



Co-funded by
the European Union

Project no. 2023-1-RO01-KA220-HED-000164767



AN INTERDISCIPLINARY AND TRANSLATIONAL EUROPEAN FRAMEWORK FOR POLLUTION-FREE SOILS GENERATING SAFE RESOURCES FOR FOOD SECURITY AND HUMAN HEALTH SUPPORT



Partnership for innovation on the exchange of best practices and the design of joint collaborative initiatives at European level related to the awareness of the effects of contamination on human health.

Erasmus+ Project – Partnership for Cooperation
Eds. Pinzaru Iulia Andreea, Dehelean Cristina Adriana

INNO-SAFE-LIFE





Co-funded by
the European Union



Un quadro europeo interdisciplinare e traslazionale per suoli privi di inquinamento che generano risorse sicure per la sicurezza alimentare e il sostegno della salute umana

Partenariato per l'innovazione sullo scambio di buone pratiche e la progettazione di iniziative collaborative congiunte a livello europeo relative alla consapevolezza degli effetti della contaminazione sulla salute umana

Erasmus+ Project – Partnership for Cooperation

Eds. Pinzaru Iulia Andreea, Dehelean Cristina Adriana

Edizione Italiana a cura di: Conforti Filomena, Statti Giancarlo, Fucile Mary

INNO-SAFE-LIFE

© 2025

Tutti i diritti di questa edizione sono riservati. La riproduzione parziale o integrale del testo, indipendentemente dallo scopo, senza il consenso informato scritto degli autori è vietata e sarà sanzionata ai sensi delle leggi vigenti.



Co-funded by
the European Union



Un quadro europeo interdisciplinare e traslazionale per suoli privi di inquinamento che generano risorse sicure per la sicurezza alimentare e il sostegno della salute umana

Titolo del progetto: Partenariato per l'innovazione sullo scambio di buone pratiche e la progettazione di iniziative collaborative congiunte a livello europeo relative alla consapevolezza degli effetti della contaminazione sulla salute umana

Acronimo del progetto: INNO-SAFE-LIFE

Numero di progetto: 2023-1-RO01-KA220-HED-000164767

Questo corso interdisciplinare esplora approcci europei innovativi per ottenere suoli privi di inquinamento che sostengano la sicurezza alimentare e proteggano la salute umana. Integra scienze ambientali, ecologia e salute pubblica attraverso quattro temi chiave: (i) l'impatto dei contaminanti del suolo e strategie ecologiche all'avanguardia per la loro bonifica; (ii) la sfida della resistenza antimicrobica causata da fattori sia naturali che umani, con un'attenzione particolare alle soluzioni ecologiche; (iii) gli effetti tossicologici dei contaminanti ambientali sull'organismo umano e i metodi ecologici per la loro mitigazione; e (iv) l'importanza di un'alimentazione sana e dell'uso di integratori alimentari sicuri e scientificamente approvati per promuovere il benessere generale.

Docenti responsabili della parte teorica:

Coordinatore (UMFVBT): Iulia Andreea Pinzaru, Cristina Adriana Dehelean, Diana Simona Tchiakpe-Antal, Codruța Marinela Soica

Partner 1 (UNICAL): Filomena Conforti, Giancarlo Statti, Mary Fucile

Partner 2 (UNIOS): Vrandečić Karolina, Ćosić Jasenka, Baličević Renata, Brigita Popovic



Co-funded by
the European Union



Partner 3 (SUA): Miroslava Kačániová, Natália Čmíková

Partner 4 (UMFCD): Andreea Arsene, Bruno Velescu, Denisa Udeanu

Partner 5 (FAVISAN): Virginia Faur, Mirabela Faur Timofti, Anca Gidofalvi

Docenti responsabili delle parti pratiche:

Coordinatore (UMFVBT): Oana Andrada Iftode, Daliana Ionela Minda, George Andrei Drăghici, Ștefania Dinu, Camelia Alexandrina Szuhaneck

Partner 1 (UNICAL): Filomena Conforti, Giancarlo Statti, Mary Fucile

Partner 2 (UNIOS): Vrandečić Karolina, Ćosić Jasenka, Baličević Renata, Brigita Popovic

Partner 3 (SUA): Miroslava Kačániová, Natália Čmíková

Partner 4 (UMFCD): Andreea Arsene, Bruno Velescu, Denisa Udeanu



INDICE

Capitolo 1. L'impatto dei contaminanti del suolo e i metodi ecologici innovativi per la riduzione dei contaminanti	5
1.1 Introduzione	
1.2 Fitodepurazione dei metalli pesanti nei suol	
1.3 Assorbimento di metalli pesanti	
1.4 Bibliografia	
Capitolo 2. La resistenza antimicrobica derivante dalla selezione naturale esacerbata dai fattori umani e gli innovativi metodi ecologici per combatterla	77
2.1 Introduzione	
2.2 Tipologie di test e protocolli di lavaro	
2.3 Bibliografia	
Capitolo 3. Gli effetti tossici dei contaminanti sul corpo umano e i metodi ecologici innovativi per ridurli	121
3.1 Introduzione	
3.2 Effetti tossici sul corpo umano	
3.3 Percorsi di esposizione	
3.4 Valutazione dei contaminanti	
3.5 Metodi ecologici innovativi per ridurre gli effetti tossici dei contaminanti	
3.6 Bibliografia	
Capitolo 4. Il ruolo di una sana alimentazione e il consumo approvato di integratori alimentari sicuri. Metodi innovativi di approccio e consapevolezza	155
4.1 Introduzione	
4.2 Fondamenti di una sana alimentazione	
4.3 Integratori alimentari sicuri	
4.4 Approcci innovativi all'educazione nutrizionale	
4.5 Valutazione della consapevolezza nutrizionale	
4.6 Efficacia degli interventi nutrizionali innovativi	
4.7 Bibliografia	



CAPITOLO 1. L'IMPATTO DEI CONTAMINANTI DEL SUOLO E I METODI GREEN INNOVATIVI PER LA RIDUZIONE DEI CONTAMINANTI

1.1 Introduzione

Le piante possono essere colpite da agenti patogeni in varie fasi della loro crescita, influenzate da fattori come le condizioni meteorologiche, che possono aumentare la presenza di agenti patogeni nell'ambiente, nonché dalle pratiche sanitarie adottate nella gestione delle colture. Ad esempio, un'inadeguata integrazione dei residui di colture precedenti può contribuire a questo problema. La vulnerabilità di una pianta alle infezioni si verifica quando le condizioni ambientali ne interrompono i processi fisiologici, compromettendone la crescita e alterandone le funzioni (Nazarov et al., 2020). Inoltre, la presenza di agenti patogeni è spesso favorita da condizioni favorevoli come temperatura, pH del suolo e livelli di umidità ottimali. È importante notare che le condizioni ideali per la diffusione di agenti patogeni possono variare significativamente tra i diversi agenti patogeni.

I patogeni terricoli sono agenti infettivi che infettano le piante ospiti attraverso il suolo, anziché attraverso l'acqua o l'aria. Questi patogeni causano malattie che possono ridurre significativamente le rese agricole in tutto il mondo (Li et al., 2023). In genere penetrano nei loro ospiti attraverso le radici, con alcuni patogeni specifici di determinate piante ospiti, mentre altri possono infettare una più ampia varietà di specie. I meccanismi di infezione includono l'uso di segnali molecolari per valutare la suscettibilità delle radici delle piante, l'ingresso attraverso aree danneggiate (che possono essere causate da animali o macchinari) o, in alcuni casi, la produzione di enzimi che scompongono i composti chimici nelle pareti cellulari delle radici delle piante. L'invasione ha successo quando il patogeno inocula e si diffonde efficacemente in tutta la pianta.

I principali patogeni del suolo che colpiscono le piante sono i funghi; tuttavia, le malattie delle piante possono derivare anche da batteri, protozoi, virus e nematodi. Inoltre, malattie non infettive possono verificarsi nel suolo a causa di condizioni di crescita sfavorevoli e generalmente non vengono trasmesse dalle piante malate a quelle sane.



Al contrario, le malattie infettive del suolo possono essere trasmesse da una pianta malata a una sana (Nazarov et al., 2020). È importante notare che le alterazioni dei fattori del suolo possono innescare focolai di patogeni del suolo sia infettivi che non infettivi.

I patogeni del suolo possono causare una varietà di sintomi nelle piante, che possono variare a seconda del patogeno specifico e del tipo di pianta interessata. I sintomi più comuni includono: marciume radicale pre-emergenza, marciume radicale post-emergenza, marciume radicale e avvizzimento vascolare.

Smorzamento pre-emergenza:

La moria pre-emergenza è una malattia delle piante che colpisce principalmente semi e piantine prima che emergano dal terreno. È causata da vari patogeni del terreno, tra cui funghi come *Pythium*, *Rhizoctonia* e *Fusarium*.

La moria è una malattia che causa il marciume dei semi in germinazione e delle giovani piantine. Può causare significative perdite di resa per gli agricoltori, colpendo sia i vivai che le colture in pieno campo.

La moria pre-emergenza è più frequente in condizioni che favoriscono elevati livelli di umidità, come irrigazione eccessiva, forti piogge o terreni compattati. Anche uno scarso drenaggio del terreno e le elevate temperature del suolo possono aggravare il problema (Punja et al., 2021, Scott e Punja, 2023).

Sintomi di marciume pre-emergenza:

- Decomposizione di semi, bulbi e tuberi (Figure 1.1 e 1.2): semi, bulbi e tuberi possono marcire nel terreno prima di avere la possibilità di germinare. Questa decomposizione è spesso caratterizzata da una consistenza molle e da scolorimento.
- Germinazione scarsa (Figura 1.3): i semi colpiti potrebbero non germinare affatto, dando luogo a piante sparse o irregolari.
- Collasso delle piantine (Figura 1.4): se le piantine emergono, potrebbero presentare avvizzimento o collasso poco dopo aver raggiunto la superficie del terreno. Ciò è spesso dovuto al marciume radicale o a lesioni del fusto causate dai patogeni.



- Scolorimento (Figura 1.5): le piantine che riescono a emergere possono mostrare segni di ingiallimento o imbrunimento, in particolare alla base dello stelo o sulle foglie.
- Crescita stentata: le piantine sopravvissute possono presentare una crescita stentata e un vigore complessivamente scarso, il che le rende più suscettibili ad altre malattie e stress ambientali.



Figura 1.1. Decomposizione dei semi di mais



Figura 1.2. I bulbi di narciso decadono



Co-funded by
the European Union

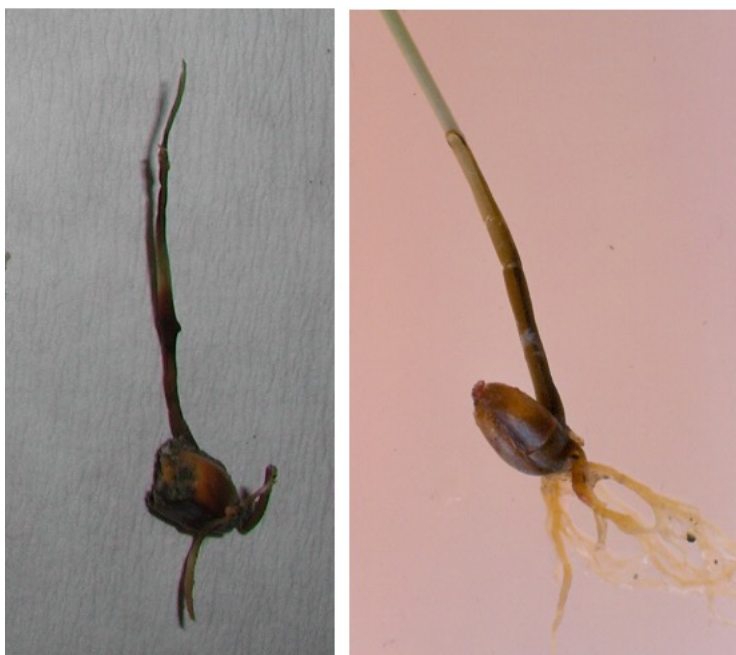


Figura 1.3. Scarsa germinazione dei semi di mais e grano



Figura 1.4. Crollo della piantina



Figura 1.5. Scolorimento delle piantine

Smorzamento post-emergenza

La moria post-emergenza è una condizione che colpisce le piantine dopo la loro emersione dal terreno (Lamichhane et al., 2017). I sintomi tipici includono:

- Appassimento: le piantine possono apparire cadenti o appassite, anche quando il terreno è sufficientemente umido.
- Crescita stentata: le piante colpite spesso mostrano tassi di crescita ridotti rispetto alle piantine sane.
- Scolorimento: le foglie possono ingiallire o presentare altri cambiamenti di colore.
- Steli molli e marci: gli steli possono diventare molli e mollicci, fino a collassare.
- Marciume radicale: le radici possono apparire scure e marce.

Marciume radicale

Il marciume radicale (Figure 1.6, 1.7 e 1.8) è una comune malattia delle piante causata da vari agenti patogeni che prosperano in condizioni di eccessiva umidità.

- Avvizzimento
- Foglie ingiallite



- Crescita stentata: le piante possono presentare una crescita rallentata o interrotta.
- Radici scure e molli: le radici sane sono solitamente bianche e sode; le radici colpite possono apparire scure, molli e mollicce.
- Cattivo odore: un odore di marcio può provenire dal terreno o dalle radici.
- Declino generale: la pianta potrebbe mostrare segni di declino generale, tra cui scarso vigore e scarsa salute.



Figura 1.6. Marciume radicale della barbabietola da zucchero



Figura 1.7. Marciume radicale da Sclerotinia sul girasole



Figura 1.8. Chalara elegans su rosa



Appassimenti vascolari

L'avvizzimento vascolare è un tipo di malattia delle piante caratterizzata dall'avvizzimento di foglie e steli dovuto all'interruzione del trasporto dell'acqua all'interno del sistema vascolare della pianta.

Esempi comuni di malattie da avvizzimento vascolare includono la fusariosi (Figure 1.9, 1.10 e 1.11) e la verticilliosi (Figura 1.12). Questi patogeni possono causare perdite agricole significative poiché colpiscono un'ampia gamma di colture e piante ornamentali.



Figura 1.9. Fusarium del pomodoro



Figura 1.10. Fusarium del crisantemo



Figura 1.11. Fusarium dell'anguria



Figura 1.12. Appassimento da *Verticillium* del girasole

Gestione delle malattie

Diverse misure possono essere utilizzate contro i patogeni del suolo. Tra queste: misure agrotecniche, metodi meccanici, chimici, fisici e biologici. Gestione Integrata dei Parassiti (IPM): combinare il controllo biologico con altre pratiche di gestione può fornire un approccio più efficace e sostenibile alla gestione delle malattie trasmesse dal suolo.

