

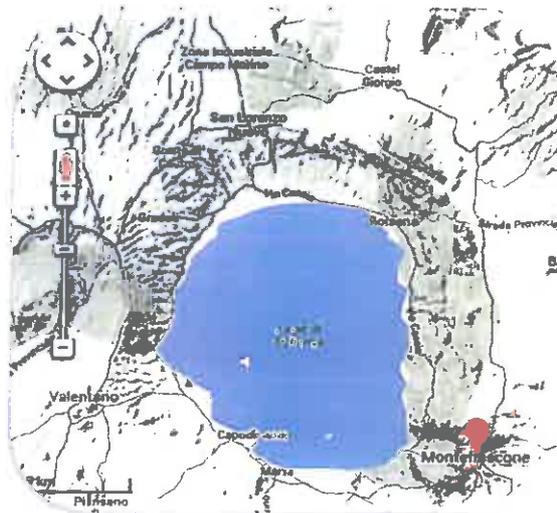


REPARTO IGIENE DELLE ACQUE INTERNE
DIPARTIMENTO AMBIENTE E CONNESSA PREVENZIONE PRIMARIA

ACCORDO DI COLLABORAZIONE
ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ – TALETE SpA
Giugno 2012 – Aprile 2015

*“Gestione del rischio correlato alla presenza di cianobatteri
nella filiera idrica delle acque destinate al consumo umano
captate dal lago di Bolsena”*

Responsabile scientifico ISS: Dott. Luca Lucentini



RELAZIONE FINALE

*Emanuele Ferretti, Federica Nigro Di Gregorio,
Valentina Fuscoletti, Vincenzo Tardella, Mario Cerroni e Luca Lucentini*

1. INDICE

1.	INDICE.....	1
2.	RIASSUNTO	2
3.	INTRODUZIONE	3
3.1.	GRUPPO DI RICERCA E COLLABORAZIONI.....	3
3.2.	QUADRO GENERALE, SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE	4
3.3.	ARTICOLAZIONE DELLE RICERCHE	4
3.4.	PRESUPPOSTI SCIENTIFICI	5
4.	MATERIALI E METODI.....	13
4.1.	AREA DI STUDIO	13
4.2.	CAMPIONAMENTO ED ANALISI IN-SITU.....	13
4.3.	IDENTIFICAZIONE DEI SITI DI CAMPIONAMENTO.....	14
4.4.	DETERMINAZIONI ANALITICHE.....	14
5.	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	17
5.1.	VALUTAZIONE DEI PROFILI TOSSICI DI CIANOTOSSINE NELLA FILIERA IDRICA DI PRODUZIONE DI ACQUE DESTINATE AL CONSUMO UMANO	17
5.2.	CONSIDERAZIONI SUI TRATTAMENTI DELL'IMPIANTO DI POTABILIZZAZIONE	17
6.	CONCLUSIONI.....	20
7.	APPENDICE A.....	22
8.	APPENDICE B.....	32

2. RIASSUNTO

Il presente rapporto riassume i risultati delle attività condotte nel periodo giugno 2012 – aprile 2015 nell'ambito del progetto Talete SpA – ISS (Reparto Igiene delle Acque Interne) finalizzato al monitoraggio della qualità della risorsa idrica nel lago di Bolsena e nell'acqua distribuita nel comune di Montefiascone.

In accordo con quanto pianificato e condiviso, le attività del progetto (giugno 2012 – aprile 2015) sono state anche focalizzate sul monitoraggio accurato della filiera idrica di produzione delle acque, con definizione dei profili di cianotossine prodotte nel corpo idrico e acquisizione di altri elementi significativi in merito alle caratteristiche chimico fisiche delle acque del Lago di Bolsena, all'identificazione e conteggio delle cellule algali utili per tracciare il trend di sviluppo della popolazione algale.

Sono state effettuate analisi dei componenti e processi del sistema idrico, dalla captazione alla fase di utenza, che hanno permesso di effettuare una valutazione del rischio di produzione di cianotossine nelle acque in fase di captazione e il destino/abbattimento delle alghe e tossine nelle acque.

È stato sviluppato e validato un metodo analitico altamente specifico e sensibile basato su estrazione in fase solida, separazione in cromatografia liquida e rivelazione in spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) per l'analisi di 19 cianotossine (21 cianotossine a partire da marzo 2014) e nodularina (standard interno) nelle acque del lago e lungo la filiera di potabilizzazione. Al fine di ottenere la definizione accurata dei profili tossici di acque esposte a fenomeni di contaminazione da cianobatteri il metodo sviluppato è stato integrato con un approccio analitico già in adozione nel laboratorio per la determinazione di cilindrospermopsina ed anatoxina-a.

Il quadro della contaminazione delle acque ha evidenziato l'assenza di tutte le cianotossine ricercate. I dati ad oggi raccolti e gli strumenti operativi messi a punto nel progetto rappresentano un contributo essenziale per le strutture regionali e territoriali, per l'elaborazione delle strategie di sorveglianza ed intervento, e la messa a punto di metodologie per il monitoraggio dello sviluppo algale e protocolli analitici idonei per una corretta gestione dell'emergenza sanitaria correlata alla proliferazione di cianobatteri.

3. INTRODUZIONE

3.1. Gruppo di ricerca e collaborazioni

Soggetti promotori

*Istituto Superiore di Sanità
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria*

V.le Regina Elena 299. 00161 Roma

Talete SpA

Via Maresciallo Mariano Romiti,48 –
01100 Viterbo

Responsabile scientifico ISS:

Dott. Luca Lucentini

Direttore del Reparto di Igiene delle Acque Interne

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria

Istituto Superiore di Sanità

V.le Regina Elena, 299. Roma

Tel. 06-49902800; Fax 06-49903115. E-mail: luca.lucentini@iss.it

Responsabile scientifico Talete SpA:

Fabio Giorgi

Direttore tecnico Talete SpA

Via Maresciallo Mariano Romiti,48 – 01100 Viterbo.

Unità operativa presso l'ISS

Lucentini Luca

Ferretti Emanuele

Nigro Di Gregorio Federica

Fuscoletti Valentina

Tardella Vincenzo

3.2. Quadro generale, scopo e campo di applicazione

Il presente rapporto riporta i risultati delle attività condotte durante il periodo giugno 2012 – aprile 2015 nell’ambito del progetto di cui all’accordo Talete SpA – ISS (Reparto Igiene delle Acque Interne), finalizzato al monitoraggio della qualità della risorsa idrica nel lago di Bolsena e in distribuzione nel comune di Montefiascone, al fine di controllare e gestire eventuali fenomeni di fioriture algali potenzialmente tossiche.

L’obiettivo è contribuire ad una gestione globale dei rischi correlati ai fenomeni di fioritura di cianobatteri nel lago di Bolsena e, analogamente, in altri laghi ed invasi utilizzati per la fornitura di acque destinate al consumo umano.

Nell’elaborazione del rapporto è stata prestata particolare attenzione all’evoluzione del quadro delle conoscenze concernenti il fenomeno oggetto di studio.

Sono stati acquisiti alcuni dati limnologici, biologici e chimico-fisici utili per la valutazione dell’eventuale esposizione correlata alla presenza di cianotossine nelle acque trattate e distribuite, provenienti dal lago di Bolsena.

Basandosi sui principi dei Water Safety Plans (WSP) dell’Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), ed in collaborazione con gli enti preposti ai programmi di sorveglianza, è stata valutata la presenza e l’intensità dei bloom algali nelle acque in fase di captazione, ricercata l’eventuale presenza di tossine e il destino/abbattimento delle alghe e tossine nelle acque prima della loro immissione in rete. È importante sottolineare che le attività di studio in questo contesto necessitano di un intervento prolungato nel tempo in considerazione delle caratteristiche di periodicità nel manifestarsi dei fenomeni di fioritura algale e dei cambiamenti di caratteristiche fisiche e chimiche delle acque che hanno luogo su base stagionale (es. temperatura, contenuti di sostanza organica) e che influenzano profondamente la tipologia e modalità di trattamento.

3.3. Articolazione delle ricerche

In sostanziale accordo con quanto pianificato, le attività del progetto nell’ambito dell’intero periodo di monitoraggio sono state focalizzate sulla definizione dei profili di cianotossine presenti nel corpo idrico, in impianto e nella rete di distribuzione, sull’acquisizione di elementi significativi in merito alle caratteristiche chimico-fisiche delle acque del lago, sull’identificazione e conteggio delle cellule algali. I campioni sono stati prelevati, secondo cronoprogramma, su base mensile, sulla base dei criteri definiti nelle linee guida per la gestione del rischio da cianobatteri emanate da questo

Istituto¹, al fine di assicurare un monitoraggio appropriato dello stato del corpo idrico e delle acque in distribuzione.

L'attività di campionamento ha previsto:

- collaborazione e supporto di Talete SpA per la raccolta di campioni nel lago, in impianto di potabilizzazione e in rete di distribuzione;
- collaborazione con l'Autorità Sanitaria Locale, attraverso la condivisione delle strategie d'intervento sulla base dei risultati delle analisi effettuate presso l'Istituto Superiore di Sanità.

Le attività di studio in questo contesto necessitano di un intervento prolungato nel tempo in considerazione delle caratteristiche di periodicità nel manifestarsi dei fenomeni di bloom algale e dei cambiamenti di caratteristiche fisiche e chimiche delle acque che hanno luogo su base stagionale (es. temperatura, contenuti di sostanza organica) e che influenzano profondamente la tipologia e modalità di trattamento.

3.4. Presupposti scientifici

3.4.1. *Planktothrix rubescens* e altri cianobatteri potenzialmente tossici.

L'utilizzo di acque superficiali da destinare al consumo umano può comportare alcune problematiche di carattere sanitario legate alla presenza di cianobatteri. Questi ultimi, noti anche come alghe verdi-azzurre, sono batteri fotosintetici Gram-negativi, caratterizzati da un'elevata variabilità morfologica (forma unicellulare, coloniale, filamentosa) e dimensionale (da organismi unicellulari con diametro < 1 µm a forme filamentose di lunghezza fino a qualche mm).

La presenza e proliferazione di cianobatteri è frequente in bacini lacustri, bacini di stoccaggio artificiale e serbatoi naturali che presentino condizioni caratterizzate da un'elevata irradiazione e temperatura, bassa turbolenza, alta concentrazione di nutrienti.

La rilevanza igienico-sanitaria dei fenomeni di diffusione di cianobatteri in acque da destinare a consumo umano è connessa alla capacità, da parte di alcune specie, di produrre metaboliti tossici (cianotossine) potenzialmente trasferibili all'uomo anche attraverso il consumo di acqua contaminata. Sono riconosciute tossiche più di cinquanta specie di cianobatteri; tra i generi maggiormente coinvolti nella produzione di cianotossine figurano *Microcystis*, *Nodularia*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Cylindrospermopsis*.

