

METODI ECOTOSSICOLOGICI PER L'ANALISI DELLE DIOSSINE

LA MISURA DI INQUINANTI COME LE DIOSSINE PUÒ ESSERE EFFETTUATA TRAMITE EFFECT BASED METHODS. TRA QUESTI, DR-CALUX È IL PIÙ UTILIZZATO PERCHÈ È UN EFFICACE METODO DI SCREENING CHE RIESCE AD ANTICIPARE CON UNA BUONA ATTENDIBILITÀ I RISULTATI OTTENUTI DALL'ANALISI CHIMICA, CHE HA TEMPI DI RISPOSTA SUPERIORI.

L'utilizzo degli Ebm (*Effect based methods*) per la misura di inquinanti chimici non è una novità e la loro utilità è dimostrata dalla loro inclusione in molte norme e nella presenza di linee guida tecniche. La normativa europea sugli alimenti [1] ad esempio prevede l'utilizzo degli Ebm (definiti metodi di *screening*) per valutare il livello di contaminazione degli alimenti da diossine. Scopo del loro utilizzo è quello di focalizzare gli sforzi di una analisi chimica, mediante un metodo di conferma, soltanto sui campioni sospetti, per i quali i livelli di diossine risultano superiori ai livelli massimi tabellari [2]. Ancora la Comunità europea, nella necessità di valutare la tossicità delle miscele delle sostanze chimiche inquinanti presenti nelle acque nelle attività di monitoraggio definite dalle direttive quadro sulle Acque [3], ha elaborato un documento tecnico per fotografare lo stato dell'arte degli Ebm per tale matrice, per chiarire come questi metodi possano rendere più efficiente il monitoraggio, anche in termini di costi [2].

Il Dr-Calux (*Dioxin responsive-chemically activated luciferase gene expression*) è l'Ebm maggiormente utilizzato per la misura di diossine (Pcdd), composti diossina simili (furani, Pcdf) e Pcb diossina-simili (dl-Pcb) in matrici ambientali, come quelle analizzate a seguito di incendi quali il suolo, inquinanti presenti nel particolato atmosferico attraverso il campionamento per deposizione, oppure su filtri o cartucce tradizionali di schiuma di poliuretano Puf o resine come amberlite stirene divinilbenzene-XAD2.

È importante sottolineare che il Dr-Calux misura la potenza (relativa alla 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina) di una miscela di indurre l'espressione di un gene, ma non dà una misura diretta di tossicità.

Il Dr-Calux si basa sull'utilizzo di una linea cellulare geneticamente modificata dell'epatoma di ratto. Tale linea cellulare

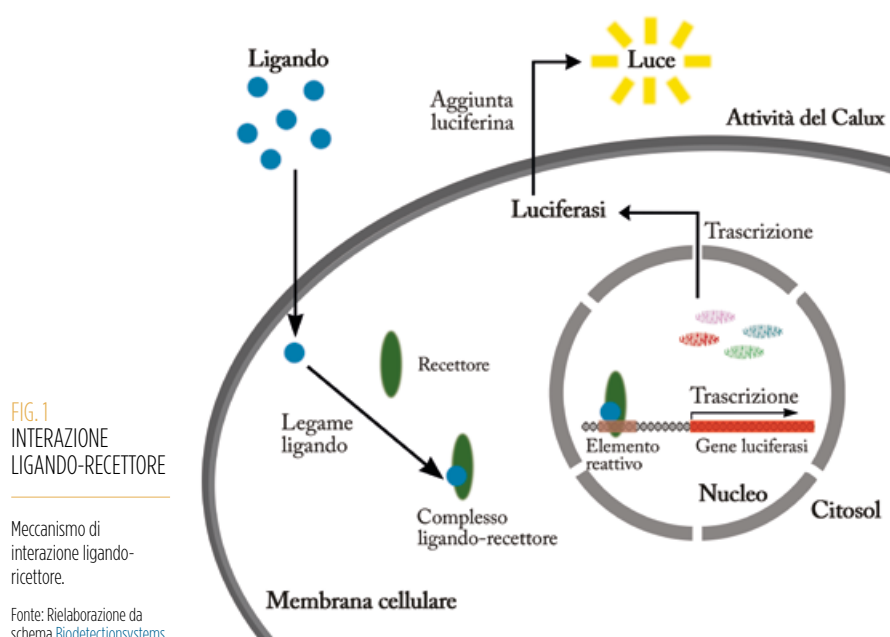


FIG.1 INTERAZIONE LIGANDO-RECETTORE

Meccanismo di interazione ligando-recettore.

