manifesterebbero nel caso di un ritardato intervento terapeutico. È stato accertato che la frequenza di ipotiroidismo neonatale transitorio è quasi 8 volte più elevata in Europa che non in Nord America, dove l'apporto nutrizionale di iodio è adeguato (10). Tuttavia anche la frequenza di ipotiroidismo congenito (IC) permanente sembra essere influenzata dalla carenza iodica ambientale. Infatti l'incidenza dell'IC in Italia (1 caso su 3000 nati vivi) è comparabile a quella documentata nei paesi europei privi di un'efficace iodoprofilassi, ma è maggiore di quella (1:4000) osservata negli Stati Uniti, in Canada e in Giappone, dove l'apporto nutrizionale di iodio è pienamente adeguato (17). Inoltre, da un'analisi condotta sui dati del Registro Nazionale degli Ipotiroidei Congeniti, che è coordinato

dall'ISS, è emerso che l'incidenza media nazionale dell'IC si è mantenuta pressoché stabile nel corso degli ultimi 10 anni, ovvero da quando le procedure di screening su scala nazionale hanno raggiunto la copertura totale della popolazione neonatale. Tuttavia nel nostro paese vi sono alcune aree caratterizzate da un'incidenza di IC molto superiore all'incidenza media nazionale. È questo ad esempio il caso delle Marche, regione storicamente riconosciuta come iodocarente, in cui l'incidenza di ipotiroidismo congenito è di 1:1840. Al contrario in Trentino, dove la iodoprofilassi viene attuata da oltre 10 anni (provincia autonoma di Bolzano), l'incidenza di ipotiroidismo congenito è di 1:5703 (www.nic.iss.it). È chiaro quindi, che la più alta incidenza di ipotiroidismo congenito in Italia rispetto a paesi non caratterizzati da iodocarenza e, all'interno del territorio nazionale, la variabilità dell'incidenza tra le diverse regioni, rappresentano evidenze che supportano fortemente la possibilità di uno stretto rapporto tra carenza iodica e la frequenza di ipotiroidismo congenito.

È importante anche aggiungere che negli ultimi anni numerosi avanzamenti sono stati raggiunti nella comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti nella morfogenesi e nella ormonogenesi tiroidea. In particolare, le forme di IC con ghiandola in sede sono attribuibili a mutazioni a carico di geni che intervengono nei processi che portano alla sintesi ormonale (18). È questo il caso del gene che codifica per la perossidasi tiroidea (TPO), enzima indispensabile per la sintesi ormonale (19); o del gene THOX2 che codifica per una proteina il cui ruolo è essenziale nel sistema che genera H₂O₂, passaggio fondamentale per l'organificazione dello iodio all'interno della tiroide (20); o del gene DEHAL1 che codifica per una nitroreductasi che, de-alogenando le iodotirosine all'interno del ghiandola, è responsabile del riciclo dello iodio intra-tiroideo che, quindi, può essere riutilizzato per ulteriori processi di ormonogenesi (18). È possibile ipotizzare quindi, l'esistenza di varianti molecolari con alterazioni funzionali anche minime di queste proteine che, in condizioni di sufficiente apporto iodico, sarebbero completamente silenti dal punto di vista fenotipico, ma che in condizioni di carenza iodica relativa possano associarsi ad un fenotipo di IC lieve. Ciò potrebbe contribuire a spiegare le notevoli differenze di incidenza dell'IC descritte più sopra.

Interferenti tiroidei

È stato ormai accertato che lo iodio non è l'unico fattore ambientale in grado di influenzare la normale funzione tiroidea. Alcuni studi infatti, hanno descritto la presenza di gozzo endemico anche in aree iodo-sufficienti (21, 22) supportando fortemente il concetto di quella che è stata definita "goitrogenesi ambientale" (23). Esistono infatti alcuni agenti chimici rilasciati nell'ambiente, soprattutto attraverso l'impiego di pesticidi o come risultato dell'attività industriale, in grado di interferire con il sistema endocrino (*Endocrine Disrupting Chemicals*, EDC). La tiroide rappresenta sicuramente uno dei principali bersagli di numerosi EDC (24) e ad oggi sono state individuate oltre 100 EDC in grado di interferire con la normale funzione tiroidea (18), i così detti *Interferenti Tiroidei*. Queste sono sostanze in grado di interferire con la normale funzione tiroidea con meccanismi d'azione che possono alterare la sintesi (25), il metabolismo (26, 27) e il trasporto (28) degli ormoni tiroidei, o possono sostituirsi a questi a livello recettoriale (29). Inoltre, sulla base di evidenze derivate sia da studi epidemiologici che sperimentali, è stato suggerito che sostanze chimiche di sintesi possono indurre una risposta autoimmune tiroide-specifica (30, 31).

Sebbene la tiroide possa essere considerata un organo piuttosto robusto nell'adulto, in grado cioè di compensare una moderata o lieve azione interferente attraverso l'iperplasia e il gozzo, nell'organismo in evoluzione la tiroide non è ugualmente in grado di adattarsi e quindi

compensare l'effetto di insulti esterni. Il fatto che numerosi di questi agenti chimici siano in grado di oltrepassare la placenta e il ruolo centrale degli ormoni tiroidei nello sviluppo del sistema nervoso, suggeriscono la potenziale pericolosità di esposizioni a tali sostanze *in utero* o durante la prima infanzia (32, 33). Ad esempio è stato riportato da alcuni autori che bambini esposti durante la vita uterina a *poli-clorobifenili* (PCB) mostravano elevati livelli di TSH alla nascita (34), mentre nelle loro madri si osservava una relazione inversa tra livelli di esposizione e concentrazione ematica di ormoni tiroidei (35). Inoltre, sulla base di test eseguiti in età scolare (36), è stato anche riportato che esposizioni *in utero* a PCB risultano associate ad un più basso QI rispetto alla media. È probabile quindi, che anche la riconosciuta azione neurotossica attribuita a queste sostanze possa, almeno in parte, essere mediata dall'effetto sulla tiroide.

Per molti di questi Interferenti Endocrini tuttavia, la conoscenza degli effetti sulla funzione tiroidea deriva prevalentemente da studi condotti su modelli sperimentali sia *in vivo* che *in vitro*. È quindi fortemente sentita da parte della comunità scientifica l'esigenza di realizzare indagini epidemiologiche finalizzate alla valutazione dell'impatto sulla salute umana dell'esposizione ambientale e alimentare a tali sostanze. La realizzazione di tali tipi di studi infatti, consentirà di costruire la base conoscitiva necessaria per individuare segmenti di popolazione a maggior rischio sui quali orientare e concentrare attuabili azioni di prevenzione.

Ringraziamenti

Questo articolo è stato realizzato nell'ambito del progetto ISPESL/ISS/Ministero della Salute: *Studio multicentrico sul rapporto tra patologia endocrina ed esposizione ambientale e occupazionale a inquinanti*, Unità Operativa ISS: *Studio degli effetti sulla salute umana dell'esposizione a Distruttori Endocrini con azione tireostatica*.