Le cianotossine ad oggi identificate, si differenziano in base al loro meccanismo d'azione in:

- epatotossine (microcistine e nodularine), hanno la capacità di inibire le fosfatasi PP1 e 2A, con conseguente iperfosforilazione proteica a livello del citoscheletro degli epatociti;

¹ Lucentini L, Ottaviani M per il "Gruppo nazionale per la gestione del rischio cianobatteri in acque destinate a consumo umano" (Ed.). *Cianobatteri in acque destinate a consumo umano. Linee guida per la gestione del rischio. Volume 2*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2011. (Rapporti ISTISAN 11/35 Pt. 2).

l'ingestione sistematica di tali tossine è correlata a fenomeni di infiammazione e degenerazione degli epatociti;

- neurotossine (anatotossine e saxitossine), agiscono sul sistema neuromuscolare, bloccando la trasmissione nervosa attraverso differenti meccanismi;
- citotossine (cilindrospermopsina), agiscono a livello di diversi organi bersaglio come inibitori della sintesi proteica;
- dermatotossine (lyngbyatossina A, aplysiatossina e lipopolisaccaridi), causano irritazione della pelle e delle mucose inibendo la sintesi proteica.

Le cianotossine presenti in un corpo idrico sono principalmente contenute all'interno delle cellule produttrici (tossine intracellulari); tuttavia elevate concentrazioni di tossine possono essere rilasciate in acqua soprattutto a seguito di senescenza e lisi cellulare (tossine extracellulari o libere).

Il rischio associato alla presenza di cianotossine nelle acque destinate al consumo umano può essere notevolmente ridotto mediante rimozione o filtrazione delle biomasse algali presenti nelle acque, mentre l'utilizzo di trattamenti con agenti ossidanti (es. cloro od ozono) responsabili di lisi cellulare potrebbe aumentare il rilascio degli agenti tossici in forma libera all'interno del corpo idrico e di conseguenza il rischio di contaminazione per l'uomo. Tuttavia gli stessi trattamenti di potabilizzazione che vengono effettuati prima della distribuzione sono generalmente efficaci per una sostanziale rimozione sia delle cellule che delle cianotossine presenti.

Tra le specie di cianobatteri potenzialmente tossiche, la *Planktothrix rubescens* trova notevole diffusione nelle acque interne nazionali. La specie appartiene tassonomicamente al Phylum Cyanobacteria, Classe Cyanophyceae, Ordine Oscillatoriales e, soprattutto in passato, è stata definita con il sinonimo *Oscillatoria rubescens*.

Le cellule di *P. rubescens* formano tricomi di color rosso porpora o rosso bruno senza visibile guaina. Il diametro medio dei tricomi è 7 µm, la loro lunghezza è variabile e può raggiungere pochi mm. I tricomi sono composti da cellule adiacenti tutte identiche tra loro, di forma tonda, assottigliata o conica, tranne quelle apicali, che vengono usate per il riconoscimento morfologico. La lunghezza delle cellule è di 1,1-4,9 µm ed il diametro è di 3,9 - 9,4 µm.

Le specie *P. rubescens* contengono soprattutto ficoeritrina. Sono comuni in corpi d'acqua profondi, stratificati, oligotrofici o mesotrofici. Dovrebbero essere adattate a crescere in condizioni di basse radiazioni luminose, in virtù del loro corredo pigmentario ricco di carotenoidi. La temperatura ottimale di crescita è 10-20°C e la salinità tollerata è 4,3‰. Le fioriture, ben visibili di colore rosso porpora, si verificano generalmente in autunno-inverno. La specie ha distribuzione cosmopolita ed è nota produrre microcistine (MCs). In Italia segnalazioni sempre più frequenti provengono dai laghi

del Lazio, della Sicilia, della Sardegna, delle Marche, della Lombardia, del Trentino, del Veneto e del Piemonte.

3.4.2. Microcistine

Tra le cianotossine, le MCs rappresentano le tossine più ampiamente distribuite e maggiormente implicate negli episodi di emergenza sanitaria relativa alla presenza di cianobatteri riscontrati fino ad oggi.

Numerose sono le specie cianobatteriche in grado di produrre MCs e da questo dipende la grande varietà strutturale di questa classe. Sono state isolate per la prima volta dalla specie *Microcystis aeruginosa*, da cui l'origine della denominazione delle tossine.

Le microcistine sono eptapeptidi ciclici a peso molecolare relativamente alto, generalmente compreso tra 900 e 1100 Da, che hanno una struttura generale (Figura 1) contenente acido D-glutammico (D-Glu), D-alanina (D-Ala), acido D-eritro-β-metilaspatico (D-MeAsp), N-metildeidroalanina (Mdha) e un amminoacido insolito: acido (2S,3S,8S,9S)-3-ammino-9-metossi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4(E),6(E)-dienoico (Adda).

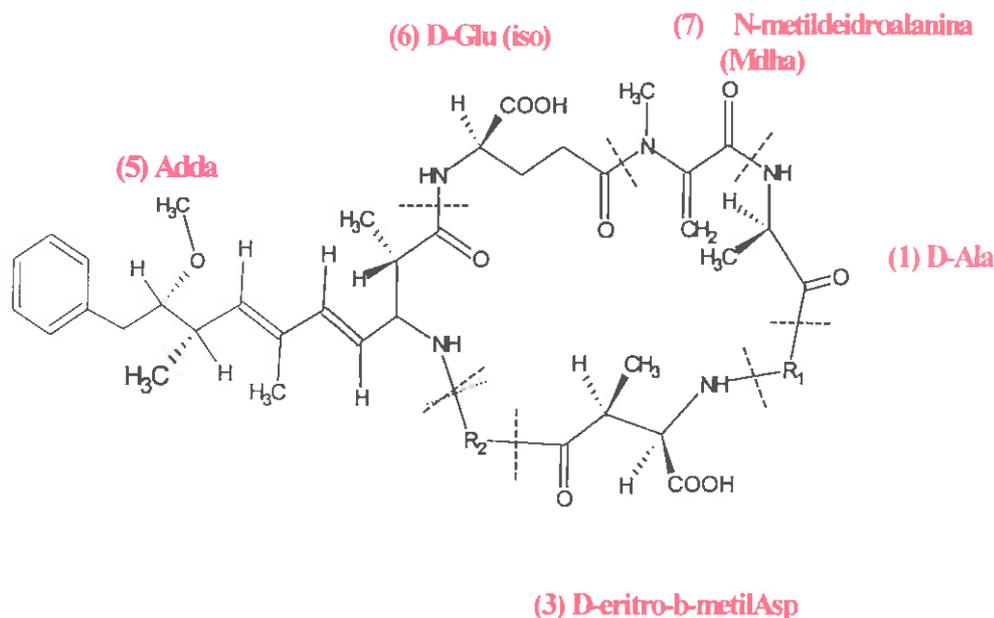


Figura 1 Struttura chimica delle Microcistine.

I due amminoacidi variabili, indicati con R₁ e R₂, che si trovano in posizione 2 e 4 nella struttura ciclica, e le più frequenti variazioni nella struttura chimica dovute all'assenza del gruppo metile nelle posizioni 3 e/o 7, danno luogo ad un numero elevato di altri congeneri.

L'insolito amminoacido Adda è alla base della tossicità di questi composti.

Le MCs devono le loro caratteristiche idrofobiche alla presenza del residuo Adda e all'eventuale presenza di altri amminoacidi a carattere idrofobico. La presenza di gruppi carbossilici, amminici e ammidici le rende comunque solubili in acqua e negli ambienti acquatici sono presenti in forma neutra o anionica².

Sono tossine estremamente stabili e difficilmente subiscono idrolisi chimica e ossidazione a pH neutro, inoltre sono resistenti alla temperatura di ebollizione dell'acqua. È stato osservato che il tempo di emivita delle MCs nelle acque naturali può variare considerevolmente in funzione della temperatura e dell'entità delle popolazioni microbiche presenti, in quanto la loro stabilità dipende sostanzialmente dalla biodegradazione ad opera di batteri piuttosto che da fenomeni chimico-fisici³. Una degradazione di tipo fotochimico può avvenire quando vi è l'esposizione diretta alla luce solare, reazione che può essere favorita dalla presenza dei pigmenti contenuti all'interno della cellula.

Le cianoficee tossiche rappresentano un rischio per l'uomo, che può essere esposto tramite il cibo contaminato, le attività ricreative e l'acqua potabile. La crescente richiesta di acqua destinata ad uso umano, conseguente all'aumento della popolazione e al miglioramento del suo stile di vita, ha portato all'intensificazione dell'utilizzo di acque superficiali a fini potabili. Per questo motivo la presenza di fioriture algali potenzialmente tossiche nei bacini idrici utilizzati come risorsa di acque da destinare ad uso umano, può comportare la necessità di gestire il rischio correlato alla contaminazione di dette acque da cianotossine.

Le MCs agiscono come agenti inibitori degli enzimi serina-treonina proteinfosfatasi (PP) presenti in tutti gli organismi viventi. Mostrano la maggiore affinità nei confronti della PP1 e della PP2A, mentre hanno un effetto minore nei confronti della PP2B. L'inibizione delle proteinfosfatasi causa l'attivazione di una serie di processi metabolici come la disgregazione delle membrane citoplasmatiche e l'attivazione di oncogeni che provocano tumori gastrointestinali ed epiteliali. I danni istologici acuti riguardano il fegato, organo bersaglio principale, i polmoni ed i reni.

La possibilità di esposizione umana a MCs attraverso l'acqua potabile ha indotto la OMS a formulare delle linee guida per le tossine cianobatteriche nelle acque. Fino ad oggi gli studi di tossicità hanno riguardato quasi esclusivamente la MC-LR, la più frequentemente riscontrata nelle fioriture cianobatteriche, e di conseguenza la valutazione del rischio associata all'assunzione di ogni altra variante di microcistina è stata sempre espressa in termini di tossicità equivalente alla MC-LR. Attraverso studi di 13 settimane su topo sono stati stabiliti i seguenti indici tossicologici: NOAEL: 40 µg/kg peso corporeo per giorno; TDI: 0,04 µg/kg peso corporeo per giorno. Tenendo conto, nel

² Rivasseau, C. *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 799 (1998), 155.

³ Cousins, I.T. *et al.*, *Water Research.*, 30.(1996), 481.

fattore di sicurezza, anche delle limitazioni relative alla carenza dei dati, in particolare quelli riguardanti la tossicità cronica e il potenziale cancerogeno, per le acque potabili l'OMS⁴ ha stabilito il valore guida provvisorio per la MC-LR di 1,0 µg/L per la tossicità cronica. Il valore stabilito è relativo alla MC-LR totale, comprendente la somma della tossina libera in acqua e quella legata alle cellule cianobatteriche.

Recentemente, Ikehara et. al.⁵ hanno effettuato studi di tossicità su 21 varianti di microcistine sulla base della caratteristica capacità di inibire la fosfatasi PP2A (Tabella 1).

Questo studio consente di poter utilizzare i dati analitici finora raccolti per proporre una valutazione adeguata del rischio associato al consumo di diverse varianti di MCs.

