IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Concentrazione e distribuzione di diossine e PCB in tessuti e fluidi biologici di ovini allevati in prossimità di un termovalorizzatore

I risultati della ricerca corrente condotta dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise. Anno 2015, Teramo 15 Giugno 2016

Manuela Leva

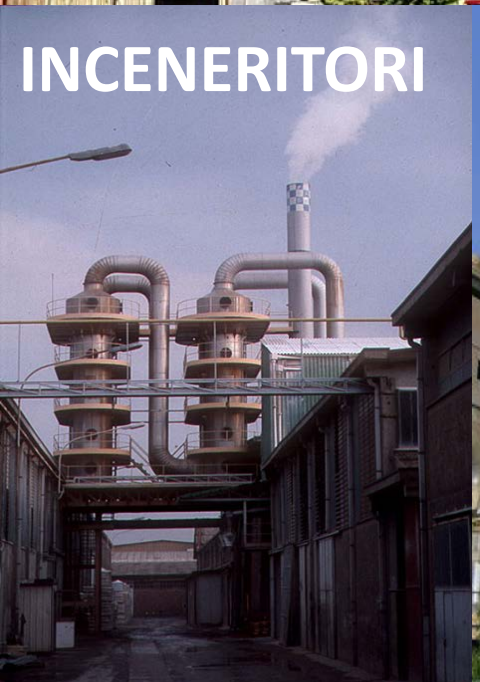
LNR diossine e PCB in alimenti e mangimi

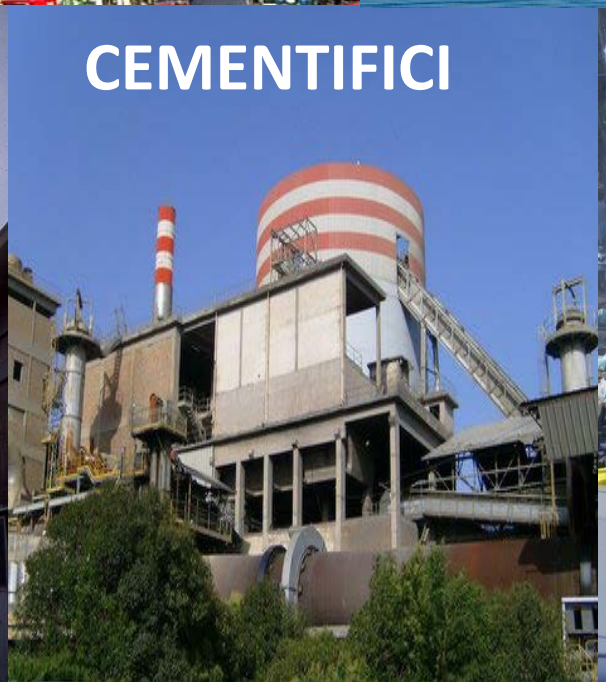
IZS AM 05/12 RC

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute, Dipartimento della Sanità Pubblica Veterinaria, della Sicurezza Alimentare e degli Organi Collegiali per la Tutela della Salute

Progetto IZS AM 05/12 RC

Fonti diossine

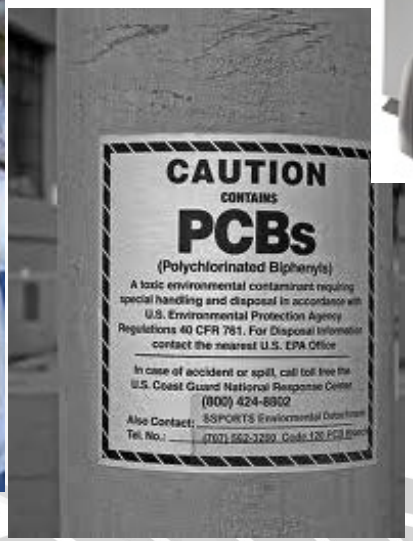




Introduzione

Fonti PCB

- I PCB sono stati intenzionalmente prodotti e commercializzati per usi industriali
  - Fluidi dielettrici per transformatori/ condensatori
  - Fluidi idraulici
  - Altre applicazioni



Introduzione

Esposizione umana

- Esposizione accidentale
- Esposizione occupazionale
- Esposizione ambientale
  - la dieta rappresenta la via principale di esposizione per l'uomo **(90%)**

Introduzione

Carenza di dati sul bioaccumulo di tali sostanze nei tessuti degli ovini

Definizione di nuove strategie per gestire i casi di contaminazione degli allevamenti

Protezione della salute umana

Conseguenze economiche

Introduzione

Legislazione

I limiti massimi per diossine, somma diossine e DL-PCB e somma 6 PCB indicatori NDL-PCB negli alimenti sono fissati:

- Regolamento della Commissione (CE) N. 1881/2006
- Regolamento della Commissione (CE) N. 1259/2011
- Regolamento della Commissione (CE) N. 1067/2013 **(fegato di animali terrestri)**

Introduzione

Legislazione

Alimenti	Diossine (WHO-PCDD/F-TEQ)	Somma diossine e DL-PCB (WHO-PCDD/F-PCB-TEQ)	Somma 6 NDL-PCB (ng/g)
Fegato di ovini e prodotti derivati (Reg. CE 1067/2013)	1.25 pg/g di peso fresco	2.00 pg/g di peso fresco	3.00 ng/g di peso fresco
Fegato di animali terrestri ad eccezione dei precedenti (Reg. CE 1067/2013)	0.30 pg/g di peso fresco	0.50 pg/g di peso fresco	3.00 ng/g di peso fresco
Grasso / carne di ovini (Reg. CE 1259/2011)	2.5 pg/g di grasso	4.0 pg/g di grasso	40 ng/g di grasso

