



REGIONE DEL VENETO

Biomonitoraggio di sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) nella Regione del Veneto



Determinazione della concentrazione dei biomarcatori di esposizione

Descrizione dello studio e suoi obiettivi

Lo studio si propone di definire l'esposizione a sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) in soggetti residenti in aree delle Province del Veneto caratterizzate da presumibile esposizione incrementale a questi inquinanti rispetto a popolazione di controllo residente in altra area geografica del Veneto.

E' condotto nell'ambito dell'Accordo di collaborazione tra Istituto Superiore di Sanità e Regione del Veneto finalizzato al "Supporto tecnico scientifico, analitico e consultivo per l'analisi di rischio correlato alla contaminazione da PFAS di matrici ambientali e filiera idro-potabile in talune circostanze territoriali, e potenziale trasferimento di PFAS alla filiera alimentare e allo studio di biomonitoraggio" (DGR n. 764 del 27/05/2014 -).

I PFAS sono un gruppo di sostanze caratterizzate, a livello della struttura chimica, dalla presenza una catena alchilica idrofobica completamente fluorurata, di varia lunghezza ma generalmente costituita da 4-16 atomi di carbonio, e da un gruppo idrofilico. Tra i PFAS, l'acido perfluorooctanoico (PFOA) e il perfluorooctansulfonato (PFOS) sono le due molecole di gran lunga più abbondanti nell'ambiente e negli organismi, incluso l'uomo, a causa del loro vasto impiego a livello industriale e commerciale e da una elevata persistenza ambientale e biologica.

I PFAS sono caratterizzati da spiccate capacità di bioaccumulo, che aumentano con l'aumentare del numero di atomi di carbonio, e da proprietà anfotere. A differenza di altri composti organici persistenti (POP), quali i composti organoclorurati, le cui proprietà chimico-fisiche limitano significativamente le circostanze di contaminazione delle acque, i PFAS presentano un'elevata idrosolubilità che ne connota una diffusa presenza nell'ambiente idrico.

Sotto un profilo tossicologico, le informazioni disponibili caratterizzano PFOS e PFOA come composti a elevata tossicità, mentre sono estremamente lacunose o del tutto assenti dati tossicologici sulle altri membri della famiglia.

I PFAS oggetto dello studio sono quelli individuati nelle acque per il consumo umano dalle Autorità competenti sul territorio.

L'esposizione ai PFAS selezionati verrà caratterizzata attraverso il biomonitoraggio, misurandone la concentrazione in un campione di sangue. Il biomonitoraggio umano è lo strumento più efficace nella misura dell'esposizione umana a inquinanti organici persistenti, perché l'analisi della loro concentrazione nel corpo umano fornisce una misura della reale dose interna risultante da tutte le possibili vie e fonti espositive.

Protocollo dello studio

Partecipano allo studio, coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità, la Regione del Veneto (Area Sanità e Sociale, Sezione Tutela Ambiente e ARPAV) e le Aziende Ulss dei territori identificati nell'area di maggior impatto (Az. Ulss 5 Ovest Vicentino e ULSS 6 Vicenza) e nell'area di controllo (Az. Ulss 6 di Vicenza, 8 di Asolo, 9 di Treviso, 15 di Cittadella, 22 di Bussolengo).

Lo studio si propone di caratterizzare un'eventuale sovraesposizione a PFAS in gruppi di soggetti residenti nelle aree interessate dalla contaminazione delle acque per il consumo umano a fronte di residenti in Comuni ubicati in aree a presumibile esposizione "di fondo" a questi inquinanti considerando anche il ruolo che possono avere che gli alimenti a determinare il carico corporeo di PFAS. Per questo motivo si reputa opportuno includere nello studio anche gruppi di operatori di aziende agricole e zootecniche situate nei Comuni selezionati che consumino alimenti di produzione propria.

Selezione dei Comuni da includere nello studio

I Comuni da includere nello studio sono stati selezionati dalle Autorità competenti sul territorio nelle aree identificate come a più elevato impatto in base ai dati di contaminazione ambientale disponibili. Nell'effettuare la selezione si è tenuto conto anche della storia pregressa delle aree in esame, a causa della lunga emivita e delle spiccate capacità di bioaccumulo dei PFAS e delle modificazioni succedutesi nel tempo della rete idrica.

I comuni selezionati sono:

per l'area di impatto: Montecchio Maggiore, Lonigo, Brendola, Creazzo, Altavilla, Sovizzo, Sarego;

per l'area di controllo: Mozzecane, Dueville, Carmignano, Fontaniva, Loreggia, Resana, Treviso.

