



Istituto Superiore di Sanità

Dipartimento Ambiente e Salute

*Studio di monitoraggio di policlorodibenzodiossine (PCDD),
policlorodibenzofurani (PCDF), e policlorobifenili (PCB) nel latte materno di
donne residenti nella Provincia di Brescia (Novembre 2015 – Ottobre 2018)*

RELAZIONE SCIENTIFICA CONCLUSIVA

*a cura di Elena De Felip, Roberto Miniero, Anna Maria Ingelido, Annalisa
Abballe*

Responsabile Scientifico: Elena De Felip

Maggio 2019

Unità Operativa

Reparto “Esposizione Umana a Contaminanti Ambientali”, Dipartimento Ambiente e Salute,
Istituto Superiore di Sanità

Gruppo di lavoro

Per l’analisi chimica:

Abate Vittorio

Abballe Annalisa

Dellatte Elena

De Luca Silvia

Ferri Fabiola

Fulgenzi Anna Rita

Iacovella Nicola

Iamiceli Anna Laura

Ingelido Anna Maria

Marra Valentina

Per l’analisi statistica:

Miniero Roberto

Obiettivo dello studio

Lo studio ha avuto lo scopo di definire l'esposizione a policlorodibenzodiossine (PCDD), policlorodibenzofurani (PCDF), e policlorobifenili (PCB) di donne residenti a Brescia e zone limitrofe a presumibile esposizione incrementale a questi inquinanti (DGD 1 Brescia città, DGD 2 Brescia hinterland e DGD 3 Valle Trompia) a fronte dell'esposizione di donne residenti in un'area a presumibile contaminazione "di fondo" dagli stessi inquinanti (DGD 5 (Bassa Bresciana)). La valutazione dell'esposizione è stata effettuata attraverso il biomonitoraggio, analizzando le concentrazioni degli inquinanti in campioni di latte materno. Lo studio prevedeva che in ogni area venissero arruolate 40 donatrici aventi caratteristiche simili (primiparità, età compresa tra i 20 e i 35 anni, residenza nella zona da almeno 10 anni). Le donatrici dovevano raccogliere un campione del proprio latte nell'intervallo temporale compreso tra la quarta e l'ottava settimana dal parto. Al momento del prelievo a ognuna delle donatrici doveva essere somministrato un questionario mirato a raccogliere informazioni su dati antropometrici e stile di vita.

Lo studio è stato condotto in collaborazione con la ASL di Brescia (attualmente Azienda di Tutela della Salute (ATS) di Brescia), responsabile della selezione delle strutture territoriali da coinvolgere nello studio, della selezione delle donatrici e del loro arruolamento, della somministrazione del materiale informativo e del questionario, della raccolta e conservazione del campione fino al trasporto in ISS, della divulgazione del piano di biomonitoraggio e della presentazione dei risultati (quest'ultima, congiuntamente con ISS).

Sono stati a cura dell'ISS (nello specifico, dell'Unità "Esposizione Umana a Contaminanti Ambientali" del Dipartimento Ambiente e Salute) il disegno dello studio, la predisposizione del materiale per le donatrici, l'analisi dei contaminanti, e la valutazione dei relativi risultati.

Donatrici partecipanti allo studio

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico di Brescia.

Nella Figura 1 vengono illustrate le zone di arruolamento delle donne residenti a Brescia e zone limitrofe (di seguito indicate come "esposte") e delle donne residenti nell'area di controllo, considerate a esposizione di fondo ("non esposte").

In sintesi, sono stati raccolti 82 campioni di latte, 41 appartenenti al gruppo delle esposte e 41 a quello delle non esposte.

Nell'arruolamento particolare attenzione è stata dedicata al bilanciamento delle donatrici per fascia di età, parametro questo a elevata criticità, considerando come l'età sia nota influenzare il carico corporeo degli inquinanti organici persistenti quali quelli analizzati nello studio.

Ogni partecipante allo studio ha compilato, con l'aiuto di un operatore della ASL, un questionario contenente domande su stile di vita e abitudini alimentari da utilizzarsi a supporto dell'interpretazione dei dati analitici.

Analiti e variabili di interesse per lo studio

PCDD e PCDF (comunemente indicati come “diossine”) e PCB costituiscono tre famiglie di sostanze chimiche organoclorurate composte da numerosi congeneri (210 tra PCDD e PCDF, 209 PCB). Tra le diossine, solo 7 congeneri di PCDD e 10 di PCDF, caratterizzati da comuni meccanismi di azione, sono ritenuti altamente tossici. Per quanto riguarda i PCB, 12 congeneri presentano un'azione tossica assimilabile a quella delle diossine e vengono identificati come PCB diossina-simili (DL-PCB, divisi nelle due classi dei non-orto PCB e dei mono-orto PCB, in funzione della presenza o meno di un atomo di cloro in posizione *orto*). Tutti gli altri congeneri, caratterizzati da una diversa gamma di attività a livello tossicologico, vengono identificati come non diossina-simili (NDL-PCB).

Per esprimere il potenziale tossicologico di una miscela di congeneri ad azione diossina-simile la concentrazione di ogni congenere viene moltiplicata per un fattore di conversione (TEF, *toxicity equivalency factor*) che “pesa” la sua tossicità relativamente al congenere più attivo (2,3,7,8-tetraclorodibenzodiossina o 2,3,7,8-TCDD, TEF = 1); si ottiene in tal modo una concentrazione analitico-tossicologica espressa in equivalenti di tossicità (TEQ, o unità TE). Il procedimento di normalizzazione mediante l'uso dei TEF consente quindi di esprimere il contenuto di diossine e/o DL-PCB come somma di tutte le concentrazioni analitico-tossicologiche dei singoli congeneri.

Tra le varie scale di tossicità relativa esistenti, per molti anni la più utilizzata è stata quella adottata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) nel 1998 (Van den Berg et al., 1998). Nel 2005 i valori TEF per i 29 congeneri d'interesse sono stati rivalutati dal WHO (Van den Berg et al., 2006) e la nuova scala di tossicità è entrata progressivamente in uso.

Nel presente studio i risultati analitici dei 29 congeneri con attività diossina-simile sono stati convertiti in unità TE utilizzando la più recente scala TEF del 2005.

Per quanto riguarda i PCB ad azione non diossina-simile, sono stati analizzati i sei congeneri cosiddetti “indicatori” (PCB 28, 52, 101, 138, 153, 180), considerati a maggiore interesse espositivo per le matrici biologiche. Come di prassi, le concentrazioni di questi congeneri sono state riportate come concentrazione analitica cumulativa (NDL₆-PCB). In aggiunta ai sei indicatori, e considerando la storica esposizione a PCB di Brescia e dintorni, sono state determinate le concentrazioni di tre ulteriori congeneri ritenuti di qualche rilievo espositivo (PCB 74, 99, e 170) al fine di ottenere un quadro quanto più possibile esaustivo dell'esposizione complessiva a PCB.

Le informazioni sulle variabili di carattere non analitico di interesse per lo studio, raccolte tramite compilazione del questionario, hanno riguardato principalmente i dati antropometrici delle donatrici, le abitudini e l'ambiente di vita, la dieta.