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Introduzione

European Food Safety Authority

EFSA Journal 2011;9(7):2297

SCIENTIFIC OPINION

Scientific Opinion on the risk to public health related to the presence of high levels of dioxins and dioxin-like PCBs in liver from sheep and deer[1]

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM Panel)[2, 3]

European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy

Introduzione

Nel 2009 un gregge di pecore è stato abbattuto a seguito di un caso di contaminazione da diossine e PCB nella provincia di Lecce

L'allevamento era situato nelle vicinanze di un'area industriale e di un termovalorizzatore

Obiettivo dello studio

- Misurare i livelli di diossine e PCB in differenti comparti di pecore esposte in funzione dell'età e del numero di lattazioni (parti) dell’animale
- Valutare il profilo di contaminazione congenere-specifico delle diossine e PCB nei diversi tessuti di ovini

Materiali e Metodi

Campionamento

Animali selezionati in funzione

- ETÀ (mesi)
- NUMERO LATTAZIONI

Matrici campionate

- FEGATO
- MUSCOLO
- GRASSO PERIRENALE

Materiali e Metodi

Campionamento

Gruppo	N° animali	N° campioni
Agnelli <3 mesi	6	18
Agnelli 3-8 mesi	6	18
Pecore I parto	6	18
Pecore II parto	6	18
Pecore III parto	6	18
Totale	30	90

Materiali e Metodi

Analiti ricercati

POLICLORODIBENZO-*p*-DIOSSINE (PCDD)

POLICLORODIBENZOFURANI (PCDF)

POLICLOROBIFENILI (PCB)

PCDD/PCDF	DL-PCB	NDL-PCB
PCDD	**non-*ortho*-PCB**	
2,3,7,8-TCDD	PCB-77	PCB-28
1,2,3,7,8-PeCDD	PCB-81	PCB-52
1,2,3,4,7,8-HxCDD	PCB-126	PCB-101
1,2,3,6,7,8-HxCDD	PCB-169	PCB-138
1,2,3,7,8,9-HxCDD		PCB-153
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD		PCB-180
OCDD		
PCDF	**mono-*ortho*-PCB**	
2,3,7,8-TCDF	PCB-105	
1,2,3,7,8-PeCDF	PCB-114	
2,3,4,7,8-PeCDF	PCB-118	
1,2,3,4,7,8-HxCDF	PCB-123	
1,2,3,6,7,8-HxCDF	PCB-156	
2,3,4,6,7,8-HxCDF	PCB-157	
1,2,3,7,8,9-HxCDF	PCB-167	
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	PCB-189	
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF		
OCDF		

Materiali e Metodi

Fattori di tossicità equivalente PCDD, PCDF e DL-PCB

- **Tossicità equivalente di TCDD (TEF=1)**

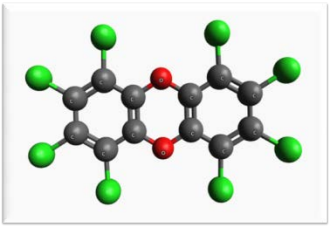
Per facilitare la **comparazione** dei dati analitici e di esposizione

Per convertire i risultati analitici dei 17 congeneri PCDD/F e dei 12 congeneri DL-PCB in un unico valore **somma**

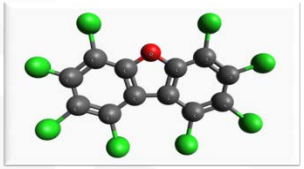
TCDD toxic equivalent (TEQ)

Materiali e Metodi

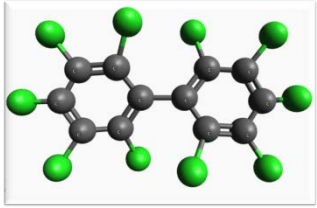
Fattori di tossicità equivalente PCDD, PCDF e DL-PCB



= H o Cl = O = C



Congenere	TEF_{WHO05}	Congenere	TEF_{WHO05}
Dibenzo-p-diossine		**Non-*orto* PCB**	
2,3,7,8-TCDD	**1**	PCB-77	**0.0001**
1,2,3,7,8-PeCDD	**1**	PCB-81	**0.0003**
1,2,3,4,7,8-HxCDD	**0.1**	PCB-126	**0.1**
1,2,3,6,7,8-HxCDD	**0.1**	PCB-169	**0.03**
1,2,3,7,8,9-HxCDD	**0.1**		
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	**0.01**		
OCDD	**0.0003**		
Dibenzofurani		**Mono-*orto* PCB**	
2,3,7,8-TCDF	**0.01**	PCB-105	**0.00003**
1,2,3,7,8-PeCDF	**0.03**	PCB-114	**0.00003**
2,3,4,7,8-PeCDF	**0.3**	PCB-118	**0.00003**
1,2,3,4,7,8-HxCDF	**0.1**	PCB-123	**0.00003**
1,2,3,6,7,8-HxCDF	**0.1**	PCB-156	**0.00003**
1,2,3,7,8,9-HxCDF	**0.1**	PCB-157	**0.00003**
2,3,4,6,7,8-HxCDF	**0.1**	PCB-167	**0.00003**
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	**0.01**	PCB-189	**0.00003**
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	**0.01**		
OCDF	**0.0003**		



Legenda:

- **T = tetra; Pe = penta; Hx = esa; Hp = epta; O = octa; CDD = clorodibenzo-p-diossina; CDF = clorodibenzofurano; CB = clorobifenile**