In riferimento all'articolo 11 comma 1 lettera b del D.Lgs 31/2001, nel quale si stabilisce che siano le Autorità Sanitarie competenti a fissare valori di parametri aggiuntivi non riportati nell'Allegato I di tale decreto, l'Istituto Superiore di Sanità in risposta alla richiesta di parere con protocollo N. 4264/AMPP/IA12, sancisce che può essere stabilito un valore massimo ammissibile provvisorio per la MC-LR nelle acque destinate al consumo umano pari a 1,0 µg/litro riferito al contenuto di tossina totale (*intra-* ed *extra-* cellulare); sulla base di un approccio ampiamente conservativo nei confronti della protezione della salute, tale valore deve essere riferito alla somma delle concentrazioni dei diversi congeneri di MCs riscontrabili nel campione, inclusa la MC-RR oggetto della richiesta di parere sopra citata.

Il valore sopra riportato può essere oggetto di revisione in considerazione dei progressi sulle conoscenze in materia di tossicità delle cianotossine e del quadro della contaminazione nazionale. Si ricorda inoltre che ai sensi dell'articolo 8 comma 3 del D.Lgs. 31/2001 è raccomandato l'utilizzo di metodi ufficiali, elaborati dall'Istituto Superiore di Sanità, con lo scopo di accordare le valutazioni analitiche effettuate.

I metodi attualmente disponibili per lo screening e la conferma della presenza di MCs sono: il metodo ELISA, metodo di screening rispondente in modo aspecifico a tutti i composti contenenti l'amminoacido caratteristico delle MCs, Adda, e i metodi chimici di conferma, basati su cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata a rivelatori a serie di diodi (HPLC-DAD) e con spettrometri di massa (LC/MS).

⁴ Guidelines for drinking water quality, -second edition, volume 2- *Health criteria and other supporting information- Addendum*, WHO, Geneva, (1998)

⁵ Ikehara T. et al., *Toxicon*, 54 (2009), 539

Tabella 1. Fattori di conversione definiti per 21 congeneri di MCs basati sulla IC50 definita mediante saggi di inibizione della PP2a (prove in triplicato). Fonte Ikehara et. al.⁵

No.	Cyanobacterial toxin	IC ₅₀ (nM)	Conversion factor
1	MC-LR	0.032 ± 0.004	1.000
2	MC-RR	0.056 ± 0.002	0.571
3	MC-FR	0.069 ± 0.003	0.464
4	Mc-LF	0.096 ± 0.019	0.333
5	[D-Asp ³]MC-HtyR	0.098 ± 0.006	0.327
6	[D-Asp ³ , (Z)-Dhb ⁷]MC-HtyR	0.110 ± 0.008	0.291
7	MC-LW	0.114 ± 0.003	0.281
8	[D-Asp ³ , (E)-Dhb ⁷]MC-HtyR	0.122 ± 0.005	0.262
9	MC-YR	0.125 ± 0.005	0.256
10	MC-LA	0.161 ± 0.002	0.199
11	[D-Asp ³ , (Z)-Dhb ⁷]MC-LR	0.164 ± 0.010	0.195
12	[Dha ⁷]MC-LR	0.167 ± 0.003	0.192
13	MC-WR	0.179 ± 0.011	0.179
14	[D-Asp ³ , (E)-Dhb ⁷]MC-LR	0.201 ± 0.003	0.159
15	[D-Asp ³ , Dha ⁷]MC-RR	0.220 ± 0.012	0.145
16	[D-Asp ³ , Dha ⁷]MC-LR	0.254 ± 0.004	0.126
17	[Dha ⁷]MC-RR	0.293 ± 0.012	0.109
18	[D-Asp ³]MC-RR	0.300 ± 0.009	0.107
19	[Dha ⁷]MC-YR	0.379 ± 0.003	0.084
20	Nodularin	0.540 ± 0.063	0.059
21	[6-(Z)-Adda ⁵]MC-RR	10.126 ± 0.314	0.003

3.4.3. Anatossina-a

L'anatossina-a (ANA-a) è un alcaloide amminico biciclico a basso peso molecolare (MW=165), un'ammina secondaria (2-acetyl-9-azabicyclo(4-2-1)non-2-ene) ad azione neurotossica (Figura 2).

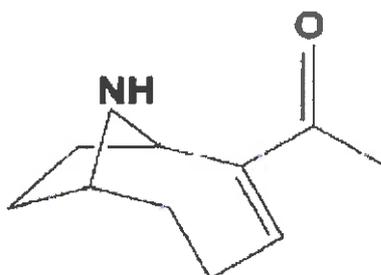


Figura 2 Struttura chimica dell'Anatossina-a.

Cylindrospermopsis raciborskii è la specie che rappresenta il problema maggiore su scala mondiale. È una molecola altamente idrofila, il cui assorbimento intestinale richiede sistemi di trasporto attivo così come l'ingresso negli epatociti, utilizzando la bile come sistema di trasporto. Come risulta da studi in vitro che ne dimostrano gli effetti citotossici, le ridotte dimensioni della molecola, permettono la diffusione passiva, anche se limitata, attraverso la membrana cellulare. La CYN ha un potere inibitorio verso la sintesi delle proteine; è stata dimostrata la sua genotossicità ed è considerata anche un potenziale cancerogeno.

L'esposizione per via orale con acqua contaminata può causare disturbi gastrointestinali con diarrea sanguinolenta, grave disidratazione con perdita di proteine, elettroliti, glucosio e chetoni con le urine.

Per l'elaborazione di un valore di NOAEL/TDI sono stati utilizzati due studi: il primo di questi, a 90 giorni, è stato condotto su topi abbeverati con acqua contaminata, e ha prodotto un NOAEL di 150 µg/kg di peso corporeo e sulla base di tale valore è stato calcolato un TDI di 0,3 µg/kg pc/giorno⁷. Il secondo studio, condotto su topi trattati per gavaggio per 11 settimane, ha portato alla stima di un NOAEL di 30 µg/kg di peso corporeo e un TDI di 0,06 µg/kg pc/giorno⁸.

⁷ Falconer IR, Humpage AR. *Preliminary evidence for in vivo tumour initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga Cylindrospermopsis raciborskii containing the toxin cylindrospermopsin*. Environmental Toxicology 2001;16(2):192-195.

⁸ Griffiths DJ, Saker ML. *The palm island mystery disease 20 years on, a review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin*. Environmental Toxicology 2002;18(2):78-93.

4. MATERIALI E METODI

4.1. Area di studio

Il lago di Bolsena (Figura 4), situato interamente nel territorio della provincia di Viterbo, è un lago di origine vulcanica, situato a 305 m s.l.m., ha un'area totale di 113,5 km², una profondità massima di 151 m e una profondità media di 81 m. Il bacino imbrifero ha una superficie di 271 km². La falda si estende oltre il bacino imbrifero ed ha una superficie di 342 km². Si valuta che in totale i prelievi idrici ammontino a 35 milioni di m³/anno.



Figura 4 Lago di Bolsena (VT).

4.2. Campionamento ed analisi in-situ

I campionamenti sono stati effettuati in maniera sistematica da settembre 2012 a aprile 2015 su base mensile, sulla base dei livelli di rischio definiti nelle linee guida sulla gestione del rischio da cianobatteri emanate da questo Istituto⁹ al fine di assicurare un monitoraggio puntuale e completo delle acque in distribuzione.

I campioni sono stati prelevati in impianto di potabilizzazione in collaborazione con Talete SpA nell'ambito delle attività di controllo straordinario previste dal progetto di cui all'accordo Talete SpA – ISS (Reparto Igiene delle Acque Interne).

Sono stati determinati parametri essenziali ai fini della persistenza delle tossine in rete quali temperatura, conducibilità e cloro libero. In ogni sito sono state prelevate aliquote di acqua utilizzando una bottiglia in policarbonato di volume pari o superiore a 0,5 L. I campioni sono stati trasportati dal personale dell'ISS, alla temperatura di 5±3 °C, per le analisi chimico-fisiche e la determinazione delle conte cellulari.

⁹ Lucentini L, Ottaviani M per il "Gruppo nazionale per la gestione del rischio cianobatteri in acque destinate a consumo umano" (Ed.). *Cianobatteri in acque destinate a consumo umano. Linee guida per la gestione del rischio. Volume 2*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2011. (Rapporti ISTISAN 11/35 Pt. 2).

4.3. Identificazione dei siti di campionamento

La campagna di monitoraggio ha interessato il comune di Montefiascone, in cui è presente un impianto di potabilizzazione all'interno del quale convergono le acque provenienti dal lago di Bolsena.

Sono stati stabiliti tre differenti punti di prelievo:

- 1) acqua grezza proveniente dal lago di Bolsena, in entrata al potabilizzatore;
- 2) acqua trattata in uscita dal potabilizzatore;
- 3) acqua in distribuzione nel comune di Montefiascone.

4.4. Determinazioni analitiche

Il protocollo analitico ha previsto l'estrazione della frazione totale di tossine. Questo tipo di estrazione prevede la lisi cellulare mediante cicli di congelamento - scongelamento del campione per liberare il contenuto intracellulare di tossine.

Nell'adottare principi cautelativi per la salvaguardia della salute umana, soprattutto se in concomitanza di intense fioriture algali, è consigliabile comunque determinare la frazione totale di tossine eventualmente presenti sia nelle acque da destinare sia in acque destinate al consumo umano¹⁰.

Le analisi chimico-fisiche sono effettuate su acque da destinare e destinate al consumo umano. Le cianotossine sono state determinate mediante cromatografia liquida a fase inversa accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS).

Il metodo analitico utilizzato per l'intero monitoraggio è stato ottimizzato rispetto alla metodica precedentemente sviluppata e proposta come Metodo analitico di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001 (Appendice A: Rapporti Istisan 11/35) ampliando il numero di cianotossine identificabili e migliorando le caratteristiche di prestazione del metodo in termini di esattezza, precisione e sensibilità.

Di seguito vengono riassunte alcune delle fasi operative impiegate per la determinazione delle cianotossine nei campioni di acqua prelevati lungo la filiera idropotabile del Comune di Montefiascone:

¹⁰ Lucentini L, Ottaviani M per il "Gruppo nazionale per la gestione del rischio cianobatteri in acque datinate al consumo umano"(Ed.). *Cianobatteri in acque destinate al consumo umano. Stato delle conoscenze per la valutazione del rischio*. Volume 1. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2011. (Rapporti ISTISAN 11/35 Pt.1).

- il campione d'acqua, del volume di 0,25 L, è stato sottoposto ad estrazione in fase solida (SPE) utilizzando come materiale adsorbente 0,5 g di Carbograph 4, un Carbon Black Graftizzato, per la preconcentrazione degli analiti;
- lo standard interno utilizzato è stata la Nodularina;
- gli analiti estratti sono stati successivamente separati, identificati e quantificati mediante un sistema LC-MS/MS, equipaggiato con una interfaccia elettrospray a pressione atmosferica. La misura si basa sull'intensità dei segnali ionici relativi a due transizioni ione pseudo-molecolare > ione frammento degli analiti;
- il limite di rivelabilità (LOD) è compreso nell'intervallo 0,004 - 0,050 µg/L.

In Figura 5 è riportato un cromatogramma rappresentativo MRM LC-MS/MS ottenuto dall'analisi di una miscela standard di cianotossine e nodularina.