Bibliografia

1. Glinoe D, Delange F. The potential repercussion of maternal, fetal and neonatal hypothyroxinemia on the progeny. *Thyroid* 2000;10:871-87.
2. Utiger RD. Maternal hypothyroidism and fetal development. *N Engl J Med* 1999;341:601-2.
3. Iskaros J, Pickard M, Evans I, Sinha A, Hardiman P, Ekins R. Thyroid hormone receptor gene expression in first trimester human fetal brain. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2620-3.
4. Zhang SS, Carrello AJ, Darling DS. Expression of multiple thyroid hormone receptor mRNAs in human oocytes, cumulus cells and granulosa cells. *Mol Hum Reprod* 1997;3:555-62.
5. Bayer SA, Altman J, Russo RJ, Zhang X. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology* 1993;14:83-144.
6. Howdeshell KL. A model of the development of the brain as a construct of the thyroid system. *Environ Health Perspect* 2002;110(suppl.3):337-48.
7. Van Vliet G, Czernichow P. Screening of neonatal endocrinopathies: rationale, methods and results. *Semin Neonatol* 2004;9:75-85.
8. Rovet J, Danemar D. Congenital hypothyroidism: a review of current diagnostic and treatment practices in relation to neuropsychologic outcome. *Paediatr Drugs* 2003;5:141-9.
9. Kopp P. Thyroid hormone synthesis: thyroid iodine metabolism. In: Braverman L, Utiger R. (Ed.). *Werner and Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2005. p. 52-76.

10. Delange F. Iodine deficiency in Europe and its consequences: an update. *Eur J Nucl Med* 2002;29 (Suppl.2):S404-S416.
11. Pinchera A, Sorcini M, Chiovato L (Ed.). Carezza iodica, ipotiroidismo congenito, gozzo: fisiopatologia e prevenzione. *Ann Ist Super Sanità* 1998;34(3):299-443.
12. Panunzi C, Manca Bitti ML, Di Paolo A, Fabbrini R, Valle D, Spadoni GL, Del Duca E, Guglielmi R, Valente M, Finocchi A, Vitale S, Dituri F, Valenti M, Banzulli N, Olivieri A, Gilardi E, D'Archivio M, Sorcini M, Boscherini B. Prevalenza del gozzo ed escrezione urinaria di iodio in un campione di bambini in età scolare della città di Roma. *Ann Ist Super Sanità* 1998;34(3):409-412.
13. Hetzel BS. *The story of iodine deficiency*. Oxford: Oxford University Press; 1989.
14. Delange F. The disorders induced by iodine deficiency. *Thyroid* 1994;4:107-112.
15. Mitchell ML, Klein RZ, Sargent JD, Meter RA, Haddow JE, Waisbren SE, Faix JD. Iodine sufficiency and measurements of thyroid function in maternal hypothyroidism. *Clin Endocrinol* 2003;58:612-6.
16. Montanelli L, Pinchera A, Santini F, Cavaliere R, Vitti P, Chiovato L. Ipotiroidismo congenito transitorio: fisiopatologia e clinica. *Ann Ist Super Sanità* 1998;34(3):321-9.
17. Toublanc JE. Comparison of epidemiological data on congenital hypothyroidism in Europe with those of other parts in the world. *Horm Res* 1992;38:230-235.
18. Moreno JC. Identification of novel genes involved in congenital hypothyroidism using serial analysis of gene expression. *Horm Res* 2003;60(suppl.3):96-102.
19. Niu DM, Lin CY, Hwang B. *et al.* Contribution of genetic factors to neonatal transient hypothyroidism. *Arch Dis Child Fet Neonatal Ed* 2005;90:69-72.
20. Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ *et al.* Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N Eng J Med* 2002;347:95-102.
21. Gaitan E. Iodine sufficient goiter and autoimmune thyroiditis: the Kentucky and Columbian experience. In: Medeiros-Neto G, Gaitan E (Ed.). *Frontiers in Thyroidology* Vol.1. New York: Plenum Press; 1986. p. 19-25.
22. Beierwaltes WH. The most common thyroid disease in the state of Michigan is endemic goiter not due to iodine deficiency. *Washington City Med Soc Bull* 1987;39:3-10.
23. Gaitan E. Environmental goitrogens. In: Van Middlesworth L (Ed.). *The thyroid gland: practical clinical treatise*. Chicago: Year Book Medical Publishers; 1986. p. 263-80.
24. Brucker-Davis F. Effects of environmental synthetic chemicals on thyroid function. *Thyroid* 1998;8(9):827-56.
25. Marinovich M, Guizzetti M, Ghilardi F, Viviani B, Corsini E, Galli CL. Thyroid peroxidase as toxicity target for dithiocarbamates. *Arch Toxicol* 1997;71:508-12.
26. Morse DC, Groen D, Veerman M, van Amerongen CJ, Koeter HB, Smits von Prooije AE, Visser TJ, Koeman JH, Brouwer A. Interference of polychlorinated biphenyls in hepatic and brain thyroid hormone metabolism in fetal and neonatal rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993;122:27-33.
27. Visser TJ, Kaptein E, van Toor H, van Raaij JA, van den Berg KJ, Joe CT, van Engelen JG, Brouwer A. Glucuronidation of thyroid hormone in rat liver: effects of *in vitro* treatment with microsomal enzyme inducers and *in vitro* assay conditions. *Endocrinology* 1993;133:2177-86.
28. Van den Berg KJ, van Raaij JAGM, Braft PC, Notten WRF. Interactions of halogenated industrial chemicals with transthyretin and effects on thyroid hormone levels in vivo. *Arch Toxicol* 1991;65:15-9.

29. McKinney J, Fannin R, Jordan S, Chae K, Rickenbacher U, Pedersen L. Polychlorinated biphenyls and related compound interactions with specific binding sites for thyroxine in rat liver nuclear extracts. *J Medicinal Chem* 1987;30:79-86.
30. Safran M, Paul TL, Roti E, Braverman LE. Environmental factors affecting autoimmune thyroid disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1987;16:327-42.
31. De Angelis S, Olivieri A, Fazzini C, Gilardi E, Fiumalbi C, Perico A, Mechi MT, Santini F, Rago T, Valeriano R, Vitti P, Pinchera A, Sorcini M. Effects of occupational exposure to ethylenebisdithiocarbamate (EBDC) on thyroid function. *J Endocrinol Invest* 2005;28(suppl.4):109.
32. Schantz SL, Widholm JJ. Cognitive effects of endocrine disrupting chemicals in animals. *Environ Health Perspect* 2001;109:1197-206.
33. Zoeller RT, Bowling ALS, Herzig CTA, Iannacone EA, Ganger KJ, Bausal R. Thyroid hormone, brain development and the environment. *Environ Health Perspect* 2002;110(suppl.3):355-61.
34. Koopman-Esseboom C, Morse DC, Weisglas-Kuperus N, Lutkeshipholt IJ, Van der Paauw CG, Tuinstra LG, Brouwer A, Sauer PJ. Effects of dioxins and polychlorinated biphenyls on thyroid hormone status of pregnant women and their infants. *Pediatr Res* 1994;36:468-73.
35. Sauer PJJ, Huisman M, Koopman-Esseboom C, Morse DC, Smits-van Prooijie AE, Van der Berg KJ, Tuinstra LG, van der Paauw CG, Boersma ER, Weisglas-Kufern N, Lammers JH, Kulig BM, Brouwer A. Effects of polychlorinated biphenyls (PCBs) and dioxins on growth and development. *Hum Exp Toxicol* 1994;13:900-6.
36. Jacobson JL, Jacobson SW. Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero. *N Engl J Med* 1996;335:783-9.