Fonte: Rielaborazione da schema Biodetectionsystems.

incorpora il gene della luciferasi accoppiato ai *Dioxin responsive elements* (Dre), cioè "geni reporter" alla presenza di Pcdd, Pcdf e dl-Pcb. In seguito al legame tra diossine e/o composti diossina-simili e il recettore citosolico per gli idrocarburi arilici (AhR), il complesso ligando-recettore lega i Dre. Le cellule che sono esposte alle diossine e ai composti diossina simili non soltanto esprimono le proteine che sono normalmente associate ai Dre, ma anche la luciferasi. Aggiungendo l'appropriato substrato alla luciferasi, viene emessa luce. La quantità di luce prodotta è proporzionale al numero di legami ligando-recettore specifico; il numero di legami che si è formato è esplicitato rispetto alla quantità di un composto di riferimento, cioè la 2378-Tcdd (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina), con la quale viene costruita una curva dose-risposta. Il saggio Dr-Calux esprime i risultati in termini di 2378-Tcdd tossicità equivalente (Teq) per le matrici ambientali, mediante i fattori di tossicità equivalenti (Tef) e in termini di equivalente bioanalitico (Beq) per matrici

alimentari, o, per i mangimi, mediante i valori di potenza relativa (Rep). Le procedure utilizzate per il saggio nei laboratori sono diverse, tranne per i metodi descritti dai maggiori gruppi di ricerca nel campo o per i rivenditori commerciali delle cellule (vedi Xenobiotic detection systems Inc. e Bio detection systems b.v.). Non esiste un metodo unico condiviso che permetta una comparabilità dei dati, viste le differenze nelle metodologie analitiche di pretrattamento del campione e nel saggio. La *United States Environmental protection agency* (Epa) ha pubblicato una procedura dettagliata di *screening* bio-analitica per la misura di diossine e composti diossina-simili in suoli e sedimenti, cioè il metodo Epa4435 [4]. Tale metodo è stato ottimizzato e validato utilizzando le linee cellulari della Xds Inc. Affinchè le cellule possano essere esposte al campione per procedere poi alla lettura con il chemiluminometro, il campione deve subire un pretrattamento in cui si portano le sostanze da misurare in soluzione organica (estrazione) e

si allontanano possibili interferenti (purificazione) come nei metodi prettamente chimici. Il purificato viene portato infine in dimetilsolfossido (DmsO), solvente compatibile con le cellule del saggio.

È come sempre fondamentale verificare che il saggio nelle sue diverse fasi risulti sotto controllo. In letteratura sono presenti diversi esempi di tali attività di verifica [5, 6, 7].

Negli ultimi anni, il saggio Dr-Calux è stato oggetto di studio per valutare il suo possibile uso come alternativa alla misura delle diossine in Hrgc-Hrms (gas cromatografia e spettrometria di massa ad alta risoluzione). La bibliografia è ampia e riguarda diverse matrici come ad esempio suolo, sedimenti, deposizioni atmosferiche, aria ambiente ecc. [6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24].

Nei diversi lavori si confrontano i risultati ottenuti sugli stessi campioni con il saggio Dr-Calux e con la misura in Hrgc-Hrms. Quanto emerge dalla letteratura approfondita è in generale riassunto in un importante articolo di Windal [25], che riporta le seguenti problematiche nell'uso di questo saggio:

- assenza di una procedura condivisa che permetta la comparabilità dei dati
- il Dr-Calux non è un saggio composto-specifico, ma risponde a tutti i composti presenti nell'estratto o nel purificato in grado di legare il recettore AhR. In particolare i ligandi AhR sono:

a) ligandi agonisti/classici: si legano al recettore e attivano l'espressione del gene, per esempio composti di struttura simile a quella delle diossine, composti planari, idrofobici e aromatici per i quali vale l'approccio del fattore equivalente di tossicità (Tef) e si considera la tossicità come somma, i composti quali Pbdd/f (polibromodibenzodiossine e polibromodibenzofurani), Pbb (polibromodifenili) e alcuni policloronaftaleni (Pcn)

b) questi ultimi [5], ma anche gli Ipa (idrocarburi policiclici aromatici) per i quali non vale l'approccio del fattore di tossicità equivalente.