Analisi chimica

Dopo scongelamento e omogeneizzazione, a ogni campione (20 g) sono stati aggiunti gli standard interni (SI), ovvero traccianti marcati con ^{13}C in numero pari ai congeneri da dosare.

L'analisi dei campioni è stata accompagnata da quella dei "bianchi procedurali" per la valutazione delle interferenze, e dal controllo sistematico delle rese di recupero degli SI utilizzando come soglia di accettabilità il 60% e come intervallo raccomandato 60-120%.

Ogni campione è stato estratto due volte con un'estrazione liquido-liquido effettuata con miscela di etil etere, *n*-esano e metanolo. L'estratto organico è stato pesato e purificato con eluzione su colonna di solfato di sodio. L'eluato è stato quindi concentrato e sottoposto a ulteriore purificazione su sistema automatizzato multicolonna DEXTech (LCTech, DE).

La determinazione della percentuale del grasso è stata effettuata per via gravimetrica su una frazione dell'eluato della colonna di solfato.

La quantificazione degli analiti – basata sui *Methods 1613B e 1668C* della *Environmental Protection Agency* per PCDD e PCDF (US EPA, 1994) e PCB (US EPA, 2008) – ha fatto ricorso all'impiego della gas cromatografia ad alta risoluzione abbinata a spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRGC-HRMS) e a bassa risoluzione (HRGC-LRMS) rispettivamente per PCDD, PCDF e DL-PCB, e NDL₆-PCB e NDL₉-PCB.

Analisi statistica

Sono state stimate le medie, le mediane e i rispettivi minimi e massimi delle concentrazioni espresse su base grassa di PCDD+PCDF, PCDD+PCDF+DL-PCB, DL-PCB e NDL-PCB relative ai due gruppi delle esposte e non esposte. Per PCDD+PCDF, PCDD+PCDF+DL-PCB e DL-PCB tali stime sono state effettuate sulle concentrazioni analitico-tossicologiche (TE, equivalenti di tossicità di 2,3,7,8-TCDD ottenute utilizzando la scala di fattori di equivalenza di tossicità (TEF) adottata dal WHO nel 2005), mentre per gli NDL-PCB sulle concentrazioni analitiche. Le stime delle differenze tra i due gruppi sono state effettuate mediante il test di Mann-Whitney.

L'influenza delle singole variabili da questionario sulle concentrazioni delle summenzionate famiglie di sostanze chimiche è stata studiata mediante regressione multipla o regressione robusta. Quest'ultima opzione è stata scelta quando nella valutazione preliminare della distribuzione di

frequenza della variabile dipendente (la concentrazione della famiglia di inquinanti) questa non risultava normale o normalizzabile. Prima di sviluppare i modelli di regressione è stata effettuata una disamina delle variabili personali, ambientali e alimentari per determinarne la loro frequenza relativa in termini di dati mancanti (*missing*). In quest'ambito, a causa dei limiti di natura metodologica (*overfitting*) dato il numero di campioni (n=82), si è proceduto a identificare le variabili che a un primo *screening* risultassero diverse nel confronto tra casi e controlli. L'obiettivo era, infatti, quello di non superare la soglia operativa di 10 variabili per campione (Harrell, 1996) a partire dal modello iniziale. A questo fine è stato osservato che i) i consumi alimentari, relativi alle categorie alimentari considerate nel questionario, non risultavano significativamente diversi tra i due gruppi di donatrici o presentavano un tasso di *missing* molto elevato, ii) il consumo di prodotti di origine locale risultava di ridotta rilevanza o addirittura nullo. Infine, è sembrato importante inserire tra le variabili indipendenti anche l'anno di raccolta del campione o, in alternativa, il giorno di raccolta, perché distribuito in maniera differenziale tra esposte e non esposte nei tre anni di campionamento. Da queste osservazioni sono scaturite due decisioni: i) le variabili alimentari non sono state prese in considerazione nello sviluppo del modello di esposizione e ii) l'anno di raccolta del campione è stato preferito al giorno in quanto considerato come variabile categorica e, quindi, compatibile con i limiti imposti dal rischio di *overfitting*.

Nei modelli di regressione sviluppati (uno per ogni gruppo di analiti) sono state incluse inizialmente le seguenti variabili indipendenti: esposta/non esposta, età, BMI, settimana di raccolta del latte, zona di residenza (centro città, periferia, zona rurale) e anno di campionamento (2016, 2017, 2018). Nonostante la scelta relativa alla variabile temporale, il numero di coefficienti di regressione atteso risultava essere superiore al limite adottato di 10 variabili per campione e ancora a rischio di *overfitting*. Come criterio per la loro eliminazione progressiva è stato adottato il punto di *cut off* in cui la variabile pertinente mostrava un valore di $P > 0.20$, cioè un valore ininfluenza per quanto concerne il confondimento residuo (Maldonado and Greenland, 1993).

Prima della finalizzazione i modelli sono stati controllati per l'eventuale violazione del principio di omoschedasticità attraverso la valutazione della normalità dei residui (test della curtosi e dell'asimmetria della distribuzione di frequenza). Infine, tutte le variabili sono state controllate per la loro collinearità o multicollinearità attraverso la determinazione del *Variance Inflation Factor* (VIF) delle singole variabili e della loro combinazione.

Risultati

I risultati individuali delle concentrazioni delle sostanze analizzate nel latte delle donatrici sono riportate nell'Allegato.

Nella Tabella 1 sono riportate le stime di mediana, media, minimo e massimo delle concentrazioni delle sostanze chimiche misurate suddivise per il gruppo delle donatrici esposte e non esposte. Tutte le concentrazioni sono espresse su base grassa. In Figura 2 sono riportati graficamente i valori mediani di concentrazione di PCDD, PCDF e DL-PCB (Figura 2a) e di NDL-PCB (Figura 2b) nei due gruppi di donatrici residenti a Brescia e zone limitrofe e nelle aree a esposizione di fondo in provincia di Brescia.

Le differenze di concentrazione tra esposte e non esposte, valutate mediante il test di Mann-Whitney, sono risultate significative per le somme PCDD+PCDF in pgWHO-TEQ₂₀₀₅/g di grasso (P=0.0003), PCDD+PCDF+DL-PCB in pgWHO-TEQ₂₀₀₅/g (P=0.0005), DL-PCB in pgWHO-TEQ₂₀₀₅/g di grasso (P=0.0010), NDL₆-PCB (P=0.0451) e NDL₉-PCB (P=0.0432).

Il rapporto delle concentrazioni mediane esposte/non esposte è risultato pari a 1.33 per PCDD+PCDF+DL-PCB, 1.25 per PCDD+PCDF, 1.45 per DL-PCB, 1.12 per NDL₆-PCB e 1.13 per NDL₉-PCB.

