

BIOMARCATORI DI ESPOSIZIONE E DI EFFETTO NEL BAMBINO

Antonio Menditto e Marina Patriarca

Istituto Superiore di Sanità

Corso

**SALUTE DEL BAMBINO E SICUREZZA ALIMENTARE:
ANALISI DEL RISCHIO DA AGENTI CHIMICI E FATTORI
ASSOCIATI A STILI DI VITA**

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

22-23 giugno 2005

ESSERE UMANO ED ETA' PEDIATRICA

In accordo al 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 morfo-funzionali.

ESSERE UMANO ED ETA' PEDIATRICA

Fase prenatale (44 sett.)

Neonato (1-4 sett.)

Lattante (fino a 12 mesi)

**Bambino prima infanzia
(fino a 24 mesi)**

**Bambino seconda infanzia
(fino a 6 aa)**

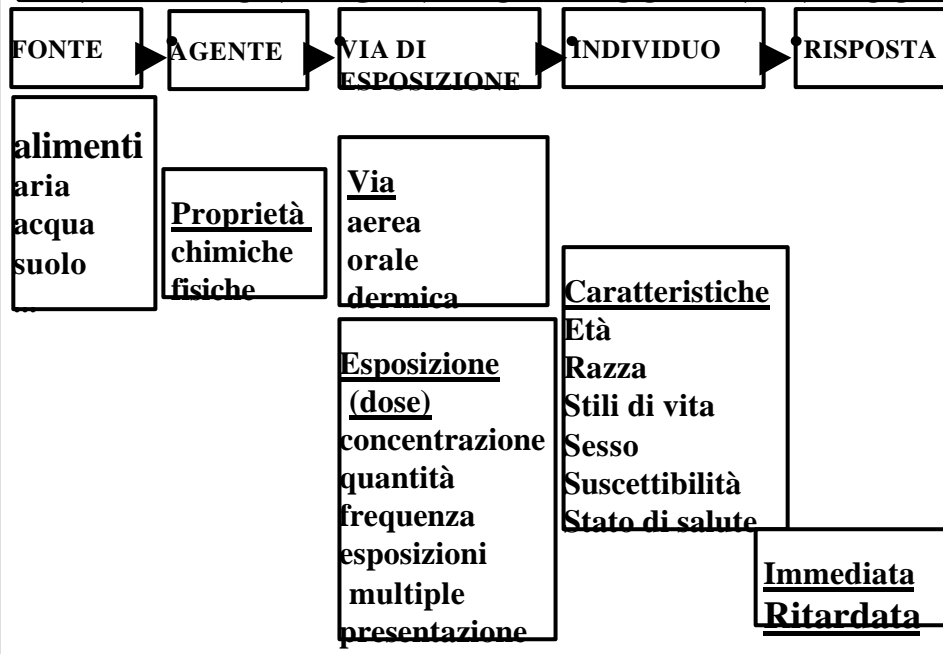
**Bambino terza infanzia
(fino alla pubertà ~12 aa)**

**Adolescenza
(fino a 18 aa)**

Durante l'età pediatrica, come durante lo sviluppo prenatale, gli esseri umani sono potenzialmente più vulnerabili agli effetti dannosi delle sostanze chimiche, anche per esposizioni considerate "sicure" per gli adulti.

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).

INTERAZIONE AGENTE CHIMICO E INDIVIDUO



ETA' PEDIATRICA E FONTI DI ESPOSIZIONE

Fase prenatale (44 sett.)	Circolazione feto-placentare
Neonato (1-4 sett.)	Allattamento al seno o con latte artificiale e svezzamento Ambiente indoor
Lattante (fino a 12 mesi)	
Bambino 1a infanzia (fino a 24 mesi)	Dieta Esplorazione orale Ambiente indoor Ambiente outdoor
Bambino 2a infanzia (fino a 6 aa)	
Bambino 3a infanzia (fino a ~12 aa)	Dieta Ambiente indoor (scuola) Ambiente outdoor Stili di vita e abitudini voluttuarie
Adolescenza (fino a 18 aa)	

Elenco sostanze contaminanti e alimenti di interesse prioritario in accordo al programma GEMS/FOOD.

Sostanza	Alimento
Aldrina, Dieldrina, DDT, TDE, DDE, Endosulfan, Endrina, Esacloro-cicloesano, Esacloro-benzene, Eptacoloro, Eptacloro epossido, Clordano, PCB (cong. 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
* o gli altri alimenti di prima necessità	

Elenco sostanze contaminanti e alimenti di interesse prioritario in accordo al programma GEMS/Food.

Sostanza	Alimento
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
Deossivalenolo	Grano, cereali
Patulina	Succo di mela
Fumonisine	Granturco, grano

* o gli altri alimenti di prima necessità

Elenco sostanze contaminanti e alimenti di interesse prioritario in accordo al programma GEMS/Food.

Sostanza	Alimento
Diazinone, Fenitrotione, Malatone, Parathon, Parathon metile, Pirimifos metile, Clorpirifos	Cereali *, vegetali, frutta, dieta totale
Aldicarb, Captan, Dimetoato, Folpet, Fosalone	Cereali *, vegetali, frutta, dieta totale
Ditiocarbammati	Cereali *, vegetali, frutti, dieta totale, acqua potabile
Radionuclidi (Cs-137, Sr-90, I-131, Pu-239)	Cereali *, vegetali, frutti, dieta totale, acqua potabile
Nitrati/nitriti	Acqua potabile
Arsenico inorganico	Acqua potabile

* o gli altri alimenti di prima necessità



MONITORAGGIO BIOLOGICO

BIOMARKER

“indicatori biologici” o “biomarcatori”.
Parametri oggetto di misura. Consentono di rilevare eventi (biochimici, molecolari, genetici, immunologici o fisiologici) in un sistema biologico che possono influenzare o predire l’insorgenza e l’evoluzione di una malattia

Misurazione, continua o ripetuta, di sostanze potenzialmente tossiche (o dei loro metaboliti o degli effetti biochimico/fisici) nei tessuti, nelle escrezioni o nell’aria espirata, al fine di valutare l’esposizione occupazionale o ambientale e i rischi per la salute attraverso un confronto con appropriati valori di riferimento sulla base della conoscenza della probabile relazione causale tra esposizione ambientale e risultanti effetti dannosi sulla salute (IUPAC)

Valori di riferimento

Rappresentano l’intervallo di concentrazione degli indicatori nella popolazione sana non esposta, con il quale vanno confrontati i risultati del monitoraggio biologico.

Permettono di definire la variabilità intra- o inter-individuale, tenuto conto di fattori confondenti (età, sesso, stili di vita, ecc.)

MONITORAGGIO AMBIENTALE

- **Controllo conformità a norme vigenti in materia di igiene occupazionale/ambientale; valutazione efficacia di misure di controllo ambientale atte a minimizzare l'esposizione**
- **Rilievo di esposizioni acute a composti pericolosi; monitoraggio di condizioni potenzialmente pericolose; attuazione immediata di misure preventive**
- **Valutazione esposizione a composti con scarso assorbimento e azione tossica sulla sede di contatto (cute, occhio, polmone)**
- **Campioni ambientali sono più facilmente ottenibili**
- **Per molti composti i dati sulla relazione tra esposizione ed effetti negativi e di tossicocinetica sono troppo limitati per proporre un valido e pratico monitoraggio biologico.**
- **Se il monitoraggio ambientale ha mostrato livelli bassi di inquinamento, la necessità di eseguire un monitoraggio biologico può venire meno**

MONITORAGGIO BIOLOGICO

Valuta l'assorbimento attraverso vie diverse rispetto a quella inalatoria (cute, tratto gastrointestinale).

Valuta l'effetto di variazioni interindividuali nell'assorbimento, metabolismo ed escrezione.

Possono essere messe in evidenza esposizioni dovute a fonti diverse (attività ricreative, residenza, dieta).

E' più direttamente correlato agli effetti negativi sulla salute.

La sua capacità di valutare l'esposizione complessiva può essere utilizzata per testare l'efficacia di azioni preventive e correttive.

Può richiedere procedure invasive (prelievo ematico) per la raccolta del campione.

Il disegno dello studio e il trattamento dei dati sono soggetti a limitazioni di carattere etico.

Aspetti sociali, etici e legali rilevanti per gli studi epidemiologici in età pediatrica

Approvazione del Comitato Etico

Gli studi epidemiologici, valutativi e medico sociali che richiedono la raccolta di dati personali devono essere approvati dal Comitato Etico

Consenso informato:

Arruolamento libero e basato sul consenso informato da parte del titolare del diritto, nel caso di 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.

Aspetti sociali, etici e legali rilevanti per gli studi epidemiologici in età pediatrica

Gestione dei campioni biologici:

Procedure documentate per la raccolta, il trasporto, la conservazione, l'analisi e l'eliminazione di campioni biologici di origine umana. Garanzia della tracciabilità del campione all'individuo donatore dello stesso attraverso la "catena di custodia".