Materiali e Metodi

Fattori di tossicità equivalente PCDD, PCDF e DL-PCB

- 17 congeneri di **PCDD**, **PCDF**
- 12 congeneri di **PCB** diossina simili
- Moltiplicando la concentrazione analitica di ciascun congenere per il corrispondente fattore di tossicità equivalente (**TEF**) si ottiene la tossicità equivalente (**TEQ**) dei 29 congeneri rilevati nel campione

$$TEQ = \Sigma[PCDD_i \times TEF_i] + \Sigma[PCDF_i \times TEF_i] + \Sigma[PCB_i \times TEF_i]$$

Materiali e Metodi

Estrazione: ASE o PLE

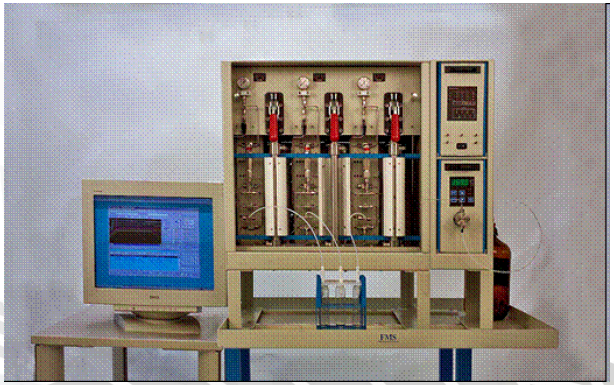
ASE

Esano/Acetone (80:20, v/v)

T = 125°C

P = 1500 psi

3 cicli di estrazione



PLE

Esano/Acetone (80:20, v/v)

T = 125°C

P = 1500 psi

3 cicli di estrazione

Materiali e Metodi

Purificazione

Fase 1: Partizione liquido-liquido

1. Acido Solforico (98%)
2. Cloruro di sodio (10%)
3. Idrossido di potassio (20%)
4. Cloruro di sodio (10%)

Materiali e Metodi

Purificazione

Fase 2: Purificazione su colonne di Silica, Alumina e Carbone

POWER-PREP™

1. Gel di Silica multistrato
2. Alumina Basica
3. Carbone

PCB
PCDD/F

3. Toluene

PCDD/F

2. Esano:diclorometano 95:5 (v/v)

PCB

GC-HRMS

Materiali e Metodi

GC-HRMS

SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

- DB-5 MS (60 m x 0.25 mm, 0.10 μm): **PCDD/F**
- HT-8 PCB (60 m x 0.25 mm, 0.25 μm): **DL-PCB e NDL-PCB**

DETERMINAZIONE ANALITICA

- Risoluzione ≥ 10000
- Acquisizione in Single Ion Monitoring

Risultati: livelli di contaminazione

39 campioni non conformi (43%) per almeno un parametro

24 animali (80%) con livelli di contaminazione superiori ai limiti massimi in almeno una delle tre matrici analizzate

Risultati: livelli di contaminazione

Fegato

Valori medi, minimi e massimi di contaminazione relativi a Diossine, DL-PCB, Diossine+DL-PCB, e somma analitica NDL-PCB espressi su prodotto intero

GRUPPO	MATRICE	PCDD/F media (min-max) (pg WHO_{05}-TEQ/g)	DL-PCB media (min-max) (pg WHO_{05}-TEQ/g)	PCDD/F + DL-PCB media (min-max) (pg WHO_{05}-TEQ/g)	SOMMA NDL-PCB media (min-max) (ng/g)
Agnelli 3-8 mesi	FEGATO	**1,413** (0,389-2,121)	2,266 (0,552-3,578)	**3,680** (0,940-5,186)	**3,777** (1,095-6,138)
	GRASSO	0,739 (0,115-1,329)	2,929 (0,604-5,763)	3,637 (0,719-7,092)	15,618 (2,366-34,410)
	MUSCOLO	0,043 (0,011-0,093)	0,143 (0,046-0,242)	0,187 (0,057-0,335)	0,819 (0,365-1,590)
Terzo parto	FEGATO	**1,539** (0,918-3,123)	2,946 (1,948-4,167)	**4,485** (3,166-7,085)	**1,793** (0,612-2,365)
	GRASSO	0,624 (0,014-1,606)	2,557 (0,047-5,626)	3,181 (0,0662-7,232)	7,386 (0,315-15,321)
	MUSCOLO	0,057 (0,008-0,144)	0,197 (0,033-0,608)	0,254 (0,045-0,751)	0,712 (0,303-0,982)

Limiti di legge Reg. CE 1067/2013

Alimenti	Diossine (WHO-PCDD/F-TEQ)	Somma diossine e DL-PCB (WHO-PCDD/F-PCB-TEQ)	Somma 6 NDL-PCB (ng/g)
Fegato di ovini e prodotti derivati	1.25 pg/g di peso fresco	2.00 pg/g di peso fresco	3.00 ng/g di peso fresco

Risultati: livelli di contaminazione

Grasso, muscolo

Valori medi, minimi e massimi di contaminazione relativi a Diossine, DL-PCB, Diossine+DL-PCB, e somma analitica NDL-PCB espressi su prodotto grasso.