Le misure agrotecniche di protezione contro i patogeni del suolo sono pratiche essenziali volte a prevenire la diffusione e l'impatto di questi organismi nocivi sulle colture. Queste misure includono:

1. Rotazione delle colture: alternare diverse colture in una sequenza specifica può interrompere i cicli vitali dei patogeni del suolo, riducendone le popolazioni e prevenendo l'accumulo di malattie. Nella rotazione delle colture, è importante evitare di produrre specie vegetali che ospitino gli stessi agenti patogeni economicamente importanti. In questo caso, ci si può aspettare un aumento della frequenza della malattia di anno in anno (Figure 1.13 e 1.14).



Figura 1.13. La semina ripetuta del grano provoca un alto livello di incidenza della malattia (*Gaeumannomyces graminis*)



Figura 1.14. La quantità di inoculo di *Sclerotinia sclerotiorum* aumenta alternando girasole, soia e colza nella rotazione delle colture

2. Gestione del suolo: pratiche come il mantenimento di un adeguato livello di umidità, pH e contenuto di sostanza organica del suolo possono creare un ambiente sfavorevole per i patogeni. Tra queste rientrano pratiche come la pacciamatura (Figura 1.15) e la copertura vegetale.



Figura 1.15. Pacciamatura

3. Igiene: mantenere puliti i campi e le attrezzature aiuta a prevenire l'introduzione e la diffusione di agenti patogeni. Ciò include la rimozione dei detriti vegetali infetti (Figura 1.16) e la disinfezione degli attrezzi.



Figura 1.16. Rimozione dei detriti vegetali dalla serra



4. Varietà resistenti (Figura 1.17): piantare varietà di colture resistenti o tolleranti a specifici agenti patogeni presenti nel suolo può ridurre significativamente l'incidenza delle malattie.



Figura 1.17. Diversa suscettibilità delle cultivar di grano alla fusariosi della spiga

5. Miglioramento della salute del suolo: il miglioramento della salute del suolo mediante l'aggiunta di materia organica, compost e microrganismi benefici può promuovere un ecosistema del suolo equilibrato che sopprime i patogeni (Figura 1.18).

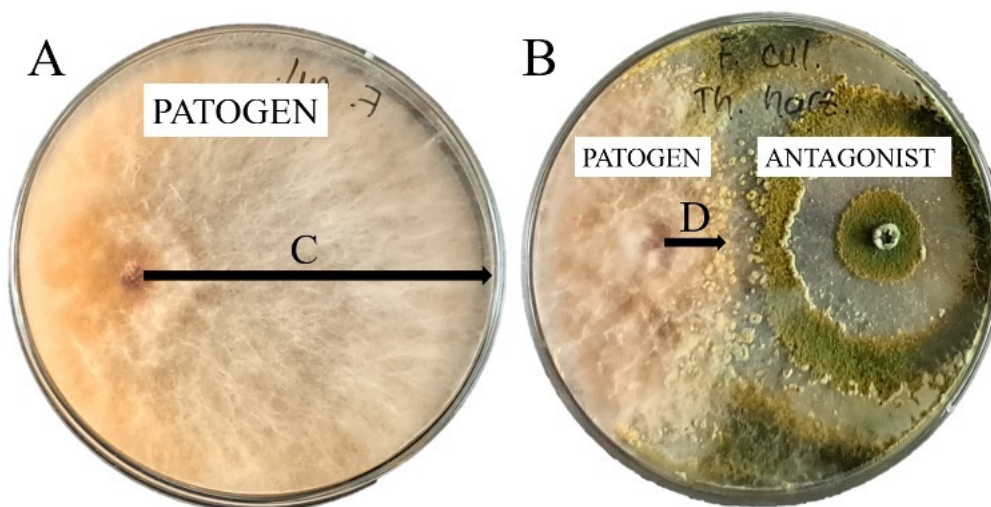


Figura 1.18. Influenza di *Trichoderma asperellum* sulla pathogenic fungi



6. Pratiche di irrigazione adeguate (Figura 1.19): evitare l'irrigazione eccessiva e garantire un buon drenaggio può aiutare a prevenire condizioni che favoriscono lo sviluppo di malattie trasmesse dal suolo.



Figura 1.19. Irrigazione del tabacco

Misure meccaniche: alcuni metodi comuni includono:

1. Tagliare, sradicare, rimuovere le piante malate dai campi (Figura 1.20), dalle piantagioni, dai frutteti, ecc. o da parti di piante in modo che non diventino una fonte di infezione per le piante sane.



Figura 1.20. Rimozione delle parti malate della pianta



2. Distruzione degli organi della pianta in cui il parassita sverna, ad esempio nei frutteti, rimuovere tutte le foglie infette dopo la fine della stagione di crescita e seppellirle o bruciarle (Figura 1.21).



Figura 1.21. Smaltimento delle piante malate

I formulati chimici possono essere applicati nel terreno come fumiganti o spray fogliari per mitigare l'insorgenza, la diffusione e lo sviluppo di malattie sia nelle piante che nel terreno. Sebbene questi formulati siano efficaci nel prevenire perdite significative e l'insorgenza di malattie nelle colture, presentano anche diversi svantaggi. Tra questi, ecotossicità, bioaccumulo, impatti negativi su piante e animali non bersaglio, nonché potenziali rischi per la salute umana (Del Martínez-Diz et al., 2021). L'applicazione di pesticidi chimici ha contribuito all'aumento di patogeni resistenti, il che a sua volta ha ridotto l'efficacia di molti metodi di controllo chimico.

Il terreno può essere trattato anche in modo ecologico, ad esempio con vapore riscaldato, solarizzazione e biofumigazione.

Il trattamento con vapore riscaldato nel terreno è un metodo efficace per la gestione dei patogeni delle piante in ambito agricolo. Questa tecnica prevede l'applicazione di vapore al terreno, che ne aumenta la temperatura in modo sufficiente a uccidere i microrganismi nocivi, tra cui batteri, funghi e nematodi, che possono influire



negativamente sulla salute delle piante (Luvisi et al., 2015). Utilizzando questo metodo, è possibile ridurre l'incidenza delle malattie trasmesse dal suolo, migliorare la salute del suolo e incrementare le rese delle colture. Rappresenta un'alternativa sostenibile ai trattamenti chimici, poiché riduce al minimo il rischio di residui chimici e promuove un ecosistema più sano.

La vaporizzazione del terreno prevede il trasferimento di energia dal combustibile bruciato attraverso il vapore acqueo per aumentare la temperatura del terreno o del substrato a livelli adatti alla pastorizzazione o alla sterilizzazione. A bassa pressione, le temperature del vapore superano i 100 °C (212 °F) e, quando il vapore si condensa nuovamente in acqua, rilascia una quantità significativa di energia, riscaldando efficacemente il terreno mantenendone al minimo il contenuto di umidità. La pastorizzazione del terreno avviene a temperature comprese tra 71 °C e 83 °C, mentre la sterilizzazione si ottiene al punto di ebollizione dell'acqua (100 °C). Nelle pratiche agricole, la vaporizzazione del terreno è considerata principalmente un metodo di pastorizzazione, con temperature indicate di 71 °C per 30 minuti per eliminare la maggior parte di funghi, batteri, insetti e nematodi patogeni e di 83 °C per 30 minuti per eradicare i semi di erbe infestanti resistenti. Tuttavia, sono necessari tempo ed energia sufficienti per raggiungere queste temperature alla profondità del terreno specificata. (Ramon, 2020)

La sterilizzazione a vapore ha eliminato efficacemente molti organismi del suolo; tuttavia, alcuni gruppi di organismi sono riusciti a sopravvivere e riprodursi. Inoltre, questo metodo ha comportato un aumento dei livelli di fosforo e del pH del suolo, mentre i livelli di potassio sono diminuiti dopo il trattamento di sterilizzazione iniziale. Nonostante questi cambiamenti, la sterilizzazione a vapore rimane un'alternativa rapida ed economica ad altri metodi di sterilizzazione, in particolare quando sono necessarie grandi quantità di substrato del suolo (Dietrich et al., 2020).

La solarizzazione del terreno è una pratica agricola ecosostenibile utilizzata per gestire i patogeni delle piante presenti nel terreno (Elmore e Katan, 1998). Questa tecnica prevede la copertura del terreno umido con plastica trasparente per diverse settimane durante la stagione calda (Figura 1.22), aumentando la temperatura del terreno a livelli in grado di uccidere o sopprimere vari patogeni, parassiti e semi di erbe infestanti.



La ricerca ha dimostrato che la solarizzazione del terreno può ridurre significativamente le popolazioni di patogeni come *Fusarium* (Bottomley et al., 2024), *Pythium* e *Rhizoctonia*, tra gli altri. L'efficacia di questo metodo è influenzata da fattori quali l'umidità del terreno, la temperatura e la durata della solarizzazione. In alcuni periodi dell'anno (soprattutto in estate), il terreno viene coperto con pellicole trasparenti in polietilene per riscaldare gli strati superficiali del terreno ad alte temperature. Per il massimo riscaldamento del terreno, la pellicola deve essere vicina al terreno, il che significa che il terreno deve essere privo di detriti, residui vegetali e grandi zolle di terra che potrebbero sollevare la pellicola dal terreno e potenzialmente danneggiarlo. Per una solarizzazione efficace, il terreno deve essere ben preparato, smosso a una profondità di 30-40 cm e irrigato con una maggiore quantità d'acqua. Un terreno umido conduce meglio la temperatura, rendendo la solarizzazione più efficace.



Figura 1.22. Solarizzazione del suolo

La biofumigazione è una pratica agricola ecocompatibile che prevede l'utilizzo di alcune piante, in particolare quelle della famiglia delle Brassicaceae, tra cui cavolo, cavolfiore, broccoli, cavolo riccio e diverse varietà di senape, per sopprimere agenti patogeni e parassiti presenti nel terreno (Ziedan 2022). Questo metodo sfrutta i composti naturali rilasciati da queste piante, come i glucosinolati, che possono essere convertiti in sostanze bioattive con proprietà antimicrobiche quando il materiale vegetale viene incorporato nel terreno.



Il processo prevede in genere la coltivazione di specifiche colture biofumiganti, come senape o ravanello, e la loro successiva incorporazione nel terreno quando sono ancora verdi o subito dopo la fioritura. Questa incorporazione rilascia composti volatili in grado di inibire la crescita di vari patogeni del suolo, tra cui funghi, batteri e nematodi, migliorando così la salute del suolo e la resa delle colture.

Un materiale alternativo per la biofumigazione ha dimostrato che anche il letame animale, che può produrre ammoniaca, può essere utilizzato come materiale biofumigato per prevenire le malattie trasmesse dal suolo (Zhang et al., 2020).

Il **controllo biologico** rappresenta una strategia efficace per la gestione dei patogeni del suolo. Fondamentalmente, il controllo biologico prevede l'utilizzo di organismi viventi per colpire specifiche malattie o parassiti delle piante. I principali meccanismi attraverso i quali gli agenti di biocontrollo (BCA) agiscono per mitigare i patogeni del suolo includono l'antibiosi, la resistenza sistemica indotta, il parassitismo (in particolare il micoparassitismo), l'antagonismo, la competizione per i nutrienti e lo spazio e la promozione della crescita delle piante attraverso mezzi indiretti. La maggior parte dei biofungicidi commerciali si basa su molteplici meccanismi d'azione (Figura 1.23).

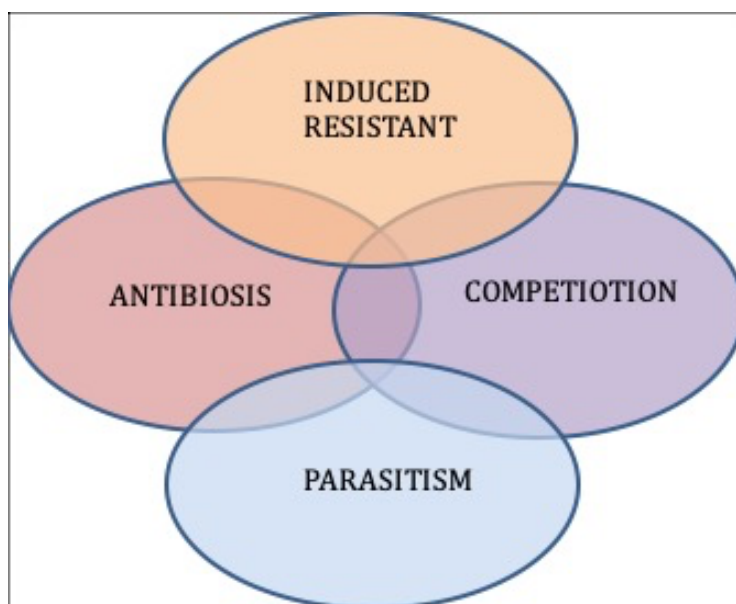


Figura 1.23. Meccanismi d'azione del BCA

L'efficacia dei BCA nelle sperimentazioni sul campo è significativamente influenzata da vari fattori ecologici, tra cui lo stato fisiologico e genetico dell'ospite, nonché le



condizioni climatiche. Queste variabili contribuiscono alla variabilità dell'impatto dei BCA, motivo per cui la loro applicazione è prevalentemente limitata alle serre. Nelle serre, le condizioni ambientali possono essere attentamente monitorate e controllate, consentendo risultati più costanti (Del Martínez-Diz. et al., 2021).

Il controllo biologico dipende dalle varie interconnessioni agoniste e antagoniste tra piante e microbi che vivono nel suolo. I microrganismi benefici del suolo possono sopprimere i patogeni delle piante attraverso due meccanismi principali: azioni dirette e indirette. Direttamente, sintetizzano metaboliti antagonisti dei patogeni, come antibiotici, composti organici e tossine. Indirettamente, potenziano i meccanismi di difesa della pianta ospite e inibiscono la crescita dei patogeni, contribuendo così alla salute generale e alla resistenza delle piante.

Nei biofungicidi commerciali, oggi più di 100 in tutto il mondo, i funghi antagonisti più comunemente utilizzati appartengono ai generi *Trichoderma*, *Ampelomyces*, *Gliocladium*, *Coniothyrium* e *Pythium*, nonché ai batteri antagonisti dei generi *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium* e *Bacillus*.