Trattamento dei dati e comunicazione dei risultati:

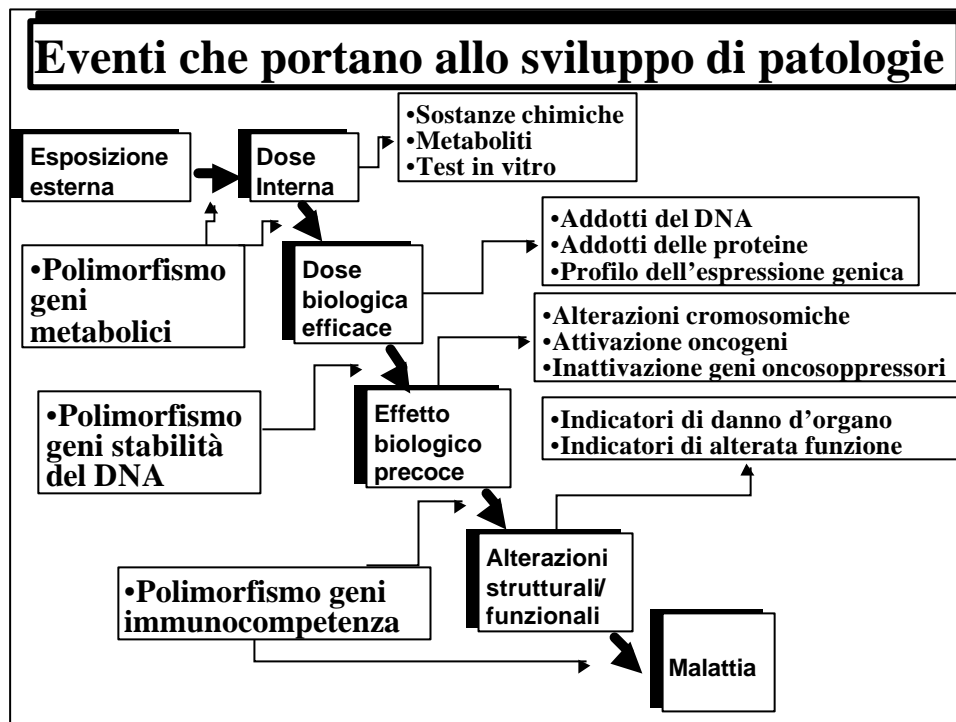
- Consenso scritto dell'interessato al trattamento dei dati (Legge n. 675/97).
- Notifica al Garante dell'esistenza della banca dati
- Misure per garantire la riservatezza dei dati
- Comunicazione all'interessato solo per il tramite di un medico designato dall'interessato o dal titolare"

Aspetti sociali, etici e legali rilevanti per gli studi epidemiologici in età pediatrica

Considerazioni etiche devono essere applicate 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. Particolare attenzione deve essere posta alla gestione delle informazioni ottenute in studi correlati a biomarker di suscettibilità in età prenatale e pediatrica, per la possibilità che l'esito di tali studi possa comportare discriminazioni nei confronti del soggetto in età pediatrica o dei suoi familiari.

CLASSIFICAZIONE DEL BIOMARKER

<i>biomarker di esposizione</i>	concentrazione di uno xenobiotico, di un suo metabolita o del prodotto della loro interazione con un componente endogeno
<i>biomarker di effetto</i>	alterazioni biochimiche morfologiche o funzionali rilevabili nell'organismo umano
<i>biomarker di suscettibilità</i>	indice di predisposizione (ereditaria od acquisita) di un individuo a subire gli effetti di uno xenobiotico



Matrici utilizzate per la Stima dell'esposizione Fetale/Neonatale - Matrici di origine materna

- **Urine**
 - Matrice disponibile in quantità adeguata e relativamente facile da ottenere.
 - La raccolta richiede cooperazione.
 - L'espressione dei risultati necessita di standardizzazione.
- **Capelli**
 - Relativamente facile da ottenere.
 - Può dare indicazioni sulla finestra di esposizione.
 - Rappresenta una misura dell'esposizione integrata a lungo termine.
 - La raccolta richiede cooperazione.
 - Il prelievo può essere non gradito.
 - Richiede speciali tecniche di prelievo.
 - Può richiedere speciali tecniche analitiche

Matrici utilizzate per la Stima dell'esposizione Fetale/Neonatale - Matrici di origine materna

- **Sangue/Siero/Plasma**
 - Matrice più facile da analizzare per alcune tipologie di contaminanti (per es. metalli).
 - E' in equilibrio con i compartimenti dove la "dose" raggiunge la sua efficacia biologica.
 - Atto medico invasivo; comporta dolore; può comportare effetti avversi (emorragia, abrasione, infezione, ematoma).
- **Saliva**
 - Matrice relativamente facile da ottenere in quantità adeguata.
 - 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.

Matrici utilizzate per la Stima dell'esposizione Fetale/Neonatale - Matrici di origine materna

- **Latte materno**
 - Matrice relativamente facile da ottenere in quantità adeguata.
 - Composizione variabile.
 - Alcune sostanze chimiche possono essere concentrate nel latte rispetto ad altre matrici biologiche se utilizzano le stesse vie per la secrezione attiva di composti nutrienti.
 - Fornisce indicazioni sull'esposizione del neonato e del lattante attraverso l'alimentazione.

Matrici utilizzate per la Stima dell'esposizione Fetale/Neonatale-Matrici di origine fetale/neonatale

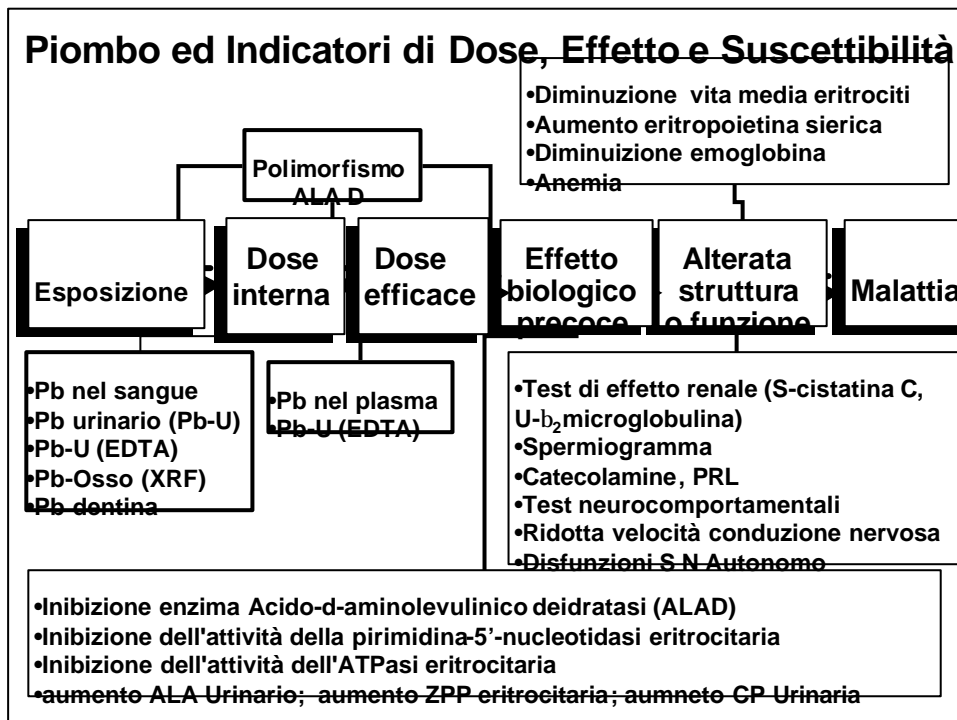
- **Sangue cordonale**
 - Matrice disponibile in quantità adeguata.
 - E' in equilibrio con i compartimenti dove la "dose" raggiunge la sua efficacia biologica.
 - Intervallo temporale utile per la raccolta del campione molto breve.
 - Per alcune sostanze chimiche (Hg) fornisce una stima della esposizione nella seconda metà del 3° trimestre di gravidanza.
- **Placenta**
 - Matrice disponibile in quantità adeguata.
 - Intervallo temporale utile per raccolta campione molto breve.
 - Indica l'esposizione materna in gravidanza (sostanze trattenute, ad es. Cd) o materno/fetale (sostanze che oltrepassano la barriera placentare, ad es. Pb e mercurio organico) a partire dal primo trimestre di gravidanza.

Matrici utilizzate per la Stima dell'esposizione Fetale/Neonatale-Matrici di origine fetale/neonatale

- **Liquido amniotico**
 - Disponibile in quantità adeguata.
 - Rappresenta una risorsa unica per la misura dell'esposizione cumulativa durante una fase critica per lo sviluppo fetale.
 - La raccolta è un atto medico invasivo, limitato a gruppi a rischio di malformazioni.
 - Intervallo temporale utile per la raccolta del campione relativamente breve (tra la 15a e la 20a settimana).
- **Urine**
 - Esame non invasivo.
 - Il prelievo richiede l'uso di bustine monouso autoadesive applicate previo lavaggio genitale.
 - L'espressione dei risultati necessita di standardizzazione.
- **Meconio**
 - Facile da ottenere.
 - Fornisce informazioni sull'esposizione cumulativa del feto.
 - L'espressione dei risultati necessita di standardizzazione.