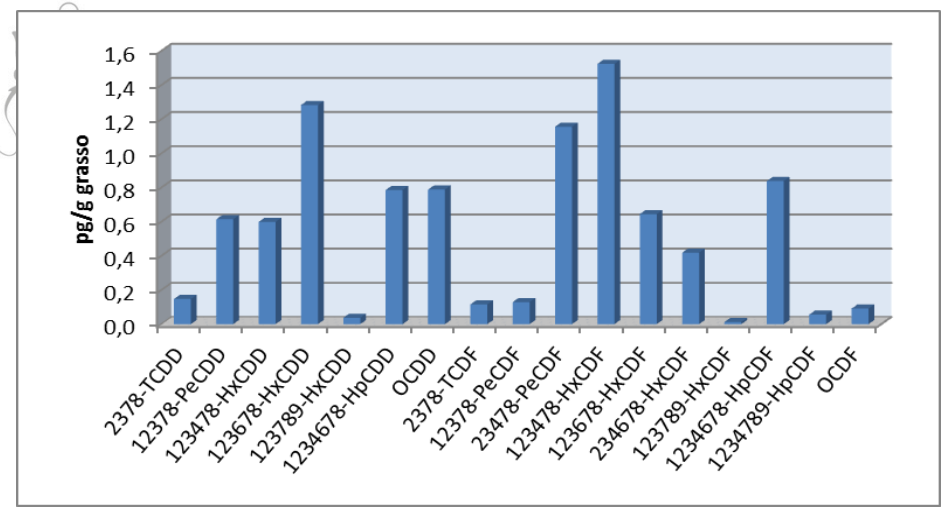
GRUPPO	MATRICE	PCDD/F media (min-max) (pg WHO_{05}-TEQ/g grasso)	DL-PCB media (min-max) (pg WHO_{05}-TEQ/g grasso)	PCDD/F + DL-PCB media (min-max) (pg WHO_{05}-TEQ/g grasso)	SOMMA NDL-PCB media (min-max) (ng/g grasso)
Agnelli < 3 mesi	FEGATO	10,25 (0,42-20,86)	18,40 (0,94-40,54)	27,75 (1,35-61,40)	27,38 (2,75-42,14)
	GRASSO	0,82 (0,57-1,19)	4,23 (2,71-5,48)	5,06 (3,27-6,67)	15,01 (7,98-23,98)
	MUSCOLO	0,67 (0,23-1,10)	2,57 (0,15-5,27)	3,24 (1,25-6,26)	9,83 (6,22-18,34)
Agnelli 3-8 mesi	FEGATO	38,40 (9,04-102,46)	59,05 (13,27-116,69)	97,45 (22,31-219,15)	106,71 (14,42-218,50)
	GRASSO	**1,59** (0,77-3,27)	6,38 (3,30-10,23)	**8,01** (4,14-13,50)	**35,88** (13,73-69,74)
	MUSCOLO	**1,07** (0,50-1,93)	4,15 (2,01-10,58)	**5,23** (2,63-12,51)	**22,81** (12,25-45,92)
Primo parto	FEGATO	13,81 (5,11-29,45)	32,80 (10,77-63,38)	46,60 (15,88-92,82)	44,18 (12,23-131,62)
	GRASSO	0,49 (0,14-0,86)	2,47 (1,18-3,91)	2,97 (1,32-4,77)	8,49 (3,20-16,54)
	MUSCOLO	0,51 (0,31-0,85)	2,29 (1,68-3,05)	2,80 (2,11-3,90)	14,00 (7,38-29,61)
Secondo parto	FEGATO	16,63 (4,96-37,18)	34,25 (9,64-58,31)	50,88 (14,60-95,49)	34,36 (13,82-80,51)
	GRASSO	0,74 (0,40-1,67)	2,66 (1,77-3,04)	3,40 (2,37-4,71)	10,02 (6,80-16,21)
	MUSCOLO	0,47 (0,18-0,85)	1,93 (0,61-3,99)	2,39 (0,79-4,68)	9,05 (4,53-17,73)
Terzo parto	FEGATO	22,57 (6,60-44,65)	43,19 (17,32-96,23)	65,77 (23,92-140,88)	25,21 (11,13-54,31)
	GRASSO	**1,66** (0,15-4,79)	5,81 (0,48-13,28)	**7,47** (0,63-18,08)	**19,57** (3,20-54,62)
	MUSCOLO	**0,82** (0,24-1,30)	2,45 (1,18-5,41)	**3,27** (1,42-6,69)	**11,93** (8,75-20,70)

Reg. CE N. 1259/2011

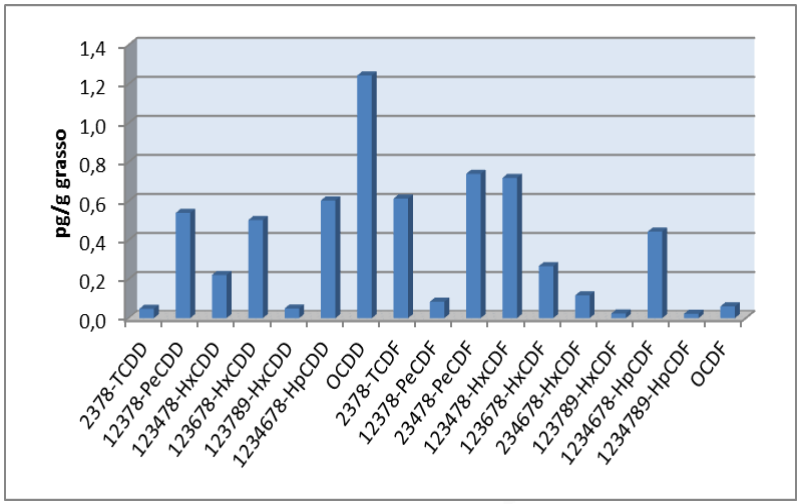
Alimenti	Diossine (WHO-PCDD/F-TEQ)	Somma diossine e DL-PCB (WHO-PCDD/F-PCB-TEQ)	Somma 6 NDL-PCB (ng/g grasso)
Grasso / carne di ovini	2.5 pg/g di grasso	4.0 pg/g di grasso	40 ng/g di grasso