Il valore del mercato europeo dei biopesticidi è aumentato di circa il 31,2% nel periodo storico (2017-2022). Si prevede che aumenterà di circa il 77,9%, raggiungendo i 3,20 miliardi di dollari entro la fine del 2029. (<https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/european-biopesticides-market-industry>)

Uno dei generi di funghi più importanti e utilizzati nel controllo biologico dei patogeni è il genere *Trichoderma* (Figura 1.24). *Trichoderma* sfrutta l'antagonismo e la competizione diretti, soprattutto all'interno della rizosfera, per influenzare la composizione e le interazioni dei microrganismi circostanti. Quando colonizza le piante, sia sulle radici che come endofita, *Trichoderma* ha sviluppato la capacità di comunicare con la pianta ospite, offrendo una serie di benefici complessi (Woo et al., 2023).

Oggi sono circa 20 le specie di *Trichoderma* presenti sul mercato per il biocontrollo. Tra le specie registrate, figurano *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* e *Trichoderma asperellum* (Sidhu, CABI).



Figura 1.24. Confronto tra la protezione chimica (sinistra) e biologica (destra) delle piantine di pomodoro contro *Rhizoctonia solani* e *Pythium debaryanum*

Le specie di *Trichoderma* sono abili a stabilirsi sul rizopiano, nella rizosfera e all'interno delle radici delle piante. Generano vari metaboliti dotati di proprietà antimicrobiche, come enzimi che degradano le pareti cellulari, antibiotici e composti sia volatili che non volatili. Producono sostanze biostimolanti come fitormoni e fitoregolatori. Il *Trichoderma*, in particolare, è riconosciuto per la sua elevata capacità di assorbire i nutrienti dalle radici e di interagire non solo con i microrganismi nocivi, ma anche con il più ampio microbioma del suolo.

I **composti naturali bioattivi** possono essere utilizzati anche durante la semina, poiché promuovono la crescita delle piante e quindi ne controllano le malattie (Pandit et al., 2022). Questi composti appartengono solitamente a una delle tre grandi classi chimiche: terpenoidi, fenoli e alcaloidi. Alcune delle specie vegetali utilizzate per l'estrazione di composti bioattivi sono: *Allium* spp., *Citrus* spp., *Malaleuca alternifolia* L., alghe brune (*Ascophyllum nodosum*), alghe brune (*Laminaria digitata*), alghe marine (*Spatoglossum variabile*, *Melanothamnus afaqhusainii*, *Halimeda tuna*), alghe rosse (*Chondrus crispus*, *Gigartina stellata*), alghe marine, crostacei marini (Crustacea) (Jamiołkowska, 2020).



Procedura per la registrazione dei prodotti fitosanitari e la gestione del rischio

I prodotti fitosanitari vengono immessi sul mercato sulla base della Decisione di registrazione o approvazione rilasciata dal Ministero dell'Agricoltura della Repubblica di Croazia. Registrando un prodotto fitosanitario, l'obiettivo è ridurre il rischio per la salute umana, animale e ambientale e incoraggiare misure integrate e alternative per il controllo degli organismi nocivi.

La procedura di registrazione dei prodotti fitosanitari nella Repubblica di Croazia è la stessa di quella degli altri membri dell'Unione Europea; al fine di ridurre gli oneri amministrativi, è stato introdotto un sistema di registrazione zonale. A tal fine, vengono applicati principi decisionali unici e numerose linee guida dell'UE e standard di organizzazioni internazionali. La documentazione dei prodotti fitosanitari deve essere effettuata secondo linee guida, standard e protocolli appropriati (GLP, GEP, OCSE, FAO, EPPO e altri). La valutazione del rischio e la documentazione valutata costituiscono la base scientifico-professionale per decidere in merito alla registrazione o all'approvazione dei singoli prodotti fitosanitari.

Il Regolamento (CE) n. 1107/2009 relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari è stato pubblicato il 24 novembre 2009 e la sua applicazione è iniziata il 14 giugno 2011, con numerosi periodi di transizione. Il regolamento stabilisce nuovi standard con l'obiettivo di aumentare il livello di sicurezza per la salute delle persone, degli animali e dell'ambiente.

Tutti i prodotti fitosanitari registrati in Croazia possono essere trovati nel motore di ricerca dei prodotti registrati sul sito web (database FIS) del Ministero dell'Agricoltura.

Nella Repubblica di Croazia, tre istituzioni hanno partecipato al processo di registrazione dei prodotti fitosanitari (Figura 1.25):

- Ministero dell'Agricoltura;
- Centro per la protezione delle piante (Agenzia croata per l'agricoltura e l'alimentazione HAPIH);
- Istituto per la ricerca medica e la medicina del lavoro (IMI).



Il Ministero dell'Agricoltura è il principale coordinatore di tutte le attività relative alla registrazione dei prodotti fitosanitari. Il Ministero riceve le domande di registrazione, verifica la completezza della documentazione e, se necessario, richiede documentazione aggiuntiva al richiedente. Le domande e la documentazione allegata vengono presentate in tre copie identiche. Dopo aver verificato la completezza della documentazione presentata, due copie identiche della documentazione vengono inviate alle istituzioni autorizzate per la valutazione della documentazione e la valutazione del rischio. In caso di necessità, le istituzioni autorizzate richiedono la consegna di documentazione aggiuntiva, eventuali modifiche alle richieste, spiegazioni, ecc. La comunicazione con il richiedente in tutte le fasi del processo di registrazione dei prodotti fitosanitari avviene tramite il coordinatore del Ministero dell'Agricoltura. Dopo che le istituzioni autorizzate hanno completato la valutazione della documentazione e la valutazione del rischio, il coordinatore presenta una proposta di registrazione al Ministero dell'Agricoltura. Sulla base della proposta dell'istituzione autorizzata, il Ministero dell'Agricoltura emette una decisione sulla registrazione dei prodotti fitosanitari.

Il Centro per la Protezione delle Piante esegue parte della valutazione del rischio e della documentazione. Su richiesta del Ministero dell'Agricoltura, elabora proposte per la registrazione dei prodotti fitosanitari, proposte per il rilascio di determinate licenze per i prodotti fitosanitari, proposte per l'estensione delle registrazioni e fornisce pareri di esperti nel campo dei prodotti fitosanitari.

L'Istituto per la Ricerca Medica e la Medicina del Lavoro (IMI) esegue la valutazione della documentazione e del rischio nei settori della tossicologia dei mammiferi e dell'esposizione di utilizzatori, lavoratori e altre persone. Su richiesta del Ministero, elabora inoltre proposte per la registrazione di prodotti fitosanitari, proposte per il rilascio di determinate autorizzazioni, proposte per l'estensione delle registrazioni e fornisce pareri tossicologici specialistici nel suo ambito di attività. Valutatori presso istituzioni autorizzate (ZZB e IMI) (coordinatori)

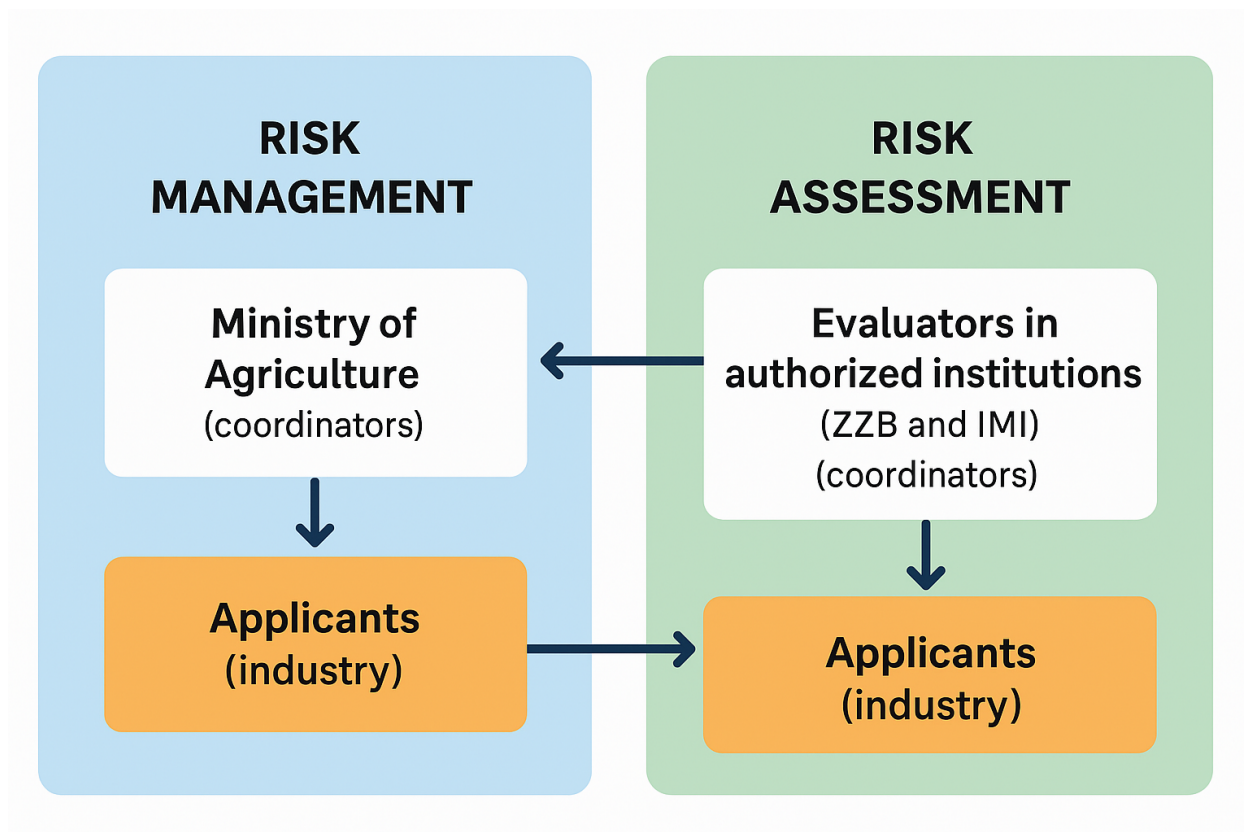


Figura 1.25 Rappresentazione schematica della procedura di registrazione dei prodotti fitosanitari nella Repubblica di Croazia

Il regolamento (CE) n. 1107/2009 apporta numerose innovazioni, le più importanti delle quali riguardano criteri aggiuntivi per la valutazione delle sostanze attive, la registrazione zonale dei prodotti fitosanitari e il commercio parallelo.

L'immissione sul mercato di prodotti fitosanitari nella Repubblica di Croazia è regolata dalla Legge di attuazione del Regolamento (CE) n. 1107/2009. Tale Legge è in vigore dal 1° luglio 2013 e consente l'attuazione diretta del Regolamento (CE) n. 1107/2009 nella Repubblica di Croazia.

Sulla base del Regolamento (CE) n. 1107/2009, la Commissione Europea ha adottato numerosi regolamenti di attuazione direttamente applicabili negli Stati membri dell'Unione Europea, che disciplinano più dettagliatamente l'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari, l'approvazione di sostanze attive, antidoti agronomici, sinergizzanti, coformulanti, eccipienti, sostanze a basso rischio, sostanze di base, sistema di registrazione zonale, candidati alla sostituzione, interferenti ormonali



(interferenti endocrini), rischi comparativi, valutazione parallela, estensione della registrazione per piccole colture commerciali e piccoli scopi, immissione sul mercato di sementi trattate, protezione dei dati, ecc.

A livello dell'Unione Europea, con l'adozione della Direttiva 91/414/CEE nel 1991, sono stati stabiliti principi unici per la valutazione di principi attivi e agenti, nonché per la valutazione del rischio per la salute umana e animale e la tutela dell'ambiente. L'attuazione di questa Direttiva nell'Unione Europea è iniziata nel 1993.

Registrazione nella Repubblica di Croazia e nel resto dell'Unione Europea

Il settore dei prodotti fitosanitari e dei residui di pesticidi negli alimenti è disciplinato da Regolamenti a livello dell'Unione Europea. Nel giugno 2013 sono state approvate le seguenti leggi che consentono l'applicazione diretta del Regolamento:

Legge di attuazione del regolamento (CE) n. 1107/2009 relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari,

Legge di attuazione del regolamento (CE) n. 396/2005 sui livelli massimi di residui di pesticidi nei e sui prodotti alimentari e mangimi di origine vegetale e animale.

Il regolamento (CE) n. 1107/2009 ha istituito un sistema di registrazione zonale per i prodotti fitosanitari.

Gli Stati membri sono divisi in tre zone di registrazione amministrativa (Figura 1.26):

- Zona A - Zona settentrionale, che comprende Danimarca, Svezia, Finlandia, Lituania, Lettonia ed Estonia

- Zona B - Zona intermedia, che comprende Regno Unito, Irlanda, Paesi Bassi, Germania, Belgio, Lussemburgo, Austria, Slovenia, Slovacchia, Repubblica Ceca, Polonia,

Ungheria, Romania

- Zona C – Zona meridionale, che comprende Francia, Spagna, Grecia, Italia, Portogallo, Bulgaria, Malta, Cipro e Croazia

Per evitare duplicazioni di lavoro sono state istituite zone amministrative.



Figura 1.26 Zone di registrazione amministrativa in Europa

Ai sensi della Direttiva 91/414/CEE, ogni Stato membro dell'Unione Europea ha effettuato una valutazione della documentazione e una valutazione del rischio al fine di approvare la registrazione di un prodotto fitosanitario sul proprio territorio e, nel sistema di registrazione zonale, una valutazione del rischio è stata effettuata da uno Stato membro nella stessa zona di registrazione o da uno Stato membro di qualsiasi zona di registrazione nella procedura di registrazione interzonale. Al fine di ridurre gli oneri amministrativi per l'industria e per le autorità competenti degli Stati membri e di garantire una maggiore uniformità e disponibilità dei prodotti fitosanitari, le registrazioni di prodotti fitosanitari approvate da uno Stato membro dovrebbero essere accettate in altri Stati membri, se presentano condizioni agricole, ambientali e climatiche comparabili.

Per i motivi sopra esposti, gli Stati membri sono suddivisi in zone con condizioni agricole, ambientali e climatiche comparabili, al fine di facilitare il reciproco



riconoscimento delle valutazioni del rischio e delle registrazioni approvate. Tuttavia, le caratteristiche climatiche variano anche a livello di singolo paese, ed è per questo che è necessario tenerne conto al momento della registrazione dei prodotti fitosanitari.