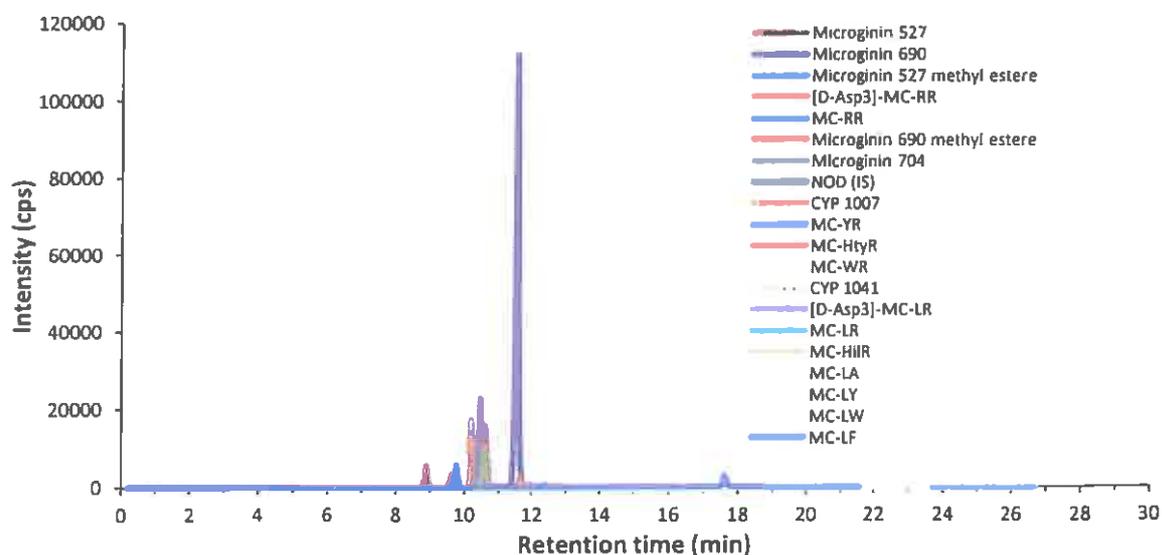


Figura 5 Cromatogramma rappresentativo LC-MS/MS di una miscela standard di cianotossine e nodularina.

Sono state condotte anche analisi per la rivelazione e quantificazione di cilindrospermopsina e anatoossina. Queste molecole, composti altamente polari difficilmente trattenuti da qualsiasi materiale adsorbente, per essere analizzati hanno richiesto un metodo di analisi mediante iniezione diretta.

Brevemente, 200 μL di acqua filtrata addizionata con lo standard interno (nodularina), sono stati direttamente iniettati ed analizzati mediante l'apparato HPLC-MS/MS, in base ad un protocollo sperimentale già in uso presso il Reparto di Igiene delle Acque Interne¹¹. I limiti di rivelazione risultano rispettivamente per l'anatossina-a 0,200 $\mu\text{g/L}$, e per la cilindrospermopsina 0,080 $\mu\text{g/L}$.

¹¹ Bogialli S, Nigro di Gregorio F, Lucentini L, Ferretti E, Ottaviani M, Ungaro N, Abis PP and Cannarozzi de Grazia M. *Management of a Toxic Cyanobacterium Bloom (Planktothrix rubescens) Affecting an Italian Drinking Water Basin: A Case Study*. Environ. Sci. Technol. 2013, 47, 574–583

5. RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1. Valutazione dei profili tossici di cianotossine nella filiera idrica di produzione di acque destinate al consumo umano

Nel periodo compreso tra settembre 2012 e aprile 2015 sono stati effettuati da personale ISS, in collaborazione con Talete SpA, nove campionamenti di acqua proveniente dal lago di Bolsena. In particolare, sono stati analizzati campioni di acque grezze prelevati in entrata all'impianto di trattamento, campioni di acqua trattata in uscita dall'impianto, e campioni di acqua in distribuzione nel comune di Montefiascone.

In Appendice B sono riportate le tabelle riassuntive, condivise con la ASL di Viterbo e Talete SpA, contenenti i valori di concentrazione di cianotossine e i valori di densità cellulare rilevati per i campioni prelevati durante la campagna di monitoraggio.

Nel campionamento effettuato in data 21/9/2012 è stata rilevata per la prima volta la presenza di una specie algale (ipotizzata come appartenente al genere *Snowella* sp.) con una densità cellulare quantificabile, il cui valore risulta comunque inferiore al livello di rivelazione riportato nelle linee guida per la gestione del rischio da cianobatteri. In tutti gli altri campioni analizzati la presenza di colonie di cianobatteri risulta assente o solamente ipotizzabile, cioè è presente una densità cellulare insufficiente per poter essere identificata e quantificata con certezza.

In accordo con l'assenza di fioriture di cianobatteri nel corso dei diversi campionamenti, le analisi LC-MS/MS hanno evidenziato l'assenza di tutte le cianotossine ricercate.

5.2. Considerazioni sui trattamenti dell'impianto di potabilizzazione

Il controllo della presenza di cianobatteri nelle acque destinate ad uso umano e delle cianotossine negli impianti di potabilizzazione può essere effettuato in diverse fasi della catena, dalle acque superficiali alle acque distribuite.

Il migliore approccio di gestione a lungo termine rimane la prevenzione della formazione delle fioriture algali attraverso il controllo del fenomeno dell'eutrofizzazione delle acque naturali¹². Strategie di intervento più immediate e a breve e medio termine che prevedono la captazione selettiva delle acque grezze con lo scopo di evitare i bloom algali di cianobatteri, si basano sul monitoraggio in tempo quasi reale delle popolazioni algali nella risorsa idrica, nel posizionamento strategico delle opere di presa, l'individuazione dell'opportuna profondità di captazione e l'uso di

¹² Svrcek C., Smith D.W., *J. Environ. Engin. Sci.* 3 (2004) , 155.

barriere per limitare il movimento delle schiume¹³. I trattamenti chimici con alghecidici sono stati usati efficacemente in passato, ma sono oggi sconsigliati in quanto potrebbero causare la lisi cellulare e quindi il rilascio delle tossine. Il loro uso dovrebbe comunque limitato alle prime fasi della crescita algale¹⁴.

Le possibilità di controllo dei cianobatteri e delle tossine nei sistemi di potabilizzazione delle acque, sono in genere basate su un intervento volto alla rimozione delle cellule intatte per la riduzione del contenuto intracellulare di tossine e/o sulla rimozione della tossina disciolta in seguito a lisi della cellula che può avere luogo sia nel corpo idrico che nella fase di trattamento delle acque in impianto.

La concentrazione di tossina intra ed extra-cellulare può essere efficacemente abbattuta tramite processi fisici o chimico-biologici convenzionalmente adottati e correttamente gestiti nell'impianto di potabilizzazione, principalmente basati su coagulazione e flocculazione, filtrazione e disinfezione chimica con agenti ossidanti.

I processi di chiari-flocculazione principalmente finalizzati alla sedimentazione o flottazione delle cellule di cianobatteri si sono spesso dimostrati efficaci nell'abbattimento delle fioriture algali, ma è necessaria un'attenta gestione dei fanghi poiché stato riportato in letteratura che possono causare la lisi cellulare¹².

I sistemi di filtrazione a sabbia non garantiscono una significativa riduzione del contenuto di tossine, mentre i filtri a carbone, soprattutto di tipo granulare (GAC) sono i più indicati per la rimozione totale o parziale delle tossine liberate in seguito a lisi cellulare. Alcuni studi di letteratura propongono una efficienza per i filtri GAC nella rimozione di MCs di circa 30 giorni, indicando così un tempo di vita relativamente breve¹⁵, influenzato comunque dal carico totale di materiale organico, sali minerali e altri contaminanti, che compete per i siti di adsorbimento¹⁶ e dall'efficienza dei processi di rigenerazione. È opportuno sottolineare che le MCs sono adsorbite fisicamente sui filtri, non degradate, quindi sono necessarie adeguate procedure di manutenzione dei filtri per evitare una esposizione alle cianotossine.

La clorazione è un processo chimico largamente utilizzato anche per l'abbattimento delle MCs; l'efficacia del trattamento dipende come noto dalle condizioni utilizzate, quali, tra l'altro, specie chimica, sostanza organica e pH di esercizio.

¹³ Hrudey L. et al, in *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*, Edited by Ingrid Chorus and Jamie Bartram, 275-312 (1999)

¹⁴ Burch M.D. et al, personal communication : *Algicides for control of toxic cyanobacteria*, proceeding of AWWA (2001) Water Quality Technology Conference

¹⁵ Hart J., et al., *Water Supply*, 16 (1998), 611.

¹⁶ Kull, T.P.J., et al., *Environ. Sci. & Technol.*, 38 (2004) 6025

Nell'ambito della presente convenzione l'attività da parte del Reparto, in collaborazione con l'ASL di Viterbo e il gestore del servizio idrico incaricato dei processi di potabilizzazione, ha previsto la verifica *in-situ* e il monitoraggio delle misure di trattamento, con contestuale proposta di eventuali misure correttive da effettuare sui processi di trattamento in esercizio.

Misure in situ: cloro libero

Studi di letteratura¹⁷ consigliano la misura del cloro libero come parametro indicativo per la gestione della disinfezione delle microcistine tramite clorazione, poiché questo non dipende dal contenuto di sostanza organica, che può variare per ogni impianto di trattamento delle acque come anche per il periodo dell'anno considerato. Una concentrazione di 0,5 mg/L di cloro libero per un tempo di contatto di 30 minuti è stata riportata come efficace nell'abbattimento di circa il 95% di tossine prodotte da *Microcystis*¹⁸. Le migliori condizioni di rimozione comunque prevedono pH inferiori ad 8.

Durante tutto il periodo di monitoraggio la concentrazione di cloro libero è stata registrata in situ dal personale dell'ISS incaricato dei prelievi in collaborazione con Talete SpA. La concentrazione massima di cloro libero registrata nelle acque trattate è stata di 0,70 mg/L (17/2/2015), mentre nelle acque in distribuzione è variata da 0,01 (26/6/13) a 0,41 mg/L (17/2/15).

¹⁷ Merel S. *et al.*, *Toxicon*, 55 (2010), 677.

¹⁸ Nicholson B.C. *et al.*, *Water Research*, 28 (1994), 1297.

6. CONCLUSIONI

Il progetto, di cui all'accordo Talete SpA – ISS (Reparto Igiene delle Acque Interne), è stato finalizzato al monitoraggio della qualità della risorsa idrica nel lago di Bolsena e in distribuzione nel comune di Montefiascone, in relazione alla possibile presenza di fioriture dicianobatteri ed alla eventuale produzione di cianotossine. L'obiettivo principale è stato il monitoraggio della filiera idrica di produzione delle acque, con definizione dei profili di cianotossine prodotte nel corpo idrico e acquisizione di altri elementi significativi in merito alle caratteristiche chimico fisiche delle acque del Lago di Bolsena, all' identificazione e conteggio delle cellule algali utili per tracciare il trend di sviluppo della popolazione algale. Il presente rapporto finale concerne i risultati complessivi delle attività condotte nell'ambito del progetto nel periodo settembre 2012 – aprile 2015. Le attività condotte durante l'intero progetto sono state sostanzialmente in linea con quanto inizialmente pianificato.