Studio sulla popolazione generale dell'area di impatto e di controllo

Verranno arruolati 480 soggetti, 240 residenti nei Comuni sotto impatto (area di presumibile sovraesposizione) e 240 residenti in Comuni a presumibile esposizione di fondo (area di presumibile *background*) agli inquinanti di interesse.

In ogni area, verranno arruolati 120 soggetti per sesso, 40 per ognuna delle classi di età: 20-29, 30-39 e 40-49 anni. All'interno di ognuna di queste fasce, si cercherà di assicurare una distribuzione il più possibile omogenea dell'età dei soggetti.

Ogni soggetto dovrà essere residente nell'area da almeno 10 anni.

Studio sugli operatori e residenti di aziende zootecniche

Una volta individuati i Comuni prioritari per lo studio, la selezione delle aziende all'interno degli stessi sarà orientata dalla presenza dei seguenti fattori di rischio:

1) Consumo di alimenti di produzione propria. Verranno selezionate 20-30 aziende zootecniche sulla base di una lista prodotta dai servizi veterinari delle Ulss coinvolte nelle quali ci sia un significativo presunto consumo di prodotti di produzione propria sia di origine animale (animali allevati al pascolo e a terra e prodotti derivati) che vegetale (in particolare, verdure a foglia larga e tuberi), sulle quali effettuare una ricognizione dei soggetti arruolabili e acquisire, laddove possibile, informazioni sulle concentrazioni dei PFAS in studio negli alimenti.

2) Livelli di contaminazione (anche pregressa) delle acque utilizzate per consumo umano, irriguo e zootecnico.

L'utilizzo di fanghi e digestati non è stato incluso tra i fattori di rischio considerati per la selezione, poiché i referenti delle Ulss e di ARPAV hanno comunicato che nell'area di impatto non sono applicate pratiche agronomiche che prevedono l'impiego di fanghi e digestati da depuratori.

Lo studio includerà 120 soggetti residenti nelle 20-30 aziende selezionate, stesse classi di età come sopra, 60 soggetti per sesso, residenza nell'azienda da almeno 10 anni. Potranno essere arruolati più soggetti appartenenti ad uno stesso nucleo familiare/aziendale.

Al momento del prelievo del campione ematico sarà consegnato ad ogni soggetto materiale informativo riguardante lo studio (modulo di consenso informato, informativa a tutela della riservatezza dei dati personali). Sarà inoltre somministrato un questionario che ha lo scopo di raccogliere le informazioni utili all'interpretazione del dato di biomonitoraggio e che contiene domande su stili di vita e abitudini alimentari.

Il prelievo ematico conterà di circa 5 mL. Sul campione di siero ottenuto dopo centrifugazione e inviato al Reparto di Chimica Tossicologica dell'Istituto Superiore di Sanità verranno determinati:

- *acido perfluorobutanoico (PFBA)*
- *acido perfluoropentanoico (PFPeA)*
- *acido perfluoroesanoico (PFHxA)*
- *acido perfluotoeptanoico (PFHpA)*
- *acido perfluorooctanoico (PFOA)*
- *acido perfluorononanoico (PFNA)*
- *acido perfluorodecanoico (PFDeA)*
- *acido perfluoroundecanoico (PFUnA)*
- *acido perfluorododecanoico (PFDoA)*
- *perfluorobutansulfonato (PFBS)*
- *perfluoroesansulfonato (PFHxS)*
- *perfluorooctansulfonato (PFOS)*

Potenza dello studio e analisi statistiche

Studio sulla popolazione generale. Tenendo conto di quanto rappresentato dalla Regione del Veneto sulla necessità di includere nello studio il massimo numero di aree e soggetti compatibili con la numerosità campionaria totale definita nell'accordo di collaborazione, in modo da rendere massima la probabilità di evidenziare eventuali "criticità" espositive sul territorio sulle quali orientare azione di prevenzione e tutela della salute pubblica, verranno arruolati 480 soggetti, 240 nei Comuni sotto impatto e 240 residenti in Comuni a presumibile esposizione di fondo ai PFAS di interesse.

In base ai valori di concentrazione nel siero di PFOS e PFOA riscontrati nello studio più ampio ad oggi disponibile su gruppi della popolazione generale italiana (Ingelido et al., 2010), utilizzando come riferimento il valore medio osservato per ognuna delle due sostanze (PFOS: valore medio 6.86 ng/g, deviazione standard 3.93 ng/g; PFOA: valore medio 4.15 ng/g, deviazione standard 3.79 ng/g), si stima che la numerosità selezionata consenta di rilevare un incremento percentuale del valore medio iniziale pari a circa 13 per il PFOS e 21 per il PFOA (utilizzando il test T di Student per dati appaiati ad una coda, per un rischio $\alpha=0.05$ e una potenza $\beta=0.80$).