PRINCIPIO DI PRECAUZIONE E RISCHI ALIMENTARI

Carlo Petrini

Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Precauzione e metodo scientifico

L'epistemologia evidenzia i limiti del nostro sapere nelle discipline scientifiche. Caduta la fiducia nell'*ipse dixit*, nella deducibilità da principi primi universali (1), è nato il fruttuoso approccio del metodo induttivo. La sperimentazione ne è un cardine. A volte è una verifica di ipotesi, a volte è fonte di inattese scoperte. Spesso dall'esperienza si acquisiscono dati statistici che ci offrono un graduale accrescimento della probabilità di conoscere un evento, oppure un rapporto di causa-effetto, oppure ancora un'associazione tra eventi.

Sono stati conati termini nuovi per indicare concetti intuiti da sempre, come la "complessità" o la "multivaribilità". Il falsificazionismo e i timori dei filosofi della scienza (2) non devono condurre a pensare che sia in ogni caso impossibile perseguire e raggiungere conoscenze pratiche idonee ad affrontare rischi generati da noi stessi, minimizzare o annullare pericoli e danni. Sia lecita una battuta: nessuno ha dovuto cambiare gli occhiali dopo l'esperienza di Michelson e Morley che ha sconvolto le conoscenze della propagazione della luce, e senza ricorrere al principio di precauzione è stato imposto l'esame della vista per la patente di guida.

Importanza del principio di precauzione

Tra i molti esempi che si possono portare per attestare l'importanza che viene sempre più attribuita al principio di precauzione, si può citare la legge francese 2005-205 del 1° marzo 2005, con la quale viene adottata a livello costituzionale la "Carta dell'ambiente" ("Charte de l'environnement") (3). L'articolo 5 della "Carta" stabilisce: "Quando la realizzazione di un danno, sebbene incerto allo stato delle conoscenze scientifiche, potrebbe danneggiare in modo grave e irreversibile l'ambiente, le autorità pubbliche sorvegliano, mediante l'applicazione del principio di precauzione e nei loro settori di competenza, per l'attuazione di procedure di valutazione dei rischi e l'adozione di provvedimenti provvisori e proporzionati al fine di evitare la realizzazione del danno". La formulazione adottata dalla "Carta dell'ambiente" riprende l'enunciazione contenuta in una legge francese già precedentemente in vigore (4), ed è quasi identica a quella che compare al punto n. 15 della Dichiarazione redatta al termine della Conferenza delle Nazioni Unite su Ambiente e Sviluppo svoltasi a Rio de Janeiro dal 4 al 13 giugno 1992 (5)¹ (dove però si chiede di applicare il principio di precauzione a rischi "gravi o irreversibili", anziché a "rischi gravi e irreversibili", come ha scelto il legislatore francese, che

¹ "Al fine di proteggere l'ambiente, gli Stati applicheranno largamente, secondo le loro capacità, il metodo precauzionale. In caso di rischio di danno grave o irreversibile, l'assenza di certezza scientifica assoluta non deve servire da pretesto per rinviare l'adozione di misure adeguate ed efficaci, anche in rapporto ai costi, dirette a prevenire il degrado ambientale".

ha dunque ristretto il campo di applicazione). La legge francese, come la “Dichiarazione di Rio” si riferisce alla protezione dell’ambiente, ambito al quale il principio di precauzione è stato applicato nella sua prima formulazione, ma sempre più spesso il principio è adottato anche per la protezione della salute umana (6).

Sul significato e sulle possibilità di applicazione del principio di precauzione si interrogano gli scienziati che studiano le caratteristiche dei rischi (7) e i decisori responsabili delle scelte nella cosa pubblica (8). Per le sue molteplici implicazioni, il principio di precauzione è oggetto di studio anche per filosofi, sociologi, giuristi, eticisti come attesta il fatto che il Comitato Nazionale per la Bioetica abbia voluto dedicare ad esso un ampio documento, in cui si esaminano aspetti di bioetica, filosofici, giuridici (9). In ultima analisi, il principio di precauzione interessa tutti i cittadini (10).

Definizioni e inquadramento storico

Definizioni in documenti istituzionali, dichiarazioni, normative

L’espressione “principio di precauzione” fu coniata in Germania alla fine degli anni Settanta (11). L’espressione tedesca (*Vorsorgeprinzip*, che letteralmente può essere tradotta: “principio del preoccuparsi prima”) ha una connotazione attiva (in francese potrebbe essere resa con *souci*). Il termine italiano “precauzione”, così come l’inglese *precaution*, sembra invece rimandare prevalentemente ad un atteggiamento di difesa.

Con l’uso in ambiti specialistici e a seguito di precise definizioni enunciate in documenti istituzionali, l’espressione “principio di precauzione” ha oggi acquisito un significato specifico: il principio di precauzione è un criterio di azione che, a fronte di potenziali rischi sanitari o ambientali per i quali non si dispone di sufficienti dati scientifici oppure si dispone di dati scientifici incerti o contraddittori, impegna le autorità pubbliche a fronteggiare la situazione con decisioni proporzionate, senza attendere l’acquisizione di conoscenze più consolidate. L’incertezza può derivare dalla scarsità di dati scientifici, da una loro contraddittorietà che non permette di raggiungere risultati sicuri, da incertezze nello stimare la probabilità che si verifichi un evento oppure l’entità del danno che esso può provocare. Collocandosi in uno scenario di incertezza, le decisioni basate sul principio di precauzione devono consistere in misure transitorie e flessibili, destinate ad essere modulate con il progressivo avanzamento delle conoscenze. Tra le due decisioni estreme (da una parte bloccare l’agente, il prodotto, la tecnologia potenzialmente dannosi, dall’altra scegliere di non intervenire) vi è un’ampia gamma di possibilità intermedie, che dipendono da caso a caso.

La precauzione differisce dunque dalla prevenzione. La prima si riferisce a rischi inerti o non ben noti, mentre la seconda si riferisce a rischi sufficientemente conosciuti nelle loro caratteristiche di probabilità e gravità delle conseguenze.