Il clima è lo stato medio dell'atmosfera (mantello terrestre gassoso) su un'area osservata per un periodo di tempo più lungo (da 25 a 35 anni). Il clima è influenzato da numerosi fattori come latitudine, correnti marine, conformazione del territorio e del mare, rilievo, ecc. L'Oceano Atlantico è la principale fonte di umidità per l'Europa. I venti occidentali portano umidità. La quantità di precipitazioni diminuisce con la distanza dall'Oceano Atlantico. Nelle aree più vicine al mare, la maggior parte delle precipitazioni si verifica in inverno e nelle aree più remote in estate.

In Europa prevalgono climi temperati: moderatamente caldi e moderatamente continentali e mediterranei. I climi polari e steppici sono meno rappresentati. Il clima ha un'influenza incommensurabile sulla distribuzione delle specie vegetali e animali, sulla possibilità di coltivare determinate specie vegetali in spazi aperti, sulla distribuzione di parassiti, fitopatogeni ed erbe infestanti. La copertura vegetale (vegetazione) dipende dal clima, ma anche l'influenza umana è importante. La vegetazione originaria è rara. L'uomo ha distrutto vaste aree di vegetazione naturale costruendo insediamenti e strade e trasformando le foreste in pascoli e terreni coltivabili.

Un'eccezione al sistema di registrazione zonale sono le registrazioni i cui usi non sono correlati al clima e ad altre condizioni essenziali d'uso. Tali usi includono il trattamento delle sementi, l'uso in aree protette, magazzini, silos e simili, per i quali è stato istituito un sistema di registrazione interzonale.

Il prerequisito per presentare una domanda di registrazione è che il principio attivo contenuto nel prodotto fitosanitario sia approvato a livello dell'Unione Europea.

Il richiedente/l'azienda che presenta domanda di registrazione seleziona uno degli Stati membri all'interno della zona di registrazione come Stato membro segnalante zonale (ZRMS), che esegue la valutazione della documentazione e la valutazione del rischio per l'intera zona di registrazione. Gli altri Paesi all'interno della zona di registrazione in cui è stata presentata contemporaneamente la domanda di



registrazione devono astenersi dalla valutazione della documentazione e dalla valutazione del rischio e attendere che lo zRMS completi la valutazione della documentazione e la valutazione del rischio. Il processo di valutazione della documentazione e della valutazione del rischio dura 12 mesi dal completamento della documentazione.

Dopo che lo Stato membro segnalante zonale (zRMS) ha rilasciato una registrazione per un prodotto fitosanitario sul proprio territorio, gli altri Stati membri in cui l'azienda ha presentato domanda di registrazione (Stato membro interessato - cMS) sono tenuti a rilasciare una registrazione entro 120 giorni. Nel decidere le condizioni di autorizzazione, il cMS può tenere conto delle specificità e dei requisiti nazionali (Addenda nazionali).

Nel caso in cui tutti i Paesi costituiscano un'unica zona (uso in magazzini e simili), l'azienda sceglie un Paese come relatore interzonale (Stato Membro Relatore Interzonale - izRMS) per l'intera Unione Europea e presenta una domanda a tutti gli Stati membri in cui intende registrare il dispositivo di protezione individuale a base di erbe. Dopo che izRMS ha rilasciato la registrazione nella propria area, ogni CMS, indipendentemente dalla zona di registrazione, è tenuto a rilasciare una registrazione nella propria area entro 120 giorni.

Uno Stato membro dell'Unione Europea può rifiutare di emettere una decisione sulla registrazione di un determinato prodotto fitosanitario per il quale zRMS o izRMS hanno effettuato una valutazione della documentazione e una valutazione del rischio. Inoltre, uno Stato membro può rifiutare il riconoscimento reciproco (MR) di una registrazione di un altro Stato membro. In entrambi i casi, è obbligatorio informare il richiedente e la Commissione Europea della propria decisione e presentare una motivazione scientifica e professionale di tale decisione.

Il richiedente può successivamente presentare una richiesta di mutuo riconoscimento della registrazione in uno Stato membro che non ricopriva la funzione di CMS al momento della presentazione della richiesta di registrazione zonale. Tale Stato membro riconoscerà la registrazione ed emetterà una Decisione di Registrazione entro 120 giorni oppure respingerà la richiesta di mutuo riconoscimento.



Il regolamento consente anche il riconoscimento di registrazioni provenienti da un'altra zona di registrazione se le condizioni climatiche, ambientali, agricole e di altro tipo sono simili. Tuttavia, per evitare l'"effetto domino", il riconoscimento di registrazioni già riconosciute (riconoscimenti) non è consentito.

Ai fini della valutazione della documentazione dei prodotti fitosanitari, ai fini della loro registrazione o approvazione nella Repubblica di Croazia, si procede alla valutazione del rischio e alla valutazione della documentazione in termini di identità, proprietà fisico-chimiche, metodi analitici, efficacia del prodotto, tossicologia, esposizione degli utenti, residui del prodotto, comportamento nell'ambiente ed ecotossicologia. A tal fine, vengono applicati principi decisionali unici, nonché numerose linee guida dell'UE e standard di organizzazioni internazionali. L'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari nella Repubblica di Croazia è regolamentata da regolamenti in conformità con le norme e le leggi del Paese.

Ai fini della registrazione del prodotto fitosanitario, parte della documentazione presentata deve essere il rapporto di registrazione dello Stato membro (rapporto di registrazione), che si compone di tre parti:

- a) Valutazione nazionale dello Stato membro in base al quale si richiede il riconoscimento (Parte A);
- b) Sintesi della valutazione dello Stato membro in base al quale viene richiesto il riconoscimento (Parte B);
- c) Dati riservati (Parte C)

Tipi di approvazione secondo la legge di attuazione del regolamento 1107/2009

Approvazioni temporanee - immissione sul mercato di prodotti contenenti un principio attivo non ancora approvato a livello UE ai sensi dell'art. 30 del Regolamento (CE) n. 1107/2009. È necessario presentare la documentazione completa relativa al principio attivo e all'agente. La procedura è stata abbandonata e sarà eseguita solo fino al 14 giugno 2016.

Approvazioni zonali quando la Repubblica di Croazia è uno zRMS: la Repubblica di Croazia, nella zona amministrativa di registrazione meridionale, ha il ruolo di Paese



segnalante (Stato membro relatore zonale - zRMS), che esegue la valutazione della documentazione e la valutazione del rischio per l'intera zona di registrazione. Gli Stati membri interessati (cMS), in cui viene presentata la domanda di registrazione, sono tenuti, dopo aver commentato e armonizzato la valutazione e dopo che lo zRMS ha emesso una decisione sulla registrazione, ad approvare il dispositivo nei rispettivi Paesi (gli Stati membri possono avere requisiti nazionali o possono rifiutare di emettere una decisione sulla registrazione, ma sono tenuti a informarne la Commissione europea).

Approvazioni interzonali quando la Repubblica di Croazia fa parte dello Stato membro relatore (RMS): tutti gli Stati membri rappresentano un'unica zona per l'applicazione dei fondi nelle aree protette (serre, serre), l'applicazione dopo il raccolto o la raccolta, l'applicazione in aree di stoccaggio vuote o aree per lo stoccaggio di piante o prodotti vegetali e per il trattamento delle sementi. Nell'UE, la Repubblica di Croazia svolge il ruolo di relatore interzonale (Stato membro relatore interzonale - izRMS), che valuta la documentazione e i rischi per l'intera Unione europea. Gli Stati membri interessati (cMS), in cui viene presentata la domanda di registrazione, sono tenuti, dopo aver commentato e armonizzato la valutazione e dopo che l'izRMS ha emesso una decisione sulla registrazione, ad approvare il dispositivo nei propri paesi (gli Stati membri possono avere requisiti nazionali o possono rifiutare di emettere una decisione sulla registrazione, ma sono tenuti a informarne la Commissione europea).

Approvazioni zonali quando la Repubblica di Croazia è cMS: la Repubblica di Croazia non valuta la documentazione e la valutazione del rischio, ma ha il diritto di commentare la valutazione effettuata da zRMS o izRMS. Dopo il completamento della valutazione zonale e dopo che zRMS o izRMS hanno emesso una decisione sulla registrazione, cMS ha un termine di 120 giorni per emettere una decisione sulla registrazione del bene (la Repubblica di Croazia può rifiutare di emettere una decisione sulla registrazione, ma è tenuta a informarne la Commissione Europea).

Se il principio attivo, l'antidoto agronomico o il sinergizzante del prodotto provengono da un'altra fonte o dalla stessa fonte con una modifica nel processo produttivo e/o nel luogo di produzione, è richiesta una valutazione di equivalenza, ai sensi dell'art. 38 del Regolamento (CE) n. 1107/2009. La valutazione di equivalenza viene effettuata a



livello UE e, di norma, dal Paese che era il Paese di Riferimento per il principio attivo, ma non di regola. Nella valutazione di equivalenza, vengono valutati i dati sul principio attivo.

Riconoscimento reciproco dell'approvazione - riconoscimento dell'approvazione da parte di un altro Stato membro dell'UE, ai sensi degli articoli 40, 41 e 42 del Regolamento (CE) n. 1107/2009. La procedura di registrazione o approvazione del mezzo nel Paese in cui si richiede il riconoscimento deve essere effettuata ai sensi del Regolamento 1107/2009 o della Direttiva 91/414/CEE. Se il bene non ha superato la procedura zonale, ovvero se è registrato in uno Stato membro ai sensi della Direttiva 91/414/CEE, il richiedente deve presentare i dettagli della valutazione effettuata in tale Paese sotto forma di valutazione nazionale dettagliata o valutazione della parte B del RR o valutazione del documento MIII. Nei casi in cui non vi sia alcuna valutazione nazionale nello Stato membro in base al quale viene effettuato il riconoscimento, la valutazione della documentazione e la valutazione del rischio vengono effettuate sulla base dell'etichetta e della licenza di tale Paese e del documento MIII presentato da tutte le aree. È importante sottolineare che in tali casi non si applica il termine di 120 giorni per il rilascio dell'approvazione.

Estensione dell'approvazione – effettuata a livello zonale ai sensi dell'articolo 43 del regolamento (CE) n. 1107/2009 per l'attività su richiesta del titolare dell'approvazione, se sono soddisfatte le condizioni di cui all'articolo 29 del regolamento (CE) n. 1107/2009, entro 3 mesi dall'estensione dell'approvazione per la sostanza attiva, l'antidoto agronomico o il sinergizzante, che contiene tale agente.

Revoca o modifica dell'approvazione - gli Stati membri possono in qualsiasi momento rivedere l'approvazione e revocarla o modificarla ai sensi dell'articolo 44 del regolamento (CE) n. 1107/2009. L'articolo 45 del regolamento (CE) n. 1107/2009 consente la revoca o la modifica dell'approvazione su richiesta del titolare dell'approvazione, fermo restando che le modifiche possono essere approvate solo se si accerta che i requisiti dell'articolo 29 sono stati rispettati.

Immissione sul mercato di prodotti fitosanitari a basso rischio - ai sensi dell'articolo 47 del Regolamento (CE) n. 1107/2009, quando tutte le sostanze attive contenute in un



prodotto sono sostanze attive a basso rischio ai sensi dell'articolo 22, tale prodotto è approvato come prodotto a basso rischio, se non sono richieste misure speciali di riduzione del rischio in base alla valutazione del rischio. I requisiti per la documentazione necessaria sono meno stringenti ai sensi dell'articolo 47, paragrafo 1, lettere da a) a e).

Valutazione comparativa dei prodotti fitosanitari contenenti sostanze candidate alla sostituzione: viene effettuata per i prodotti contenenti sostanze attive identificate come candidate alla sostituzione. Sebbene la valutazione comparativa venga effettuata a livello nazionale, non è ancora stata effettuata nella Repubblica di Croazia, in quanto sono in fase di elaborazione le linee guida per il Paese.

Estensione dell'autorizzazione per usi minori - ai sensi dell'articolo 51 del Regolamento (CE) n. 1107/2009, il titolare dell'autorizzazione, gli organismi ufficiali o scientifici impegnati in attività agricole, le associazioni professionali agricole o gli utilizzatori professionali possono richiedere che l'autorizzazione per il prodotto, già approvata nella Repubblica di Croazia, venga estesa a usi minori non ancora coperti da tale autorizzazione. L'estensione può essere approvata sotto forma di modifica di un'autorizzazione già esistente o di un'autorizzazione separata, secondo la procedura amministrativa della Repubblica di Croazia. È possibile estendere l'autorizzazione per usi minori mediante mutuo riconoscimento, a condizione che il prodotto fitosanitario in questione sia autorizzato in tale Stato membro. Gli Stati membri autorizzano tali usi conformemente alle disposizioni dell'articolo 41, a condizione che tali usi siano considerati minori anche negli Stati membri in cui viene presentata la richiesta.

L'autorizzazione per il commercio parallelo, ai sensi dell'articolo 52 del Regolamento (CE) n. 1107/2009, viene rilasciata per l'importazione e l'immissione sul mercato di un prodotto nella Repubblica di Croazia, se la composizione di tale prodotto è identica a quella di un prodotto di riferimento già approvato nella Repubblica di Croazia. La valutazione dell'identità del farmaco viene effettuata in base ai dati sulla composizione del farmaco e ad altri dati ottenuti dall'amministrazione competente del Paese dell'UE da cui il farmaco viene importato nella Repubblica di Croazia.



Autorizzazione in situazioni di emergenza - ai sensi dell'articolo 53 del Regolamento (CE) n. 1107/2009, può essere approvata, per un periodo massimo di 120 giorni, l'immissione sul mercato di prodotti fitosanitari per uso limitato e controllato, qualora tali misure si rivelino necessarie a causa di un pericolo che non può essere contenuto in altro modo soddisfacente. È necessario informare la Commissione Europea di quanto sopra.

Licenza per ricerca e sviluppo - ai sensi dell'articolo 54 del Regolamento (CE) n. 1107/2009, viene rilasciata per attività di ricerca o sviluppo in cui viene rilasciato nell'ambiente o utilizzato un agente non approvato, se lo Stato membro sul cui territorio saranno condotti la ricerca o gli esperimenti ha valutato i dati disponibili. Le quantità e le aree di trattamento possono essere limitate e possono essere prescritte condizioni aggiuntive per prevenire effetti negativi sulla salute umana e animale o effetti inaccettabili sull'ambiente. Viene rilasciata solo a livello nazionale.

L'immissione sul mercato e l'uso dei mezzi ausiliari - ai sensi dell'articolo 58 del regolamento (CE) n. 1107/2009 - vengono effettuati nonché la procedura di approvazione dei fondi tramite la procedura zonale.