Matrici utilizzate per la Stima dell'esposizione Fetale/Neonatale-Matrici di origine fetale/neonatale

- **Capelli**
 - Rappresenta una misura dell'esposizione integrata a lungo termine.
 - Può dare indicazioni sulla finestra di esposizione.
 - Può non essere disponibile.
 - Il prelievo può essere non gradito dai genitori.
 - Richiede speciali tecniche di prelievo.
 - Può richiedere speciali tecniche analitiche.
- **Sangue/Siero/Plasma**
 - Matrice più facile da analizzare per alcune tipologie di contaminanti (per es. metalli).
 - E' in equilibrio con i compartimenti dove la "dose" raggiunge la sua efficacia biologica.
 - La raccolta del sangue è un atto medico invasivo; comporta dolore e stress; può comportare effetti avversi (emorragia, abrasione, infezione; ematoma).



Biochemical and health effects of human lead exposure

Biochemical and health effects	Lead in blood ($\mu\text{g/L}$)		
	Children	Women	Men
Inhibition of erythrocyte ALAD activity	<100	200	200
Inhibition of erythrocyte pyrimidine-5'-nucleotidase activity	100		
Inhibition of dihydrobiopterin reductase	?	100	100
Decreased serum levels of 1,25-dihydroxy-vitamin D	?	>200	>200
Increased erythrocyte porphyrins	150-200	200-300	250-300
Inhibition of erythrocyte ATPase activity	300-400	300-400	300-400
Reduced nerve conduction velocity	?	300	300
Autonomic nervous system disfunction	?	350	350
Increased ALA excretion in urine	350	350	450
Effects on sperm morphology and function	-	-	400
Increased coproporphyrin excretion in urine	?	400	400
Decreased haemoglobin concentration	400	500	500
Impaired neurobehavioural test performance	?	400-500	400-500
Acute or chronic encephalopathy	600	800	800

WHO IPCS, EHC 3, 1977 and WHO IPCS, EHC 165, 1995

Limiti per la concentrazione di piombo nel sangue ($\mu\text{g/L}$) nella popolazione generale

	Tipo	Tutti	Bambini	Donne <45 a	Adulti F>45 a/M
Direttiva CEE 1977	Limiti (centili)	200 (50°) 300 (90°) 350 (98°)			
CDC (USA) 1980	livello di azione		250		
CDC (USA) 1991	livello di azione		100		
CHBM (DE) 1999	valore di riferimento		60	90	90/120
	livello di allarme		100	100	150
	livello di azione		150	150	250

CDC = Centers for Disease Control and Prevention, USA

CHBM = Commission on Human Biological Monitoring

Federal Health Office, Federal Environmental Agency, Germany

Evoluzione dei limiti Nuove conoscenze scientifiche derivate da studi epidemiologici

Lanphear et al. Public Health Reports, 115: 521, 2000

Studio: NHANES III 1988-1994

Campione: 4853 bambini ed adolescenti (6-16 anni)

Indicatore biologico: piombemia (PbS)

media geometrica della PbS = 1.9 µg/dl

Risultato: deficit delle capacità cognitive e delle prestazioni scolastiche associati a concentrazioni di piombo nel sangue anche inferiori a 5 µg/dl

Typical levels of pesticides and PCBs in human milk (TL) in the U.S., FDA Action Levels for whole milk (cows') (AL), Allowable Daily Intake (Adults, ADI), and Actual Daily Intake (DI) of Breast-Fed Infants and Ratio between DI and ADI.

Pesticide	TL	AL	ADI	DI	Ratio
	ppb				
Dieldrin	1-6	9	0.1	0.8	8
Heptachlor Expoxide	8-30	0.3	0.5	4.0	8
PCBs	40-100	63	1.0	14	14
Total DDT	50-200	38	5.0	28	5.6

Source: Walter J. Rogan and others. "Pollutants in Breast Milk," NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE Vol. 302 (June 26, 1980), pg. 1451

UTILIZZAZIONE DEI BIOMARKER

- **STUDI EPIDEMIOLOGICI (EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE)**
- **MONITORAGGIO BIOLOGICO**
 - popolazione generale
 - soggetti professionalmente esposti

Attività a carattere multidisciplinare che prevedono la misurazione di indicatori biochimici (biochemical markers = biomarkers)

STUDI EPIDEMIOLOGICI E LABORATORIO CLINICO

I *biomarker* sono utilizzati per misurare, valutare e/o caratterizzare:

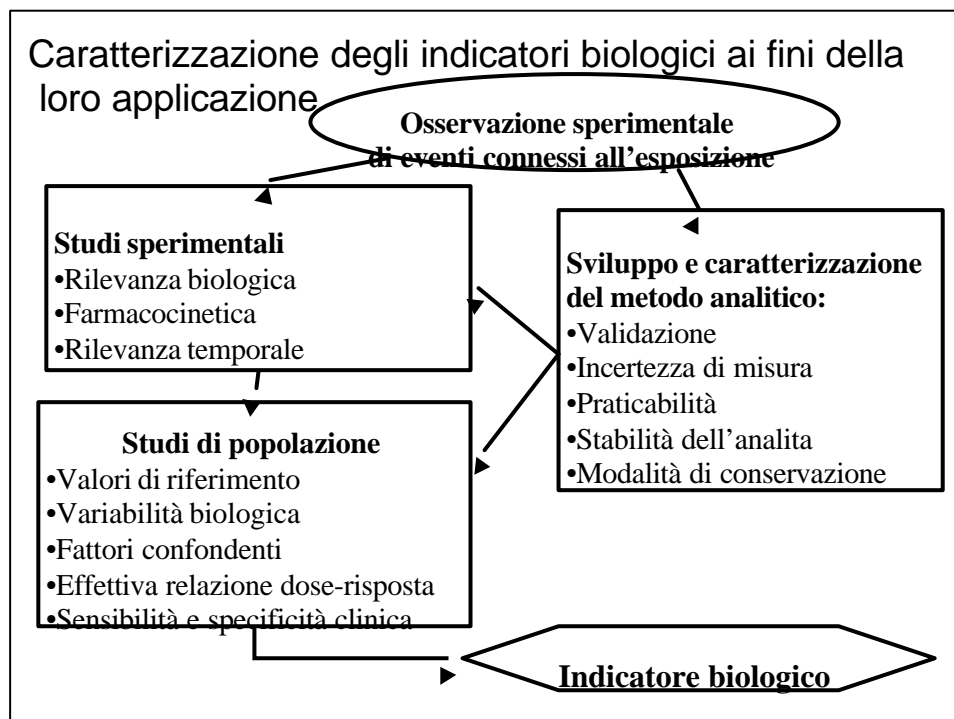
- **l'esposizione**
- **la relazione dose/risposta**
- **il rischio**
- **gli esiti**
- **i fattori di confondimento**
- **i modificatori di effetto**

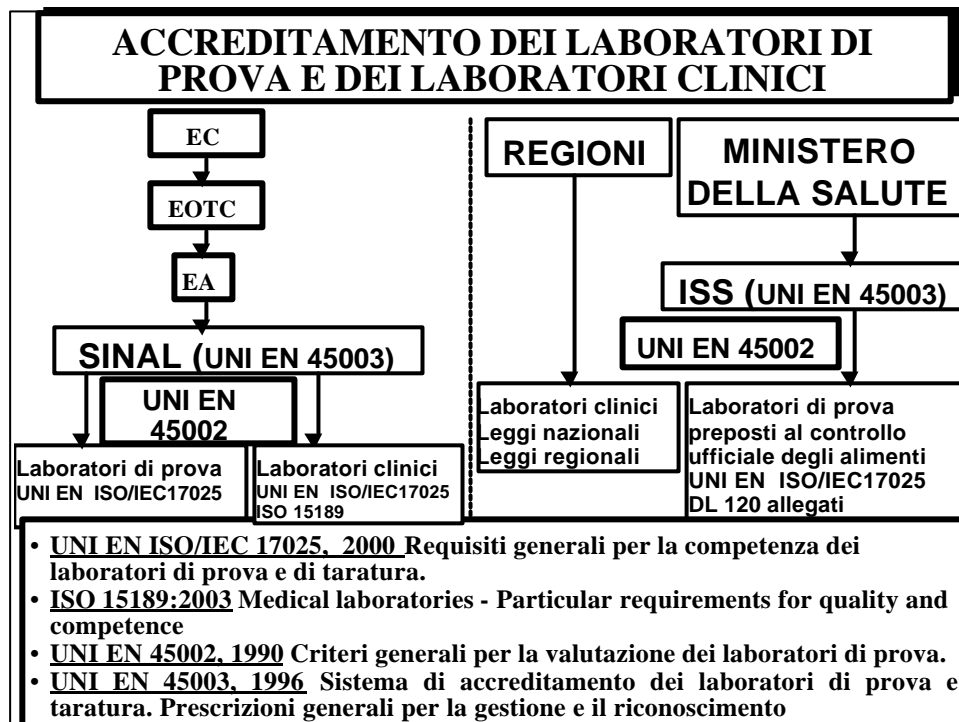
Modificato da: Boffetta P., Am J Int Med 248: 447-54, 2000.