Alla nozione di precauzione si fece riferimento già nella prima delle Conferenze delle Nazioni Unite su Ambiente e Sviluppo, svoltasi a Stoccolma nel 1972 (12). A partire dagli anni Ottanta il principio di precauzione è stato citato in numerosi documenti istituzionali, trattati, convenzioni, dichiarazioni. Dapprima esso è stato riferito prevalentemente alla protezione dell’ambiente marino (13, 14), come attesta una lunga serie di articoli pubblicati nel *Marine Pollution Bulletin* (15). Progressivamente esso venne poi esteso dapprima ad altri aspetti della protezione ambientale e poi anche alla salute umana. Sono ormai molto numerosi i trattati, le dichiarazioni, le convenzioni, le raccomandazioni internazionali in cui si fa riferimento al principio di precauzione. Un loro elenco esula dagli scopi del presente lavoro ed è reperibile in

varie pubblicazioni (16). Si accenna qui soltanto ad alcuni testi esemplificativi, selezionati nella consapevolezza che le varie definizioni proposte in documenti istituzionali non differiscono tra loro significativamente per quanto riguarda gli aspetti fondamentali.

Significativa è, ad esempio, la Dichiarazione di Bergen, promulgata nel 1990, dove il principio di precauzione è citato con un riferimento alla nozione di “sviluppo sostenibile”, che ebbe un ampio successo a seguito della pubblicazione del cosiddetto “Rapporto Bruntland” (17). Al paragrafo 7 della Dichiarazione si afferma infatti: “Al fine di raggiungere uno sviluppo sostenibile, le politiche devono essere basate sul principio di precauzione. Le misure ambientali devono anticipare, prevenire e attaccare le cause di degradazione ambientale. Quando vi sono minacce di danni seri o irreversibili, la mancanza di certezze scientifiche complete non deve essere usata come una ragione per ritardare misure per prevenire il degrado ambientale” (18).

L'intreccio tra tutela della salute e tutela dell'ambiente è evidente, per esempio, nell'Accordo dell'Organizzazione Mondiale del Commercio sulle Misure Sanitarie e Fitosanitarie (1997), che all'articolo 5.7 prescrive: “Nei casi in cui un'evidenza scientifica pertinente è insufficiente, un Membro può provvisoriamente adottare misure sanitarie o fitosanitarie sulla base delle informazioni pertinenti disponibili (...). In tali circostanze, i Membri dovranno cercare di ottenere le ulteriori informazioni necessarie per una valutazione del rischio più oggettiva e rivedere di conseguenza la misura sanitaria o fitosanitaria in un periodo di tempo ragionevole” (19).

Analogamente, anche il “Protocollo sulla biosicurezza” di Cartagena (2000) fa riferimento al principio di precauzione a proposito sia della salute umana, sia della protezione degli ecosistemi. L'articolo 10.6 stabilisce infatti: “La mancanza di certezze scientifiche riguardanti la portata dei potenziali effetti negativi di un organismo vivente modificato sulla conservazione e l'utilizzazione sostenibile della diversità biologica nella Parte d'importazione, tenendo conto anche dei rischi per la salute umana, non dovrà impedire a tale Parte di adottare decisioni adeguate rispetto all'introduzione degli organismi viventi modificati (...), al fine di evitare o limitare tali effetti potenzialmente negativi” (20).

Principio di precauzione nell'Unione Europea

In Europa il principio di precauzione è incluso in vari documenti, con valore sia vincolante, sia di indirizzo e orientamento.

Il Trattato di Maastricht (7 febbraio 1992) accenna al principio a proposito sia dei rischi ambientali, sia di quelli sanitari (21).

Il Trattato di Amsterdam (2 ottobre 1997) stabilisce: La politica della Comunità in materia ambientale mira ad un livello elevato di tutela, tenendo conto della diversità delle situazioni nelle varie regioni della Comunità. Essa è fondata sui principi della precauzione e dell'azione preventiva, sul principio della correzione, in via prioritaria alla fonte, dei danni causati all'ambiente, nonché sul principio “chi inquina paga” (22, 23).

A livello europeo sono stati emanati anche documenti che offrono indicazioni operative per l'adozione e l'applicazione del principio di precauzione. Se ne ricorderanno qui in particolare tre: le “Guidelines on the application of the Precautionary Principle” (24) (17 ottobre 1998), la “Comunicazione della Commissione sul principio di precauzione (25) (2 febbraio 2000) e le Conclusioni del Consiglio Europeo di Nizza (7-9 dicembre 2000) (26)

Particolarmente significativo è il fatto che il principio di precauzione sia menzionato anche nella Costituzione Europea, firmata a Roma il 29 ottobre 2004. La Costituzione, riprendendo le enunciazioni espresse nei Trattati precedenti, ne dà la seguente formulazione (Parte III, titolo III, capo III, sezione 5, articolo III-233): *La politica dell'Unione Europea in materia ambientale*

mira ad un elevato livello di tutela, tenendo conto delle varie situazioni nelle regioni dell'Unione. Essa è fondata sui principi della precauzione, dell'azione preventiva, sul principio della correzione, in via prioritaria alla fonte, dei danni causati all'ambiente, nonché sul principio "chi inquina paga" (27).

Sintesi degli elementi fondamentali del principio di precauzione sulla base dei documenti istituzionali

Gli elementi che, in base alle enunciazioni proposte nei vari documenti, caratterizzano il principio di precauzione possono essere riassunti nei termini seguenti:

- La precauzione si applica in condizioni di incertezza scientifica, quando vi sono indicazioni di possibili effetti avversi sanitari o ambientali, ma i dati scientifici sono insufficienti oppure incerti.
- Le politiche cautelative, basate sul principio di precauzione, sono inserite nei più ampi processi di "risk management".
- Il principio di precauzione impone, a fronte di rischi incerti, di prendere decisioni. Le decisioni possono anche consistere nella scelta di non agire. Esse devono in ogni caso essere proporzionate al rischio temuto, coerenti con decisioni prese per rischi di intensità e gravità analoghe, basate su attente valutazioni rischi/benefici e costi/benefici.
- Le decisioni sull'applicazione del principio di precauzione si devono basare su dati scientifici, ma sono eminentemente politiche e spettano ai decisori con responsabilità pubbliche.
- Il principio di precauzione non deve essere applicato arbitrariamente a fronte di qualsiasi rischio ipotizzabile, ma deve seguire i criteri di applicabilità enunciati nei documenti internazionali e, ove esistano, nelle normative nazionali.
- Il principio di precauzione deve essere accompagnato da uno sforzo per colmare il più possibile le carenze nelle conoscenze scientifiche.
- Le procedure decisionali basate sul principio di precauzione devono essere "trasparenti" e permettere la partecipazione di tutte le parti che, in modalità diverse, possono essere coinvolte nel rischio.
- La precauzione non è una regola di astensione, né la pretesa di un irraggiungibile "rischio zero".
- Le misure basate sul principio di precauzione devono avere carattere provvisorio, ed essere adattate alla luce delle nuove conoscenze scientifiche progressivamente acquisite.

Rischio, precauzione, alimentazione

Importanza del principio di precauzione nel settore alimentare

L'alimentazione è un settore in cui il principio di precauzione può avere applicazioni importanti. Vi sono infatti ambiti dell'alimentazione in cui alcuni degli aspetti che determinano l'applicabilità del principio di precauzione (incertezza, provvisorietà, ecc.) sono particolarmente rilevanti.