Valutazione della documentazione e valutazione del rischio per area

HAPIH – Centro per la protezione delle piante svolge attività di valutazione della documentazione e di valutazione del rischio nei seguenti ambiti:

- l'identità delle sostanze attive e degli agenti fitosanitari,
- metodi analitici,
- efficacia dei prodotti fitosanitari,
- residui di pesticidi negli alimenti,
- comportamento nell'ambiente,
- ecotossicologia,
- esposizione degli applicatori, dei lavoratori e delle altre persone presenti.
- coordinamento tecnico, redazione di relazioni e pareri di esperti



L'Organizzazione Europea e Mediterranea per la Protezione delle Piante (EPPO) ha suddiviso le zone agroclimatiche in Europa, Mediterraneo ed Eurasia. Queste zone sono state create per lo scambio internazionale di dati sull'efficacia e la fitotossicità dei prodotti fitosanitari. Secondo la divisione EPPO, sono state istituite 4 zone agroclimatiche:

1. Area mediterranea,
2. Aree marine,
3. Zona nord-est,
4. Zona sud-est.

La zona mediterranea comprende paesi o parti di paesi che si affacciano sul Mar Mediterraneo, tra cui Giordania, Macedonia e Portogallo.

La zona marittima si estende a nord della costa sud-occidentale della Francia, passando per Lione fino al confine meridionale con Svizzera e Austria, a ovest fino al confine con Austria e Ungheria, più a ovest del confine tra Repubblica Ceca e Slovacchia, a ovest del fiume Oder (confine tra Polonia e Germania). Questa zona comprende anche l'intero territorio di Irlanda, Svezia e Regno Unito.

La zona nord-orientale comprende i paesi e le regioni a est del fiume Oder (confine tra Polonia e Germania), a nord del confine tra Repubblica Ceca e Polonia, a ovest del confine tra Polonia e Ucraina, a nord del confine tra Ucraina e Bielorussia, e la Russia a nord del 50° di latitudine.

La zona sud-orientale comprende Bulgaria, Ungheria, Serbia, Moldavia, Romania, Russia a sud di 50° di latitudine, Ucraina, Slovacchia, Slovenia, Croazia, Bosnia-Erzegovina, Montenegro e Turchia, ad eccezione delle zone costiere del Mediterraneo. Queste aree presentano caratteristiche climatiche diverse rispetto alle zone in cui sono classificati i paesi. In alcuni stati membri, ad esempio in Francia e Croazia, queste differenze sono particolarmente pronunciate. I dati di efficienza di una zona possono essere considerati accettabili in un'altra zona se le condizioni agricole, ambientali, climatiche e di altro tipo sono comparabili (Manuale per la manipolazione e l'applicazione sicure dei prodotti fitosanitari, Ministero dell'Agricoltura 2014).



Valutazione della documentazione in materia di residui di pesticidi negli alimenti

Applicando agenti fitosanitari (pesticidi) a piante trattate, prodotti di origine vegetale e/o animale, permangono residui di sostanze attive e/o metaboliti che possono avere effetti nocivi sulla salute umana e animale. Il rispetto delle dosi di applicazione prescritte, del numero e delle modalità di trattamento, il rispetto del periodo di sospensione e l'applicazione solo su colture per le quali il prodotto fitosanitario è approvato, determineranno se i residui saranno conformi alle quantità massime ammissibili di residui di pesticidi (MDK) o se saranno presenti negli alimenti in concentrazioni non consentite che possono potenzialmente mettere a repentaglio la salute dei consumatori, in particolare di gruppi sensibili come bambini, donne in gravidanza, malati e anziani.

L'uso di prodotti fitosanitari comporta una possibile esposizione ai residui, sia direttamente che indirettamente. Dopo l'uso di SZB, i residui possono rimanere sulle/nelle colture e nei prodotti immagazzinati. Tali colture/prodotti sono utilizzati direttamente per il consumo umano o servono come materia prima per alimenti e bevande. L'esposizione attraverso l'acqua potabile può verificarsi attraverso il contatto con le acque superficiali durante l'applicazione o quando i pesticidi (o i loro metaboliti) vengono dilavati nelle falde acquifere.

Indirettamente, i residui nelle colture trattate destinate all'alimentazione animale possono portare al trasferimento di residui a/su prodotti animali destinati al consumo umano (come carne, uova e latte). Sono necessari dati sui residui di SZB (prodotti fitosanitari) per poterne valutare la "natura" e la quantità. I residui possono formarsi quando gli SZB vengono applicati a/in colture agricole (destinate in tutto o in parte al consumo); colture che (possono) essere utilizzate per l'alimentazione del bestiame (residui nei prodotti animali); colture che seguono nello stesso campo le colture trattate per trasferimento dal terreno (la coltura successiva nella rotazione colturale); alimenti immagazzinati o materie prime di prodotti alimentari; acqua potabile (attraverso la dispersione di pesticidi nei corsi d'acqua o la lisciviazione degli SZB nelle falde acquifere).



Tutte le indagini sui residui devono essere supportate da metodi analitici convalidati e studi sulla stabilità dei residui durante la conservazione.

Sulla base dei dati del "pacchetto residui" sui residui negli alimenti di origine vegetale e animale e nei prodotti trasformati (dati sulla ricerca sul metabolismo nelle piante e negli animali domestici, ricerca sui residui mediante il modello di alimentazione degli animali domestici (ANIMOD), ricerca necessaria sui residui effettuata in conformità con la domanda proposta, ricerca sui residui di pesticidi nella rotazione delle colture, ricerca durante la lavorazione del prodotto (impostazione del fattore di trasferimento), ricerca sui residui di sostanze attive e/o metaboliti nel miele) vengono ottenuti i dati sui residui dell'agente e delle sostanze attive necessari per la valutazione nell'ambito dei residui.

La documentazione di valutazione nel campo dei residui viene effettuata in conformità alle linee guida dell'UE:

La documentazione nel campo dei residui di pesticidi nei/sui prodotti trattati, negli alimenti e nei mangimi è necessaria per poter valutare il rischio per la salute delle persone, di tutte le fasce d'età, derivante dall'ingestione di residui di prodotto negli alimenti di origine vegetale e/o animale.

Anche le caratteristiche climatiche e i fattori meteorologici influenzano i residui di pesticidi nei prodotti trattati e nel terreno. La stessa quantità di pesticida applicata e lo stesso numero di trattamenti possono determinare concentrazioni diverse di residui di pesticidi a causa delle differenze agroclimatiche.

Uno dei parametri significativi che influenzano il comportamento dei residui è la differenza climatica tra le aree di produzione. Secondo la Direttiva SANTE/2019/12752, l'Europa è divisa in due zone ai fini della valutazione dei residui dopo l'applicazione dell'agente in campo aperto:

1. Zona settentrionale – Europa settentrionale e centrale, che comprende Svezia, Norvegia, Islanda, Finlandia, Danimarca, Regno Unito, Irlanda, Francia settentrionale, Belgio, Paesi Bassi, Lussemburgo, Germania, Polonia, Repubblica Ceca, Slovacchia, Austria, Ungheria, Svizzera, Estonia, Lettonia, Lituania, Romania e Slovenia e



2. Zona meridionale – Europa meridionale e Mediterraneo, che comprende Spagna, Portogallo, Francia meridionale, Italia, Grecia, Malta, Croazia, Serbia, Bosnia ed Erzegovina, Macedonia, Montenegro, Kosovo, Albania, Turchia, Bulgaria e Cipro.

Il sistema zonale di registrazione dei prodotti fitosanitari provenienti dall'area dei residui è suddiviso in due zone

- Europa settentrionale e centrale
- Europa meridionale e Mediterraneo

Per gli usi in aree protette (serre, serre) e per gli usi successivi al raccolto, si applica una zona specifica. Ciò significa che, ai fini della registrazione dei prodotti fitosanitari, gli studi sui residui di pesticidi possono essere condotti in qualsiasi zona, poiché le condizioni sono controllate.

Livelli massimi di residui (LMR)

Per dimostrare che l'applicazione richiesta del prodotto è conforme ai regolamenti UE sugli LMR, è necessario fare riferimento alla valutazione degli studi sui residui a livello UE o presentare studi di ricerca sui residui dopo l'applicazione proposta. Gli studi presentati devono dimostrare che l'applicazione proposta dell'agente non comporterà il superamento del valore LMR. Il calcolo dei valori LMR viene effettuato in conformità con le linee guida dell'OCSE per il calcolatore degli LMR. Con l'obiettivo di armonizzare il calcolo dei valori limite massimi di residui (LMR) nell'Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico, l'OCSE ha sviluppato il calcolatore degli LMR (<https://www.epa.gov/pesticide-tolerances/oecd-maximum-residue-limit-calculator>).

I valori LMR sono prescritti dalla Legge di attuazione del Regolamento (CE) n. 396/2005 sui livelli massimi di residui di pesticidi negli e sugli alimenti e mangimi di origine vegetale e animale (Gazzetta Ufficiale 80/13), che per l'applicazione proposta del prodotto è armonizzata con il Regolamento della Commissione Europea n. 396/2005 e le relative modifiche.

Ai sensi del Regolamento (CE) n. 396/2005, i livelli massimi di residui (LMR) rappresentano i livelli massimi di residui di pesticidi legalmente consentiti negli o sugli alimenti o mangimi, sulla base delle buone pratiche agricole (GAP) e della minima



esposizione necessaria per proteggere i consumatori vulnerabili. Tali livelli vengono stabiliti dopo una valutazione completa delle proprietà del principio attivo e dell'uso previsto del pesticida. Queste restrizioni legali si applicano anche agli alimenti importati, definiti come "tolleranze all'importazione" per soddisfare le esigenze del commercio internazionale.

Prima di stabilire o modificare gli LMR (ad esempio, quando un richiedente richiede l'autorizzazione di un nuovo prodotto fitosanitario), l'EFSA valuta il comportamento dei residui di pesticidi e i possibili rischi per la salute dei consumatori derivanti dai residui negli alimenti. Se la valutazione del rischio dell'EFSA non individua rischi inaccettabili per i consumatori, vengono stabiliti LMR in linea con quelli dell'UE (LMR della banca dati UE sui pesticidi) e il prodotto fitosanitario può essere approvato.

Valutazione dell'esposizione alimentare cronica e acuta

La Repubblica di Croazia non dispone di un proprio modello nutrizionale nazionale; la valutazione del rischio durante la registrazione del prodotto viene effettuata utilizzando il modello "PRIMo" dell'EFSA (rev3.1) (modello di assunzione di residui di pesticidi <http://www.efsa.europa.eu/en/mrls/mrlteam.htm>).

Nella valutazione del rischio per l'uomo, dovuto all'esposizione a residui di pesticidi attraverso il consumo di alimenti, i dati sui residui di agenti fitosanitari vengono confrontati con i valori di riferimento tossicologici della Dose Giornaliera Accettabile (DGA) e della Dose Acuta di Riferimento (DARf). Dal punto di vista della sicurezza alimentare, un determinato tipo di alimento è considerato sicuro per i consumatori se l'assunzione stimata della sostanza nociva non supera il valore della DGA o della DARf.

La valutazione del rischio per i consumatori viene effettuata dal modello "PRIMo" rev3.1. (Eng. Pesticide Residue Intake Model) dell'EFSA nell'ambito della valutazione della documentazione, ovvero ai fini della registrazione del bene, nell'ambito del Programma nazionale di monitoraggio dei residui attuato dal Ministero della Salute e ai fini della valutazione iniziale del rischio per il sistema RASFF.

Valutazione del rischio cumulativo



Vi è una crescente necessità di affrontare i potenziali rischi derivanti dall'esposizione combinata a più residui di pesticidi nella dieta. Le prove disponibili suggeriscono che il problema principale sia l'aggiunta di dosi di composti che agiscono con la stessa modalità d'azione. I rischi per i consumatori derivanti dalla presenza di residui di pesticidi negli alimenti sono attualmente valutati sostanza per sostanza. Tuttavia, molti pesticidi hanno effetti simili e i loro effetti sulla salute umana possono essere maggiori se combinati piuttosto che presi singolarmente.

Valutazione della documentazione nel campo del comportamento ambientale

I Regolamenti (UE) n. 545/2011 e 284/2013 stabiliscono i requisiti relativi alla presentazione dei dati necessari sui prodotti fitosanitari, in conformità al Regolamento (CE) n. 1107/2009. Le informazioni fornite sul prodotto fitosanitario, insieme ad altre informazioni essenziali, nonché le informazioni fornite sulla sostanza attiva, devono essere sufficienti a consentire la valutazione del comportamento del prodotto nell'ambiente. Tutte le informazioni pertinenti sul prodotto fitosanitario e sulla sostanza attiva devono essere prese in considerazione per la valutazione delle concentrazioni ambientali previste (PEC).

In conformità con il documento Comunicazione della Commissione nell'ambito dell'attuazione del regolamento (UE) n. 284/2013 della Commissione del 1° marzo 2013 (2013/C 95/02), viene elaborata la metodologia per condurre ricerche sul comportamento degli agenti e delle sostanze attive nell'ambiente e sono disponibili tutte le informazioni necessarie sulle linee guida.

Regolamenti (UE) n. 544/2011 e 283/2013, i requisiti relativi alla fornitura dei dati necessari sulle sostanze attive, in conformità al Regolamento (CE) n. 1107/2009. Le informazioni fornite sulla sostanza attiva devono essere sufficienti per indagare il comportamento della sostanza attiva nell'ambiente (ad esempio, vengono valutate la modalità e la velocità di degradazione nel suolo, la mobilità nel suolo, la via e la velocità di degradazione nei sistemi idrici).

Valutazione della documentazione nel campo dell'ecotossicologia

Ai fini della registrazione dei prodotti fitosanitari nel campo dell'ecotossicologia, è necessario presentare



- valutazione del rischio per gli uccelli, che dovrebbe essere effettuata secondo le linee guida dell'EFSA sulla valutazione del rischio per uccelli e mammiferi, EFSA-Q-2009-00223;

- la valutazione del rischio per i mammiferi deve essere effettuata secondo le linee guida dell'EFSA sulla valutazione del rischio per uccelli e mammiferi, EFSA-Q-2009-00223.