Risultati: profilo di contaminazione

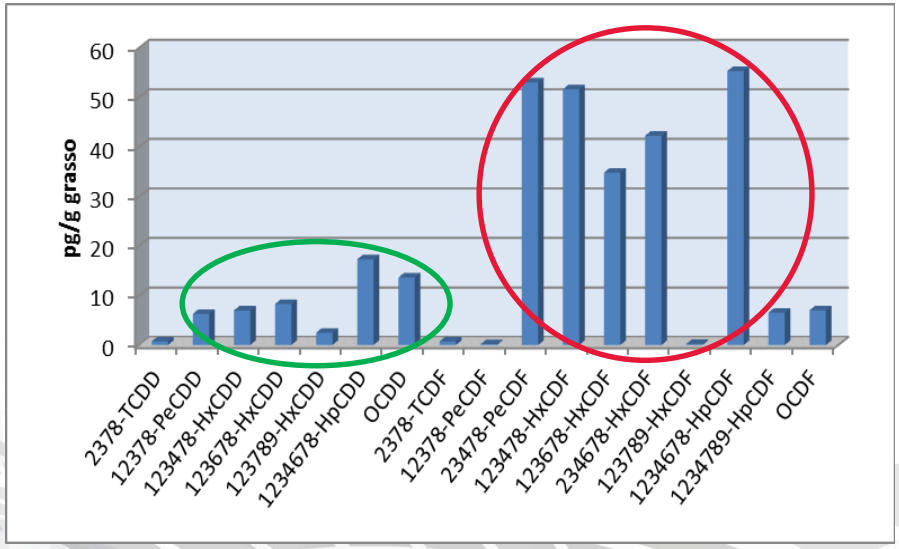
GRASSO



MUSCOLO



FEGATO

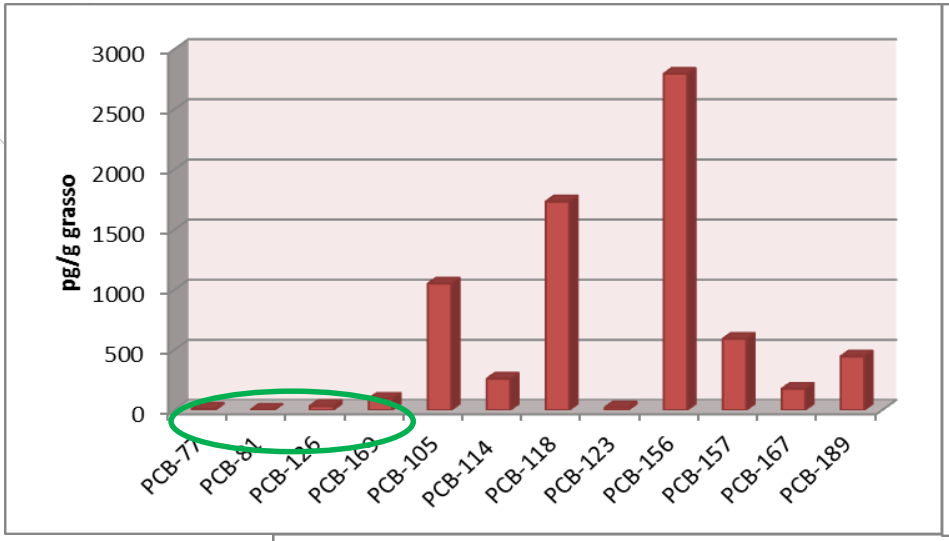


PCDD-PCDF

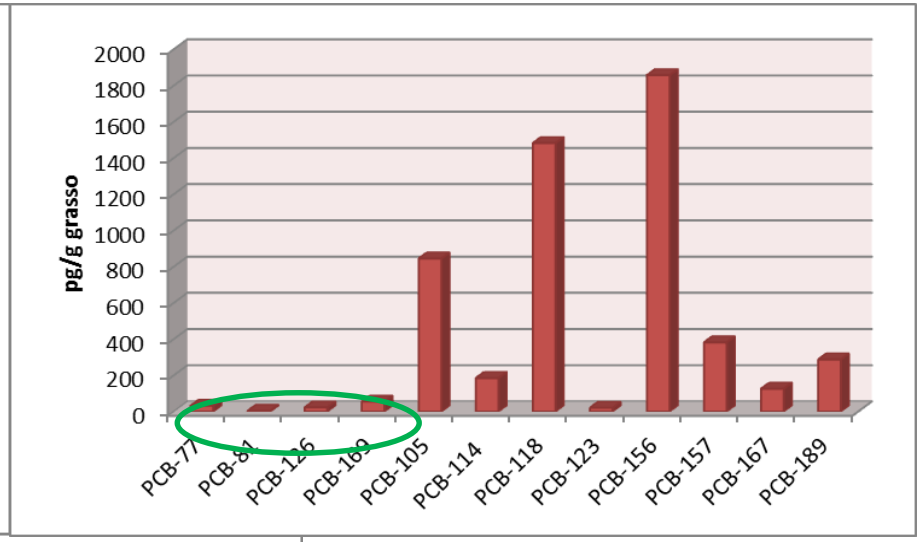
(Agnelli 3-8 mesi)