Significativo è il fatto che il "Libro bianco sulla sicurezza alimentare" della Commissione Europea, approvato nel 1999, enunci la precauzione tra i "principi della sicurezza alimentare" cui ci si deve attenere. Al punto 14 del "Libro bianco" si prevede infatti che: "Ove appropriato si applicherà il principio di precauzione nelle decisioni di gestione del rischio" (28).

La cronaca recente offre esemplificazioni significative della rilevanza del principio di precauzione nel settore alimentare. Si pensi, ad esempio, ai casi, assai diversi tra loro, degli organismi geneticamente modificati (OGM) (29) e dell'encefalopatia spongiforme bovina (BSE) (30).

Non sono qui affrontati aspetti tecnici relativi a casi specifici. Si esprimono invece argomentazioni di carattere generale relative al principio di precauzione nel settore alimentare, nonché alcune considerazioni tratte dai due esempi specifici ora citati, ma con una valenza più ampia.

Tra i motivi che rendono il principio di precauzione pertinente con i rischi alimentari si possono citare schematicamente i seguenti:

- molti alimenti disponibili in commercio sono eterogenei, con composizioni complesse che talvolta le stesse etichette non definiscono in modo univoco;
- gli alimenti che giungono sulla tavola del consumatore derivano spesso da una catena di lavorazione complessa, in cui intervengono operatori diversi in vari stadi successivi;
- la gravità dei rischi alimentari copre uno spettro di gravità molto ampio, che spazia tra le piccole reazioni di origine infettiva oppure allergica ed effetti fisiopatologici o tossici gravi fino alla letalità;
- l'insorgenza di un eventuale danno sanitario si può manifestare in modi diversi, che vanno dall'effetto acuto immediato all'effetto cronico a lungo termine;
- le prime sperimentazioni di modificazioni genetiche sono state effettuate su vegetali commestibili.

A tutto ciò si deve poi aggiungere il fatto che all'alimentazione sono associati valori simbolici e culturali molto forti.

Per quanto riguarda poi specificamente la gestione dei rischi che coinvolgono la popolazione infantile (31, 32), varie motivazioni rendono il principio di precauzione particolarmente importante. Tra queste si possono ricordare:

- gli effetti degli agenti nocivi per la salute dei bambini sono in alcuni casi meno studiati rispetto agli effetti per gli adulti;
- lo sviluppo biologico cui sono soggetti i bambini può rendere più rilevante l'effetto nocivo di un rischio rispetto agli adulti;

Considerazioni sulla recente evoluzione del rischio alimentare

L'alimentazione è un esempio eloquente dell'evoluzione che negli ultimi decenni le società industrializzate hanno avuto nei confronti dei rischi. L'espressione "società del rischio", riferita alla civiltà moderna, ha avuto particolare successo (33, 34). La "società del rischio" è caratterizzata da nuovi rischi che ciascuna delle nuove tecnologie introduce, da una maggiore attenzione e sensibilità da parte del pubblico verso i rischi (come attestano anni di studio sulla percezione del rischio, a partire dai noti studi di Paul Slovic (35)), ma anche, svariati settori, da possibilità sempre maggiori di garantire sicurezza. Oggi gli alimenti in commercio sono, per molti aspetti, assai più sicuri rispetto ad anni non lontani. Ciò è stato possibile grazie sia a nuove tecnologie (per esempio per la conservazione), sia a sempre più precise regolamentazioni cui produttori e distributori di alimenti devono attenersi.

In particolare è innegabile che dal punto di vista batteriologico i cibi oggi disponibili siano molto più sicuri rispetto al passato (sebbene mutazioni, possibilità di adattamento, sviluppo di resistenze impongano di non abbassare la guardia).

Il rischio chimico è invece molto diffuso. Precisi vincoli di controllo, regolati anche con specifiche normative, rendono rari i rischi acuti, mentre rischi a lungo termine, non identificabili

con le normali metodologie messe in atto prima di autorizzare la commercializzazione, non possono mai essere esclusi.

Se dunque, per moti aspetti, i rischi alimentari che si corrono nelle società contemporanee sono inferiori rispetto a tempi recenti, si deve anche notare come nel pubblico la percezione verso rischi alimentari sia ovunque aumentata (36). Nelle società sviluppate si sono infatti esauriti i timori di rischi alimentari derivanti da carestie, ma sono molto aumentati i timori per rischi connessi all'intreccio tra alimentazione, ambiente, sviluppo tecnologico. Si può non a torto dire che si sia verificata una sorta di "inversione" culturale: oggi si tende ad identificare il "naturale" con "sano" e "lavorato" con "rischioso". Fino a tempi recenti accadeva prevaleva l'atteggiamento contrario. La lavorazione umana è invece oggi vista con sospetto. A questo proposito si deve notare che frequentemente i mezzi di informazione contribuiscono a generare allarmi e sospetti. (37)

Il settore alimentare è dunque un esempio significativo della necessità (e della difficoltà) di trovare un punto di incontro tra valutazione scientifica, decisione politica, percezione pubblica. La precauzione si trova al centro di tale crocevia.

Due esempi emblematici

I due esempi citati inizialmente (OGM e BSE) offrono utili spunti per esprimere alcune considerazioni di sull'applicazione del principio di precauzione nel settore alimentare. Si è già detto che non si vuole qui entrare in dettagli tecnici, ma soltanto esprimere considerazioni di carattere generale.

Considerazioni a partire dal caso degli OGM

I possibili rischi associati agli OGM sono, come è noto, oggetto di dibattito (38).

Per alcuni rischi è spesso invocato il principio di precauzione. Alla luce dei criteri generali di applicazione del principio di precauzione, sopra brevemente citati, non sempre il ricorso al principio di precauzione è pertinente. Senza entrare nella troppo ampia analisi di ciascuno dei possibili rischi, si esprimono qui soltanto due riflessioni. La prima riguarda l'adozione del principio di precauzione con riferimento agli OGM nell'Unione Europea. La seconda riguarda il rapporto tra il principio di precauzione e il cosiddetto principio di "equivalenza sostanziale".

A livello europeo, per quanto riguarda l'alimentazione, il settore degli OGM costituisce l'ambito per il quale si è fatto maggiormente ricorso al principio di precauzione. Senza entrare nel dettaglio delle singole direttive, si deve rilevare come la legislazione europea relativa agli OGM stia orientando verso un'inversione del cosiddetto "onere della prova". Un approccio "di mercato", finora assai diffuso, attribuiva a coloro che temono un danno il dovere di dimostrare le ragioni per cui opporsi ad un'innovazione ad un prodotto, a una tecnologia. Il regime di autorizzazione preventiva, ora imposto dalla Commissione Europea per gli OGM, capovolge la prospettiva: si esige infatti che coloro che propongono un'innovazione forniscano preventivamente argomentazioni a sostegno dell'innocuità. Ciò significa passare dalla prospettiva "tutto ciò che non è vietato è permesso" alla prospettiva "tutto ciò che non è permesso vietato". In questo senso si esprimono in particolare la direttiva 2001/18/CE sull'emissione deliberata nell'ambiente di OGM (39) e i regolamenti 1829/2003 e 1830/2003 (40, 41). Nella direttiva, riconoscendo la difficoltà per il legislatore a seguire l'aggiornamento tecnologico, si propone non tanto una normativa rigida e cristallizzata, ma uno strumento flessibile, che, conformemente al principio di precauzione, sia in grado di fornire un orientamento per governare le diverse situazioni che progressivamente si succedono.