- valutazione del rischio per gli organismi acquatici. Per le domande presentate prima del 1° gennaio 2015, la valutazione del rischio per gli organismi acquatici deve essere effettuata secondo le linee guida SANCO/3268/2001 rev 4. (definitiva) del 17 ottobre 2002. Per le domande presentate dopo il 1° gennaio 2015, l'EFSA ha preparato la prima delle tre nuove linee guida per gli organismi acquatici: Guida alla valutazione del rischio a più livelli per i prodotti fitosanitari per gli organismi acquatici nelle acque superficiali di bordo campo (EFSA Journal 2013;11(7):3290).

- valutazione del rischio per le api secondo le linee guida attualmente in vigore SANCO/10329/2002 rev 2 definitivo 17 ottobre 2002. Nel caso in cui gli studi utilizzati nella valutazione del rischio di livello superiore siano stati condotti in condizioni di campo o semi-campo, l'esposizione in tali studi dovrebbe essere conforme alle BPA proposte per la Repubblica di Croazia.

- valutazione del rischio per gli artropodi non bersaglio secondo le linee guida ESCORT 2 e SANCO/10329/2002 rev 2 final del 17 ottobre 2002 attualmente in vigore.

La valutazione del rischio viene effettuata per la fauna di artropodi non bersaglio che si trovano "sul campo" e "fuori dal campo".

Nel caso in cui la valutazione del rischio dimostri che esiste un rischio per gli artropodi non bersaglio "sul campo", è necessario presentare studi che dimostrino il recupero della fauna degli artropodi non bersaglio "sul campo".

Nel caso in cui la valutazione del rischio evidenzi un rischio per gli artropodi non bersaglio "fuori dal campo", è necessario adottare misure di riduzione del rischio.

- valutazione del rischio per i lombrichi e i microrganismi nel suolo secondo le linee guida attualmente in vigore SANCO/10329/2002 rev 2 definitivo 17 ottobre 2002.



- valutazione del rischio per le piante non bersaglio secondo le linee guida attualmente in vigore SANCO/10329/2002 rev 2 definitivo 17 ottobre 2002.

Valutazione della documentazione nel campo della tossicologia

L'Istituto per la ricerca medica e la medicina del lavoro (IMI), insieme al Centro per la protezione delle piante (HAPIH), esegue la valutazione della documentazione e la stima dei rischi nei seguenti ambiti:

- Tossicologia dei mammiferi,
- Esposizione degli applicatori, dei lavoratori e delle altre persone presenti
- Coordinamento tecnico, redazione di relazioni e pareri di esperti

La classificazione e l'etichettatura dell'agente vengono effettuate sulla base dei risultati di studi di tossicità acuta orale, cutanea e inalatoria, irritazione oculare, irritazione e ipersensibilità cutanea, secondo i criteri specificati nell'Allegato I del Regolamento (CE) 1272/2008 o secondo le tabelle di traduzione dell'Allegato VII dello stesso Regolamento. In sede di etichettatura, si devono tenere in considerazione anche le etichette di avvertenza trasferite al prodotto in base alle proprietà tossicologiche del principio attivo e/o degli additivi nella formulazione, reperibili nell'Allegato VI del Regolamento o nella banca dati C&L Inventory sul sito web dell'ECHA. Per tutti i principi attivi e tutti gli additivi nella formulazione, è necessario presentare schede di dati di sicurezza in inglese, in conformità all'Allegato II del Regolamento (CE) 1907/2006 (Regolamento REACH), e per gli agenti fitosanitari è possibile presentare anche la scheda di dati di sicurezza e tecnica in lingua croata e approvata dall'Istituto croato di tossicologia, se già predisposta.

Dal 1° giugno 2015, i prodotti fitosanitari devono essere classificati ed etichettati secondo il Regolamento (CE) 1272/2008, che deve essere indicato sulla proposta di etichetta al momento della domanda di registrazione del prodotto. Sebbene il Regolamento (CE) 1272/2008, insieme alle prime due modifiche (Adeguamento al Progresso Tecnico - ATP), sia stato trasferito all'Ordinanza sulla classificazione, marcatura, etichettatura e imballaggio delle sostanze chimiche pericolose (Gazzetta Ufficiale 64/11, 137/11, 71/12), con l'adesione della Croazia all'UE, ulteriori integrazioni



e modifiche non saranno più trasmesse sotto forma di Ordinanza, poiché dal 1° luglio 2013 l'Ordinanza è direttamente applicabile nella Repubblica di Croazia. Tutte le modifiche al Regolamento sono disponibili sul sito web dell'Agenzia europea per le sostanze chimiche (ECHA).

La valutazione della documentazione dei prodotti fitosanitari provenienti dal campo della tossicologia si basa sulla valutazione delle proprietà tossicologiche del principio attivo e dei coformulanti in conformità ai requisiti prescritti da:

Regolamento (CE) n. 1107/2009; Regolamento (CE) n. 1272/2008 - classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche; Conclusioni dell'EFSA (revisione paritaria); Sicurezza - scheda tecnica (STL/MSDS); Autorizzazioni ed etichette dello Stato membro interessato.

Approvazione delle sostanze attive

L'Agenzia europea per le sostanze chimiche (ECHA), con sede in Finlandia, è responsabile dell'uso sicuro delle sostanze chimiche da parte di tutti i soggetti coinvolti nel processo (ambiente, consumatori, lavoratori, aziende, ecc.). L'ECHA applica la legislazione dell'UE in materia di sostanze chimiche, garantisce la competitività dell'industria chimica europea e l'innovazione, assicurando al contempo indipendenza, trasparenza e solidità scientifica nel processo decisionale politico.

Le sostanze attive sono ancora approvate a livello dell'Unione Europea. L'industria prepara gli studi necessari per la preparazione della documentazione e seleziona un Paese segnalante che rappresenti l'azienda presso la Commissione Europea e l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA), che esegue la valutazione del rischio in tutti gli ambiti pertinenti, e la Commissione Europea e gli Stati membri, attraverso i loro rappresentanti nel Comitato Permanente per la Catena Alimentare e la Salute Animale - Prodotti Fitosanitari - Legislazione, discutono e prendono decisioni sull'approvazione delle sostanze attive a maggioranza qualificata. Le sostanze attive sono spesso approvate per un periodo fino a dieci anni e sono soggette a rivalutazione periodica; in caso di nuove conoscenze scientifiche, sono soggette a rivalutazione anche prima della scadenza del periodo di approvazione. Il prerequisito per la



presentazione di una domanda di registrazione è che la sostanza attiva contenuta nel prodotto fitosanitario sia approvata a livello dell'Unione Europea.

Valutazioni di principi attivi a livello UE, in cui la Repubblica di Croazia è lo Stato membro relatore (Stato membro di riferimento RMS) e, in collaborazione con l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA), effettua una valutazione del rischio nel processo di approvazione o riapprovazione del principio attivo, mentre la Commissione europea svolge un ruolo di gestione del rischio nella procedura e prende la decisione finale sull'approvazione di un singolo principio attivo a livello UE. I compiti di valutazione del rischio per la valutazione del principio attivo includono la valutazione della documentazione in materia di efficacia, residui, proprietà ecotossicologiche, comportamento nell'ambiente, metodi analitici, proprietà fisico-chimiche, tossicologia ed esposizione degli utilizzatori secondo principi univoci, laddove sia necessario garantire un elevato livello di protezione della salute umana e animale e dell'ambiente.

Interferenti endocrini (EDS) e biocidi

Gli interferenti endocrini (interferenti ormonali) sono sostanze naturali e chimiche che possono alterare le funzioni del sistema ormonale negli esseri umani e negli animali e quindi influire negativamente sulla loro salute.

Nel 2002, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha definito un disruptor endocrino come una sostanza o una miscela che modifica la/le funzione/i del sistema endocrino e di conseguenza provoca effetti negativi sulla salute di un organismo intatto, della sua prole o delle (sotto)popolazioni.

L'UE si occupa da anni del problema degli interferenti endocrini attraverso normative in settori quali la salute umana (inclusi consumatori e lavoratori), la salute animale, gli alimenti e i mangimi e l'ambiente.

Le agenzie di regolamentazione dell'UE, i comitati scientifici indipendenti, la Commissione e gli Stati membri si occupano già di interferenti endocrini regolamentati da normative settoriali in settori quali la salute umana (compresa la salute dei consumatori e dei lavoratori), la salute animale e l'ambiente. Tra gli esempi figurano la legislazione UE in materia di sicurezza e salute sul lavoro (dove la legislazione sugli agenti chimici sul lavoro include tutti gli agenti chimici, compresi gli interferenti



endocrini), la sicurezza degli alimenti e dei mangimi (dove i rischi tossicologici, compresi quelli derivanti dagli interferenti endocrini, sono soggetti a una valutazione completa del rischio) e i prodotti di consumo (tra cui, ad esempio, cosmetici e giocattoli, REACH), nonché la legislazione ambientale. In base al Regolamento (UE) n. 528/2012 sui biocidi, i principi attivi considerati in grado di interferire con il funzionamento del sistema endocrino non saranno approvati, a meno che non si determini che il rischio di esposizione al principio attivo è trascurabile o che vi siano prove che il principio attivo sia necessario per la soppressione o il controllo di un grave pericolo per la salute umana e animale e per l'ambiente. La Commissione europea ha chiesto all'ECHA e all'Agenzia europea per la sicurezza alimentare (EFSA) di elaborare, con il supporto del Centro comune di ricerca (JRC), linee guida congiunte sull'applicazione di criteri basati sul pericolo per l'identificazione degli interferenti endocrini nel contesto del regolamento (CE) n. 1107/2009 sui prodotti fitosanitari e del regolamento (UE) n. 528/2012 sui biocidi, che sono state pubblicate nella Gazzetta ufficiale dell'EFSA.

Biocidi

I prodotti biocidi (Figura 1.27) sono sostanze e miscele, preparate nella forma in cui vengono consegnate all'utilizzatore, che contengono una o più sostanze attive, il cui scopo è distruggere, scoraggiare, rendere innocuo, impedire l'azione di o controllare chimicamente o biologicamente qualsiasi organismo nocivo.



Figura 1.27 Biocidi nella protezione delle piante



I biocidi e i prodotti fitosanitari sono pesticidi. I biocidi sono utilizzati nell'igiene pubblica (DDD - disinfezione, disinfestazione, derattizzazione), per mantenere l'igiene personale, per proteggere i materiali (ad esempio, le pareti delle case da funghi e altri parassiti, le barche da sanguisughe o alghe, il legno da vari parassiti, ecc.) e in molti altri ambiti (ad esempio, per distruggere pesci, uccelli, ecc. nocivi).

Nel nostro Paese questo settore è regolamentato dal Regolamento europeo sui biocidi.

I prodotti biocidi possono contenere anche altri additivi comuni inattivi che ne garantiscono l'efficacia, nonché il pH, la viscosità, il colore e l'odore desiderati del prodotto finale. I prodotti biocidi sono disponibili sul mercato per le esigenze di consumatori professionali e/o non professionali (Wittmer IK et al.; (2011), Christensen FM et al.; Scher, et al., 2012).

L'ordinanza sulla documentazione per la valutazione del principio attivo nei preparati biocidi, sulla documentazione per la valutazione dei preparati biocidi, sulle procedure per la valutazione dei preparati biocidi e del loro impiego, nonché sui tipi di preparati biocidi con le relative descrizioni e i principi univoci per la valutazione dei preparati biocidi prescrive la documentazione per la valutazione del principio attivo nei preparati biocidi, sulla documentazione per la valutazione dei preparati biocidi, sulla procedura per la valutazione dei preparati biocidi e del loro impiego, nonché sui tipi di preparati biocidi, sulle relative descrizioni e sui principi univoci per la valutazione dei preparati biocidi.

Procedura di valutazione dei prodotti biocidi

L'organismo di valutazione competente valuta la documentazione, predispone la bozza del Rapporto di Valutazione e le conclusioni della valutazione. La bozza del Rapporto di Valutazione viene inviata al richiedente entro 30 giorni per la presentazione di note scritte.

La relazione di valutazione e il riepilogo delle proprietà del prodotto vengono inviati alla valutazione degli esperti del Comitato per i biocidi (OBP). Il Comitato per i biocidi ha 180 giorni di tempo per emettere un parere basato sulla valutazione degli esperti e presentarlo alla Commissione. La Commissione decide in merito all'approvazione del biocida nell'Unione (Figura 1.28).

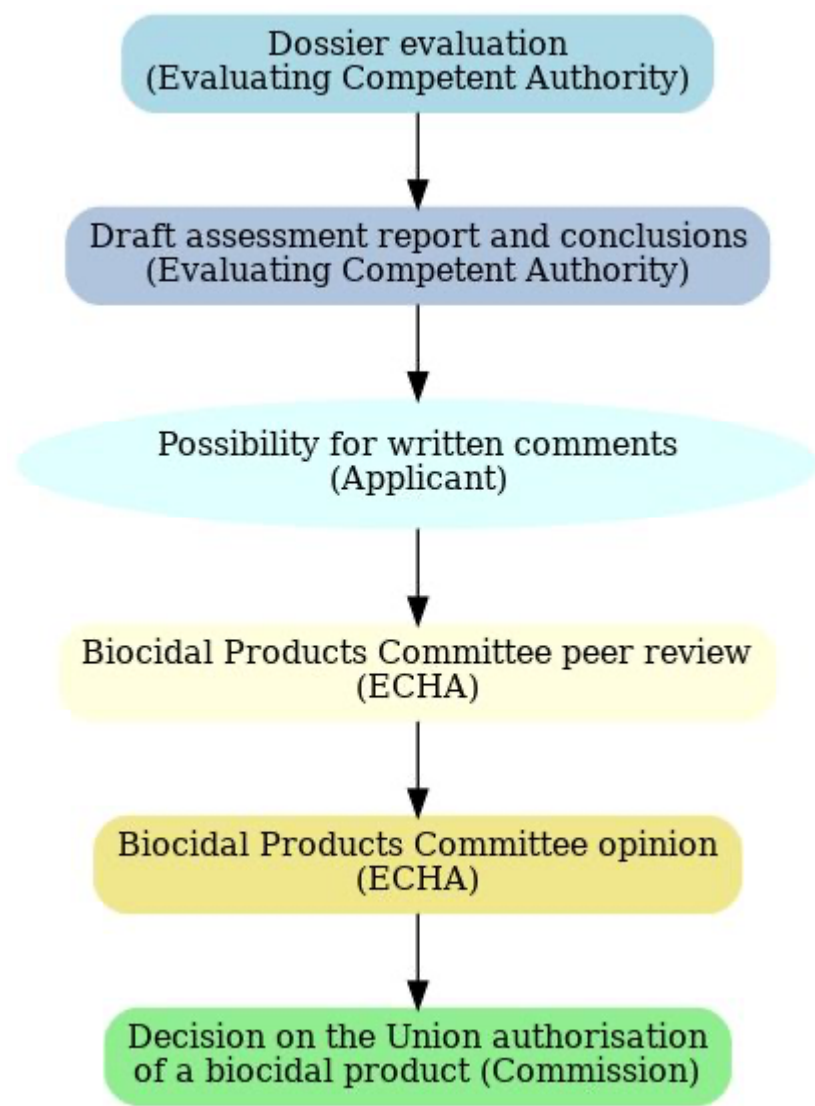


Figura 1.28 Panoramica del processo di valutazione della documentazione sui prodotti biocidi

Le richieste di approvazione di un biocida vengono presentate tramite il sistema R4BP 3 (Registro per i biocidi), così come tutte le altre richieste basate sul Regolamento sui biocidi equivalenti (BPR). I requisiti per l'iscrizione nel registro e l'immissione sul mercato di preparati biocidi, per i biocidi contenenti principi attivi elencati al paragrafo 2 dell'articolo 89 del Regolamento (UE) n. 528/2012, vengono presentati tramite il modulo web.