VALIDITA' DEL BIOMARKER

La definizione della attendibilità e validità di uno specifico programma di monitoraggio biologico comprende il riconoscimento della competenza (accreditamento) del laboratorio che effettua le analisi e la validazione del/i biomarker che include la valutazione di tre aspetti:

- a) validazione della procedura analitica
- b) validazione tossicocinetica
- c) validazione clinica (sul campo).





Requisiti dei risultati di misurazioni

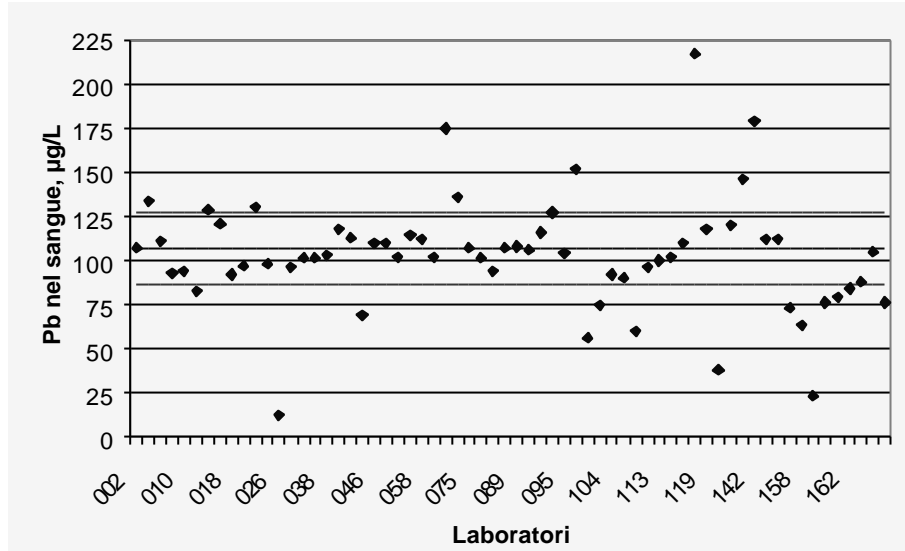
Comparabilità nel tempo

Comparabilità tra luoghi diversi

Confronto con valori limite o intervalli di riferimento

E' necessario assicurare la qualità e l'affidabilità dei risultati analitici

Pb nel sangue: risultati confrontabili?



Programma nazionale di valutazione esterna di qualità (Progetto METOS) 2003

Strumenti operativi

Implementazione di SQ
(ISO/IEC 17025:1999 e ISO 15189:2003)

Qualificazione del personale

Qualificazione della
strumentazione

Materiali di Riferimento Certificati

Validazione dei metodi analitici

Verifica di una terza parte indipendente
(accreditamento)

RIFERIBILITÀ

Proprietà del risultato di una misurazione o del valore di un campione tale che esso possa essere collegato a riferimenti determinati, generalmente campioni nazionali o internazionali, attraverso una catena ininterrotta di confronti tutti con incertezza dichiarata.

(VIM, 1993 - trad. IMGC-ISS)

RIFERIBILITÀ



Prototipo del
kilogrammo conservato
dal BIPM

Campione nazionale
conservato dall'IMGC

Campione secondario utilizzato
dal Centro di Taratura

Risultato della
pesata eseguita in
laboratorio

CAMPIONAMENTO

1. FLUIDO BIOLOGICO

sangue
urine
aria espirata
altro

2. MOMENTO DEL CAMPIONAMENTO

3. RACCOLTA DI CAMPIONI RAPPRESENTATIVI

4. ASPETTI ETICI

**Garanzia
della
qualità**

VALIDAZIONE TOSSICOCINETICA

Con la validazione tossicocinetica viene definita la capacità del biomarker di riflettere l'esposizione (ad es. recente, pregressa o cumulativa) o i suoi effetti biologici.

La tossicocinetica e il metabolismo di una sostanza tossica sono di solito valutati in base a studi sperimentali su animali.

L'estrapolazione di questi dati all'uomo può essere molto difficile e, per una valutazione obiettiva, possono essere necessari studi su volontari.

VALIDAZIONE (PRE)CLINICA

Validazione (pre)clinica: stabilire la relazione tra i dati di monitoraggio biologico e i corrispondenti effetti negativi sulla salute.

Per molte sostanze chimiche (in particolare i composti organici) non sono state individuate relazioni quantitative dose-risposta.

Quando manca questa informazione, è estremamente difficile identificare il livello a cui non si hanno effetti negativi sulla salute (NOEL: no-effect level) e definire livelli tollerabili di esposizione.

STUDI EPIDEMIOLOGICI DI TIPO OSSERVAZIONALE

- studi di coorte o longitudinali**
- studi trasversali o di prevalenza**
- studi caso controllo**

STUDI EPIDEMIOLOGICI E BIOMARKER

- **Studio delle malattie infettive**
Antigeni batterici /Anticorpi
- **Studio delle malattie cardiovascolari**
Lipidi e lipoproteine nel siero
- **Epidemiologia ambientale ed
occupazionale**
Pb nel sangue
Addotti IPA-DNA

EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE

“Applicazione di tecniche sofisticate agli studi epidemiologici che si avvalgono di materiale biologico”.
Higginson, 1977.

“Approccio in cui metodiche di laboratorio sofisticate vengono impiegate in combinazione con l’epidemiologia analitica per identificare a livello biochimico o molecolare degli agenti esogeni specifici e/o dei fattori dell’ospite che hanno un ruolo nell’insorgenza dei tumori dell’uomo”. Perera & Weinstein, 1982.

“Gli studi di epidemiologia molecolare sono studi epidemiologici in cui i fattori di rischio, gli esiti, i fattori di confondimento o i modificatori di effetto vengono misurati attraverso l’utilizzazione di biomarkers”.
Boffetta, 2000.

EPIDEMIOLOGIA AMBIENTALE RELAZIONI TRA ESPOSIZIONE E MALATTIA

Modificanti di effetto
(Fattori di rischio, fattori protettivi)

Esposizione

Malattia

Errore casuale
Errore sistematico (bias, confounding)

B-Pb (µg/l) per consumo giornaliero di sigarette e di vino

Maschi <= 40 anni	consumo di vino								
	non consumatori			fino a 0,25 l/die			oltre 0,25 l/die		
	N	B-Pb GM	DSG	N	B-Pb GM	DSG	N	B-Pb GM	DSG
Fumo sigarette/die									
0	546	62,6	1,61	183	71,9	1,53	178	91,6	1,52
1-10	122	67	1,57	42	79,4	1,52	52	87,4	1,56
11-20	108	73,6	1,42	41	84,1	1,35	57	94,7	1,54
>20	31	92	1,61	5	96	1,42	11	107,2	1,47

Fumo: F = 6,30, p = 0,0003; Vino: F = 15,70, p < 0,0001; Interazione: F = 0,095, p < 0,4611

Maschi >40 anni	consumo di vino								
	non consumatori			fino a 0,25 l/die			oltre 0,25 l/die		
	N	B-Pb GM	DSG	N	B-Pb GM	DSG	N	B-Pb GM	DSG
Fumo sigarette/die									
0	303	79,6	1,64	323	90,5	1,63	343	114,4	1,54
1-10	50	83,3	1,69	45	113,2	1,63	49	140,5	1,67
11-20	58	88,1	1,51	57	98,9	1,42	104	132,2	1,54
>20	29	76,2	1,67	16	128,3	1,56	39	151,9	1,52

Fumo: F = 9,87, p < 0,0001; Vino: F = 67,61, p < 0,0001; Interazione: F = 2,15, p = 0,0452

Menditto A. Chiodo F. Patriarca M. Morisi G. *Ann. Ist. Super. Sanità* 34(1), 27-39,1998

Regressione multipla. Adulti (N =5332) esaminati tra il 1992 e il 1995. Variabile dipendente Ln[B-Pb ($\mu\text{g/l}$)].

Variabili indipendenti	ordine entrata	b	r	R ²	Variazione F R ²	
intercetta		4,4149				
Sesso	1	-0,3845	0,4215	0,1777	0,1777	1115,79
Età	2	0,0106	0,5419	0,2932	0,1160	875,25
Consumo di vino	3	0,1411	0,5893	0,3473	0,0536	437,35
Consumo di sigarette	4	0,0437	0,6032	0,3639	0,0166	139,15
BMI	5	-0,0069	0,6050	0,3661	0,0022	18,28

Menditto A. Chiodo F. Patriarca M. Morisi G. *Ann. Ist. Super. Sanità* 34(1), 27-39,1998

STUDI TRANSIZIONALI

Scopo

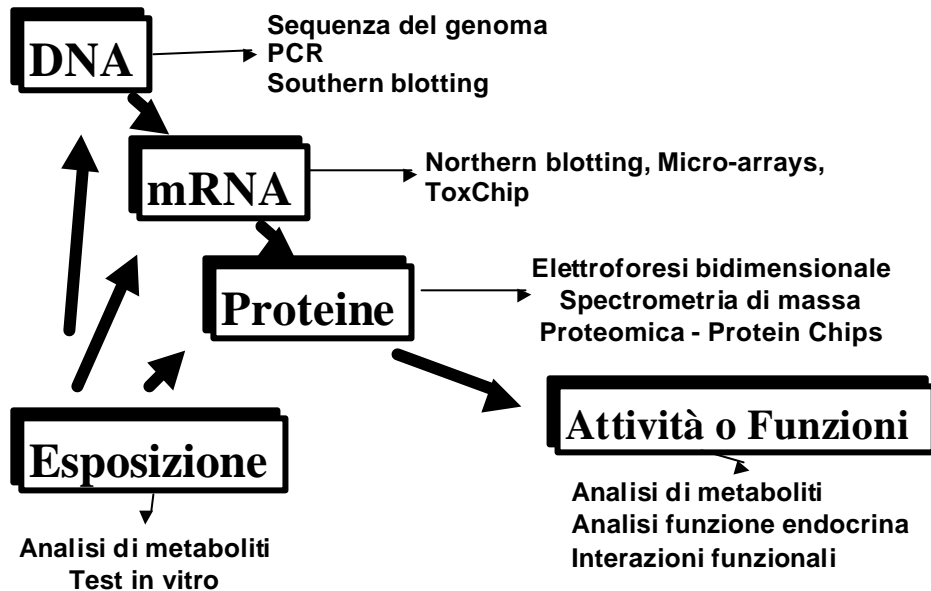
Caratterizzare il biomarker stesso piuttosto che il fenomeno biologico di cui il biomarker stesso è espressione.