Alcune indicazioni di carattere generale contenute nella direttiva possono offrire utili spunti per un approccio precauzionale non solo agli alimenti geneticamente modificati o derivanti da OGM, ma più in generale ai rischi alimentari. Tra questi vi sono:

- una dettagliata valutazione del rischio;
- il monitoraggio a lungo termine;
- norme sull’etichettatura e sulla tracciabilità;
- consultazione di comitati di esperti.

Allo stesso tempo, si deve constatare come proprio gli OGM costituiscano un caso in cui l’applicazione del principio di precauzione può sollevare alcune ambiguità.

Sotto il profilo metodologico, infatti, l’approccio precauzionale propone una valutazione del rischio che consideri tutte le fasi del processo che conduce ad un prodotto. Come si è sopra evidenziato, l’approccio precauzionale richiede di adottare criteri di prudenza fino a quando non vi siano evidenze di innocuità sufficientemente consolidate. Si è già detto che ciò non è sinonimo di blocco o divieto assoluto: significa piuttosto che occorre valutare caso per caso, adottando misure da modulare progressivamente per renderle coerenti con le evidenze scientifiche che nel tempo vengono prodotte.

Alcuni autori ravvisano una differenza, o addirittura una contrapposizione, tra un simile approccio e il cosiddetto principio della “equivalenza sostanziale”, che considera non tanto il procedimento seguito, quanto i risultati. Il concetto di “equivalenza sostanziale” venne enunciato per la prima volta nel 1991 dall’Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico (OCSE) a proposito degli organismi geneticamente modificati (OGM) e prevede che se un OGM si comporta, sotto ogni punto di vista, come il suo equivalente non transgenico, esso debba essere considerato “sostanzialmente equivalente” a quello non modificato, e che quindi non possa essere sottoposto a restrizioni o “discriminazioni” (42). Nel 1996 la *Food and Agriculture Organization* (FAO) e l’OMS formularono congiuntamente la seguente definizione di “equivalenza sostanziale”: “una dimostrazione che le caratteristiche analizzate per l’organismo geneticamente modificato, o per lo specifico alimento da esso derivato, sono equivalenti alle stesse caratteristiche dell’organismo di paragone. I livelli e le variazioni delle caratteristiche dell’organismo transgenico devono essere all’interno delle variazioni delle stesse caratteristiche nell’organismo di paragone” (42). Il concetto di “equivalenza sostanziale” è stato criticato come antiscientifico e si è voluto vedere nella sua adozione un tentativo di aggirare analisi biochimiche e tossicologiche che vengono sistematicamente applicate per additivi alimentari, pesticidi, farmaci (43). A questo proposito si possono sollevare due argomentazioni a favore del concetto di “equivalenza sostanziale”.

Il primo argomento è di tipo tecnico: le analisi biochimiche e tossicologiche sono ben applicabili a sostanze isolate, e permettono di identificare il *no observe adverse effect level* (NOAEL), che, ridotto con opportuni fattori di sicurezza (in genere pari a 100) conduce alla definizione dell’*acceptable daily intake* (ADI). Il metodo è invece difficilmente applicabile ad un alimento, in particolare geneticamente modificato (in cui la nuova proteina, derivante dalla modificazione, rappresenta in genere meno dello 0.1% delle proteine totali).

Il secondo argomento, che si vuole qui sottolineare perché significativo per il contesto, è che l’ “equivalenza sostanziale” non esclude un quadro precauzionale: come l’approccio cautelativo, infatti, anche l’ “equivalenza sostanziale” non è tanto una tecnica scientifica, quanto un approccio che, come la precauzione, richiede una valutazione flessibile da applicarsi caso per caso.

Considerazioni a partire dal caso della BSE

Il caso della BSE ha offerto molti spunti di riflessione per chi si occupa di valutazione e gestione del rischio. Esso è anche stato studiato in rapporto al principio di precauzione e, più in generale, alle politiche cautelative (44).

Senza entrare nei dettagli del problema della BSE, né in un esame complessivo del caso della BSE alla luce del principio di precauzione, può essere interessante considerare un episodio accaduto nell'autunno del 1999 a proposito dell'autorizzazione a riprendere l'esportazione di carne bovina inglese.

All'epoca, infatti, l'Agenzia Francese di Sicurezza Sanitaria degli alimenti (*Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments*, AFSSA) si pronunciò in modo opposto rispetto al Comitato Scientifico istituito presso la Commissione Europea.

In un parere pubblicato il 30 settembre 1999 l'AFSSA si pronunciò contro la proposta, avanzata da più parti, di sospendere l'embargo verso le carni di origine inglese. Gli esperti dell'AFSSA si espressero nel modo seguente: "Allo stato attuale delle conoscenze e dei dati epidemiologici disponibili, il gruppo di esperti emette dunque il parere che il rischio che la Gran Bretagna esporti carni di bovini contaminate non può essere considerato come completamente controllato" (45). Sulla base del "rischio non completamente controllato", l'AFSSA si oppose alla ripresa delle importazioni dalla Gran Bretagna verso la Francia. Il governo francese adottò la posizione dell'AFSSA.

Le argomentazioni enunciate dall'AFSSA sono un esempio di interpretazione del principio di precauzione. Riassumendo schematicamente il parere dell'Agenzia francese, le argomentazioni possono essere riassunte nei termini seguenti:

- Non si può escludere che i prioni possano diffondersi in altri tessuti degli animali, oltre che nel tessuto nervoso e nei gangli linfatici.
- La trasmissione dell'infezione potrebbe seguire una via diversa rispetto a quelle finora identificate (farine di origine animale e trasmissione dalla mucca al vitello): una decrescita meno rapida dell'epidemia negli ultimi tempi potrebbe infatti suggerire la presenza di una terza via.
- L'assenza di casi identificati tra i vitelli nati dopo il 1995 non significa che alcuni animali non siano infettati, in quanto il tempo di incubazione è di circa 54-60 mesi.
- Non è dimostrata l'affidabilità del sistema di identificazione e di tracciabilità adottato in Gran Bretagna.

Poco tempo dopo il Comitato Scientifico istituito presso la Commissione Europea (costituito dai rappresentanti dei comitati specializzati nazionali e da altri otto esperti) si espresse in modo opposto, e cioè a favore dell'interruzione dell'embargo (46). Secondo il Comitato, infatti, i rischi derivanti dalle carni inglesi non potevano essere considerati superiori rispetto a quelli delle carni provenienti da altri paesi.