Dal 1° settembre 2015 i prodotti biocidi non possono essere immessi sul mercato se il produttore o l'importatore del principio attivo contenuto nel prodotto o, se necessario,



l'importatore del prodotto biocida non è incluso nell'elenco tenuto dall'Agenzia europea per le sostanze chimiche (ECHA).

Tutte le decisioni prese in conformità alla legge sui biocidi (Gazzetta Ufficiale 63/07, 35/08, 56/10) cessano di essere valide per quanto riguarda la data di approvazione di una sostanza attiva specifica per un tipo specifico di prodotto e la disapprovazione di una sostanza attiva secondo le modalità specificate nell'articolo 89 del regolamento (UE) n. 528/2012.

La procedura di registrazione dei prodotti fitosanitari nella Repubblica di Croazia è la stessa di quella degli altri membri dell'Unione Europea e, al fine di ridurre gli oneri amministrativi, è stato introdotto un sistema di registrazione zonale. A tal fine, vengono applicati principi decisionali unici e numerose linee guida dell'UE e standard di organizzazioni internazionali. La documentazione dei prodotti fitosanitari deve essere effettuata secondo linee guida, standard e protocolli appropriati (GLP, GEP, OCSE, FAO, EPPO e altri). La valutazione del rischio e la documentazione valutata costituiscono la base scientifico-professionale per decidere in merito alla registrazione o all'approvazione dei singoli prodotti fitosanitari.

Tutti i prodotti fitosanitari registrati in Croazia possono essere trovati nel motore di ricerca dei prodotti registrati sul sito web del Ministero dell'Agricoltura.

Registrando un prodotto fitosanitario si riduce il rischio per la salute umana, animale e ambientale e si incoraggiano misure integrate e alternative per controllare organismi nocivi, malattie delle piante ed erbe infestanti.

Ai fini della registrazione di un prodotto fitosanitario nella Repubblica di Croazia, è necessario presentare tutti gli studi necessari, in conformità con le Linee Guida e le Leggi prescritte, svolti nella zona meridionale dell'UE, in base ai quali il prodotto fitosanitario potrebbe essere approvato, poiché senza studi svolti nella zona meridionale dell'UE non è possibile affermare se il prodotto comporti rischi per la salute di bambini e adulti.



1.2 FITOREMEDIAZIONE DEI METALLI PESANTI NEI SUOLI

La fitorimediazione è una strategia di biorisanamento che prevede l'utilizzo di piante, alghe o funghi viventi per mitigare la contaminazione ambientale, in particolare riducendo la concentrazione di inquinanti come metalli pesanti, composti organici o radionuclidi nel suolo, nell'acqua o nell'aria (Figura 1.29). Questo processo è guidato dalla capacità naturale di piante e microrganismi di assorbire, trasformare o sequestrare questi inquinanti, facilitandone la detossificazione e promuovendo il ripristino ambientale. L'uso della fitorimediazione come soluzione sostenibile ed economica per la bonifica di siti contaminati ha ricevuto notevole attenzione negli ultimi decenni (Vangronsveld, 2009).

Il termine "fitorimedio" deriva dal greco phytos (pianta) e dal latino remedium (trattare o guarire). Il processo comprende diversi meccanismi attraverso i quali le piante, in collaborazione con i microrganismi associati alle radici, svolgono un ruolo chiave nell'isolamento, nel trasporto, nella detossificazione e nella mineralizzazione degli inquinanti presenti nel suolo (Prasad, 2003).

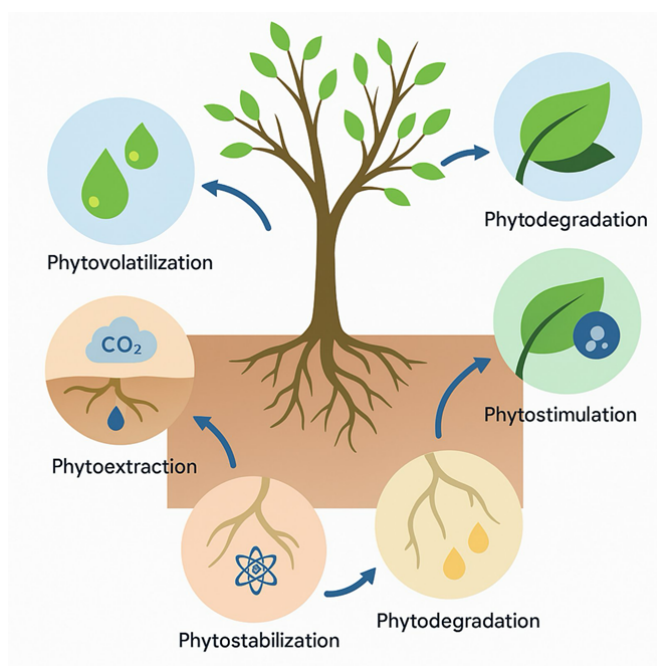


Figura 1.29 Tipi di fitodepurazione



METODI DI FITOREMEDIAZIONE

La bonifica del suolo contaminato da metalli pesanti può essere effettuata con vari metodi:

FISICO-Lisciviazione del suolo

CHIMICO-Biorimediazione

BIOLOGICO-Biorimediazione

Esempi di questi metodi (Figura 1.30) includono la fitorisanamento, la stabilizzazione, la rizofiltrazione, la fitovolatilizzazione e vari metodi di lisciviazione del suolo (Vangronsveld, 2009).

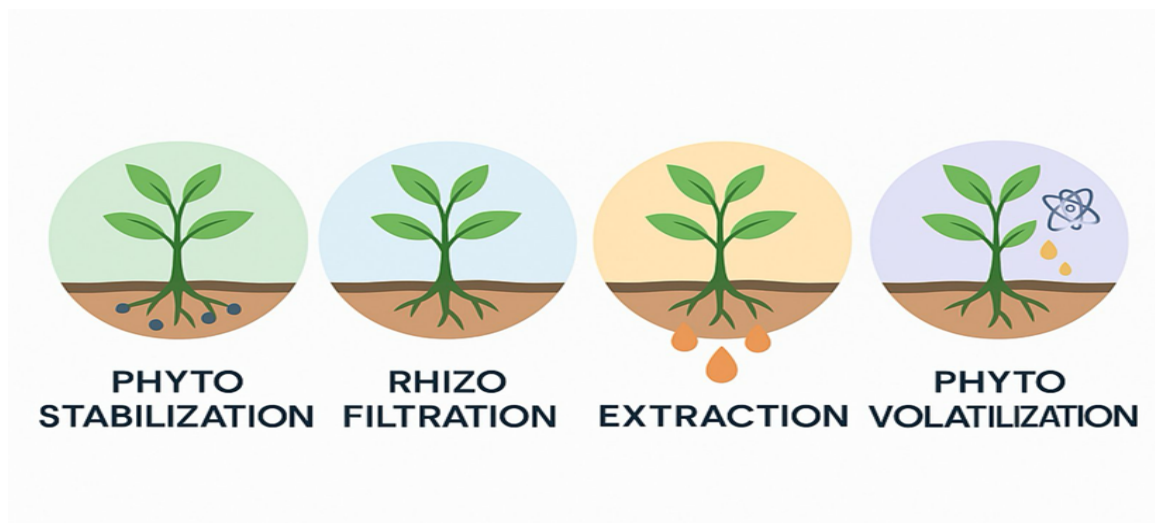


Figura 1.30 Metodi di fitodepurazione

La fitodepurazione utilizza piante, alghe e funghi per rimuovere, ridurre o trasformare gli inquinanti (Küpper, 2007).

I meccanismi di base della fitodepurazione includono:

1. Fitoproliferaazione

Processo mediante il quale le piante crescono in ambienti contaminati, in particolare terreni o acque inquinati, e assorbono gli inquinanti attraverso le radici. Questo processo coinvolge la capacità naturale delle piante di tollerare e accumulare inquinanti, come metalli pesanti, composti organici e altre sostanze tossiche,



dall'ambiente. A differenza dei meccanismi che comportano l'immobilizzazione o la stabilizzazione degli inquinanti (come la fitorizostasi), la fitoproliferazione si concentra sull'assorbimento attivo dei contaminanti da parte delle piante durante la crescita. Questo la rende una componente chiave delle strategie di fitorimediale volte a bonificare i siti inquinati utilizzando i meccanismi fisiologici intrinseci delle piante per assorbire e potenzialmente detossificare gli inquinanti (Cheng, 2002).

La fitoproliferazione può essere particolarmente utile in ambienti con livelli di inquinamento da moderati ad alti e dove altri metodi di bonifica, come i trattamenti chimici o la rimozione fisica, risultano troppo costosi o non praticabili. Attraverso questo processo, le piante possono contribuire a migliorare la qualità del suolo o dell'acqua, rendendolo un'opzione sostenibile ed ecologica per la gestione dei siti contaminati.

Meccanismi di fitoproliferazione:

La fitoproliferazione è guidata da diversi meccanismi chiave attraverso i quali le piante assorbono e accumulano inquinanti dall'ambiente circostante. Questi meccanismi sono spesso interconnessi e possono variare a seconda del tipo di inquinante, della specie vegetale e delle condizioni ambientali. I principali meccanismi coinvolti nella fitoproliferazione includono: assorbimento e traslocazione degli inquinanti da parte delle radici, bioaccumulo di metalli e inquinanti, fitorisanamento degli inquinanti organici, aumento della crescita e dell'espansione delle radici nei suoli inquinati, interazioni con la rizosfera e mobilizzazione degli inquinanti (Glick, 2010).

Benefici della fitoproliferazione nella mitigazione dell'inquinamento:

1. **Rimozione degli inquinanti e stabilizzazione dei contaminanti:** la fitoproliferazione consente la rimozione attiva degli inquinanti dai siti contaminati concentrando queste sostanze nei tessuti vegetali. Questo è particolarmente utile per i metalli pesanti e i contaminanti organici. Assorbendo e immagazzinando questi inquinanti, le piante ne riducono la biodisponibilità nell'ambiente, prevenendo così l'ulteriore contaminazione del suolo, dell'acqua e dell'aria. Una volta assorbiti e accumulati gli inquinanti, le piante possono



essere raccolte e smaltite correttamente, fornendo un mezzo per la gestione a lungo termine dei siti contaminati.

2. **Miglioramento della qualità del suolo e dell'acqua:** attraverso la fitoproliferazione, le piante contribuiscono a ripristinare la qualità dei suoli e dei corpi idrici inquinati. Negli ambienti acquatici inquinati, le piante possono assorbire i contaminanti direttamente dall'acqua, migliorandone la qualità riducendone le concentrazioni. Allo stesso modo, nei suoli contaminati, le piante possono migliorare la struttura del suolo e ridurre l'erosione, con conseguente miglioramento della fertilità e della stabilità del suolo.
3. **Soluzione economica e sostenibile:** la fitoproliferazione è un metodo di bonifica ambientale ecologico ed economico. Rispetto alle tecnologie di bonifica tradizionali, come l'escavazione del terreno, il trattamento chimico o il soil washing, la fitoproliferazione è relativamente poco costosa. L'uso di piante per la mitigazione dell'inquinamento riduce anche l'impatto ambientale dei processi di bonifica, rendendola un'opzione sostenibile per la gestione ambientale a lungo termine.
4. **Biodiversità e ripristino degli ecosistemi:** uno dei principali vantaggi della fitoproliferazione è che consente il ripristino della biodiversità in ambienti inquinati. Utilizzando piante autoctone o adattate all'ambiente locale, la fitoproliferazione può contribuire a ristabilire gli ecosistemi naturali che potrebbero essere stati danneggiati dall'inquinamento. Inoltre, la crescita delle piante in aree contaminate può attrarre e sostenere la fauna selvatica, contribuendo ulteriormente al ripristino degli ecosistemi e alla salute ambientale generale (Figura 1.31).

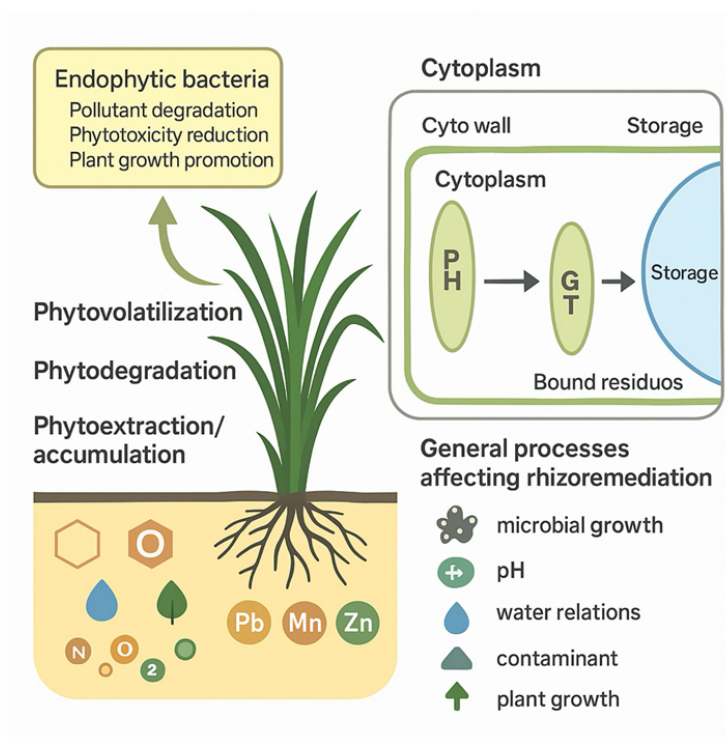


Figura 1.31. Meccanismi di fitodepurazione

1. Fitorrizostasi

Fitorrizostasi è un termine usato per descrivere una forma specifica di fitorisanamento in cui le piante accumulano inquinanti nei loro tessuti, in particolare nelle radici, senza subire danni significativi. Questo meccanismo rappresenta un'importante strategia per immobilizzare i contaminanti, in particolare i metalli pesanti, nella rizosfera e prevenirne la diffusione nelle aree circostanti. Concentrando gli inquinanti in un'area localizzata, le piante facilitano la rimozione o il contenimento di queste sostanze pericolose. Sebbene la fitorrizostasi sia spesso considerata una tecnica stabilizzante, svolge un ruolo cruciale nel più ampio campo della bonifica ambientale (Clemens, 2001).