Valutazione dei fattori che influenzano l'esposizione

Per quanto concerne la valutazione delle variabili che influenzano le concentrazioni delle varie classi di analiti nel latte delle donatrici, i principali risultati sono riportati nella Tabella 2. Le variabili che risultano significativamente associate alle concentrazioni analitico-tossicologiche di PCDD+PCDF, PCDD+PCDF+DL-PCB e DL-PCB e alle concentrazioni analitiche di NDL₆-PCB e NDL₉-PCB sono: esposta/non esposta, età, BMI, e settimana in cui è stato raccolto il campione. Tutti i valori del coefficiente di correlazione *R* delle regressioni significative riportate in Tabella 2 sono significativi con un $P < 0.001$. La variabile anno di campionamento, per la quale pur è stata rilevata un'associazione con le concentrazioni degli analiti nel latte, non è stata tuttavia considerata nel modello di statistica multivariata, perché collineare con la variabile esposta/non esposta. In dettaglio, tra i coefficienti aggiustati, il maggiore incremento in termini di pg di famiglia chimica/g di grasso per unità di variabile indipendente è quello relativo alla classificazione delle donatrici come esposte o non esposte (Tabella 2). L'intervallo di incrementi di concentrazione passando dal gruppo delle non esposte a quello delle esposte va da 0.197 ng/g per la concentrazione NDL₆-PCB a 0.279 pgTEQ₀₅/g per la concentrazione di DL-PCB.

Un altro fattore che contribuisce all'incremento del carico corporeo è l'età, come osservato in tutti gli studi di biomonitoraggio su inquinanti organici persistenti e bioaccumulabili come quelli oggetto del presente studio.

Il fattore che, invece, risulta essere associato a una diminuzione di carico corporeo è l'aumento dell'indice di massa corporea (BMI) con un coefficiente massimo per le concentrazioni di NDL₆-PCB di 0.073 pg/g.

Di interesse è il significato della variabile relativa alle settimane di distanza dal parto in cui è stato effettuato il campionamento del latte: a una distanza temporale maggiore è associata una minore concentrazione di PCDD+PCDF (come pgTEQ₀₅/g) ma non di DL-PCB e NDL₆-PCB, i cui coefficienti non risultano significativi.

Analisi congenere-specifica

L'analisi congenere-specifica (effettuata sulle concentrazioni analitiche dei singoli congeneri) è stata applicata come strumento di indagine per valutare l'impatto sorgente-specifico sui soggetti d'interesse. Dal punto di vista statistico la valutazione è stata effettuata come in precedenza, e cioè mediante regressione multipla o robusta.

Per quanto riguarda PCDD e PCDF, i congeneri che sono risultati caratterizzare le donatrici esposte sono i seguenti: 2,3,7,8-T₄CDD, 1,2,3,7,8-P₅CDD, 1,2,3,4,7,8-H₆CDD, 1,2,3,6,7,8-H₆CDD, 1,2,3,7,8,9-H₆CDD, O₈CDD, 1,2,3,4,7,8-H₆CDF e 1,2,3,6,7,8-H₆CDF (Tabella 3). Considerando la *P* del modello, e il coefficiente e la probabilità della variabile pertinente, i modelli di regressione che maggiormente caratterizzano le donatrici esposte sono quelli relativi ai congeneri 1,2,3,4,7,8-H₆CDD, 1,2,3,6,7,8-H₆CDD e 1,2,3,6,7,8-H₆CDF. Tra le variabili considerate, l'incremento di età è quello che, per la maggior parte dei congeneri, contribuisce in modo costante all'incremento di concentrazione osservato. Il BMI invece, e solo per 2,3,7,8-T₄CDD, 1,2,3,7,8-P₅CDD e 1,2,3,4,7,8-H₆CDD, ha andamento contrario.

Come osservato per le concentrazioni analitico-tossicologiche di PCDD+PCDF (Tabella 2), anche per la maggior parte dei singoli congeneri riportati in Tabella 3 più lontana dal parto è la settimana di raccolta del latte minore è la concentrazione osservata.

Relativamente alla differenza di profilo espositivo tra i due gruppi di donatrici, il congenere 1,2,3,6,7,8-H₆CDD, già identificato come indicatore d'esposizione nelle emissioni dell'industria metallurgica Bresciana (Miniero et al., 2017), è anche tra i più abbondanti tra quelli presenti nel siero umano come anche il 2,3,4,7,8-PeCDF (EFSA, 2004).

Per i PCB, tutti i modelli relativi ai congeneri dei DL-PCB della Tabella 4 hanno mostrato una elevata probabilità ($P=0.0000$) e, in particolare, le donatrici esposte mostrano sempre concentrazioni più elevate rispetto ai controlli in maniera statisticamente significativa. I tassi di incremento di concentrazione da non esposte a esposte è compreso tra 0.23 pg/g (PCB 189) a 0.38 pg/g (PCB118). Tra i fattori indipendenti che influenzano i livelli di concentrazione dei DL-PCB, età e BMI hanno la maggiore importanza: quest'ultimo, in particolare, mostra un andamento inversamente proporzionale rispetto all'aumento di concentrazione. Tra i 6 NDL-PCB indicatori solo PCB 138 e PCB 153 hanno mostrato un comportamento analogo a quello dei DL-PCB con un incremento di concentrazione osservato nelle donatrici esposte (Tabella 5). Tra le variabili indipendenti, l'età e il BMI (con un andamento opposto) sono i fattori più importanti nel caratterizzare il livello d'esposizione, come già osservato per PCDD, PCDF e DL-PCB.

Confronto con altri studi di biomonitoraggio relativi a Brescia e provincia

I risultati ottenuti possono essere confrontati con i dati ottenuti in uno studio effettuato dall'ISS nel 2008-2009 (Abballe et al., 2013), riepilogati in Tabella 6. Questo studio, finanziato dalla ASL di Brescia e con essa condotto in collaborazione, aveva l'obiettivo di caratterizzare l'esposizione a PCDD, PCDF e PCB dei lavoratori dell'industria metallurgica bresciana a fronte di un gruppo di residenti in città non professionalmente esposti e di un gruppo di residenti in zone rurali della provincia.

Nel confrontare i dati si deve tener conto che, a fronte di elementi comuni (arruolamento di soggetti residenti nell'area da almeno 10 anni, analisi effettuate dallo stesso laboratorio, stesso metodo di analisi) esistono alcune differenze fondamentali tra i due studi: nello studio del 2008-2009 le determinazioni analitiche vennero effettuate su campioni compositi (*pool*) costituiti da circa 10 campioni individuali; vennero arruolati solo soggetti di sesso maschile; l'età media dei soggetti era significativamente più elevata (*range* di valori medi di età: 35.3-47.1 anni). Un'ulteriore differenza è determinata dalla diversa matrice biologica analizzata, rappresentata dal siero nello studio del 2008-2009, sebbene tale differenza non sembri essere associata a particolari criticità. Diversi autori (Wittsiepe et al., 2007; Nakamura et al., 2008) hanno infatti rilevato che, a livello individuale, esiste una correlazione molto significativa tra le concentrazioni di diossine e PCB nelle due matrici biologiche; in particolare, alcuni autori hanno osservato un rapporto sangue/latte di circa 1 (Wittsiepe et al., 2007) in termini di equivalenti totali di tossicità (concentrazione di PCDD+PCDF+DL-PCB in pgWHO-TE/g di grasso).

Nei limiti sopra evidenziati, il confronto tra i due studi evidenzia per la città di Brescia un *trend* di marcata diminuzione dell'esposizione sia per le sostanze diossina-simili che per i NDL-PCB, per i quali la diminuzione è di oltre un fattore sette.