Le argomentazioni portate dal Comitato europeo possono essere riassunte nei termini seguenti:

- La presenza di prioni in piccolissime proporzioni in alcuni tessuti non è sufficiente per dedurre che essi abbiano capacità di infettare: per esempio non vi sono dimostrazioni che il tessuto muscolare possa causare infezioni.
- L'esistenza di una terza via di trasmissione non può essere scartata a priori, ma al momento essa non è dimostrata. Si può inoltre ritenere che la sua incidenza sia trascurabile, tenendo conto della correttezza della stima di decrescita dell'epidemia ottenuta con un modello predittivo basato sulle due motivazioni classiche (farine e trasmissione materna).

- Lo studio epidemiologico, volto ad identificare il peggior scenario di trasmissione ipotizzabile, ha stimato che su un numero di circa 75.000 unità annue esportate, si possa ipotizzare al massimo un rischio di 1,3 animali infetti. Per quanto riguarda le farine, la situazione può essere considerata sotto controllo grazie al divieto di utilizzo.
- L'utilità di test allo stadi pre-clinico non è ancora provata.

L'organizzazione dei controlli della tracciabilità non è tema scientifico, ma riguarda la gestione del rischio. Non è pertanto di competenza del Comitato Scientifico.

I pareri contrapposti dell'AFSSA e del Comitato Scientifico europeo, in entrambi dei quali si fa riferimento all'approccio precauzionale, permettono di sviluppare alcune considerazioni.

Si deve innanzitutto rilevare che tra le due istituzioni non vi sono divergenze significative per quanto riguarda i dati epidemiologici alla base dell'analisi. Le divergenze insorgono invece nelle valutazioni che se ne traggono.

L'Agenzia francese insiste sulle incertezze residue e sulle ipotesi che non possono essere scartate. Il Comitato europeo, invece, sottolinea l'assenza di prove empiriche a sostegno dell'ipotesi di trasmissioni diverse rispetto a quelle previste nel modello tradizionale (che prevede la trasmissione attraverso soltanto due modalità).

L'Agenzia considera poi con maggiore ampiezza la possibilità di quadri eziologici più complessi e imprevedibili, mentre il Comitato europeo adotta un approccio più rigido, confermando i dati disponibili e dichiarandosi pronto a modificare le valutazioni soltanto quando vi siano elementi probanti e non soltanto ipotesi.

Inoltre, l'AFSSA invoca il principio di precauzione sulla base del fatto che il rischio non può essere considerato nullo, mentre il Comitato europeo ritiene che l'ottenimento di un rischio residuo di 1,3 casi per anno, sulla base di un criterio cautelativo, permetta di considerare sufficienti le misure adottate.

Si noti infine che anche il caso della BSE, come già riportato a proposito degli OGM, ripone il problema dell'onere della prova

Alcuni spunti offerti dai due casi

I due esempi qui adottati permettono di trarre alcune ulteriori considerazioni con valenza più generale.

Innanzitutto, alla luce di quanto esposto, è evidente come la definizione del livello di rischio accettabile sia di competenza non degli scienziati, bensì dei responsabili politici. Gli esperti forniscono i dati tecnici sulla base di precise procedure di valutazione dei rischi. Spetta poi alle autorità competenti scegliere quali misure e quali livelli di sicurezza adottare. I documenti riguardanti il principio di precauzione, come si è già detto, raccomandano che questo processo sia trasparente e coinvolga anche i cittadini e tutti gli attori in gioco.

Inoltre, si può constatare come il principio di precauzione non sia una regola di condotta, ma un orientamento cui ispirarsi nell'adottare misure di protezione. La "giusta" precauzione è difficile da identificare, proprio perché richiede di basarsi non soltanto su dati scientifici validati e condivisi, ma anche su considerazioni di altro tipo. Dalla parte opposta, certamente sono lontane dalla precauzione la negazione sistematica dei rischi, la sordità nei confronti dei segnali premonitori, ma anche la strumentalizzazione delle incertezze e delle controversie scientifiche, la trasformazione di ipotesi in dogmi, la pretesa di eradicare qualsiasi rischio dal nostro vissuto.

Bibliografia

1. Bronner G. *L'incertitude*. Paris: Presses Universitaires de France; 1997.

2. Popper KR. *La logica della scoperta scientifica*. Torino: Einaudi; 1970.
3. Republique Française. Loi constitutionnelle n. 2005-205 du 1^{er} mars 2005 relative a la Charte de l'environnement. *Journal Officiel de la Republique Française* n. 51, 2 mars 2005.
4. Republique Française. Loi 95-101 du 2 février 1995 relative au renforcement de la protection de l'environnement (loi Barnier). NOR : ENVX9400049L, art. 1. *Journal Officiel de la Republique Française* n. 29, 3 février 1995.
5. United Nations. *Rio Declaration on Environment and Development*. Doc A/CONF.151/26 (Vol. I); 1992. Disponibile all'indirizzo: www.un.org/documents/ga/conf151/aconf15126-1annex1.htm; ultima consultazione 20/12/05.
6. Poulard J. Le principe de précaution. Rapport adopté lors de la session d'avril 1999. Paris: Ordre National des Médecins; 1999.
7. DeKay ML. Risk-based decision analysis in support of precautionary policies. *J Risk Res* 2002;5(4):391-417.
8. Stirling A, Tickner JA. Implementing precaution: assessment and application tools for health and environmental decision making. In: Martuzzi M, Tickner JA (Ed.). *The precautionary principle: protecting public health, the environment and the future of our children*. Copenhagen: WHO Office for Europe; 2004. p. 181-208.
9. Comitato Nazionale per la Bioetica. *Il principio di precauzione: profili bioetici, filosofici, giuridici*. Roma: Comitato Nazionale per la Bioetica; 2004.
10. Biocca M. Risk communication and the precautionary principle. *Eu J Oncol Library* 2003;2:241-6.
11. Von Moltke K. *The Vorsorgeprinzip in West German environmental policy*. Royal Commission on Environmental Pollution. Twelfth Report: Best practicable environmental option. London: HMSO; 1988.
12. United Nations. *Declaration of the United Nations Conference on Human Environment*; 1972. Disponibile all'indirizzo: <http://www.unep.org/Documents.multilingual/Default.asp?DocumentID=97&ArticleID=1503>; ultima consultazione 22/12/05.
13. Conferenza Interministeriale. *Ministerial Declaration of the Second International Conference on the Protection of North Sea*; 1987. Paragraphs VII and XVI.1. Disponibile all'indirizzo: <http://www.intfish.net/docs/1987/nsc/nsc2.htm>; ultima consultazione 27/12/05.
14. Conferenza Interministeriale. *Ministerial Declaration of the Third International Conference on the Protection of the North Sea*. 1990. Preamble. Disponibile all'indirizzo: <http://www.intfish.net/docs/1990/nsc/nsc3.htm>; ultima consultazione 27/12/05.
15. Gray JS. Statistics and the precautionary principle. *Marine Pollution Bulletin* 1990;21:174-6.
16. Jordan A, O'Riordan T. The precautionary principle: a legal and policy history. In: Martuzzi M, Tickner JA (Ed.). *The precautionary principle: protecting public health, the environment and the future of our children*. Copenhagen: WHO Office for Europe; 2004. p. 31-48.
17. Commissione Mondiale per l'Ambiente e lo Sviluppo. *Il futuro di tutti noi*. (Rapporto Brundtland). Milano: Bompiani; 1988.
18. Bergen Ministerial Declaration on Sustainable Development in the ECE Region 93 UN Doc. A/CONF.151/PC/10, 1 YB Intl Env'tl Law 429, 4312;1990.
19. World Trade Organisation. *WTO Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures*. Disponibile all'indirizzo: http://www.wto.org/english/tratop_e/sps_e/sps_e.htm. Ultima consultazione 27/12/05.
20. *Cartagena Protocol on Biosafety. Convention on Biological Diversity*; 2000. Disponibile all'indirizzo: www.biodiv.org/biosafety; ultima consultazione 20/12/05.