Basandosi sui principi dei Water Safety Plans (WSP) dell'OMS, ed in stretta collaborazione con gli Enti preposti ai programmi di sorveglianza, in particolare la ASL di Viterbo e Talete SpA, è stata valutata la presenza di colonie di cianobatteri nelle acque in fase di captazione, analizzate per rivelare l'eventuale presenza di tossine e il destino/abbattimento delle tossine nelle acque prima della loro immissione in rete.

Per l'analisi delle microcistine nelle acque del lago in entrata all'impianto di potabilizzazione, delle acque trattate ed in distribuzione è stato sviluppato e validato un metodo analitico altamente specifico e sensibile basato su estrazione in fase solida, separazione in cromatografia liquida e rivelazione in spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS). Il metodo, in grado di rivelare 22 congeneri di cianotossine, è risultato robusto, preciso ed esatto con limiti di rivelazione compresi tra 0,004-0,050 µg/L, quindi almeno 20 volte inferiori al valore guida stabilito dall'OMS per le acque potabili. Il protocollo analitico sarà proposto come metodo ufficiale per la determinazione di microcistine in acque destinate al consumo umano ai sensi del D.Lgs. 31/2001. Al fine di ottenere la definizione accurata dei profili tossici di acque esposte a fenomeni di contaminazione da cianobatteri il metodo sviluppato è stato integrato con un approccio analitico già in adozione nel laboratorio per la determinazione di cilindrospermopsina ed anatoossina-a.

Lo studio dei livelli totali di cianotossine nelle acque e della densità della popolazione algale, ha indicato l'assenza di fioriture algali potenzialmente pericolose per la salute umana e l'assenza delle cianotossine monitorate.

Le azioni di monitoraggio, svolte in accordo ai criteri di valutazione del rischio previsti nelle linee guida emanate da questo Istituto¹⁹, sono state essenziali per definire i profili di cianotossine nel corpo idrico, per l'acquisizione di elementi significativi in merito alle caratteristiche chimico fisiche delle acque del lago e per l' identificazione e il conteggio delle cellule algali.

Tale approccio ha fornito gli elementi necessari per una valutazione corretta del rischio di produzione di cianotossine nelle acque in fase di captazione, e il destino/abbattimento delle alghe e tossine nelle acque.

Sulla base delle valutazioni effettuate, limitatamente ai campioni prelevati ed ai parametri valutati, i valori analitici riscontrati nelle acque provenienti dal lago di Bolsena dopo potabilizzazione ed in distribuzione, non hanno evidenziato rischi sanitari correlabili alla presenza di cianobatteri potenzialmente tossici. Ai fini del mantenimento della qualità delle acque della risorsa idrica nel lago di Bolsena e in distribuzione nel comune di Montefiascone, si raccomanda di proseguire la sorveglianza con azioni di monitoraggio programmate delle acque da destinare e destinate al consumo umano.

¹⁹ Lucentini L, Ottaviani M per il “Gruppo nazionale per la gestione del rischio cianobatteri in acque destinate a consumo umano” (Ed.). *Cianobatteri in acque destinate a consumo umano. Linee guida per la gestione del rischio. Volume 2*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2011. (Rapporti ISTISAN 11/35 Pt. 2).

METODO ANALITICO PER CROMATOGRAFIA LIQUIDA-SPETTROMETRIA DI MASSA TANDEM (LC-MS/MS) PER LA DETERMINAZIONE DI MICROCISTINE IN ACQUE GREZZE E TRATTATE DA DESTINARE A CONSUMO UMANO²⁰

A.0. Generalità e definizioni

L'utilizzo di acque superficiali da destinare al consumo umano può comportare alcune problematiche di carattere sanitario legate alla presenza di cianobatteri. Questi ultimi, noti anche come alghe verde-azzurre, sono batteri fotosintetici Gram-negativi, caratterizzati da un'elevata variabilità morfologica (forma unicellulare, coloniale, filamentosa) e dimensionale (da organismi unicellulari con diametro < 1 µm a forme filamentose di lunghezza fino a qualche mm).

La presenza e proliferazione di cianobatteri è frequente in bacini lacustri, bacini di stoccaggio artificiale e serbatoi naturali che presentino condizioni caratterizzate da un'elevata irradiazione e temperatura, bassa turbolenza, alta concentrazione di nutrienti.

La rilevanza igienico-sanitaria dei fenomeni di diffusione di cianobatteri in acque da destinare a consumo umano è connessa alla capacità, da parte di alcune specie, di produrre metaboliti tossici (cianotossine) potenzialmente trasferibili all'uomo anche attraverso il consumo di acqua contaminata. Più di cinquanta specie di cianobatteri sono riconosciute come tossiche, tra i generi maggiormente coinvolti nella produzione di cianotossine figurano *Microcystis*, *Nodularia*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Cylindrospermopsis*.

Le cianotossine ad oggi identificate, si differenziano in base al loro meccanismo d'azione in:

- epatotossine (microcistine e nodularine), hanno la capacità di inibire le fosfatasi PP1 e 2A, con conseguente iperfosforilazione proteica a livello del citoscheletro degli epatociti; l'ingestione sistematica di tali tossine è correlata a fenomeni di infiammazione e degenerazione degli epatociti;
- neurotossine (anatotossine e saxitossine), agiscono sul sistema neuromuscolare, bloccando la trasmissione nervosa attraverso differenti meccanismi;
- citotossine (cilindrospermopsina), agiscono a livello di diversi organi bersaglio come inibitori della sintesi proteica;
- dermatotossine (lyngbyatossina A, aplysiatossina e lipopolisaccaridi), causano irritazione della pelle e delle mucose inibendo la sintesi proteica.

Le cianotossine presenti in un corpo idrico sono principalmente contenute all'interno delle cellule produttrici (frazione intracellulare di tossine); tuttavia elevate concentrazioni di tossine possono essere rilasciate in acqua soprattutto a seguito di senescenza e lisi cellulare (frazione extracellulare o libere libere di tossine).

Il rischio associato alla presenza di cianotossine nelle acque destinate al consumo umano può essere notevolmente ridotto mediante rimozione o filtrazione delle biomasse algali presenti nelle acque, mentre l'utilizzo di trattamenti con agenti ossidanti (es. cloro od ozono) responsabili di lisi cellulare potrebbe aumentare il rilascio degli agenti tossici in forma libera all'interno del corpo idrico e di conseguenza il rischio di contaminazione per l'uomo. Tuttavia gli stessi trattamenti di potabilizzazione che vengono effettuati prima della distribuzione sono generalmente efficaci per una sostanziale rimozione sia delle cellule sia delle cianotossine presenti.

Tra le cianotossine, le microcistine (MC) rappresentano le tossine più ampiamente distribuite e maggiormente implicate negli episodi di carattere sanitario riscontrati finora.

Le MC sono eptapeptidi monociclici a basso peso molecolare caratterizzati dalla presenza di un aminoacido idrofobico, l'ADDA (acido 3-ammino, 9-metossi, 2,6,8-trimetil, 10-fenildeca, 4,6-dienico). I numerosi congeneri di MC, caratterizzati da proprietà tossicologiche notevolmente diverse, si differenziano fondamentalmente a livello di due amminoacidi sui quali è anche basata la nomenclatura delle MC.

Sebbene ad oggi siano stati identificati più di 80 congeneri di MC, la WHO ha stabilito una concentrazione limite provvisoria per le acque destinate al consumo umano solo per la MC-LR, il composto ritenuto più diffuso e tossico, i cui amminoacidi sostituenti sono rispettivamente leucina e arginina. Sulla base dei dati tossicologici disponibili (*Tolerable Daily Intake*, TDI di 0,04 µg/kg pc/giorno) la WHO ha fissato per la MC-LR un valore guida di 1,0 µg/L. In considerazione della scarsa attendibilità di un approccio indiretto per la sorveglianza delle cianotossine nel corpo idrico basato sul controllo di parametri quali nutrienti e/o densità di cianobatteri, numerosi Paesi anche all'interno dell'UE,

²⁰ Lucentini L, Ottaviani M per il "Gruppo nazionale per la gestione del rischio cianobatteri in acque destinate a consumo umano" (Ed.). *Cianobatteri in acque destinate a consumo umano. Stato delle conoscenze per la valutazione del rischio. Volume 1*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2011. (Rapporti ISTISAN 11/35 Pt. 1).

prevedono il monitoraggio delle microcistine nelle acque, con un valore di parametro per la MC-LR basato sulle indicazioni della WHO.

Per la determinazione delle MC nelle acque sono attualmente disponibili metodi immunologici (cfr. metodo ISS.BGA.044.revXX in Rapporti ISTISAN 07/31), principalmente utilizzati per fini di screening e metodi di conferma basati sull'accoppiamento cromatografia liquida-spettrometria di massa.

A.1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile per l'estrazione di microcistine (Dem-MC-RR, MC-RR, MC-YR, Dem-MC-LR, MC-LR, MC-LA, MC-LY, MC-LF, MC-LW) da acque da destinare e destinate al consumo umano, incluse le acque di sorgente, le acque di piscina e quelle utilizzate per la produzione di acque per dialisi, secondo le definizioni riportate nelle normative vigenti.

Gli analiti sono determinati mediante cromatografia liquida a fase inversa accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS).

Il limite di rivelabilità è compreso nell'intervallo 0,002-0,025 µg/L.

A.2. Principio del metodo

Il campione d'acqua, del volume di 0,5 L, è sottoposto ad estrazione in fase solida (SPE) utilizzando come materiale adsorbente 0,5 g di Carbograph 4, un *Graphitized Carbon Black*, per la preconcentrazione degli analiti.

Come standard di processo è utilizzato la nodularina.

Gli analiti estratti sono successivamente separati, identificati e quantificati mediante un sistema LC/MS tandem a triplo quadrupolo, equipaggiato con una interfaccia elettrospray a pressione atmosferica (ESI). La misura si basa sull'intensità dei segnali ionici relativi a due transizioni ione pseudo-molecolare > ione frammento degli analiti.

La determinazione di MC nei campioni di acqua prevede l'impiego di procedure di preparazione del campione differenti a seconda della componente di analiti da determinare, in particolare:

- estrazione e analisi della frazione totale di tossine. Questo tipo di estrazione prevede la lisi cellulare mediante cicli di congelamento-scongelo del campione (procedura estrattiva A) per liberare il contenuto intracellulare di tossine
- estrazione e analisi della frazione extracellulare o libera (procedura estrattiva B).

A.3. Prelievo e conservazione dei campioni

A.3.1. Bianco campione

Per "bianco campione" si intende un campione costituito dalla stessa matrice avente caratteristiche analoghe al campione oggetto di indagine.

I bianchi campione, che devono essere privi degli analiti, possono essere ottenuti utilizzando:

- acqua di rubinetto previa rimozione dei residui di agenti disinfettanti, in particolare il cloro, che agiscono come ossidanti nei confronti delle MC e dello standard di processo, abbattendone i contenuti; la rimozione del cloro residuo può essere ottenuta per trattamento con una soluzione di sodio tiosolfato (preparata disciogliendo 1 g di sodio tiosolfato in 100 mL di acqua deionizzata), aggiungendo 100 µL di tale soluzione di sodio tiosolfato per ogni litro di acqua da trattare;
- acque superficiali;
- acqua deionizzata.