Pur con l'ulteriore limite alla confrontabilità determinato dalla diversità delle aree a esposizione di fondo considerate di due studi, anche per la provincia di Brescia si osserva un *trend* di diminuzione dell'esposizione alle famiglie degli inquinanti d'interesse. Tale diminuzione è in linea con quanto osservato per Brescia relativamente a PCDD, PCDF e DL-PCB, e praticamente coincidente per quanto riguarda la somma dei sei PCB indicatori.

Valutazione delle concentrazioni rilevate in un contesto di risk assessment

Sostanze diossina-simili

L'approccio che meglio consente un'immediata valutazione dei dati ottenuti è quello che fa ricorso ai valori di equivalenti di biomonitoraggio (BE) specifici per le sostanze diossina-simili (Aylward et al., 2008).

I valori di BE sono definiti come la concentrazione - o il *range* di concentrazioni - di una sostanza in una matrice biologica compatibile con i valori guida di esposizione stabiliti in base alle caratteristiche tossicologiche della sostanza stessa, e derivata integrando i dati di tossicocinetica con le indicazioni fornite dal *risk assessment* effettuato sulla sostanza. I BE sono stati concepiti per essere usati come uno strumento di *screening* che permetta di valutare se i valori di biomonitoraggio ottenuti in uno studio abbiano un margine di sicurezza rispetto ai valori guida di esposizione di natura sanitaria derivati per la sostanza, mentre non rappresentano un criterio diagnostico e non possono essere usati per valutare la probabilità di un effetto avverso in un individuo o in una popolazione.

I valori di BE per gli inquinanti diossina-simili sono stati derivati da diverse agenzie, quali il *World Health Organization Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA)*, l'*European Commission Scientific Committee on Food (ECSCF)*, l'*United Kingdom Committee on Toxicology (UKCOT)*, e la *U.S. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)* (Aylward et al., 2008). Questi valori sono stati derivati facendo riferimento agli effetti a più elevata sensibilità osservati per le diossine su modello animale e sviluppando una modellizzazione che tiene conto di una serie di fattori (relativi a farmacocinetica, distribuzione nel grasso corporeo, applicazione di fattori di incertezza, etc.) per l'estrapolazione dei valori di concentrazione dal modello animale all'uomo. Su questa base, JECFA, ECSCF e UKCOT hanno derivato intervalli di BE che sono essenzialmente gli stessi e sempre superiori a 30 pgWHO-TE/g di grasso (nello specifico, 40-70 pgWHO-TE/g grasso, 42-74 pgWHO-TE/g di grasso e 31-55 pgWHO-TE/g di grasso, rispettivamente), mentre l'ATSDR, che ha applicato

un modello che parzialmente differisce da quello delle altre tre agenzie, ha indicato come unico valore di BE un valore pari a 15 pgWHO-TE/g di grasso.

I valori di BE così derivati possono essere utilizzati come riferimento per il confronto con i dati di biomonitoraggio ottenuti in uno studio, e forniscono una valutazione iniziale sul grado di priorità di un *follow up* sulla popolazione esaminata in termini di *risk assessment*. Nello specifico, valori di concentrazione all'interno del *range* di valori di BE vengono associati a una priorità di medio grado per un successivo *follow up*, mentre valori al di sotto sono associati a una priorità di grado più basso (LaKind et al., 2008).

Si osserva che nel presente studio tutti i valori rilevati sono al di sotto dell'estremo inferiore (31 pg/g grasso) del *range* di valori ricavato da JECFA, ECCSCF e UKCOT, mentre due valori (15.8 e 20 pgWHO-TE/g di grasso) si collocano al di sopra del valore più cautelativo (15 pgWHO-TE/g di grasso) ricavato da ATSDR.

Vale sottolineare che i valori di BE sopra riportati, derivati dalle varie agenzie, saranno verosimilmente modificati in seguito alla pubblicazione della recente *Scientific Opinion on Risk for animal and human health related to the presence of dioxins and dioxin-like PCBs in feed and food* dell'European Food Safety Agency (EFSA, 2018). Nell'*Opinion* viene stabilito un valore di sicurezza per esposizione alimentare a sostanze diossina-simili di circa 7 volte inferiore a quello attualmente in uso (EFSA, 2005), in base ad alcune evidenze di recente acquisizione su possibili effetti sulla funzione riproduttiva maschile anche a livelli di esposizione finora considerati associati a un incremento di rischio trascurabile.

Proprio queste ulteriori evidenze tossicologiche confermano come sia di primaria importanza tendere a una diminuzione dell'esposizione umana alle sostanze diossina-simili, mettendo in atto tutte le possibili misure per ridurre la loro immissione nell'ambiente.

PCB

Per una valutazione di massima dei dati ottenuti in un contesto di *risk assessment* basato sul dato di dose interna si può fare riferimento alla valutazione dell'*Agence française de sécurité sanitaire des aliments* (AFSSA/ANSES, 2010). Considerando una serie di studi tossicologici ed epidemiologici che identificano gli effetti dei PCB sullo sviluppo mentale e motorio dei bambini esposti *in utero* come gli effetti critici meglio documentati, l'AFSSA pone il valore soglia di concentrazione critica per le donne in gravidanza e in allattamento a 700 ng/g di grasso di PCB totali (di cui la concentrazione dei NDL₆-PCB rappresenta, nel latte materno, una frazione non inferiore al 60% e la concentrazione dei NDL₉-PCB una frazione di circa il 70-80%).

Conclusioni

Le differenze di concentrazione tra i due gruppi di donatrici “esposte” e “non esposte” sono risultate significative per tutte le classi di analiti considerati.

Tra le variabili che risultano significativamente associate alle concentrazioni osservate, l’età è il parametro che risulta avere maggiore influenza.

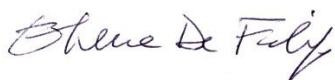
Per quanto riguarda le concentrazioni dei composti diossina-simili, espresse in pgTE₂₀₀₅/g di grasso, il rapporto tra le concentrazioni mediane di esposte/non esposte è pari a 1.33 per PCDD+PCDF+DL-PCB, a 1.25 per PCDD+PCDF, e a 1.45 per DL-PCB, mentre per le concentrazioni dei NDL-PCB (espresse in ng/g di grasso) tale rapporto è di 1.12 per NDL₆-PCB e 1.13 per NDL₉-PCB (per tutte le classi di analiti, $0.000 < P < 0.045$ al Test di Mann-Whitney).

Relativamente al profilo congenere-specifico dei contaminanti, si osserva come elemento principale un aumento di concentrazione nelle donne di Brescia e zone limitrofe di alcuni congeneri, significativo soprattutto per 1,2,3,4,7,8-H₆CDD, 1,2,3,6,7,8-H₆CDD e 1,2,3,6,8,9,-H₆CDF.

Nei limiti della comparabilità, il confronto tra i dati del presente studio e quelli ottenuti in un precedente studio di biomonitoraggio effettuato su gruppi di residenti a Brescia e provincia evidenzia un netto *trend* di esposizione in diminuzione, particolarmente marcato per i PCB non diossina-simili.