Aspetti oggetto di valutazione

- Variabilità inter- e intra-individuale
- Possibile applicazione del biomarker ad indagini sul campo (e l'ottimizzazione del loro utilizzo);
- Fattori di confondimento
- Meccanismi biologici di cui il biomarker è espressione”.

Boffetta P., *Am J Int Med* 248: 447-54, 2000.

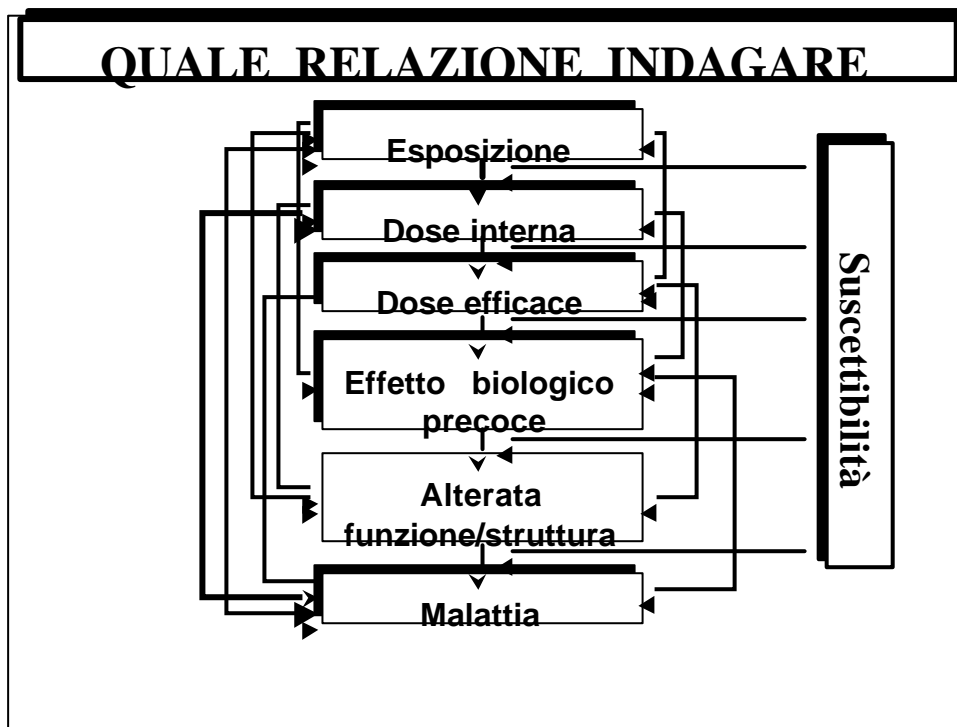
BIOLOGIA MOLECOLARE E NUOVE TECNOLOGIE



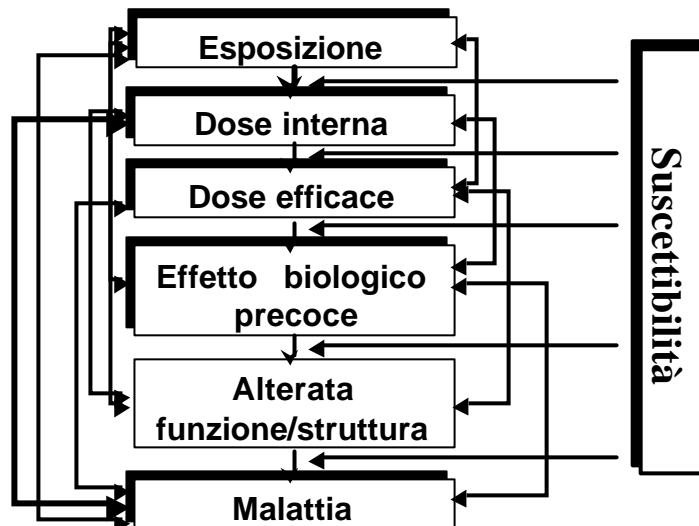
TECNICA DEL MICROARRAY

Tecnologia ad alta capacità di trattamento che permette l'analisi d'espressione di molti geni in maniera simultanea. Migliaia di geni possono essere analizzati in un singolo esperimento. Questo metodo è conveniente soprattutto per l'analisi di quei geni la cui espressione è diversa in due campioni, come ad esempio, un tessuto sano e uno a contatto con un patogeno (per approfondimenti: De Risi, J.L. et al (1997) Science: 278 p680-686; Heller, R.A. et al (1997) Proc Natl Acad Sci 94: 2150-2155).

Test in vitro	
Binding recettoriale	Recettore(i) per estrogeni, androgeni e progesterone (sistemi cell free)
Proliferazione cellulare	Cellule di ca. mammario (MCF-7) sensibili all'azione degli estrogeni (E-Screen). Cellule di ca. prostatico sensibili all'azione degli estrogeni (A-Screen). Cellule di carcinoma mammario che esprimono il recettore per gli androgeni (MCF7-ARI)
Espressione genica	Cellule di carcinoma mammario sensibili all'azione degli estrogeni che inducono l'espressione del recettore per il progesterone e il pS2
Trans-attivaz. genica	Lieviti (cellule) che esprimono il recettore per ormoni sessuali e un gene "reporter" che codifica una proteina (enzima, ad es. b-galattosidase) facilmente quantificabile con un idoneo substrato
Altro	Cellule ipofisarie (rilascio di FSH) Cellule di Leydig (inibizione sintesi del testosterone)



QUALE RELAZIONE INDAGARE



Esposizione a Piombo della popolazione generale Direttiva 77/312/CEE

Realizzazione di 2 indagini multicentriche: 1978-79 e 1980-81
Scopo: valutare l'esposizione a Pb della popolazione generale
Limiti: 50° P = 200 mg/l; 90° P 300 mg/l; 98° P = 350 mg/l

Affidabilità e comparabilità dei dati

Centro di Coordinamento

Laboratori qualificati

Procedimenti di misurazione alidati

Indicatori validati (Validazione sul campo)

Programma di CQI (Utilizzo di MR)

Partecipazione a programmi di VEQ

Controllo incrociato del 10% dei campioni reali

Legislazione

- Direttiva del Consiglio del 29 marzo 1977. concernente la sorveglianza biologica della popolazione contro il rischio di saturnismo (77/312/CEE). *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee*. N.L. 105/10 del 28/4/1977.
- Decreto del Presidente della Repubblica 8 giugno 1982 n. 496. Attuazione della direttiva (CEE) n. 77/312 relativa alla sorveglianza biologica della popolazione contro il rischio di saturnismo. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* n. 212 del 4/8/1982, p. 5492-5493, 1982.