Risultati: profili di contaminazione

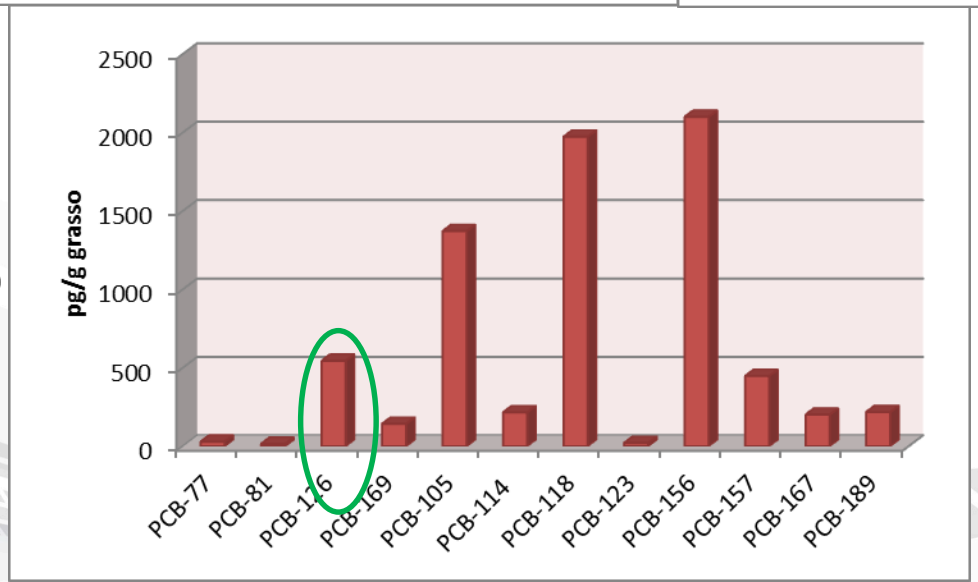
GRASSO



MUSCOLO



FEGATO

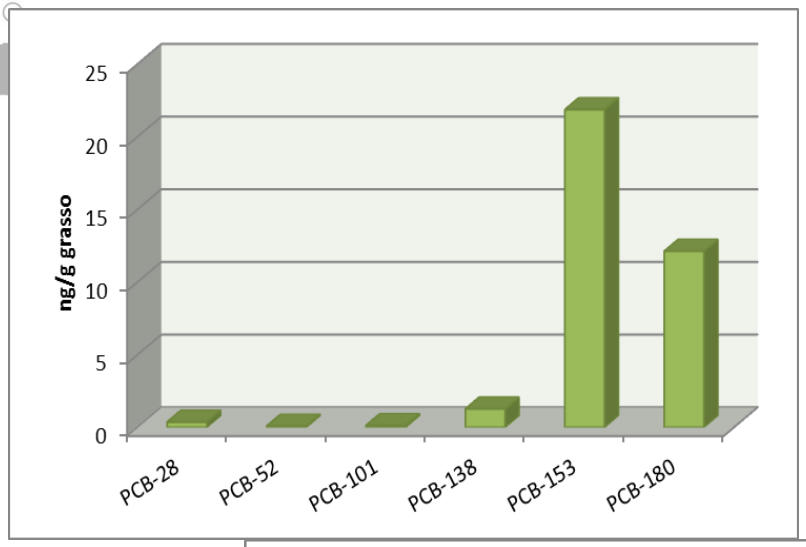


DL-PCB

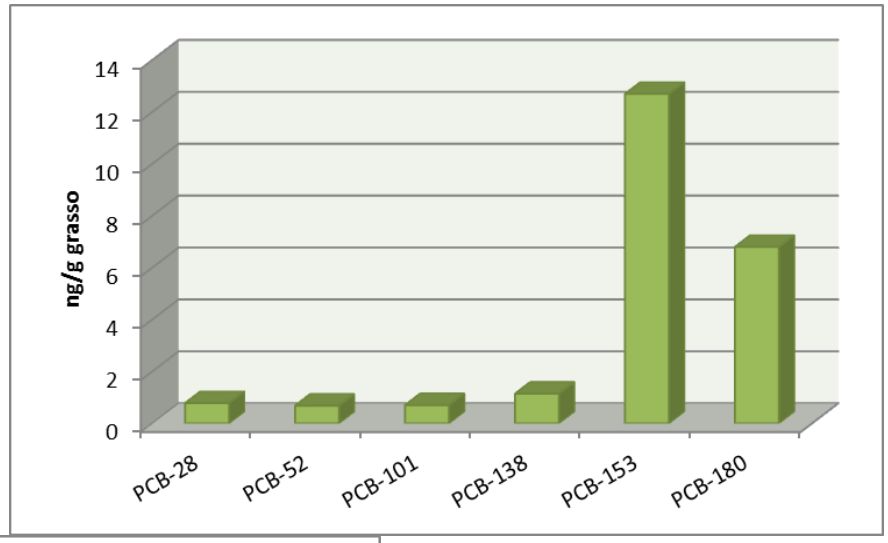
(Agnelli 3-8 mesi)

Risultati: profili di contaminazione

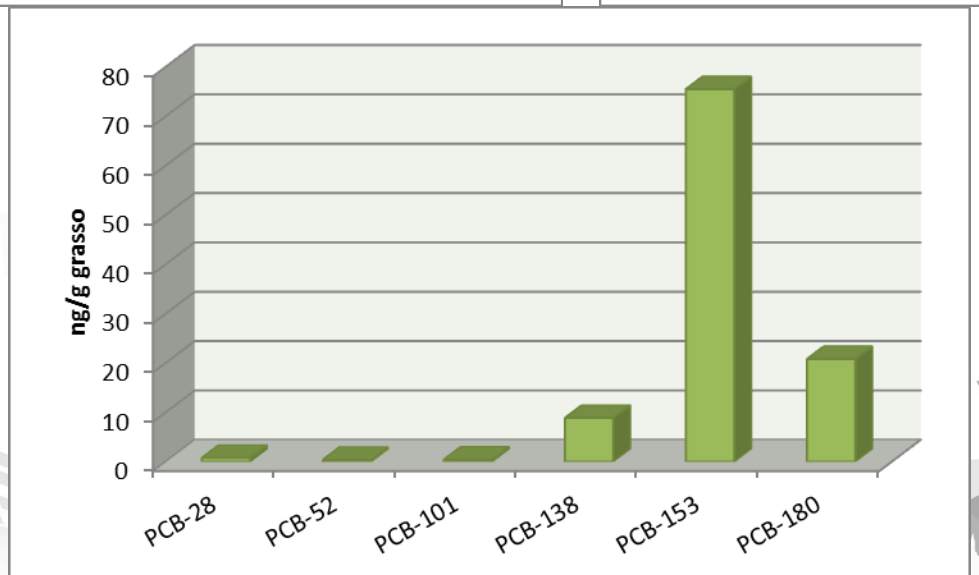
GRASSO



MUSCOLO



FEGATO



NDL-PCB

(Agnelli 3-8 mesi)