Il Responsabile Scientifico

Dr.ssa Elena De Felip



Bibliografia

Abballe A, Barbieri PG, di Domenico A, Garattini S, Iacovella N, Ingelido AM, Marra V, Miniero R, Valentini S, De Felip E (2013). Occupational exposure to PCDDs, PCDFs, and PCBs of metallurgical workers in some industrial plants of the Brescia area, northern Italy. *Chemosphere* 90(1), 49-56.

AFSSA/ANSES, 2010. Opinion of the French Food Safety Agency on interpreting the health impact of PCB concentration levels in the French population, 2010.

<https://www.anses.fr/en/system/files/RCCP2008sa0053EN.pdf>

Aylward L., LaKind J., and Hays S. (2008). Derivation of Biomonitoring Equivalent Values for 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) and Related Compounds: A screening Tool for Interpretation of Biomonitoring Data in Risk Assessment Context. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 71, 1499-1598.

EFSA's 1st Scientific Colloquium Report - Dioxins. European Food Safety Authority (EFSA) 01 December 2004 <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2004.EN-124>

EFSA (European Food Safety Authority), 2005. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to the presence of non dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCB) in feed and food. (Question No EFSA-Q-2003-114). Adopted on 8 November 2005. *EFSA Journal* 2005; 3(11):284, 137 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2005.284>

EFSA (European Food Safety Authority), 2018. Scientific Opinion on Risk for animal and human health related to the presence of dioxins and dioxin-like PCBs in feed and food. Adopted 14 June 2018, Published 20 November 2018. *EFSA Journal* 2018;16(11):5333.

doi: 10.2903/j.efsa.2018.5333

Harrell F., Lee K., and Mark D. B. (1996) Multivariable prognostic models: Issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Statistics in Medicine*, 15:361–387

LaKind J., Aylward L., Brunk C., DiZio S., Dourson M., Goldstein D., Kilpatrick M. et al. (2008). Guidelines for the communication of biomonitoring equivalents: Report from the Biomonitoring Equivalents Expert Workshop. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 51, S16-S26.

Maldonado G. and Greenland S. (1993). Simulation study on confounder selection strategies. *American Journal of Epidemiology* 138(11), 923-936.

Miniero R., Ingelido A.M, Abballe A., di Domenico A., Valentini S., Marra V., Barbieri P.G., Garattini S., Speziani F., De Felip E. (2017). Occupational exposure to PCDDs, PCDFs, and DL-PCBs in metallurgical plants of the Brescia (Lombardy Region, northern Italy) area. *Chemosphere*, 166, 418-421.

Nakamura T., Nakai K., Matsumura T., Suzuki S., Saito Y., Satoh H. (2008). Determination of dioxins and polychlorinated biphenyls in breast milk, maternal blood and cord blood from residents of Tohoku, Japan. *Science of the Total Environment* 1;394(1):39-51.

US EPA 1994. Method 1613: Tetra-Through Octa-Chlorinated Dioxins and Furans by Isotope Dilution HRGC/HRMS.

US EPA 2008. Method 1668B Chlorinated Biphenyl Congeners in Water, Soil, Sediment, Biosolids, and Tissue by HRGC/HRMS.

Van den Berg M., Birnbaum L., Bosveld AT., Brunström B., Cook P., Feeley M., Giesy JP., Hanberg A., Hasegawa R., Kennedy SW., Kubiak T., Larsen JC., van Leeuwen FX., Liem AK., Nolt C., Peterson RE., Poellinger L., Safe S., Schrenk D., Tillitt D., Tysklind M., Younes M., Waern F., Zacharewski T. (1998). Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environmental Health Perspectives* 106(12):775-92. Review.

Van den Berg M., Birnbaum LS., Denison M., De Vito M., Farland W., Feeley M., Fiedler H., Hakansson H., Hanberg A., Haws L., Rose M., Safe S., Schrenk D., Tohyama C., Tritscher A., Tuomisto J., Tysklind M., Walker N., Peterson RE. (2006). The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicological Sciences* 93(2):223-41.

Wittsiepe P., Furst P., Schrey F., Lemm M., Kraft G., Eberwein G., Winneke M. (2007). PCDD/F and dioxin-like PCB in human blood and milk from German mothers. *Chemosphere*, 67 S286-S294.

Tabelle e Figure

Tabella 1. Analisi statistica descrittiva delle concentrazioni di PCDD, PCDF e DL-PCB (in pgWHO₀₅TE/g grasso) e NDL₆-PCB e NDL₉-PCB (in ng/g grasso) nel latte delle donatrici residenti a Brescia e zone limitrofe e delle donatrici residenti in aree a esposizione di fondo.

	N	Minimo	P ₅	P ₂₅	Mediana	Media geometrica	Media	P ₇₅	P ₉₅	Massimo
Esposte e Non esposte										
Tot TE	82	2.50	4.35	5.31	6.85	6.90	7.31	8.69	11	20
PCDD+PCDF	82	1.62	2.35	3.02	3.92	3.90	4.10	4.85	6.29	8.88
DL-PCB	82	0.880	1.59	2.34	2.83	2.95	3.21	3.94	5.61	12
NDL ₆ -PCB	82	15	23	41	53	55	64	69	144	346
NDL ₉ -PCB	82	19	28	49	63	66	76	82	175	411
Esposte										
Tot TE	41	4.80	5.08	6.48	8.01	7.91	8.33	9.08	14	20
PCDD+PCDF	41	2.55	2.93	3.59	4.45	4.43	4.63	5.09	7.65	8.88
DL-PCB	41	1.45	1.87	2.55	3.69	3.41	3.70	4.08	6.09	12
NDL ₆ -PCB	41	23	31	47	57	62	72	70	150	346
NDL ₉ -PCB	41	28	37	57	70	74	87	84	176	411
Non esposte										
Tot TE	41	2.50	3.90	4.95	6.01	6.03	6.30	7.17	9.33	10
PCDD+PCDF	41	1.62	2.31	2.82	3.56	3.43	3.57	4.18	5.41	6.13
DL-PCB	41	0.88	1.37	2.23	2.55	2.56	2.73	3.14	4.47	5.61
NDL ₆ -PCB	41	15	23	37	51	48	55	63	99	204
NDL ₉ -PCB	41	19	27	44	62	58	65	75	117	244

Tabella 2. Valutazione mediante regressione delle variabili che influenzano le concentrazioni delle famiglie di sostanze chimiche analizzate nel latte delle donatrici dello studio risultate significative. Per ogni famiglia di sostanze chimiche, nell'intestazione della colonna sono stati riportati il valore di P e quello di R^2 aggiustato per i gradi di libertà (nel caso della regressione multipla). In ogni cella sono stati riportati i valori variabile-specifici del coefficiente di regressione e del P relativo.