Attuazione Direttiva 77/312/CEE e DPR 496/82

Campagne europee (Direttiva 77/312/CEE)

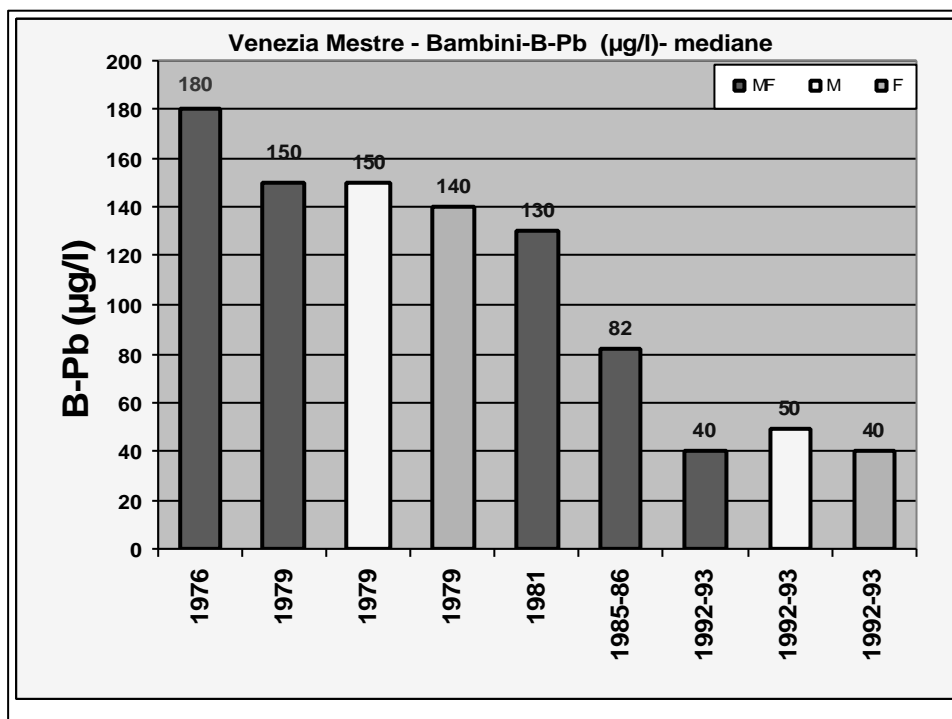
- 1978-79 (LPIP, Istituto di Igiene)
- 1980-81 (ISS, LPIP, Istituti di Igiene)

Campagne nazionali (DPR 496/82)

- 1985-86 (PMP/LPIP, Laboratori tossicologici, Istituti di Medicina del lavoro)
- 1992-96 (PMP, ARPA, Dipartimenti di prevenzione, Laboratori tossicologici, Istituti di Medicina del lavoro)

Garanzia di qualità dei dati Indagini multicentriche

- esame di campioni di controllo di qualità interno
- partecipazione a programmi di controllo di qualità esterno
- analisi incrociata di una parte (circa il 10%) dei campioni raccolti durante le campagne (campioni reali) sia da parte dei vari centri periferici che da un laboratorio designato come di riferimento.

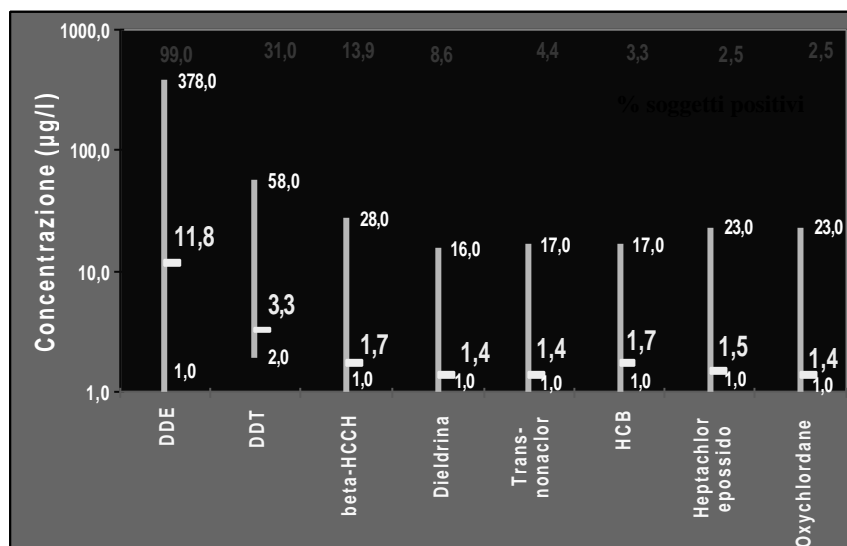


Confronto medie geometriche (MG) del B-Pb (mg/l) tra II^a campagna italiana (ITAI) e NHANES III (1988-91)-USA

Età anni	Maschi			Femmine		
	ITAI N	ITAI B-Pb MG	NHANES III B-Pb MG	ITAI N	ITAI B-Pb MG	NHANES III B-Pb MG
1-2	66	45,7	35	61	45,4	36
2-5	90	44,4	29	85	40,5	30
6-11	247	50,4	24	224	45	19
12-19	491	54,5	21	288	41,2	10
29-49	1637	82,8	38	2584	48,9	17
50-69	686	100,4	47	841	66,1	32
> 69	186	98,5	48	263	70	35

Menditto A. Chiodo F. Patriarca M. Morisi G. *Ann. Ist. Super. Sanità* 34(1), 27-39,1998

**NHANES II -Popolazione generale USA (1976-80)
Pesticidi persistenti nel siero (mediane e intervalli)**

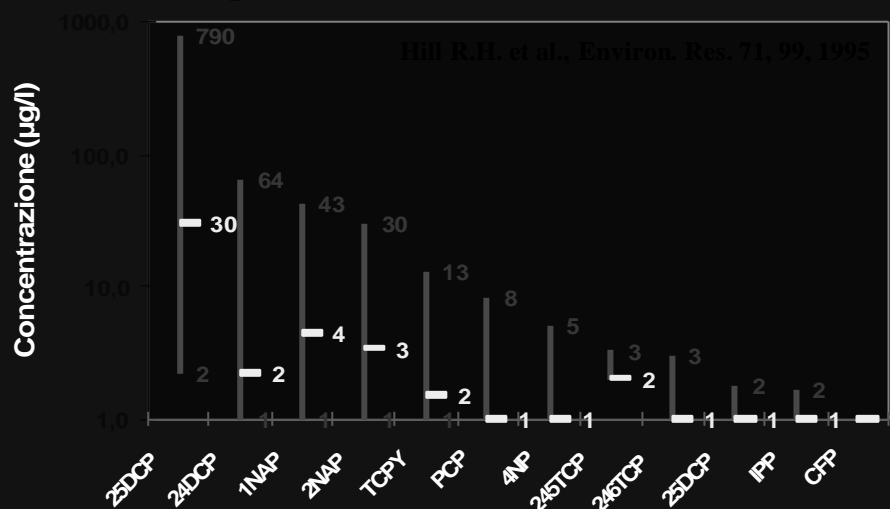


Needham L.L. et al. Reference range data for assessing exposure to selected environmental toxicants. *Toxicology and Industrial Health* 12, 507, 1996

**NHANES III (1988-94) - Popolazione generale USA (1000 soggetti)
Residui di pesticidi nelle urine (mediane e 95° centile)**

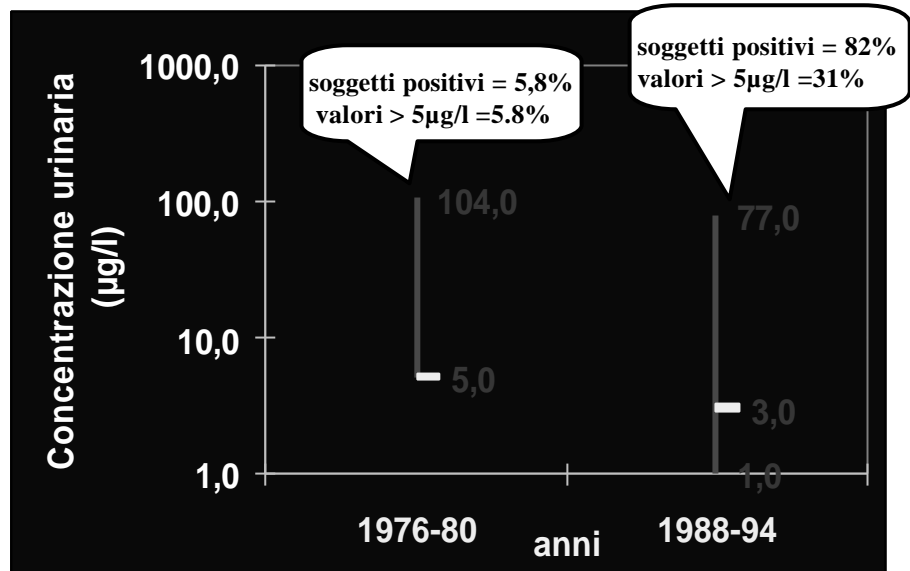
Analyte/Pest. residue	Possible parent compound
Carbofuranphenol	Benfurcarb; carbofuran; carbosulfan; furathiocarb
2,4-Dichlorophenol	Bifenox; chlomethoxyfen; 2,4D; 2,4-DB; dichlofenthion; diclofop; 1,3-dichlorobenzene; dichlorprop; nitrofen; phosdifen; prothiofos
2,5-Dichlorophenol	1,4-Dichlorobenzene
2,4-Dichlorophoxyacetic ac.	2,4-D
2-Isopropoxyphenol	Propoxur
1-Naphtol	Naphtalene; Carbaryl; napropamide
2-Naphtol	Naphtalene; napropanilide; (2-naphthyloxy) acetic ac.
4-Nitrophenol	Chlornitrophen; EPN; fluorodifen; methyl parathion; 4-nitroaniso; nitrobenzene; nitrofen; parathion;
Pentachlorophenol	PCP; Pentachloronitrobenzene (PCNB)
2,4,5-Trichlorophenol	Fenchlophos; lindane; PCNB; PCP; 1,2,4- Trichlorobenzene; trichloronat
2,4,6-Trichlorophenol	Chlornitrofen; hexachlorobenzene; lindane; PCNB; PCP; prochloraz; 1,3,5-trichlorobenzene
3,5,6-Trichloro-2-pyridinol	Chlorpyrifos; Chlorpyrifos-methyl