I bianchi campione possono essere utilizzati:

- per verifica della specificità del metodo;
- per controlli di qualità;
- per preparazione di campioni contaminati artificialmente.

A.3.2. Raccolta dei campioni

Seguire quanto indicato in ISS.PGA.901.rev00 (in Rapporti ISTISAN 07/31).

Il prelievo dei campioni da sottoporre ad analisi deve essere eseguito utilizzando come contenitori bottiglie di polietilene o vetro scuro (A.4.1.1, A.4.1.14) lavate con acqua ultrapura (A.5.1.1) esente da tracce dell'analita.

Nel caso di prelievi da cisterne, pozzi o invasi, il campionamento deve essere eseguito prelevando un volume pari a 1 L ad una profondità compresa tra 0 e 1 m.

Campionamenti di acqua possono essere effettuati anche all'interno dei sistemi di distribuzione o da rubinetti di utenza; in questi casi è necessario tenere presente che i trattamenti delle acque (quali sedimentazioni, filtrazioni, flocculazioni e/o disinfezioni, in particolare la presenza di cloro libero residuo nelle acque distribuite) possono inficiare le prestazioni dello standard di processo.

A.3.3. Conservazione dei campioni

A.3.3.1. Analisi del contenuto totale di tossine

Conservare i campioni in bottiglie di polietilene o vetro (A.4.1.1, A.4.1.14) e sottoporli ad almeno un ciclo di congelamento e scongelamento ($-18\pm 3^{\circ}\text{C}$) al fine di favorire la lisi.

A.3.3.2. Analisi del contenuto extracellulare di tossine

Conservare i campioni in bottiglie di polietilene o vetro (A.4.1.1, A.4.1.14) al buio e alla temperatura di $1-10^{\circ}\text{C}$ per prevenire la degradazione degli analiti dovuta all'azione di luce e agenti microbiologici. In queste condizioni la conservazione è limitata ad un tempo massimo di 24 h.

A.4. Vetreria, materiali e attrezzature di base

A.4.1. Attrezzature di uso comune di laboratorio

- A.4.1.1. Bottiglie in polietilene da 1 L resistenti al congelamento idonei anche per il trasferimento del campione al sistema di estrazione SPE (A.4.1.10).
- A.4.1.2. Filtri a fascia nera.
- A.4.1.3. Filtri di fibra di vetro del tipo Whatman MN-GF5 di diametro adeguato al sistema filtrante, diametro pori $\leq 0,45 \mu\text{m}$ o analoghi.
- A.4.1.4. Matracci tarati in vetro di classe A di idoneo volume (0,01 L, 0,05 L, 0,1 L, 0,5 L, 1 L).
- A.4.1.5. Microsiringhe in vetro.
- A.4.1.6. Pipette in vetro tarate di classe A.
- A.4.1.7. Vial in vetro con tappo a vite da 1,5 mL.
- A.4.1.8. Bagno ad ultrasuoni.
- A.4.1.9. Sistema di filtrazione in vetro o materiale plastico autoclavabile o monouso completo di pompa da vuoto.
- A.4.1.10. Sistema per estrazione SPE, per estrazioni singole o multiple, completo di pompa da vuoto, sistema di regolazione del flusso manometri e accessori.
- A.4.1.11. Sistema di evaporazione sotto flusso di argon o di azoto.
- A.4.1.12. Cartucce per estrazioni SPE da 8 cc, contenenti 0,5 g di Carbograph 4.
- A.4.1.13. Beuta in FEP-Teflon o in vetro da 1 L.
- A.4.1.14. Bottiglie in vetro scuro da 1L.
- A.4.1.15. Beuta in FEP- Teflon o in vetro da 50 mL.
- A.4.1.16. Provette o vials per il recupero dell'eluato, preferibilmente in FEP-Teflon o in vetro, da 10-20 mL.
- A.4.1.17. Agitatore magnetico.
- A.4.1.18. Vials per la conservazione degli standard analitici, preferibilmente in FEP-Teflon o in vetro scuro, di idoneo volume.
- A.4.1.19. Filtri per siringa in PTFE da 13 mm di diametro e $0,45 \mu\text{m}$ di porosità

Tutta la vetreria e i contenitori, ad esclusione di quelli monouso, prima del loro impiego devono essere accuratamente lavati con detergenti per vetreria e risciacquati in sequenza con acqua di rubinetto, acqua Milli-Q esente da tracce da analiti (A.5.1.1), acetone (A.5.1.6) e metanolo (A.5.1.4).

A.5. Reagenti e materiali di riferimento

A.5.1. Reagenti e standard

Tutti i reagenti utilizzati sono di grado RS (per HPLC) o superiore e i materiali di riferimento al più elevato grado di purezza disponibile in commercio.

- A.5.1.1 Acqua ultrapura (resistenza $\geq 18 \text{ M}\Omega/\text{cm}$, TOC $\geq 2 \text{ ng/L}$), esente da tracce di analita.
- A.5.1.2 Acetonitrile.
- A.5.1.3 Acido formico concentrato (46 M).
- A.5.1.4 Metanolo.
- A.5.1.5 Acido trifluoroacetico (TFA) concentrato, 13 M.
- A.5.1.6 Acetone.
- A.5.1.7 Diclorometano.
- A.5.1.8 Acido cloridrico al 37%, grado tecnico.
- A.5.1.9 Azoto o argon ultrapuro.
- A.5.1.10 Standard di processo per microcistine: utilizzare nodularina 1 mg ALEXIS® (La Jolla, CA,USA) o prodotto analogo.
- A.5.1.11 Analiti: MC-LW 25 μg ; MC-LF 25 μg ; MC-LY 25 μg ; MC-LA 100 μg ; MC-YR 25 μg ; MC-LR 500 μg ; MC-RR 250 μg ; ALEXIS® BIOCHEMICALS (La Jolla, CA,USA) o prodotto analogo.

A.5.1.12 Analiti: dem-MC-RR 8 µg/mL, dem-MC-LR 7 µg/mL DHI (Horsholm, Denmark) o ALEXIS® BIOCHEMICALS (La Jolla, CA,USA) o prodotto analogo.

A.5.1.13 Tiosolfato di sodio.

A.5.2. Soluzioni

A.5.2.1. Soluzioni di reagenti

A.5.2.1.1 Miscela acqua:acetonitrile, 70:30 (v/v): prelevare 700 mL di acqua ultrapura (A.5.1.1) e 300 mL di acetonitrile (A.5.1.2), riunire in una beuta (A.4.1.13) e miscelare accuratamente.

A.5.2.1.2 Miscela diclorometano:metanolo, 80:20 (v/v) 10 mM TFA: prelevare 400 mL di diclorometano (A.5.1.7) e 100 mL di metanolo (A.5.1.4), riunire in una beuta (A.1.13), miscelare accuratamente e aggiungere 335 µL di TFA (A.5.1.5) con una microsiringa (A.4.1.5). Conservare la soluzione in frigorifero ad una temperatura di 5±3°C in bottiglie in vetro scuro (A.4.1.14) per evitare l'esposizione alla luce.

A.5.2.1.3 Soluzione acquosa 1M di acido formico: prelevare un volume di acido formico (A.5.1.3) pari a 1 mL tramite pipetta di vetro (A.4.1.6), trasferire quantitativamente in un pallone tarato da 50 mL (A.4.1.4) e portare a volume con acqua ultrapura (A.5.1.1).

A.5.2.1.4 Soluzione acquosa 1M di acido cloridrico: prelevare un volume di acido cloridrico (A.5.1.8) pari a 8 mL tramite idonea pipetta di vetro (A.4.1.6), trasferire quantitativamente in un pallone tarato da 100 mL (A.4.1.4) e portare a volume con acqua ultrapura (A.5.1.1).

A.5.2.1.5 Soluzione acquosa 0,01 M di acido cloridrico: prelevare un volume di soluzione acquosa 1M di acido cloridrico (A.5.2.1.3) pari a 10 mL tramite idonea pipetta di vetro (A.4.1.6), trasferire quantitativamente in un pallone tarato da 1 L (A.4.1.4) e portare a volume con acqua ultrapura (A.5.1.1).

A.5.2.2. Soluzioni standard di lavoro

Per la preparazione di soluzioni primarie di standard devono essere utilizzati materiali certificati di cianotossine al più elevato grado di purezza disponibile in commercio.

Il reperimento di standard di microcistine è sottoposto a regolamentazione internazionale sulla commercializzazione di agenti biologici che costituiscono un rischio per l'operatore; tale regolamentazione prevede l'assunzione di responsabilità nell'acquisto e utilizzo e una dichiarazione di destinazione d'uso e comporta generalmente tempi di approvvigionamento dell'ordine di alcuni mesi.

A.5.2.2.1 Soluzione primaria dello standard di processo, Nodularina (250 µg/mL)

A.5.2.2.1.1 Solubilizzare il materiale standard di Nodularina (A.5.1.10) in un vial (A.4.1.18) con un volume di Metanolo (A.5.1.4) pari a 4 mL prelevato con idonea pipetta (A.4.1.6), ottenendo una soluzione alla concentrazione di 250 µg/mL.

A.5.2.2.1.2 Agitare la soluzione (A.5.2.2.1.1) per un arco di tempo pari a 15 minuti utilizzando un agitatore magnetico (A.4.1.17).

Dopo la preparazione, la soluzione è conservata a -18±3°C ed è stabile per almeno 3 mesi.

A.5.2.2.2 Soluzione primaria degli analiti

Solubilizzare il materiale standard (*standard stock solution*) di ciascun analita (A.5.1.11) in un vial (A.4.1.18) con un volume di metanolo (A.5.1.4) pari a quanto indicato in colonna B della Tabella A1 prelevato con idonea pipetta (A.4.1.6), ottenendo delle soluzioni a concentrazioni differenti secondo quanto riportato in colonna C. Il materiale standard degli analiti dem-MC-RR e dem-MC-LR (A.5.1.12) non richiede solubilizzazione con metanolo, in quanto viene fornito già in soluzione. Dopo la preparazione, le soluzioni sono conservate a -18±3°C e risultano stabili per almeno 3 mesi.

Tabella A1. Composizione della soluzione primaria degli analiti

A	B	C
Microcistina	Volume di solubilizzazione mL	Concentrazione finale soluzione standard primaria (A.5.2.2.2), µg/mL
MC-RR	4	62
MC-LA	4	25
MC-LR	4	125
MC-YR	4	25
MC-LF	4	6
MC-LW	4	6
MC-LY	4	6
dem-MC-RR	-	8*
dem-MC-LR	-	7*

*concentrazione indicata dal produttore

A.5.2.2.3 Soluzione secondaria di lavoro di Nodularina (5 µg/mL)

Prelevare con idonea microsiringa (A.4.1.5) 200 µL della soluzione primaria di standard di processo (A.5.2.2.1), trasferire in un matraccio da 10 mL (A.4.1.4) e portare a volume con metanolo (A.5.1.4), ottenendo una soluzione alla concentrazione di 5 µg/mL.