c) ligandi antagonisti/non classici: si legano al recettore e sopprimono l'espressione del gene (metalli arseniti e Cd^{2+} , Aroclor 1254, esaclorobenzene)

- il saggio Dr-Calux è influenzato dai seguenti parametri:

a) scelta delle condizioni di estrazione dei campioni: si deve tener conto di quali composti ligandi sono estratti e degli effetti conseguenti nel saggio, della loro biodisponibilità e non soltanto della quantità estratta

b) scelta della procedura di purificazione: una purificazione più spinta aumenta la selettività del saggio

c) nell'estratto purificato si osserva l'inibizione della risposta del Dr-Calux per la presenza di singoli Pcb quali, ad esempio, 52, 108, 153 e l'esaclorobenzene;

d) interazioni sinergiche che si osservano a bassi livelli di ligandi AhR i quali agiscono mediante altri meccanismi di trasduzione del segnale come i corticosteroidi (altri esempi sono le

prostaglandine, attivatori della proteina chinasi) che da soli danno una risposta debole al Dr-Calux, ma in presenza di Tcdd (tetraclorodibenzodiossina) aumentano drammaticamente la risposta nelle cellule di epatoma di ratto

e) impurezze dei solventi e degli adsorbenti utilizzati nella procedura: questi possono risultare tossici per le cellule, quindi sopprimere la risposta nell'espressione del gene AhR (viene emessa minore quantità di luce)

f) tipologia di linea cellulare utilizzate, la concentrazione e la funzionalità del recettore AhR è specifica a seconda del tessuto e della specie, inoltre gli effetti sinergici e antagonistici di alcuni composti sono linea cellulare-dipendenti

g) la durata di esposizione delle cellule ai campioni, ad esempio gli Ipa danno una risposta al saggio dopo tempi di esposizione brevi, dopo tempi superiori alle 24 h sono metabolizzati

h) dose analizzata

i) correzione per il recupero

- nonostante i valori di Teq ottenuti via Dr-Calux e via analisi in Hrgc-Hrms

risultino confrontabili, il biosaggio Dr-Calux non può sostituire l'analisi in alta risoluzione (la tecnica *gold standard*), questo perché:

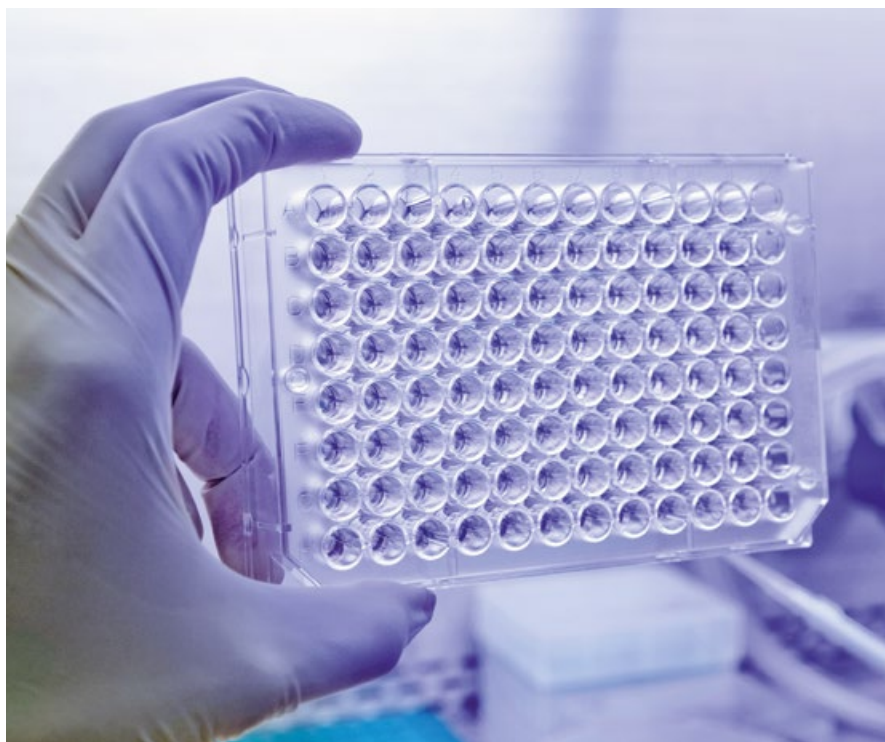
a) il Dr-Calux misura l'attività biologica di tutti i ligandi del recettore AhR presenti nell'estratto mentre l'analisi chimica è focalizzata su un numero determinato di composti