**NHANES III (1988-94) - Popolazione generale USA (1000 soggetti)
Residui di pesticidi nelle urine (mediane e 95° centile)**



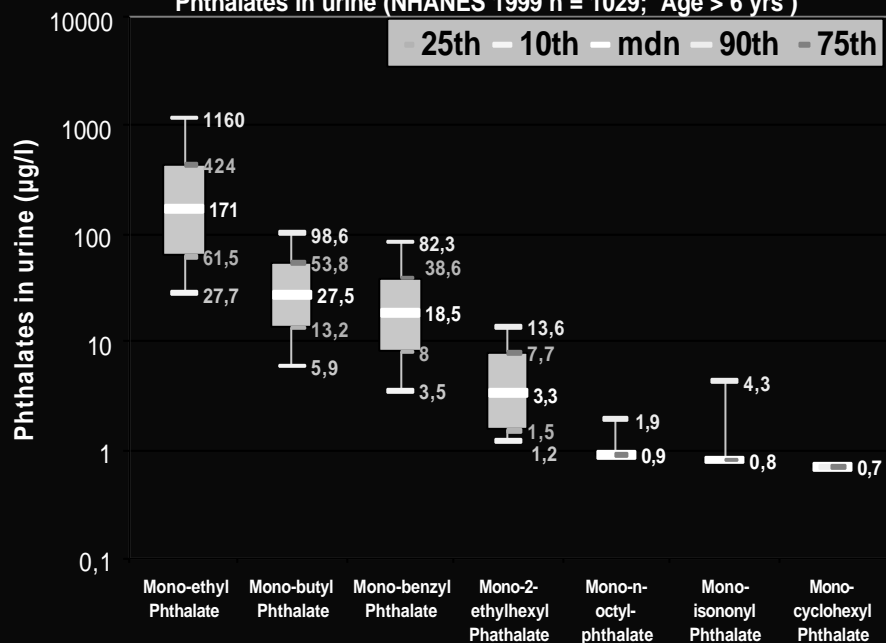
25DCP=2,5-Diclorofenolo; 24DCP=2,4-Diclorofenolo; 1NAP= 1-Naftolo; 2NAP= 2-Naftolo; TCPY= 3,5,6- Tricloro-2-piridinolo; PCP = pentaclorofenolo; 4NP = 4-Nitrofenolo; 245TCP= 2,4,5-Triclorofenolo; 246TCP= 2,4,6-Triclorofenolo; 25DCP= 2,5-Diclorofenolo; IPP=2-Isopropossifenolo; CFP= carbofuranfenolo.

NHANES II e NHANES III - Popolazione generale USA
3,5,6-trichloro-2-pyridinol (Chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl)

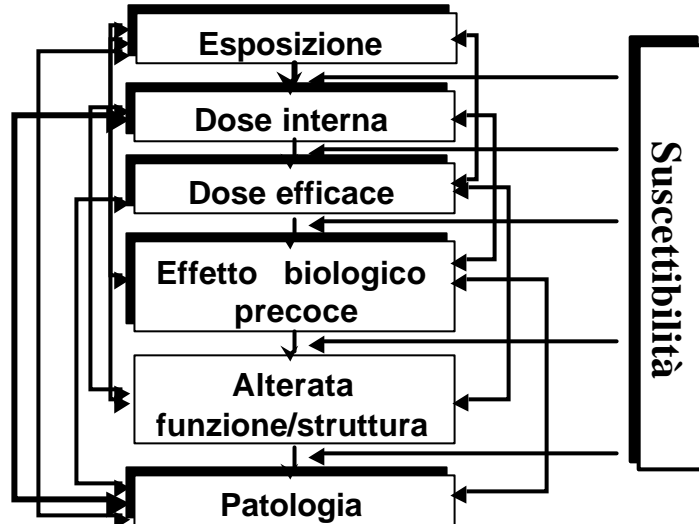


Hill R.H. et al., Environ. Res. 71, 99, 1995

National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals -
Phthalates in urine (NHANES 1999 n = 1029; Age > 6 yrs)



QUALE RELAZIONE INDAGARE



Staessen JA et al. Renal function, cytogenetic measurements, and sexual development in adolescents in relation to environmental pollutants: a feasibility study of biomarkers. *The Lancet* 357, 1660, 2001.

Study sample

17-y old adolescents, n=200

Study areas

Wilrijk (waste incinerators)=42 subjects

Hoboken (lead smelter) = 58 subjects

Poor (rural area) = 100 subjects

Methods

- Medical history
- Stages of sexual maturation (Marshall and Tanner)
- Testicular volume in boys (Prader's orchidometers)
- Lifestyle, use of tobacco and alcohol
- Food intake (fat intake), special dietary habits
- Intakes of medicines
- Social class of parents
- Collection of a blood sample (50 ml) and urine (200 ml)

Biomarkers of exposure

- Cotinine
- B-Pb (Lead)
- B-Cd, U-Cd (Cadmium)
- t,t'-muconic acid (Benzene)
- orthocresol (Toluene)
- 1-hydroxypyrene (PAH)
- PCB 138, 153, 180 (PCB)
- Calux assay (dioxin-like comp.)

Biomarkers of effect

- Cystatin C (glomerular dysf.)
- b₂-microglobulin (tubular dysf.)
- Comet assay (DNA damage)
- Chromatid breaks
- Chromosome breaks
- Chromosome aberrations (gaps)
- 8-hydroxy-deoxyguanosine (DNA repair response to oxidative stress)

Staessen JA et al. The Lancet 357, 1660, 2001.

	72 (65-79)	87 (75-101)		AB =.04 AC =.000 BC = .000
nmol/L	3.58 (3.19-4.03)	3.66 (3.06-4.39)	2.62 (2.24-3.05)	AB =.084 AC =.002 BC = .006
nmol/l	234 (217-243)		259 (237-287)	AB =.02 AC =.14 BC = .31
nmol/g fat	24.9 (21.4-29)	29.8 (23.4-38.0)		AB =.20 AC =.000 BC = .01
TEO pg/g fat	0.14 (0.13-0.15)	0.14 (0.12-0.16)	0.15 (0.13-0.17)	AB =.81 AC =.30 BC = .54
nmol/l	33.3 (28.3-39.2)		45.8 (35.0-60.0)	AB =.02 AC =.08 BC = .72
nmol/l	47.6 (39.5-57.5)		61.6 (45.1-84.1)	AB =.0001 AC =.22 BC = .01
nmol/l	30.8 (25.1-37.8)	38.5 (26.9-55.2)	36.2 (25.7-51.1)	AB =.28 AC =.48 BC = .83

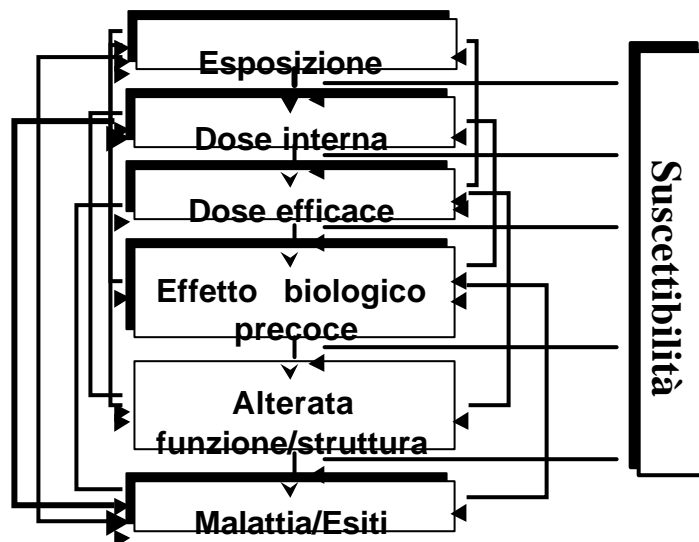
Staessen JA et al. The Lancet 357, 1660, 2001

	0.65 (0.08)	0.6 (0.08)		AB =.13 AC =.0000 BC =.000
serum mg/l	5.22 (4.59-5.94)	5.30 (4.34-6.48)		AB =.90 AC =.000 BC =.000
U mg/normal cr.	0.44 (0.40-0.48)		0.49 (0.42-0.56)	AB =.004 AC =.31 BC = .19
U mg/normal cr.	1.02 (0.44)		1.01 (0.42)	AB =.0001 AC =.98 BC = .0001
% DNA in tail	31 (62%)	19 (68%)	12 (55%)	AB =.30 AC =.81 BC = .22
	23 (46%)	12 (43%)	11 (50%)	AB =.17 AC =.08 BC = .21
	36 (72%)	20 (71%)	18 (82%)	AB =.61 AC =.74 BC = .58
	47.3 (6-50)			AB =.02 AC =.004 BC = .72
ml	3(8%)		0	AB =.003 AC =.96 BC = .001
	6(10%)		8(21%)	AB =.003 AC =.10 BC = .08
	9(9%)	15(36%)	8 (14%)	AB =.0001 AC =.27 BC = .01

Staessen JA et al. The Lancet 357, 1660, 2001.