21. Unione Europea. *Trattato sull'Unione Europea (Trattato di Maastricht)*; 1992. Disponibile all'indirizzo: http://europa.eu.int/scadplus/treaties/maastricht_it.htm; ultima consultazione 20/12/05.
22. Unione Europea. *Trattato di Amsterdam*; 1997. Disponibile all'indirizzo: <http://europa.eu.int/eur-lex/lex/it/treaties/dat/11997D/htm/11997D.html>; ultima consultazione 20/12/05.
23. Unione Europea. Versioni consolidate del Trattato sull'Unione Europea e del Trattato che istituisce la Comunità Europea (2002/C 325/01). *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee* 2002;C324:1-184.
24. Commissione Europea. *Guidelines on the application of the precautionary principle*; 1998. HB/hb d (98). 17/10/98. DG XXIV.
25. Commissione Europea. *Communication from the Commission on the precautionary principle*. COM (2000) 1; 2000. Disponibile all'indirizzo: http://europa.eu.int/comm/environment/docum/20001_en.htm; ultima consultazione 27/12/05.
26. Consiglio delle Comunità Europee. *Conclusioni della Presidenza. Consiglio Europeo di Nizza. 7, 8 e 9 dicembre 2000*. Disponibile all'indirizzo: http://europa.eu.int/council/off/conclu/dec2000/dec2000_it.htm; ultima consultazione 27/12/05.
27. Unione Europea. Trattato che adotta una Costituzione per l'Europa (2004). *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* C310 del 16 dicembre 2004.
28. Commissione Europea. *Libro bianco sulla sicurezza alimentare. COM(1999) 719 def.* Bruxelles: Commissione delle Comunità Europee; 1999.
29. Finucane ML, Holup J. Psychosocial and cultural factors affecting the perceived risk of genetically modified food: an overview of the literature. *Soc Sci Med* 2005;60(7):1603-12.
30. Comité Consultatif National d'Éthique pour les Sciences de la Vie et de la Santé. *L'information à propos du risque de transmission de la maladie de Creutzfeldt-Jakob*. Paris: Comité Consultatif National d'Éthique pour les Sciences de la Vie et de la Santé; 2004. (Avis 85).
31. Martuzzi M, Tickner JA. Introduction. The precautionary principle: protecting public health, the environment and the future of our children. In: Martuzzi M, Tickner JA (Ed.). *The precautionary principle: protecting public health, the environment and the future of our children*. Copenhagen: WHO Office for Europe; 2004. p. 7-14.
32. World Health Organization, European Environment and Health Committee. *How can the precautionary principle help protect the future of our children?* Working paper. Fourth Ministerial Conference on Environment and Health. Budapest, Hungary, 23-25 June 2004. Disponibile all'indirizzo: <http://www.who.dk/document/hms/edoc11.pdf>; ultima consultazione 27/12/05.
33. Beck U. *La società del rischio*. Roma: Carocci; 2000.
34. Beck U. *La società globale del rischio*. Trieste: Asterios; 2001.
35. Slovic P. Perception of risk. *Science* 1987;236(4799):280-5.
36. Watkins C. Analyzing consumer perception. *Inform* 2002;13(6):447-52.
37. Karatzas I. Risk communication and public trust. *The IPTS Report* 2004;82:2-7.
38. Accademia delle Scienze. *Sicurezza Alimentare e OGM*. Consensus Document. Roma: Accademia delle Scienze; 2004.
39. Parlamento Europeo e Consiglio dell'Unione Europea. Direttiva 2001/18/CE del 12 marzo 2001. Emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati e che abroga la direttiva 90/220/CEE del Consiglio - Dichiarazione della Commissione. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee* 17 aprile 2001; L106:1-39.

40. Parlamento Europeo e Consiglio dell'Unione Europea. Regolamento (CE) n. 1829/2003 del 22 settembre 2003 relativo agli alimenti e ai mangimi geneticamente modificati. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* 18 ottobre 2003; L281:1-23.
41. Parlamento Europeo e Consiglio dell'Unione Europea. Regolamento (CE) n. 1831/2003 del 22 settembre 2003 Tracciabilità e etichettatura di organismi geneticamente modificati e tracciabilità di elementi e mangimi ottenuti da organismi geneticamente modificati, nonché modifica alla direttiva 2001/18/CE. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* 18 ottobre 2003; L268:24-28.
42. Miller HI. Agricultural biotechnology, law, and food biotechnology regulation. In: Murray TH, Mehlman MJ (Ed.). *Encyclopedia of ethical, legal, and policy issues in biotechnology*. Vol. 1. New York: Wiley; p. 37-46.
43. Séralini GE. Organismes génétiquement modifiés (OGM). In : Dupont Y (Ed.). *Dictionnaire des risques*. Paris: Armand Colin; 2004. p. 286-290.
44. Van Zwanenberg P, Millstone E. "Mad cow disease" 1986-2000: how reassurances undermined precaution. In: Harremöes P, Gee D, MacGarvin M, Stirling A, Keys J, Wynne B, Guedes Vaz S (Ed.). *Late lessons form early warnings: the precautionary principle 1986-2000*. Copenhagen: European Environment Agency (Environmental Issue Report n. 22); 2001. p. 157-167.
45. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Avis relatif au projet d'arrêté du 28 octobre 1998 établissant des mesures particulières applicables à certains produits d'origine bovine expédiés du Royaume Uni. Paris: AFSSA; 1999. Disponible all'indirizzo: <http://www.afssa.fr/ftp/afssa/basedoc/a991011.pdf>; ultima consultazione 27/12/05.
46. La Documentation Française. Crise se la vache-folle. Repères chronologiques. Disponible all'indirizzo: www.ladocfrancaise.gouv.fr/dossier_actualite/esb/chronologie_shtml#1999; ultima consultazione 20/12/05.

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

Roma, dicembre 2005 (n. 4) 10° Suppl.