Studio su lavoratori di aziende agricole e zootecniche. Si stima che la numerosità selezionata consenta di rilevare un incremento percentuale del valore medio iniziale pari a circa 16 per il PFOS e 25 per il PFOA, facendo riferimento al gruppo dei 240 residenti in Comuni a presumibile esposizione di fondo.

Trattazione statistica dei risultati

In base ai risultati degli studi di distribuzione dei dati, verrà selezionato l'approccio statistico più appropriato. Con ogni probabilità, essendo generalmente le distribuzioni dei dati di biomonitoraggio umano su inquinanti organici persistenti non normali, per lo studio della differenza tra gruppi la trattazione dei risultati verrà effettuata con test statistici non parametrici (es. test di Mann-Whitney,

test di Kruskal-Wallis) Lo studio delle correlazioni tra le concentrazioni ematiche degli inquinanti e le variabili prese in considerazione dal questionario (consumi alimentari, fattori di rischio ambientale, etc.) verrà effettuato con analisi di regressione multipla.

Considerazioni sullo studio

Lo studio sopra descritto ha carattere esplorativo, e come tale non può fornire una caratterizzazione esaustiva dell'esposizione della popolazione a PFAS, ma può sicuramente individuare situazioni ad elevata criticità espositiva ed orientare, in un percorso a *step* successivi, eventuali studi su più larga scala ed estesi ad altre fasce della popolazione. Per raggiungere questo obiettivo è cruciale la selezione delle aree, che deve essere supportata da criteri tecnico-scientifici chiaramente definiti anche ai fini di una trasparente comunicazione pubblica.

Vale sottolineare che lo studio è centrato sulle tre fasce di età che comprendono le donne in età riproduttiva, i cui livelli di cui carico corporeo sono predittivi dell'esposizione *in utero*.

Nello studio non sono stati inclusi i soggetti in età pediatrica, tenendo conto delle indicazioni delle linee-guida del *Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS)* di Ginevra, che ribadiscono che, nel caso di studi (clinici, di ricerca, etc.) su gruppi di popolazione “...*before undertaking research involving children, the investigator must ensure that the research might not equally well be carried out with adults*” (prima di intraprendere una ricerca che coinvolga i bambini si deve essere sicuri che la stessa ricerca non possa essere ugualmente ben condotta sugli adulti). Questa indicazione merita particolare attenzione nel caso in cui lo studio di biomonitoraggio implichi una procedura invasiva per il prelievo del campione.

Referenze

Ingelido AM, Marra V, Abballe A, Valentini S, Iacovella N, Barbieri P, Porpora MG, di Domenico A, De Felip E. Perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoic acid exposures of the Italian general population. *Chemosphere*. 2010 Aug 80(10):1125-30.

International Ethical Guidelines for Biomedical Research Involving Human Subjects. Council for International Organizations of Medical Sciences, CIOMS, Geneva, Switzerland, 2002.



REGIONE DEL VENETO

Biomonitoraggio di sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) nella Regione del Veneto



Analisi della influenza di fattori genetici individuali nella esposizione interna da PFAS

Le caratteristiche chimico-fisiche e cinetiche dei PFAS sono tali da farli ricadere nella definizione di vP (very Persistent), vB (very bioaccumulative) and T (toxic), vale a dire molto persistenti, molto bioaccumulabili e tossici. Il potenziale di bioaccumulo dei PFAS non è correlato alla ripartizione nella frazione lipidica tissutale e nel tessuto adiposo (come accade per gli altri composti organici persistenti), ma al loro rapido assorbimento orale unito a (1) un legame rilevante alle proteine nel plasma e nel fegato, (2) assenza di reazioni di biotrasformazione, (3) eliminazione molto lenta con riassorbimento a livello renale, un processo attivo regolato da trasportatori degli anioni organici (OAT, *organic anion transporters*). I PFAS infatti sono substrati di tali trasportatori, che mostrano diversi livelli di espressione tra le specie (ECHA 2013).

Le principali differenze tossicocinetiche tra le specie riguardano l'emivita ($t_{1/2}$, cioè il tempo necessario ad eliminare il 50% della sostanza dal circolo) dei PFAS, e sono state attribuite essenzialmente ad un diverso riassorbimento renale attivo mediato dai trasportatori sopra menzionati. Nel ratto le differenze sono evidenziabili anche tra i due sessi perché l'espressione dei trasportatori OAT è sotto il controllo ormonale. L'eliminazione nel ratto femmina di PFOA ($t_{1/2}$ = 3 ore) è rispettivamente 40 e 6.000 volte più veloce rispetto al ratto maschio ($t_{1/2}$ = 5 giorni) e all'uomo ($t_{1/2}$ = 3.8 anni media dei valori; intervallo di valori: 1.5 – 13.5 anni). E' stato stimato che nell'uomo la clearance renale sia solo circa lo 0.001% della velocità di filtrazione glomerulare, avvalorando ulteriormente il ruolo del riassorbimento renale.