Variabile	Ln[PCDD+PCDF] $P=0.0000$, $R^2=0.57$	ln[TotTE] $P=0.0000$, $R^2=0.50$	Ln[DL-PCB] $P=0.0000$, $R^2=0.30$	Ln[NDL ₆ -PCB] $P=0.0000$ $R^2=0.37$	Ln[NDL ₉ -PCB] $P=0.0000$ $R^2=0.38$
Non esposte/esposte	0.256 (0.000)	0.268 (0.000)	0.279 (0.000)	0.197 (0.031)	0.200 (0.027)
Età (classe)	0.124 (0.000)	0.117 (0.000)	0.106 (0.000)	0.177 (0.000)	0.175 (0.000)
BMI (classe)	-0.038 (0.002)	-0.039 (0.005)	-0.041 (0.037)	-0.073 (0.002)	-0.073 (0.002)
Campionamento latte (settimana)	-0.047 (0.011)	-0.046 (0.028)	-0.043 (0.145)	—	—

Tabella 3. Valutazioni mediante regressione delle variabili che influenzano le concentrazioni analitiche (pg/g grasso) dei congeneri di PCDD e PCDF analizzati nel latte materno risultati significativi. Per ogni congenere, nell'intestazione della colonna sono stati riportati il valore di P e quello di R^2 aggiustato per i gradi di libertà (nel caso della regressione multipla). In ogni cella sono stati riportati i valori variabile-specifici del coefficiente di regressione e del P relativo.

Variabile	Ln[2,3,7,8 TCDD] $P=0.0000$, $R^2=0.31$	Ln[1,2,3,7,8 PeCDD], $P=0.0000$, $R^2=0.46$	Ln[1,2,3,4,7, 8 HxCDD], $P=0.0000$, $R^2=0.39$	Ln[1,2,3,6,7, 8 HxCDD], $P=0.0000$, $R^2=0.048$	Ln[1,2,3,7,8, 9 HxCDD] $P=0.0004$, $R^2=0.18$	Ln[OCDD] $P=0.0074$, $R^2=0.14$	Ln[1,2,3,4,7, 8 HxCDF], $P=0.0000$, $R^2=0.38$	Ln[1,2,3,6,7, 8 HxCDF], $P=0.0000$, $R^2=0.42$
Non esposte/esposte	0.176 (0.022)	0.275 (0.000)	0.312 (0.000)	0.326 (0.000)	0.205 (0.015)	0.412 (0.001)	0.293 (0.000)	0.332 (0.000)
Età (classe)	0.064 (0.000)	0.074 (0.000)	0.086 (0.000)	0.071 (0.000)	0.050 (0.000)	—	0.038 (0.000)	0.042 (0.000)
BMI (classe)	-0.027 (0.024)	-0.022 (0.026)	-0.036 (0.008)	—	—	—	—	—
Campionamento latte (settimana)	—	-0.072 (0.006)	-0.097 (0.006)	-0.0507 (0.036)	—	-0.072 (0.092)	-0.056 (0.011)	-0.058 (0.012)

Tabella 4. Valutazioni mediante regressione delle variabili che influenzano le concentrazioni analitiche (pg/g grasso) dei congeneri di DL-PCB analizzati nel latte materno risultati significativi. Per ogni congenere, nell'intestazione della colonna sono stati riportati il valore di P e quello di R^2 aggiustato per i gradi di libertà (nel caso della regressione multipla). In ogni cella sono stati riportati i valori variabile-specifici del coefficiente di regressione e del P relativo.

Variabile	Ln[PCB 105] $P=0.0000,$ $R^2=0.226$	Ln[PCB 126] $P=0.0000,$ $R^2=0.251$	Ln[PCB 169] $P=0.0000,$ $R^2=0.419$	Ln[PCB 114] $P=0.0000,$ $R^2=0.406$	Ln[PCB 118] $P=0.0000,$ $R^2=0.351$	Ln[PCB 123] $P=0.0000,$ $R^2=0.278$	Ln[PCB 156] $P=0.0000,$ $R^2=0.361$	Ln[PCB 157] $P=0.0000,$ $R^2=0.361$	Ln[PCB 167] $P=0.0000,$ $R^2=0.419$	Ln[PCB 189] $P=0.0000,$ $R^2=0.341$
Non esposte/esposte	0.306 (0.002)	0.318 (0.000)	0.310 (0.001)	0.329 (0.001)	0.386 (0.000)	0.306 (0.002)	0.262 (0.019)	0.268 (0.014)	0.296 (0.002)	0.236 (0.055)
Età (classe)	0.056 (0.001)	0.045 (0.002)	0.087 (0.000)	0.096 (0.000)	0.067 (0.000)	0.061 (0.000)	0.101 (0.000)	0.097 (0.000)	0.095 (0.000)	0.108 (0.000)
BMI (classe)	—	—	-0.056 (0.000)	-0.046 (0.003)	—	—	-0.052 (0.003)	-0.051 (0.003)	-0.040 (0.007)	-0.062 (0.002)
Campionamento latte	—	-0.079 (0.017)	—	—	—	—	—	—	—	—

Tabella 5. Valutazioni mediante regressione delle variabili che influenzano le concentrazioni analitiche (ng/g grasso) dei congeneri di NDL-PCB analizzati nel latte materno risultati significativi. Per ogni congenere, nell'intestazione della colonna sono stati riportati il valore di P e quello di R^2 aggiustato per i gradi di libertà (nel caso della regressione multipla). In ogni cella sono stati riportati i valori variabile-specifici del coefficiente di regressione e del P relativo.

Variabile	Ln[PCB 74] $P=0.0000$, $r^2=0.327$	Ln[PCB 138] $P=0.0000$, $r^2=0.376$	Ln[PCB 153] $P=0.0000$, $r^2=0.370$
Non esposte/esposte	0.296 (0.001)	0.274 (0.001)	0.166 (0.066)
Età (classe)	0.073 (0.000)	0.072 (0.000)	0.088 (0.000)
BMI (classe)	-0.023 (0.092)	-0.033 (0.010)	-0.043 (0.003)

Tabella 6. Concentrazione di PCDD, PCDF e DL-PCB (in pgWHO₀₅TE/g grasso) e NDL₆-PCB (in ng/g grasso) in gruppi di popolazione generale di Brescia e provincia, 2008-2009 (Abballe et al., 2013). Studio su *pool*, donatori M, età media dei pool in tabella 38-45 anni.

	N	Minimo	Mediana	Media	Massimo
Residenti a Brescia					
PCDD+PCDF+DL-PCB	4 pool	24	35	34	41
PCDD+PCDF	4 pool	12	21	20	27
DL-PCB	4 pool	13	14	14	14
NDL ₆ -PCB	4 pool	265	423	432	616
Residenti in aree rurali (Bagolino e Tignale)					
PCDD+PCDF+DL-PCB	5 pool	22	23	24	26
PCDD+PCDF	5 pool	12	12	12	13
DL-PCB	5 pool	10	11	12	14
NDL ₆ -PCB	5 pool	363	380	409	471