Discussione

- Nei ruminanti il pascolo è il meccanismo principale di esposizione a diossine e PCB
  - L'arcata dentale stretta e ricurva rende questi animali capaci di brucare erba nelle immediate vicinanze del terreno
    - assunzione involontaria di terreno depositato sulla vegetazione o ingerito dall'animale che si nutre di erba a poca distanza dal suolo

Discussione

- maggiore probabilità di venire a contatto con situazioni ambientali compromesse
  - I livelli di contaminazione nel fegato sono più alti rispetto a quelli del grasso e muscolo
    - Risultati simili in altri studi

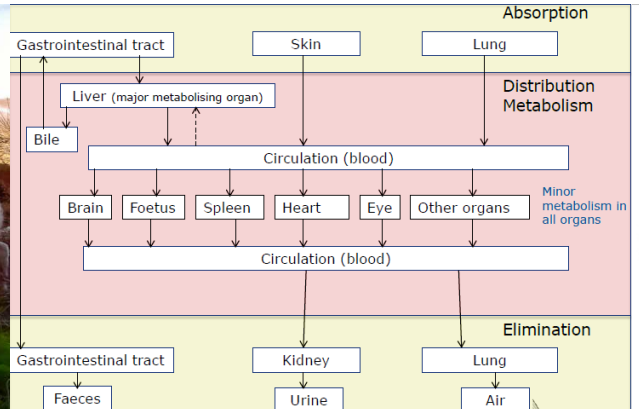
Discussione

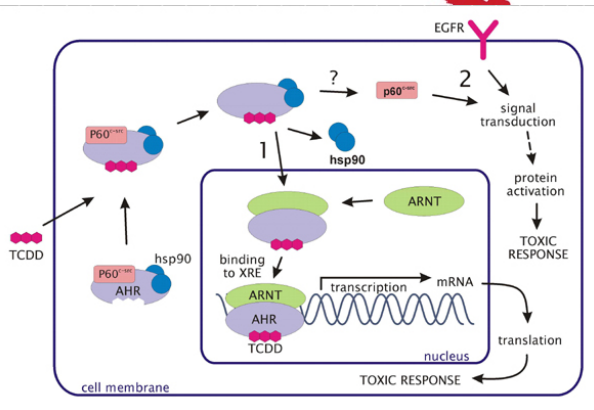
- L'accumulo di tali contaminanti nel fegato è legato alla sua funzione fisiologica
  - Abbondanza di AhR nel fegato
  - Ovini *Vs* bovini: minore attivita` del CYP1A1

    ⇓

    Minore metabolismo

    Meccanismo tipo “sequestro”

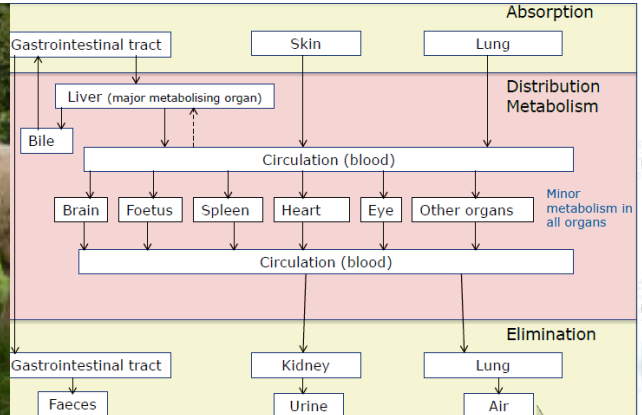


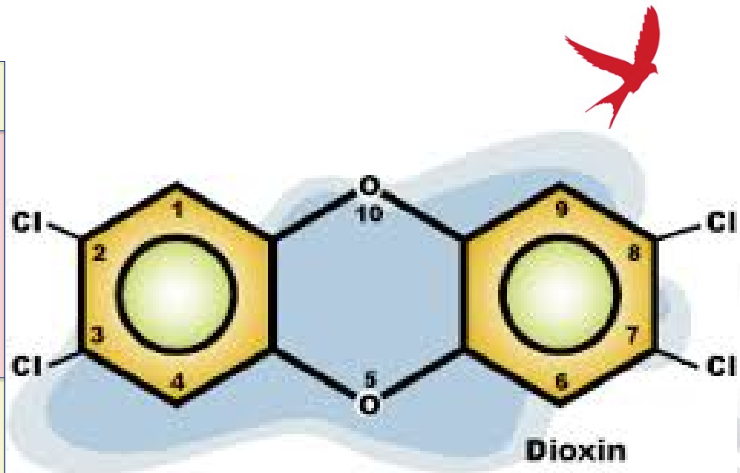


Discussione

- Il profilo di contaminazione è influenzato sia dalla differente abbondanza dei congeneri nell'ambiente sia dai meccanismi tossico-cinetici che coinvolgono questi composti una volta ingeriti dall'animale