Renal effects				
serum	B-Pb	% increase	3.6 (1.5 to 5.7)	<0.0001
urine	B-Pb	% increase	16.0 (2.7 to 31)	0.02
Cytogenic effects				
Urine	Orthocresol-U	% increase	6.8 (2.3 to 11.5)	0.003
	4,4-muconic ac.-U	% increase	4.3 (0.70 to 9.3)	0.09
	Orthocresol-U	% increase	5.3 (1.1 to 9.5)	0.01
	1-OH pyrene -U	% increase	7.0 (3.1 to 10.9)	0.0005
	4,4-muconic ac.-U	Odds ratio	1.74 (1.13 to 2.66)	0.01
	1-OH pyrene -U	Odds ratio	1.58 (1.10 to 2.26)	0.01
	1-OH pyrene -U	Odds ratio	1.56 (1.07 to 2.27)	0.02
Effects on sexual develop				
	Sum of marker PBCs in serum	Odds ratio	3.80 (0.94 to 8.00)	0.06
	Dioxin-like compounds in serum	Odds ratio	2.26(1.15 to 4.46)	0.02

QUALE RELAZIONE INDAGARE



EDCs and breast cancer (general population)			
N/Matrix	Chemicals	Results	Reference
20 AT	PCB p,p'-DDT p,p'-DDE	Incr in case	Falck F, 1992
58 S	DDE PCB	Incr in case No diff.	Wolff MS, 1993
150 S	DDE PCB	No diff. No diff.	Krieger N, 1994
21 S	p,p'-DDT p,p'-DDE	No diff. No diff.	Schecter A, 1997
240 P	DDE PCBs	No diff. No diff.	Hunter DJ, 1997
265 AT	DDE	No diff.	van't Veer P, 1997
141 S	DDT DDE	No diff.	Lopez-Carillo, 97
240 S	Dieldrin b-HCH pp'-DDT PCBs	Incr. in case No diff. No diff.	Hoyer AP, 1998
43 S	PCBs DDE PCB#77 HCB	No diff. Incr. Risk in PMW & ER+ tumor	Liljegren G, 1998
154 S	DDE HCB mirex PCBs	No diff. Inc. risk in Parous women who had never breast fed	Moysich KB, 1998
304 AT	DDE DDT	No diff. No diff.	Zheng T, 1999
346 S	DDE DDT	No diff. No diff.	Helzlsouer KJ, 1999
154 S	PCBs	Inc. risk in CYP1A1 genotype valine	Moysich KB, 1999

EPIDEMIOLOGICAL STUDIES ON EDCs AND HUMAN HEALTH

DELIBERATE OR ACCIDENTAL EXPOSURE

Compound	Effect	Reference

Mocarelli P, et al. Change in sex ratio with response to dioxin. *Lancet* 348:409, 1996

Chen Y-CJ, et al. Cognitive development of Yu-Cheng ('oil disease') children prenatally exposed to heat-degraded PCBs. *JAMA* 268:3213-3218, 1992

Guo YL, et al. Early development of Yu-Cheng children born seven to twelve years after the Taiwan PCB outbreak. *Chemosphere* 29:2395, 1994

Murai K, et al. Thyroid function in Yusho patients exposed to polychlorinated biphenyls (PCB) *Environ Res* 44:179, 1987

Haney AF, et al., Structural and functional consequences of the prenatal exposure to diethylstilbestrol in woman. In: *Developmental toxicology: mechanisms and risk*. Banbury Rpt No. 26. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press; 1987, 271-285

Change in sex ratio with exposure to dioxin

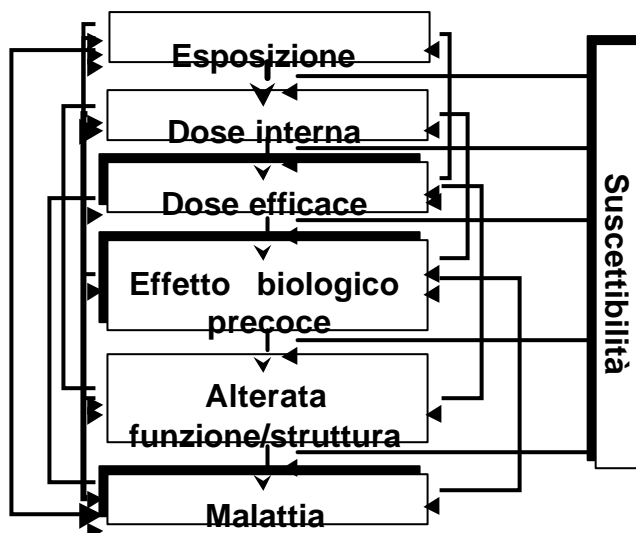
Father TCDD serum concentrations in 1976 and sex of offspring (346 girls and 328 boys, born between 1977 and 1996)

Father's conc. of TCDD (ppt)	M/F	Sex ratio	p
Unexposed	151/120	0.557	
15.1 -31.3	35/45	0.438	
31.9-60.7	41/40	0.506	
61.4-117.0	38/43	0.469	
118.0-264.0	32/48	0.400	0.04
281.0-26400.0	31/50	0.383	0.02

Test for trend, $X^2 = 7.08$; $p = 0.008$

Mocarelli P. et al. Paternal concentrations of dioxin and sex ratio of offspring. Lancet, 355 1858, 2000

QUALE RELAZIONE INDAGARE



EDCs AND HUMAN HEALTH Decline in sperm count

Reference	Effect
Carlsen E et al. <i>Brit. Med. J.</i> 305, 613, 1992	Meta-analysis of 61 studies 1938-90 50% decline in sperm count period
Auger J et al. <i>N. Engl. J Med.</i> 332, 281, 1995	Decline in sperm conc., motility and morphology. France 1973-92
Bujan L. et al. <i>Brit. Med. J.</i> 312, 467, 1996	No decline - France. Toulouse 1977-92
Fish H et al <i>Fertil. Steril.</i> 65, 1009, 1996	No decline – USA, 1970-94
Van Waeleghem KV et al <i>Human reprod.</i> 11, 325, 1996	Decline in sperm motility and morphology -Belgium 1977-95
Paulsen CA et al. <i>Fertil. Steril.</i> 65, 1015, 96	No decline -USA (Seattle) 1970-94
Irvine S et al. <i>Brit. Med. J.</i> 312, 467, 1996	Decline in sperm count and motility Scotland 1984-95
Fish and Goluboff <i>Fertil. Steril.</i> 65, 1020, 1996	Meta-analysis of 61 studies 1938-90 Geographical variations
Rasmussen K et al. <i>Fertil. Seril.</i> 68, 1059, 1997	No decline Men born between 1950-70 Denmark
Andolz P et al. <i>Human reprod.</i> 14, 731, 1999	Decline in sperm morphology Spain, Barcelona 1960-1996
Gyllenborg J. et al. <i>Int. J Androl.</i> 22, 28, 1999	Incr. in sperm count. Decl. in sperm motility. Seasonal var. Copenhagen, Denmark 1977-95

Variability of semen quality in seven healthy semen donors. Sperm concentration (million sperm/ml) measured over a period of 72 to 324 weeks

	Volunteer						
	1	2	3	4	5	6	7
Number of specimens	61	62	83	80	77	105	205
Sperm concentration	51	78	116	156	128	86	124
Min	17	9	28	61	24	23	16
Max	176	239	335	376	318	188	317

Mallidis C. et al. Variation of semen quality in normal men. *Int. J. Androl*

Variability of semen parameters in 45 unexposed workers (monthly samples collected over 9 months)

	Mean	SDb	SDw	CVt %	CVw %
Sperm count (millions/ml)	47.43	29.47	22.90	79	44
Sperm velocity ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	44.57	3.33	7.61	19	16
Motile sperm (% motile)	59.76	10.87	12.71	45	26
Morphology (% normal)	72.38	9.52	10.22	19	14
Vital stain (% unstained)	71.41	7.38	7.92	15	11
Hypoosmotic swelling (% swollen)	64.08	9.04	9.61	21	15

Schrader S.M. et al. Reproductive Toxicology 2, 183, 1988

Variabilità analitica - Parametri seminali Programmi di valutazione esterna di qualità

Sperm concentration ($6-80 \cdot 10^6/\text{ml}$) RSD%
5-68%

Da: Matson P.L. Human Reprod. 10:620, 1995

Sperm concentration ($0.4-80 \cdot 10^6/\text{ml}$) RSD%
23-73%

Da: Neuwinger J. Behre H. Nieschlag E. Fertil. Steril. 54:308, 1990.

Sperm concentration ($7-45 \cdot 10^6/\text{ml}$) RSD%
30-52%

Da: Gandini L. Menditto A. Chiodo F. Lenzi A. Int. J. Androl. 23:1, 2000

**STUDI EPIDEMIOLOGICI PER
VALUTAZIONE DEL RISCHIO DA ESPOSIZIONE
AMBIENTALE**

- **Valutazione di campioni di popolazione adeguati (dimensione del campione) e appropriati.**
- **Disegno basato su: repertori di informazione esistenti, conoscenze scientifiche e dati sperimentali.**
- **Utilizzazione di biomarker di esposizione, effetto e suscettibilità**
- **Creazione di banche biologiche nell'ambito di studi longitudinali e analisi retrospettiva dei livelli di esposizione nei "casi" e in controlli selezionati (studi nidificati caso controllo).**