Sistema Socio Sanitario



Regione Lombardia

ATS Brescia

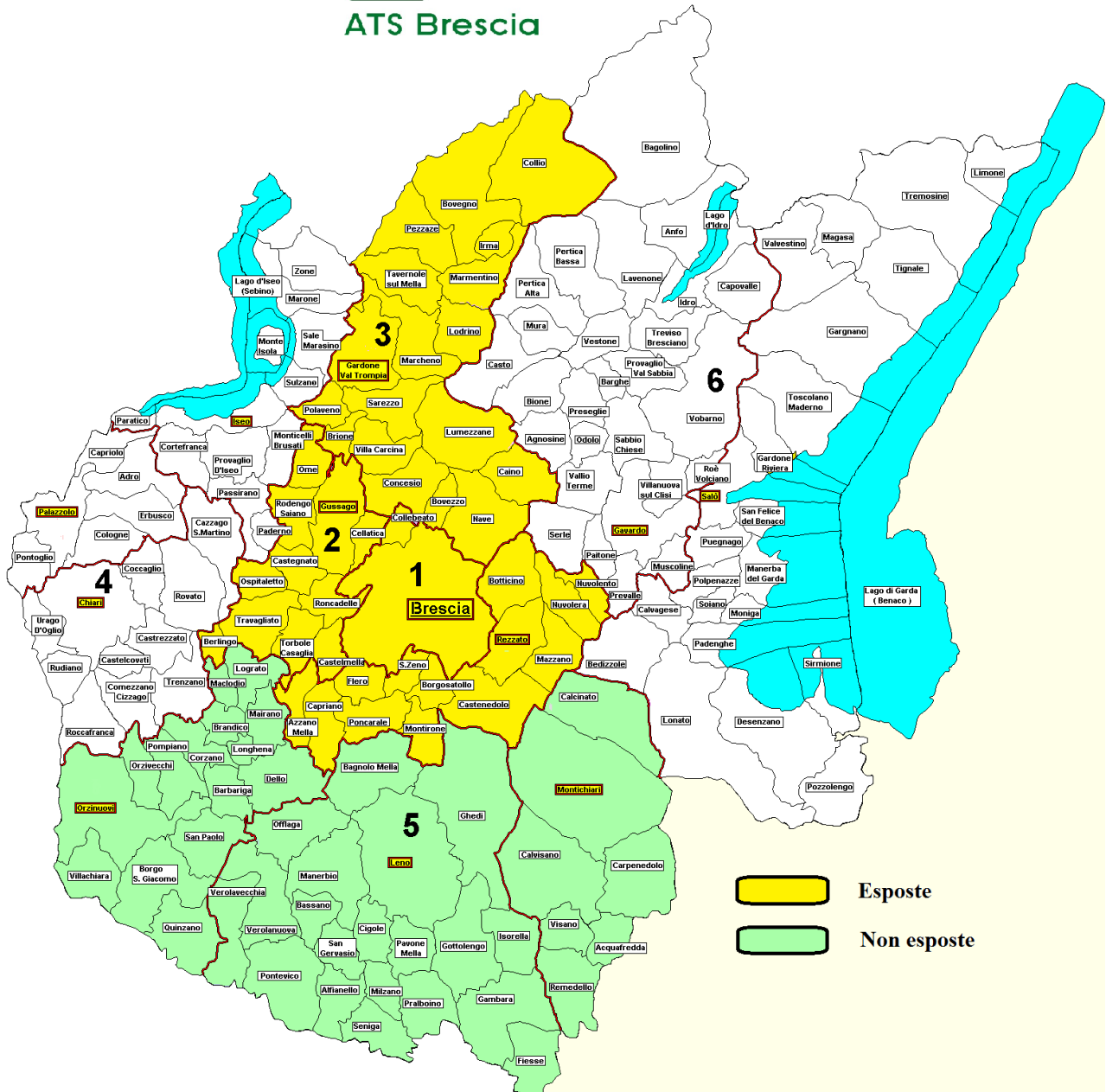


Figura 1. Zone di arruolamento delle donne residenti a Brescia e zone limitrofe (esposte) e delle donne residenti nell'area di controllo, considerate a esposizione di fondo (non esposte).

Figura 1a. Concentrazione di PCDD, PCDF e DL-PCB (pgWHO₂₀₀₅TE/g grasso) nel latte delle donatrici residenti a Brescia e zone limitrofe e in aree a esposizione di fondo.

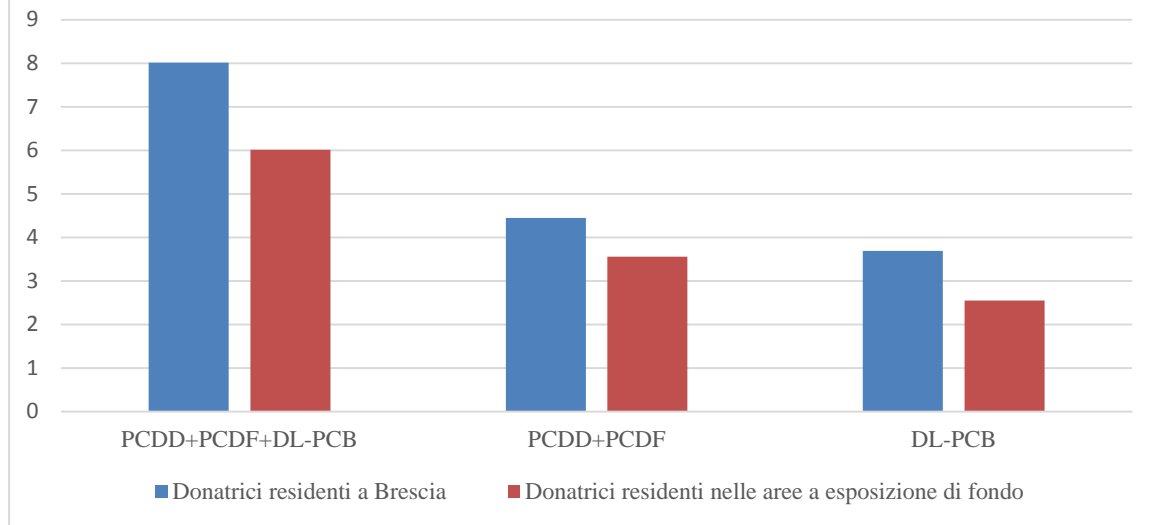
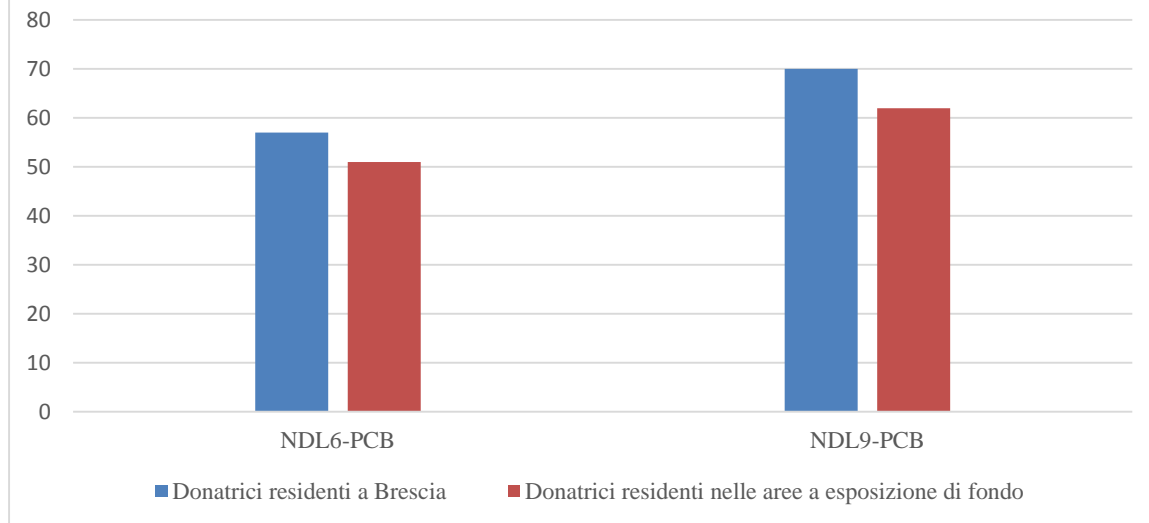


Figura 1b. Concentrazione di ND_{L6}-PCB e ND_{L9}-PCB (ng/g grasso) nel latte delle donatrici residenti a Brescia e zone limitrofe e in aree a esposizione di fondo.