  - es. i PCB ad alto grado di clorurazione (8-10 atomi di cloro) sono assorbiti meno facilmente dei congeneri a minor grado di clorurazione





Discussione

- **Esposizione con la dieta per il consumo di fegato ovino (*EFSA Journal 2011; 9(7):2297*)**

Stima effettuata su popolazione europea:
pochi consumatori fegato ovino (<3%)

Consumo regolare
Aumenta esposizione del 20%

Consumo occasionale
Aumenta TWI - Tolerable Weekly Intake
(14 pg WHO-TEQ/Kg peso corporeo)

Conclusioni

Livelli di contaminazione

- Il fegato è la matrice più contaminata
- Grasso e muscolo presentano livelli di contaminazione simili
- Alta variabilità tra i gruppi (età/n° parti) e tra le matrici (grasso/muscolo/fegato)

Conclusioni

Correlazioni

- Età degli animali *Vs* livelli di contaminazione – nessuna correlazione
- Numero di parti *Vs* livelli di contaminazione – nessuna correlazione

Contact Us

DIOXIN MADRID 2014

34th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants

HOME | GENERAL INFORMATION | COMMITTEES | SCIENTIFIC PROGRAM | REGISTRATION | ABSTRACT SUBMISSION | SPONSORS & PARTNERS | SOCIAL PROGRAM | DIOXIN 3.0

WELCOME TO DIOXIN 2014!

Dear colleagues and friends,

On behalf of the Local Organizing Committee, it is a great
to the 34th International Symposium on Halogenated Persi
Dioxin 2014 – to be held on 31st August to 5th Septembe
The venue, Hotel Meliá Castilla, located in one of the m
places of the city of Madrid will provide you with all the
experience.

CONCENTRATION AND DISTRIBUTION of DIOXINS and PCBs IN SHEEP GRAZING NEAR A WASTE INCINERATOR

R. Ceci[1], G. Diletti[1], A. De Benedictis[1], C. De Notarpietro[2], M. Leva[1], G. Scortichini[1], G. Migliorati[1]

[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", National Reference Laboratory for Dioxins and PCBs in food and feed, Via Campo Boario, 64100 Teramo, Italy
[2]Azienda Sanitaria Locale, Dipartimento di Prevenzione Servizio Veterinario, Via Sante Cezza, 73024 Lecce, Italy

Introduction

This report is concerned with an investigation on dioxins (PCDD/Fs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) contamination in a farm sheep near to an industrial area and a waste incinerator (Lecce province, Apulia Region, Italy). In November 2009, the Local Health Authority ordered to slaughter all animals in the farm due to non-compliant samples of sheep milk and meat. In cooperation with the Local Health Authority, the Italian National Reference Laboratory (NRL) for dioxins and PCBs in feed and food collected samples from farm sheep in order to evaluate levels and distribution patterns of PCDD/Fs, dioxin-like PCBs (DL-PCBs) and non dioxin-like PCBs (NDL-PCBs) in several animal tissues. The present study is a part of a larger investigation that is still ongoing.

Materials and methods

Sampling

Samples of blood, liver, muscle and perirenal fat from a farm sheep were collected at slaughter by the official veterinarian officers.

Before slaughtering, animals were categorized by gender (male - female), age (lambs under 3 months - lambs between 3- 8 months) and lambings (first, second and third lambing), each group counted 8 to 17 individuals. Four matrices (blood, liver, perirenal fat and muscle) were taken from each animal.

On a total of 356 samples collected (i.e. 89 animals), 45 samples of liver, muscle and perirenal fat have been analyzed for PCDD/Fs, DL-PCBs and NDL-PCBs, in order to evaluate the contamination levels and congener profiles in different animal tissues. The number of animals and samples are provided in Table 1.

Table 1. Animals and samples analyzed

Groups	N. of animals	N. of samples
Lamb < 3 months	3	9
Lamb 3 - 8 months	3	9
First lambing ewe	3	9
Second lambing ewe	3	9
Third lambing ewe	3	9
Total	**15**	**45**

Analysis of samples

Samples were homogenized and analyzed by a validated method routinely used for PCDD/Fs, DL-PCBs and NDL-PCBs analysis in food and feed, the method was also endorsed to perform a number of proficiency tests with successful results.

All samples were spiked with the specific PCDD/Fs, DL-PCBs and NDL-PCBs standard solution, a mixture of $^{13}C_{12}$-labelled congeners (Wellington Laboratories, Ontario, Canada).

The extraction and clean-up procedures, as well as the analytical determination, were previously reported[1].

PCDD/Fs were separated by high resolution gas chromatography (HRGC) on a DB-5 MS capillary column (60 m x 0.25 mm, 0.10 µm film thickness, J&W Scientific, California) and determined by high resolution mass spectrometry (HRMS), at a resolution of 10,000 operating with electron ionization (EI) at 40 eV in the selected ion monitoring (SIM). The HRGC/HRMS system consisted of a GC Trace Series 2000 coupled with a MAT 95 XP (Thermo Fisher, Bremen, Germany). DL-PCBs and NDL-PCBs were separated by HRGC on a HT-8 capillary column (60 m x 0.25 mm, 0.25 µm film thickness, SGE Analytical Science Pty, Ltd. Victoria, Australia) and determined by HRMS, under conditions described for PCDD/Fs.

PCDD/Fs and DL-PCBs toxic equivalent (TEQ) values were calculated using the World Health Organization Toxic Equivalency Factors (WHO-TEF_{5688}), while the sum of six indicator congeners was calculated for NDL-PCBs. WHO-TEQs and the amount of six NDL-PCBs were expressed as upper bound (UB) concentrations,

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Gruppo di lavoro

Grazie per l`attenzione!