Dopo la preparazione la soluzione è conservata a 5±3°C ed è stabile per almeno 3 mesi.

A.5.2.2.4 Soluzione secondaria di riferimento composta degli analiti (1 µg/mL)

Si preleva un'adeguata aliquota da ogni soluzione primaria (A.5.2.2.2), secondo lo schema riportato in Tabella A2, colonna B, tramite idonee microsiringhe (A.4.1.5). Si riuniscono le aliquote e si diluisce in opportuno volume di metanolo (A.5.1.4), riportato in colonna C, per ottenere la soluzione secondaria di riferimento composta a concentrazione opportuna (*working standard solution*).

Tabella A2. Composizione della soluzione di riferimento composta

A	B	C	D	E
Microcistina	Concentrazione soluzione primaria di riferimento (A.5.2.2.2) µg/mL	Volume soluzione primaria da prelevare (A.5.2.2.2) µL	Volume finale soluzione secondaria (A.5.2.2.4) mL	Concentrazione soluzione secondaria (A.5.2.2.4) µg/mL
MC-RR	62	24	1,5	1
MC-LA	25	60	1,5	1
MC-LR	125	12	1,5	1
MC-YR	25	60	1,5	1
MC-LF	6	280	1,5	1
MC-LW	6	280	1,5	1
MC-LY	6	280	1,5	1
dem-MC-RR	8*	185	1,5	1
dem-MC-LR	7*	210	1,5	1

* concentrazione indicata dal produttore

A.6. Procedura estrattiva (SPE)

A.6.1. Preparazione del campione di prova per acque superficiali

A.6.1.1. Procedura estrattiva A per l'estrazione del contenuto totale (intracellulare + extracellulare) di tossine

A.6.1.1.1 Prelevare una aliquota di 0,5 L di campione (A.3.2).

A.6.1.1.2 Sottoporre il campione ad almeno un ciclo di congelamento e scongelamento al fine di favorire la lisi cellulare. È possibile eventualmente sonicare (A.4.1.8) il campione per ottenere il totale scongelamento.

A.6.1.1.3 Aggiungere lo standard di processo, Nodularina, alla concentrazione di 1 µg/L, prelevando con una microsiringa (A.4.1.5), 100 µL della soluzione secondaria di lavoro (A.5.2.2.3) pari a 500 ng dello standard di processo.

- A.6.1.1.4 Se necessario, cioè laddove si valuti che la torbidità/presenza di particolato potrebbe occludere le colonnine per SPE durante l'estrazione, filtrare i campioni di acqua con filtri a fascia nera (A.4.1.2), utilizzando un sistema di filtrazione sotto vuoto (A.4.1.9) altrimenti procedere al punto (A.6.1.1.5).
- A.6.1.1.5 Raccogliere il filtrato in un recipiente idoneo per l'estrazione SPE (A.4.1.1).
- A.6.1.1.6 In presenza di un evidente residuo di filtrazione, lavare il particolato trattenuto dal filtro con 10 mL di metanolo (A.5.1.4) al fine di rimuovere eventuali analiti trattenuti in esso. La miscela è trasferita nel campione.
- A.6.1.1.7 Lavare una cartuccia (A.4.1.12) per estrazione SPE in successione con due volumi (circa 12 mL) di diclorometano/metanolo (80:20, v/v) 10 mM TFA (A.5.2.1.2) e un volume (circa 6 mL) di metanolo (A.5.1.4).
- A.6.1.1.8 Attivare la cartuccia con due volumi (circa 12 mL) di una soluzione acquosa 0,01 M HCl (A.5.2.1.5) ed eliminare il residuo con un volume (circa 6 mL) di acqua MQ (A.5.1.1).
- A.6.1.1.9 Far passare il campione (A.3.2) attraverso la cartuccia ad un flusso non superiore a 10 mL/min, scartando il percolato.
- A.6.1.1.10 Lavare la cartuccia con 6 mL di acqua ultrapura (A.5.1.1) sempre con un flusso non superiore a 10 mL/min.
- A.6.1.1.11 Asciugare completamente la cartuccia SPE dall'acqua, tramite l'ausilio di una pompa da vuoto (A.4.1.10). Far passare 0,5 mL di metanolo (A.5.1.4) per eliminare ogni residuo di acqua con l'ausilio di una sistema da vuoto (A.4.1.10).
- A.6.1.1.12 Eluire lentamente (a goccia a goccia) gli analiti trattenuti dalla fase stazionaria in successione con 1 mL di metanolo (A.5.1.4) e 6 mL di miscela di diclorometano /metanolo (80:20, v/v) acidificata con 10 mmol/L di TFA (A.5.2.1.2) in una provetta o vial da 10 mL (A.4.1.16).
- A.6.1.1.13 Evaporare l'eluato (A.6.1.1.12) sotto moderato flusso di gas inerte azoto o argon (A.5.1.9) rimuovendo totalmente la fase liquida.
- A.6.1.1.14 Riprendere il residuo (A.6.1.1.13) con 1 mL di miscela acqua-acetonitrile 70:30 (A.5.2.1.1).
- A.6.1.1.15 Qualora la soluzione si presenti torbida, filtrare con filtri in PTFE (A.4.1.19)
- A.6.1.1.16 Prelevare una aliquota dell'estratto ricostituito (A.6.1.1.14) con microsiringa (A.4.1.5) e sottoporre ad esame mediante LC/MS/MS.

A.6.1.2. Procedura estrattiva B per l'estrazione della frazione di tossine extracellulari o libere

- A.6.1.2.1 Prelevare una aliquota di 0,5 L di campione conservato secondo quanto indicato al punto A.3.2.
- A.6.1.2.2 Aggiungere al campione (A.6.1.2.1) lo standard di processo, Nodularina, alla concentrazione di 1 µg/L, prelevando con una microsiringa (A.4.1.5), 100 µL della soluzione secondaria di lavoro (A.5.2.2.3) pari a 500 ng dello standard di processo.
- A.6.1.2.3 Filtrare i campioni di acqua utilizzando un sistema di filtrazione sotto vuoto (A.4.1.9) con filtri in fibra di vetro (A.4.1.3).
- A.6.1.2.4 Raccogliere il filtrato in un recipiente idoneo per l'estrazione SPE (A.4.1.1).
- A.6.1.2.5 Procedere con l'estrazione come descritto in precedenza nella procedura estrattiva A (A.6.1.1.6-A.6.1.1.16).

A.6.2. Preparazione del campione di prova per acque sottoposte a trattamento di potabilizzazione

A.6.2.1. Procedura estrattiva A per l'estrazione del contenuto totale (intracellulare + extracellulare) di tossine

- A.6.2.1.1 Prelevare una aliquota di 0,5 L di campione (A.3.2).
- A.6.2.1.2 Sottoporre il campione ad almeno un ciclo di congelamento e scongelamento al fine di favorire la lisi cellulare. È possibile eventualmente sonicare (A.4.1.8) il campione per ottenere il totale scongelamento.
- A.6.2.1.3 In caso di presenza di cloro libero (metodo ISS.BHD.033.rev00 in Rapporti ISTISAN 07/31) in concentrazione superiore a 0,5 mg/L, aggiungere tiosolfato di sodio in concentrazione pari a circa 18 mg/L (A.5.1.13).
- A.6.2.1.4 Procedere con l'estrazione come descritto in precedenza nella procedura estrattiva A (A.6.1.1.3-A.6.1.1.16)

A.6.2.2. Procedura estrattiva B per l'estrazione della frazione di tossine extracellulari o libere

- A.6.2.2.1 Prelevare una aliquota di 0,5 L di campione conservato secondo quanto indicati al punto A.3.2.
- A.6.2.2.2 In caso di presenza di cloro libero (metodo ISS.BHD.033.rev00 in Rapporti ISTISAN 07/31) in concentrazione superiore a 0,5 mg/L, aggiungere tiosolfato di sodio in concentrazione pari a circa 18 mg/L (A.5.1.13).
- A.6.2.2.3 Procedere con l'estrazione come descritto in precedenza nella procedura estrattiva A (A.6.1.2.2-A.6.1.2.5)

A.6.3. Preparazione del bianco campione

- A.6.3.1 Trasferire 0,5 L di campione di acqua ultrapura in recipiente idoneo per l'estrazione SPE (A.4.1.1).
 A.6.3.2 Procedere secondo quanto descritto ai punti A.6.1.1.7-A.6.1.1.16.

A.6.4. Preparazione dei campioni per la curva di taratura

- A.6.4.1 Predisporre un numero di recipienti idonei per l'estrazione SPE (A.4.1.1, A.4.1.4) pari ai livelli di taratura considerati e, in ciascun recipiente, trasferire 0,5 L di bianco campione (A.6.3).
 A.6.4.2 Aggiungere a ciascun bianco campione (A.6.3) con una microsiringa (A.4.1.5) o una pipetta (A.4.1.6), un volume di soluzione secondaria di riferimento composita (A.5.2.2.4), secondo lo schema riportato in Tabella A3 tale da ottenere il livello di concentrazione prefissato per ogni livello di taratura. Ad esempio, per una taratura a 5 livelli (colonna A) possono essere prestabiliti campioni per la taratura aventi concentrazioni teoriche pari a 0,1 µg/L, 1 µg/L, 2,5 µg/L, 5 µg/L, 10 µg/L (colonna B) prelevando un volume di soluzione secondaria di riferimento composita (A.5.2.2.4) pari al valore riportato in colonna C.
 A.6.4.3 Procedere secondo quanto descritto ai punti A.6.1.1.7-A.6.1.1.16.

Tabella A3. Composizione dei campioni per la curva di taratura

A	B	C
Livello di taratura	Concentrazione corrispondente nel campione* (µg/L)	Prelievo da soluzione secondaria di riferimento composita (A.5.2.2.4) (mL)
1	0,1	0,05
2	1,0	0,50
3	2,5	1,25
4	5,0	2,50
5	10,0	5,00

* valore teorico ottenuto per calcolo sulla base della procedura estrattiva adottata nel metodo

A.7. Analisi LC/MS tandem

A.7.1. Strumentazione analitica e accessori

Cromatografo liquido accoppiato allo spettrometro di massa a triplo quadrupolo, (LC/MS/MS o LC-MS tandem), eventualmente preceduto da sistema automatico di iniezione (autocampionatore), costituito in sequenza da:

- A.7.1.1 Pompa HPLC adatta a gestire microflussi ed eluizione in gradiente binaria equipaggiata di sistema di iniezione a valvola, utilizzando microsiringhe con loop interno da almeno 50 µL.
 A.7.1.2 Compartimento di termostatazione per la colonna.
 A.7.1.3 Colonna a fase inversa C-18 (150 x 2,1 mm I.D. 5 µm) o analoghe.
 A.7.1.4 Analizzatore di massa a triplo quadrupolo equipaggiato con sorgente ESI a pressione atmosferica del tipo TIS (*Turbo Ion Spray*) o analogo; il sistema TIS/MS/MS è fatto operare in modalità positiva, utilizzando aria come gas di nebulizzazione, di desolvatazione e nella cella di collisione e azoto come curtain gas.
 L'utilizzo di sorgenti di differenti tipologie può comportare la necessità di un processo di ottimizzazione dei parametri fisici e strumentali.
 A.7.1.5 Sistema di acquisizione ed elaborazioni dati.