Allegato

Concentrazione di PCDD, PCDF, DL-PCB e NDL-PCB nel latte delle donatrici dello studio.

BSE= Donne residenti a Brescia

BSN= Donne residenti in aree a esposizione di fondo in provincia di Brescia

Codice Campione	pgWHO-TE2005/g grasso			ng/g grasso	
	PCDD+PCDF+ DL-PCB	PCDD+PCDF	DL-PCB	Σ9 PCB	Σ6 PCB
BSE-001	7.8	4.1	3.7	64.1	53.5
BSE-002	9.1	5.1	4.0	61.2	51.3
BSE-003	12.4	6.3	6.1	106.4	87.9
BSE-004	9.2	4.9	4.3	81.3	67.8
BSE-005	6.6	3.4	3.2	61.3	50.9
BSE-006	13.6	7.7	5.9	175.1	143.7
BSE-007	10.8	6.2	4.5	78.5	65.9
BSE-008	6.1	3.6	2.5	55.3	46.1
BSE-009	7.8	5.5	2.4	84.1	70.3
BSE-010	20.0	8.4	11.6	411.4	346.0
BSE-011	6.9	3.9	3.0	56.5	46.5
BSE-012	8.5	4.8	3.7	59.0	49.4
BSE-013	8.7	4.6	4.1	76.7	64.6
BSE-014	7.4	3.4	4.0	55.1	45.9
BSE-015	9.5	5.0	4.5	95.8	79.5
BSE-016	5.5	3.2	2.4	56.3	44.0
BSE-017	6.9	3.8	3.1	77.4	65.6
BSE-018	9.8	4.9	4.9	95.5	78.4
BSE-019	8.5	4.6	3.9	56.9	47.2
BSE-020	4.8	3.4	1.4	36.8	30.9
BSE-021	5.3	3.7	1.6	55.1	46.9
BSE-023	6.0	3.0	3.0	89.6	76.1
BSE-024	5.7	3.0	2.7	61.5	52.5
BSE-025	5.1	2.6	2.5	28.1	23.5
BSE-026	6.7	3.7	3.0	78.5	66.7
BSE-027	6.5	4.0	2.5	62.1	51.3
BSE-028	8.8	5.0	3.8	58.1	47.4
BSE-029	15.8	8.9	7.0	262.5	223.9
BSE-030	7.6	4.8	2.8	68.5	57.8
BSE-031	5.2	2.9	2.3	35.8	29.1
BSE-032	10.8	6.2	4.6	176.0	150.1
BSE-033	8.1	4.4	3.7	75.5	62.9
BSE-034	8.7	5.0	3.7	82.4	68.6
BSE-035	5.9	3.4	2.5	41.8	34.8
BSE-036	9.0	5.1	3.8	69.5	57.2
BSE-038	8.6	4.4	4.2	98.2	82.1
BSE-039	8.0	4.3	3.7	107.9	92.0
BSE-040	4.8	2.9	1.9	54.7	46.6
BSE-041	8.6	6.3	2.3	56.7	47.0
BSE-042	6.9	4.2	2.8	70.8	58.6
BSE-043	9.2	5.2	3.9	71.3	57.1

Concentrazione di PCDD, PCDF, DL-PCB e NDL-PCB nel latte delle donatrici dello studio.

BSE= Donne residenti a Brescia

BSN= Donne residenti in aree a esposizione di fondo in provincia di Brescia

Codice Campione	pgWHO-TE2005/g grasso			ng/g grasso	
	PCDD+PCDF+ DL-PCB	PCDD+PCDF	DL-PCB	Σ9 PCB	Σ6 PCB
BSN-101	4.9	2.6	2.3	56.1	46.9
BSN-102	4.7	2.9	1.7	44.2	37.5
BSN-103	8.3	4.0	4.3	82.5	70.1
BSN-104	3.7	2.4	1.4	27.9	23.4
BSN-105	10.4	4.8	5.6	74.8	62.6
BSN-106	10.2	6.1	4.1	88.9	75.2
BSN-107	8.9	4.9	4.0	113.5	96.4
BSN-108	6.0	3.3	2.7	64.7	54.6
BSN-109	6.9	3.6	3.3	73.2	61.9
BSN-110	4.8	3.0	1.8	43.1	36.1
BSN-111	6.8	3.6	3.1	62.0	51.5
BSN-112	5.3	3.0	2.3	67.5	56.9
BSN-113	4.4	2.4	1.9	38.6	32.2
BSN-114	3.9	2.3	1.6	35.3	29.2
BSN-115	5.4	2.8	2.6	54.0	45.0
BSN-116	6.3	3.8	2.5	81.8	68.8
BSN-117	6.4	4.0	2.4	84.2	71.6
BSN-118	9.1	4.1	5.0	113.4	94.3
BSN-119	5.0	2.7	2.3	46.5	39.2
BSN-120	5.9	4.0	1.9	84.2	71.8
BSN-121	5.1	2.7	2.4	63.0	53.4
BSN-122	8.1	4.6	3.5	67.1	56.0
BSN-123	6.9	3.8	3.1	49.2	40.7
BSN-124	7.2	4.2	3.0	35.4	29.1
BSN-125	5.2	2.9	2.2	44.6	37.1
BSN-126	6.4	3.8	2.6	58.6	48.8
BSN-127	4.9	2.9	2.1	42.4	34.4
BSN-128	4.0	2.7	1.2	28.3	23.4
BSN-129	5.2	3.0	2.2	27.1	22.9
BSN-130	6.3	3.6	2.7	243.7	204.0
BSN-131	4.6	2.3	2.3	48.1	40.5
BSN-132	7.2	4.3	2.9	68.9	56.5
BSN-133	4.8	2.3	2.6	49.3	40.5
BSN-134	6.8	4.6	2.3	25.2	20.2
BSN-135	5.7	2.9	2.8	61.9	51.7
BSN-136	9.2	4.7	4.5	63.2	51.8
BSN-137	2.5	1.6	0.9	18.5	15.2
BSN-138	6.8	4.5	2.3	75.4	62.7
BSN-139	5.6	3.1	2.5	44.8	37.6
BSN-140	9.3	5.8	3.6	116.8	99.0
BSN-141	8.9	5.4	3.5	116.8	98.7