b) i valori di potenza relativa utilizzati nel calcolo del Teq per il Dr-Calux sono specie e tessuto specifici e la maggior parte di essi risultano molto differenti dai valori Who-Tef usati nelle analisi chimiche

c) nelle analisi chimiche i composti inferiori al limite di rivelazione (Lod) non contribuiscono al valore di tossicità equivalente del campione, al contrario nel Dr-Calux la risposta del saggio tiene conto anche di questi composti inferiori al Lod

d) il Dr-Calux tiene conto della presenza di composti (vedi gli Ipa) che si legano al recettore anche se non hanno un effetto tossico (interazioni additive).

Diversi articoli presenti in letteratura valutano la correlazione tra i gruppi di Pcedd/f e dl-Pcb mediante test statistici, soprattutto valutano il coefficiente di correlazione tra i due dataset. Un altro tipo di confronto [26] vede la determinazione della differenza tra le due misure che, in generale, risulta buona o molto buona anche se, in quest'ultimo caso, i risultati non sono sovrapponibili. Croes procede alla validazione del saggio Dr-Calux per la misura di dl-Pcb



e Pcd/f in campioni di deposizione atmosferica [8], il metodo è ottimizzato con “clean up” più esteso e un minor utilizzo di volumi di solvente organico via estrazione con Ase (*Accelerated solvent extraction*) rispetto a quelli effettuati usualmente in letteratura. Una purificazione più estesa permette una migliore correlazione tra i due metodi biologico e chimico (Dr-Calux e Hrgc-Hrms).

In generale le misure effettuate con il Dr-Calux per la determinazione di

Pcd/f danno valori sovrastimati rispetto a quelli ottenuti con l'analisi chimica. Infatti, alla risposta del saggio possono concorrere altri composti, ligandi agonisti; la presenza di interferenti nell'analisi chimica fa sottostimare la concentrazione di una diossina o furano come anche l'approccio *lower-bound* (in cui i limiti di quantificazione sono posti uguali a zero), per i dl-Pcb è esattamente il contrario. Per le diossine quindi una purificazione spinta può permettere una migliore correlazione tra i due dataset di misure (misure Dr-Calux e misure Hrgc-Hrms).

In conclusione, il Dr-Calux risulta complementare all'analisi chimica per il basso costo, i minori tempi di analisi, e risulta quindi una procedura d'elezione come metodo di *screening* e di prioritizzazione dei campioni che, successivamente, devono però essere sottoposti ad analisi chimica per confermare il superamento dei limiti di legge.