A.7.2. Fasi mobili

Le separazioni LC/MS/MS sono realizzate in gradiente binario utilizzando come fasi mobili le seguenti soluzioni:

- A.7.2.1 **Soluzione di acido formico 10 mM in acqua ultrapura:** prelevare un volume di soluzione acquosa 1 M di acido formico (A.5.2.1.3) pari a 10 mL tramite idonea pipetta di vetro (A.4.1.6), trasferire quantitativamente in un pallone tarato da 1 L (A.4.1.4) e portare a volume con acqua ultrapura (A.5.1.1).
 A.7.2.2 **Soluzione di acido formico 10 mM in acetonitrile:** prelevare un volume di soluzione acquosa 1 M di acido formico (A.5.2.1.3) pari a 10 mL tramite idonea pipetta di vetro (A.4.1.6), trasferire quantitativamente in un pallone tarato da 1 L (A.4.1.4) e portare a volume con acetonitrile (A.5.1.2).

A.7.3. Determinazione LC/MS su campioni di prova

A.7.3.1. Operazioni preliminari

Attivare l'apparecchiatura e predisporla al funzionamento secondo le procedure operative specifiche o le indicazioni fornite dai manuali d'uso. In particolare:

- ottimizzare i parametri funzionali dello spettrometro di massa e assicurare la corretta calibrazione delle masse;
- assicurarsi che lo strumento raggiunga l'equilibrio e scegliere un fondo scala compatibile con la concentrazione degli ioni da determinare

A.7.3.2. Condizioni operative preliminari

Per le determinazioni in LC/MS tandem predisporre la valvola di iniezione, o in alternativa, un autocampionatore in modo da iniettare nel sistema un volume fisso pari a 50 µL dell'estratto concentrato e impostare le condizioni strumentali idonee allo scopo riportate, a titolo di esempio, in Tabella A4.

Tabella A4. Esempio di condizioni strumentali (mass-spettrometriche e cromatografiche)

Analita	MRM (m/z)*	DP	FP	EP	CXP	CE
Condizioni MS**						
MC-RR	520>135,5	60	400	10	8	40
	520>127	60	400	10	8	60
MC-LR	995,5>135,5	60	400	10	8	100
	995,5>137,5	60	400	10	8	125
MC-LA	910,5>135,5	55	400	10	9	80
	910,5>776,5	55	400	10	21	25
MC-YR	1045,5>135,5	60	400	10	9	100
	1045,5>213,5	60	400	10	15	84
MC-LF	986,5>478,5	60	400	10	13	30
	986,5>852,5	60	400	10	13	30
MC-LW	1025,5>446,5	30	400	10	13	30
	1025,5>891	30	400	10	13	30
MC-LY	1002,5>135,5	40	400	10	13	90
	1002,5>868	40	400	10	13	30
Dem-MC-RR	513>135,5	60	400	10	8	42
	135,5>127,5	60	400	10	8	60
Dem-MC-LR	981,5>135,5	60	400	10	8	95
	981,5>70	60	400	10	8	125
Nodularina (standard di processo)	825>135,5	60	400	10	8	80
Condizioni LC						
LC	Colonna:	a fase inversa C-18 (150 x 2.1 mm I.D. 5 µm) Altima (Alltech) o analoga.				
	Fase mobile:	fase A: acetonitrile 10 mM acido formico; fase B: acqua 10 mM acido formico.				
	Gradiente (t in min):	t ₀ →A= 35 %; t ₁₅ →A= 70 %; t ₁₆ →A= 100%; t ₂₀ →A= 35%; t ₂₉ →A=35%.				
	Temperatura colonna:	40°C				

* Transizione ione precursore > ione frammento

** Condizioni del TIS: voltaggio 5500 V; Curtain gas flow 10 u.a.; Nebulizer gas flow 12 u.a.; Turbo-gas flow 30 u.a.; CAD flow 6 u.a.

MRM: Multiple Reaction Monitoring; DP: Declustering Potential; FP: Focusing Potential; EP: Entrance Potential, CXP: potenziale di uscita dalla cella di collisione; CE: Collision Energy; u.a.: unità arbitrarie

A.7.3.3. Costruzione della curva di taratura

- A.7.3.3.1 Analizzare i diversi campioni di taratura (A.6.4.), iniettando una aliquota da 50 µL di ciascuna soluzione (A.6.1.1.16) per ciascun livello di taratura prefissato.
- A.7.3.3.2 Analizzare mediante LC/MS tandem, e tabulare il valore del rapporto tra l'area prodotta dalla somma dei segnali relativi alle due transizioni ione precursore>ione prodotto selezionate per ciascun analita e l'area prodotta dal segnale relativo alla transizione ione precursore>ione prodotto per lo standard di processo ($A_{analita}/A_{standard\ di\ processo}$) in corrispondenza di ogni livello di concentrazione per ciascun analita.
- A.7.3.3.3 Con l'ausilio di un programma dedicato (o di idonee espressioni matematiche) determinare con il metodo dei minimi quadrati, per l'intervallo lineare della curva individuato per es. con il metodo dei residui, l'equazione della retta di taratura $Y = a \cdot X + b$ dove $Y = A_{analita} / A_{standard\ di\ processo}$, $X =$

concentrazione di ciascun analita espressa in $\mu\text{g/L}$, a = coefficiente angolare a valore noto, b = intercetta sull'asse delle Y , a valore noto. Data la variabilità conseguente alla dipendenza dalle condizioni cromatografiche verificare periodicamente la validità dell'equazione corrispondente alla retta di taratura, ricavata con il metodo dei minimi quadrati, processando e analizzando due suoi punti.

- A.7.3.3.4 Il coefficiente di correlazione " r^2 ", nell'intervallo lineare della curva di taratura, deve essere $\geq 0,98$.
- A.7.3.3.5 Memorizzare i dati di taratura nel metodo cromatografico residente sul sistema di gestione (A.7.1.5).

A.7.3.4. Controllo del bianco

Secondo quanto predisposto nell'ambito delle procedure di controllo qualità (ISS.PGA.903.revXX in Rapporti ISTISAN 07/31) controllare una aliquota di bianco campione non addizionato dallo standard di processo sottoponendola alla stessa procedura analitica prevista per il campione, allo scopo di individuare gli eventuali interferenti presenti nel tracciato cromatografico nell'intorno del tempo di ritenzione degli analiti da ricercare.

A.7.3.5. Identificazione dell'analita

L'identificazione degli analiti deve basarsi sul tempo di ritenzione e sui segnali ionici relativi alle transizioni ione precursore>ione frammento. I dati sull'identificazione degli analiti devono essere ottenuti per confronto in identiche condizioni sperimentali tra il tempo di ritenzione cromatografico relativo per la/le transizione/i diagnostica/che riferite al campione in esame e il tempo di ritenzione cromatografico relativo per la/le transizione/i diagnostica/che riferite all'ultima soluzione di riferimento/curva di taratura

Per acquisizioni in MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), dovranno essere anche osservati i rapporti tra le transizioni diagnostiche. In Figura A1 è riportato un cromatogramma rappresentativo ottenuto dall'analisi LC-MS tandem di un campione bianco e addizionato di una miscela delle microcistine selezionate e dello standard di processo, la nodularina.

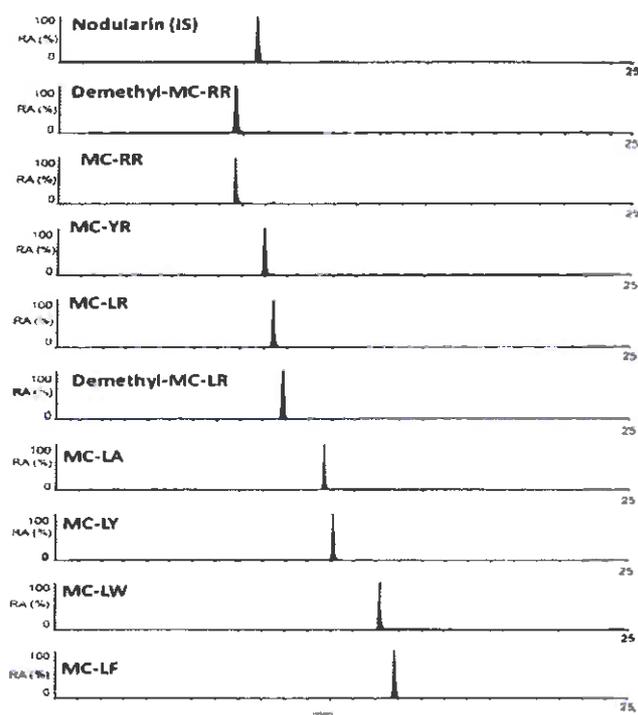


Figura A1. Cromatogramma rappresentativo risultante da un'iniezione di 0,5 L di un campione bianco contaminato con 0,1 $\mu\text{g/L}$ di una miscela delle microcistine selezionate e 1 $\mu\text{g/L}$ dello standard di processo, determinato tramite LC-MS/MS in modalità MRM

A.7.3.6. Analisi quantitativa in LC/MS

- A.7.3.6.1 Analizzare ciascuna aliquota di estratto oggetto di indagine (A.6.1; A.6.2; A.6.3; A.6.4).
- A.7.3.6.2 Dedurre il valore incognito della concentrazione X di ciascun analita nel campione di prova mediante un programma dedicato oppure sostituendo nella equazione della retta di taratura (A.7.3.3.3) il valore della Y ottenuto sperimentalmente per il campione processato.

- A.7.3.6.3 Il valore della Y nel campione di prova deve sempre cadere all'interno dell'intervallo di linearità o riportato in esso per opportuna diluizione del campione.
- A.7.3.6.4 microgrammi per litro ($\mu\text{g/L}$), vengono riportati con una cifra significativa per concentrazioni $\geq 100 \mu\text{g/L}$, con due cifre significative per concentrazione comprese tra 1-100 $\mu\text{g/L}$ e con tre cifre significative per concentrazioni $< 1 \mu\text{g/L}$.

A.8. Prestazioni del metodo

Le caratteristiche di prestazione del metodo ottenute mediante prove intra-laboratorio indicano valori di esattezza, espressa come recupero percentuale, superiori allo 85% e una precisione, intesa come riproducibilità intra-laboratorio ed espressa come deviazione standard relativa, inferiore al 25% per tutti gli analiti oggetto di indagine. Il limite di rivelabilità è compreso nell'intervallo 0,002-0,025 $\mu\text{g/L}$.

A.9. Misure di sicurezza

Le sostanze possono essere assorbite dall'organismo per inalazione, attraverso la cute e per ingestione.

Utilizzare idonee misure di protezione individuale (protezione respiratoria, protezione delle mani, protezione degli occhi, protezione della pelle e del corpo).

Effettuare tutte le operazioni descritte in sezione A.5 e A.6 sotto cappa chimica.