Nel ratto è stato evidenziato che è il trasportatore di anioni organici OATP1A1 (*anion-transporting polipeptide*) localizzato sulla membrana apicale dell'epitelio del tubulo contorto prossimale facilita il riassorbimento renale dei PFAS; il corrispondente trasportatore nell'uomo è l'OATP1A2 e un ruolo è stato evidenziato anche per OAT4.

Il polimorfismo (descritto in letteratura) per alcune isoforme dei trasportatori renali OAT/OATP nella specie umana potrebbe essere responsabile delle differenze interindividuali, potenzialmente notevoli considerando l'ampiezza dell'intervallo delle emivite finora calcolate (1.5 – 13.5 anni). Finora questo tipo di associazione nell'uomo non è mai stata studiata, ma i risultati ottenuti sugli animali, fanno ipotizzare che una influenza delle varianti genetiche possa essere rilevante anche nella specie umana per determinare differenze interindividuali nella dose interna.

Per questo motivo, sarà prelevata un'aliquota (circa 1mL) di sangue agli individui arruolati nell'ambito dello studio di biomonitoraggio per la valutazione dell'esposizione ai PFAS (che avranno dato il loro consenso informato a questo tipo di analisi genetica). La numerosità degli individui, le zone di arruolamento e le caratteristiche del disegno dello studio sono perciò sovrapponibili a quelle sopra descritte.

Il sangue verrà utilizzato per l'estrazione del DNA e la messa a punto di test genetici per l'identificazione di polimorfismi dei trasportatori renali OAT, potenzialmente responsabili di alterazioni dell'escrezione e riassorbimento renale dei PFAS, prolungando o diminuendo la loro persistenza nell'organismo. Una volta messo a punto il metodo, verranno condotte le analisi sugli stessi individui arruolati nello studio di biomonitoraggio.

La combinazione dei dati di esposizione esterna/interna con i dati genetici permetterà l'acquisizione di importanti informazioni utili ad una migliore valutazione e gestione dei rischi. Infatti, a parità di esposizione esterna (come deducibile dai questionari), la presenza di variazioni interindividuali nei livelli di PFAS nel sangue degli individui arruolati potrà essere spiegata con eventuali differenze interindividuali nei trasportatori. In alternativa se le differenze saranno presenti anche in assenza di variabilità genetica, si potrà ipotizzare ed identificare la presenza di altre fonti di esposizione significative, fino al quel momento non considerate, ma evidentemente rilevanti.

In base ai risultati degli studi di distribuzione dei dati, verrà selezionato l'approccio statistico più appropriato. Si prevede di utilizzare il test del χ^2 per verificare che la frequenza dei genotipi segue la legge di Hardy-Weinberg e la distribuzione nei gruppi di esposti e non esposti. Saranno valutati gli odds ratio (OR) con intervalli di confidenza del 95% e si prevede di utilizzare analisi con test non parametrici e la analisi detta del *case-only*, considerata una buona strategia per determinare interazioni gene-ambiente, seguendo una strategia precedentemente utilizzata dal gruppo.

Lo studio sopra descritto ha carattere esplorativo: tale caratteristica propria dello studio di biomonitoraggio è ulteriormente supportata dal fatto che per la prima volta si tenterà di spiegare differenze espositive ai PFAS attraverso uno studio di interazione gene-ambiente come quello proposto. Lo studio permetterà comunque di individuare le situazioni a più elevata criticità espositiva e metterà eventualmente in evidenza fonti espositive non considerate e/o caratteristiche interindividuali come determinanti di una più elevata dose interna.

Referenze:

Han X, Nabb DL, Russell MH, Kennedy GL, Rickard RW. (2012) Renal elimination of perfluorocarboxylates (PFCAs). *Chem Res Toxicol* 25 (1): 35 – 46.

ECHA (2013). Member State Committee Support document for identification of Pentadecafluorooctanoic acid (PFOA) as a substance of very high concern because of its CMR1 and PBT2 properties. Adopted on 14 June 2013.

Roth M, Obaidat A and Hagenbuch B (2012) OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies *British Journal of Pharmacology* 165 1260–1287.

S. Vichi, E. Medda, A.M. Ingelido, M.G. Porpora, A. Ferro, S. Resta, L. Nisticò, A. Abballe, E. De Felip, S. Gemma and E. Testai Genetic polymorphisms of Glutathione Transferases and exposure to PCBs in the susceptibility to endometriosis: A gene-environment interaction. *Fertility and Sterility* 97, 1143-1151 (2012).