Elisa Calabretta, Stefania Balzamo

Ispira, Centro nazionale per la rete nazionale dei laboratori

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- [1] Regolamento (UE) 2017/644 della commissione che stabilisce i metodi di campionamento e di analisi per il controllo dei livelli di diossine, Pcb.
- [2] Ebm final report (Draft), *Proposal for Effect-Based Monitoring and assessment in the Water Framework Directive*.
- [3] Direttiva 2000/60/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 23 ottobre 2000 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque.
- [4] Epa4435, *Screening For Dioxin-Like Chemical Activity In Soils And Sediments Using The Calux Bioassay And Toxic Equivalents (TEQs) Determinations*.
- [5] Zhou Z., Zhao B. et al., 2013, “Simple and rapid determination of PCDD/Fs in flue gases from various waste incinerators in China using DR-EcoScreen cells”, *Chemosphere*, Vol. 102, p. 24-30.
- [6] Wang B., You G. et al., 2009, “CALUX bioassay of dioxin-like compounds in sediments from the Haihe river, China”, *Soil and Sediment Contamination*, Vol. 18, p. 397-411.
- [7] Brown D.J., Goeyens L. et al., “Quality control criteria implemented for monitoring the use of the calux bioassay” ([Online](#))
- [8] Croes K., Van Langenhove K. et al., 2011, “Analysis of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in atmospheric deposition samples from the Flemish measurement network: Optimization and validation of a new CALUX bioassay method”, *Chemosphere*, Vol. 82, 5, p. 718-24.
- [9] Shy C.G., Chao H.R., 2016, “An AhR-Luciferase Adenovirus infection system for rapid screening of dioxins in soils”, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 96, 2, p. 192-196.
- [10] Kojima H., Takeuchi S., 2018, “A sensitive, rapid, and simple DR-EcoScreen bioassay for the determination of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in environmental and food samples”, *Environmental Science and Pollution Research*, Vol. 25, p. 7101-7112.
- [11] Lin D.Y., Lee Y.P. et al., 2014, “Combination of a Fast Cleanup Procedure and a DR-CALUX® Bioassay for Dioxin Surveillance in Taiwanese Soils”, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, Vol. 11, 5, p. 4886-4904.
- [12] Du Y., Chen T. et al., 2011, “Comparative analysis of PCDD/Fs in soil around waste incineration plants in China using CALUX bioassay and HRGC/HRMS”, *Journal of hazardous materials*, Vol. 192, 3, p. 1729-38.
- [13] Dindal A., Thompson E. et al., 2007, “Application of site-specific calibration data using the CALUX by XDS bioassay for dioxin-like chemicals in soil and sediment samples (and Support Information)”, *Environmental Science & Technologies*, Vol. 41, 24, p. 8376-82.
- [14] Brown D.J., Orelie J. et al., 2007, “Mathematical model developed for environmental samples: prediction of GC/MS dioxin TEQ from XDS-CALUX bioassay data”, *Environmental Science & Technologies*, Vol. 41, 12, p. 4354-60.
- [15] Nording M., Denison M.S. et al., 2007, “Analysis of dioxins in contaminated soils with the calux and caflux bioassays, an immunoassay, and gas chromatography/high-resolution mass spectrometry”, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 26, 6, p. 1122-9.
- [16] Suzuki G., Someya M. et al., 2016, “Comprehensive evaluation of dioxins and dioxin-like compounds in surface soils and river sediments from e-waste-processing sites in a village in northern Vietnam: Heading towards the environmentally sound management of e-waste”, *Emerging Contaminants*, Vol. 2, 2, p. 98-108.
- [17] Jung K.E., Chung Y.H. et al., 2007, “DRE-CALUX bioassay in comparison with HRGC/MS for measurement of toxic equivalence in environmental samples”, *Science of the Total Environment*, Vol. 372, 23, p. 657-67.
- [18] Croes K., Vandermarken T. et al., 2012, “Analysis of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in atmospheric deposition samples from the Flemish measurement network: correlation between the CALUX bioassay and GC-HRMS”, *Chemosphere*, Vol. 88, 7, p. 881-7.
- [19] Chao H.R., Wang Y.F. et al., 2011 “Fast cleanup system combined with a dioxin-responsive element-driven luciferase bioassay for analysis of polychlorinated dibenzo-p-dioxins/furans in sediments and soils”, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 86, 3, p. 278-82.
- [20] Dindal A., Thompson E. et al., 2011, “Application of GC-HRMS and GCxGC-TOFMS to aid in the understanding of a dioxin assay's performance for soil and sediment samples”, *Environmental Science & Technology*, Vol. 45, 24, p. 10501-8.
- [21] Hoogenboom R., 2002, “The combined use of the CALUX bioassay and the HRGC/HRMS method for the detection of novel dioxin sources and new dioxin-like compounds”, *Environmental Science and Pollution Research*, Vol. 9, 5, p. 304-6.
- [22] Addeck A., Croes K. et al., 2014, “Time-integrated monitoring of dioxin-like polychlorinated biphenyls (dl-PCBs) in aquatic environments using the ceramic toximeter and the CALUX bioassay”, *Talanta*, Vol. 120, p. 413-8.
- [23] Vromman V., Baert K., 2012, “Evaluation of the use of CALUX results for dioxins and dioxin-like PCBs analysis for quantitative human exposure assessments”, *Food Control*, Vol. 27, p. 314-321.
- [24] Sciuto S., Martucci F. et al., 2013, “Valutazione del biosaggio cellulare DR-CALUX® come metodo di screening per la rivelazione di contaminazioni da diossine nel latte in Piemonte”, *Large Animal Review*, Vol. 19, p. 107-114.
- [25] Windal I., Denison M.S. et al., 2005, “Chemically activated luciferase gene expression (CALUX) cell bioassay analysis for the estimation of dioxin-like activity: critical parameters of the CALUX procedure that impact assay results”, *Environmental Science & Technology*, Vol. 39, 19, p. 7357-64.
- [26] Hui L.L., Hedley A.J. et al., 2007, “Agreement between breast milk dioxin levels by CALUX bioassay and chemical analysis in a population survey in Hong Kong”, *Chemosphere*, Vol. 69, 8, p. 1287-94.