Meccanismi della fitorrizostasi:

Nella fitorrizostasi, le piante non necessariamente "ripuliscono" l'ambiente estraendo e rimuovendo gli inquinanti dal suolo, ma agiscono piuttosto per contenerli all'interno di un'area specifica. Gli inquinanti vengono generalmente trattenuti nella zona radicale, dove si immobilizzano, riducendone la mobilità e impedendone la lisciviazione nelle



falde acquifere o la diffusione nel suolo e nell'aria. Diversi meccanismi sono alla base del processo fitorizzostatico, tra cui: essudazione radicale e legame con i metalli, formazione di complessi metallici, contenimento fisico nelle radici, alterazione delle proprietà del suolo (Hossain, 2012).

Benefici della fitorizzostasi:

1. **Prevenzione della diffusione di contaminanti:** Il principale vantaggio della fitorizzostasi è la sua capacità di ridurre la diffusione di inquinanti. Immobilizzando metalli pesanti o altri contaminanti nella zona radicale, le piante impediscono a queste sostanze di essere trasportate attraverso il suolo o l'acqua, salvaguardando così gli ecosistemi circostanti. Ciò è particolarmente importante negli ambienti in cui i contaminanti rischiano di essere trasportati via dal deflusso superficiale o di lisciviazione nelle falde acquifere.
2. **Danni minimi alle piante:** a differenza di altri meccanismi di fitodepurazione, come la fitoestrazione, la fitorizzostasi consente alle piante di accumulare inquinanti senza causare danni significativi alla salute delle piante. Gli inquinanti rimangono concentrati nell'apparato radicale, impedendone la risalita verso fusti e foglie, dove potrebbero compromettere la fotosintesi o la crescita. Ciò riduce al minimo l'impatto negativo sulla pianta e ne garantisce il normale funzionamento nel suo ambiente.
3. **Miglioramento della qualità del suolo:** la fitorizzostasi può anche portare a un miglioramento della qualità del suolo. Stabilizzando gli inquinanti in un'area, riduce la tossicità del suolo nelle aree circostanti. Inoltre, gli apparati radicali delle piante coinvolte nella fitorizzostasi possono migliorare la struttura del suolo, aumentare l'attività microbica nella rizosfera e potenzialmente portare a un miglioramento della fertilità del suolo.
4. **Bonifica economica:** la fitorizzostasi, come parte di una più ampia strategia di fitorimediazione, è un approccio economico ed ecologico alla gestione dei siti contaminati. Questa tecnica richiede una manutenzione relativamente bassa rispetto ai metodi di bonifica più convenzionali, come scavi, trattamenti chimici o lavaggio del terreno. Inoltre, le piante coinvolte nella fitorizzostasi possono



essere coltivate in loco, riducendo i costi di trasporto e migliorando la sostenibilità complessiva del processo.

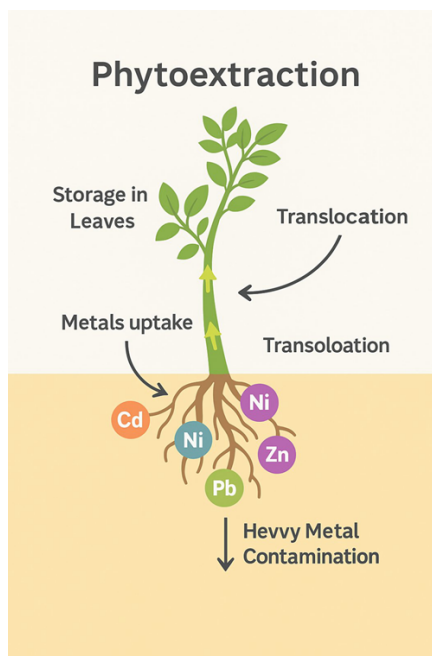


Figura 1.32. Meccanismi di fitoestrazione

2. Fitodegradazione

Le fitodegradazioni sono processi in cui le piante, attraverso la produzione di enzimi specifici, scompongono o trasformano gli inquinanti – solitamente contaminanti organici – in composti meno nocivi. Questo meccanismo di fitodegradazione svolge un ruolo cruciale nella detossificazione degli ambienti inquinati, utilizzando i percorsi metabolici naturali delle piante per degradare le sostanze tossiche. A differenza di altri meccanismi di fitodegradazione come la fitoestrazione (che comporta l'accumulo di inquinanti nei tessuti vegetali), la fitodegradazione si concentra sulla trasformazione o degradazione biochimica degli inquinanti, portando spesso alla mineralizzazione dei contaminanti in prodotti non tossici (McGrath, 2001, McGrath e Zhao, 2003).

La fitodegradazione è una strategia importante per la bonifica di siti contaminati da inquinanti organici come pesticidi, solventi, idrocarburi petroliferi e prodotti chimici industriali. Le piante in grado di fitodegradare sono in grado di metabolizzare direttamente questi contaminanti attraverso l'attività enzimatica, scomponendoli in



forme meno tossiche o addirittura innocue, contribuendo al ripristino ambientale (Newman e Reynolds 2004).

Meccanismi di fitodegradazione

La fitodegradazione coinvolge diversi percorsi biochimici, attraverso i quali le piante utilizzano i loro sistemi enzimatici intrinseci per degradare o modificare i contaminanti. Questi processi sono facilitati sia dagli enzimi vegetali che dalle comunità microbiche nella rizosfera (la regione che circonda le radici delle piante), che possono lavorare in sinergia con la pianta per degradare gli inquinanti. Alcuni dei meccanismi chiave coinvolti nella fitodegradazione includono: la degradazione enzimatica degli inquinanti organici, i percorsi metabolici per la degradazione degli inquinanti, il ruolo dei microrganismi della rizosfera, la riduzione della tossicità e la mineralizzazione.

Vantaggi della fitodegradazione:

1. **Detossificazione degli inquinanti organici:** la fitodegradazione è particolarmente utile per il trattamento di inquinanti organici come pesticidi, erbicidi, solventi e prodotti petroliferi. Utilizzando enzimi vegetali per scomporre o trasformare queste sostanze, la fitodegradazione può ridurre significativamente la tossicità, rendendo l'ambiente più sicuro per la fauna selvatica, le piante e l'uomo. Il processo può anche contribuire alla scomposizione di inquinanti complessi in composti più semplici e meno tossici, rimuovendoli efficacemente dal sito contaminato.
2. **Sostenibilità ed ecocompatibilità:** la fitodegradazione è un processo naturale che richiede un apporto energetico minimo rispetto ai metodi tradizionali di rimozione degli inquinanti, come l'incenerimento o il trattamento chimico. Utilizzando sistemi enzimatici vegetali, questo processo è sostenibile ed ecocompatibile. L'uso di piante e microrganismi per la bonifica ambientale è una soluzione economica e a bassa manutenzione, in linea con i principi della chimica verde e dello sviluppo sostenibile.
3. **Applicazione alla contaminazione su larga scala:** la fitodegradazione ha il potenziale per essere utilizzata in interventi di bonifica ambientale su larga scala. Le piante possono essere coltivate su ampie aree per assorbire e

degradare gli inquinanti, rendendo questo processo adatto al trattamento di terreni, corpi idrici e siti industriali contaminati. Inoltre, alcune piante in grado di fitodegradare, come le specie di *Populus*, hanno tassi di crescita rapidi e possono accumulare grandi quantità di inquinanti, rendendole candidate ideali per l'uso nei programmi di bonifica.

4. **Miglioramento della salute del suolo e dell'ecosistema:** la degradazione dei contaminanti organici attraverso la fitorisanamento può migliorare la salute del suolo riducendo i livelli di sostanze chimiche tossiche che inibiscono l'attività microbica del suolo e la crescita delle piante. Questo processo può anche contribuire a ripristinare gli ecosistemi degradati dall'inquinamento, portando al recupero della biodiversità e della funzionalità degli ecosistemi (Figura 1.33).

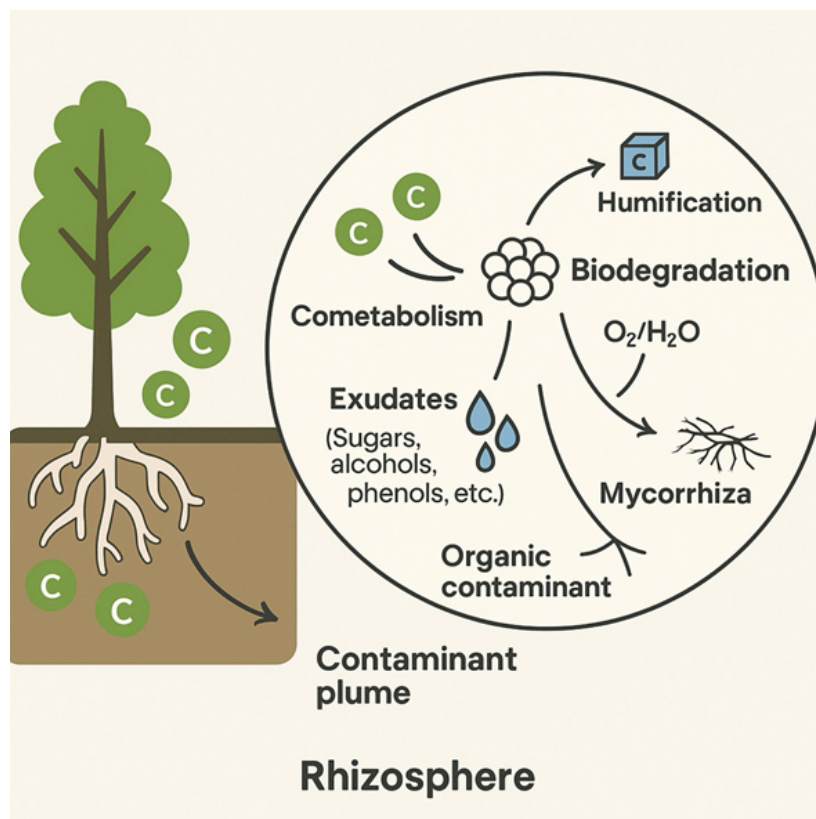


Figura 1.33 Meccanismo di bonifica nella rizosfera

3. Fitoestrazione



La fitoestrazione è il processo mediante il quale le piante assorbono contaminanti, tipicamente metalli pesanti o elementi tossici, dal suolo o dall'acqua attraverso il loro apparato radicale e li accumulano nei tessuti superficiali, come foglie, steli e fiori. L'aspetto chiave della fitoestrazione è che, dopo che gli inquinanti sono stati assorbiti e concentrati nella pianta, le piante vengono raccolte e rimosse dall'area contaminata, rimuovendo così fisicamente gli inquinanti dall'ambiente. Questo meccanismo è una parte importante della fitorisanazione, offrendo un metodo sostenibile ed ecologico per la bonifica dei siti contaminati (Raskin, 1994).

I principali inquinanti interessati dalla fitoestrazione sono in genere metalli pesanti come piombo (Pb), cadmio (Cd), arsenico (As), mercurio (Hg) e nichel (Ni), oltre ad altri elementi tossici. Questi metalli sono spesso non degradabili e possono persistere nell'ambiente, causando l'inquinamento a lungo termine di suoli e corpi idrici. Attraverso la fitoestrazione, le piante possono rimuovere e concentrare efficacemente questi contaminanti nella loro biomassa, che può quindi essere smaltita o trattata in sicurezza, riducendo così la tossicità complessiva dell'area contaminata.

Meccanismi di fitoestrazione:

La fitoestrazione (Figure 1.32 e 1.34) prevede una serie di fasi in cui le piante interagiscono con gli inquinanti presenti nell'ambiente, li assorbono e li concentrano nei loro tessuti. Diversi meccanismi chiave sono coinvolti in questo processo: l'assorbimento degli inquinanti da parte delle radici, il trasporto degli inquinanti ai tessuti superficiali, la concentrazione degli inquinanti nei tessuti vegetali, la raccolta e lo smaltimento del materiale vegetale contaminato (González, 2008).

Benefici della fitoestrazione:

1. **Efficienza economica e sostenibilità:** uno dei principali vantaggi della fitoestrazione è la sua economicità rispetto ai metodi di bonifica tradizionali come scavi, trattamenti chimici o lavaggio del terreno. La fitoestrazione richiede meno energia e infrastrutture, il che la rende un'opzione più sostenibile ed economicamente valida, soprattutto per applicazioni su larga scala. Le piante possono anche essere coltivate in loco, riducendo la necessità di trasporto e altre sfide logistiche.

2. **Non invasivo e rispettoso dell'ambiente:** a differenza delle tecniche di bonifica meccanica o chimica, la fitoestrazione è non invasiva e minimamente dannosa per l'ambiente. Non comporta la rimozione o la distruzione della struttura del suolo, che può portare all'erosione del suolo e alla distruzione dell'habitat. Inoltre, l'uso di piante per la bonifica contribuisce al sequestro del carbonio, il che rappresenta un ulteriore vantaggio ambientale.
3. **Rimozione selettiva dei contaminanti:** la fitoestrazione può essere selettiva, consentendo la rimozione di specifici inquinanti senza interferire con altri componenti dell'ecosistema. Utilizzando iperaccumulatori, è possibile concentrare l'estrazione su specifici metalli o contaminanti, garantendo un processo di bonifica altamente efficiente e mirato.
4. **Ripristino della salute del suolo:** attraverso la fitoestrazione, le piante possono contribuire a ripristinare la salute dei terreni contaminati. Rimuovendo gli inquinanti dal suolo, le sue proprietà fisiche e chimiche possono migliorare, rendendolo più adatto alla futura crescita delle piante e riducendo il rischio di esposizione tossica agli ecosistemi circostanti.

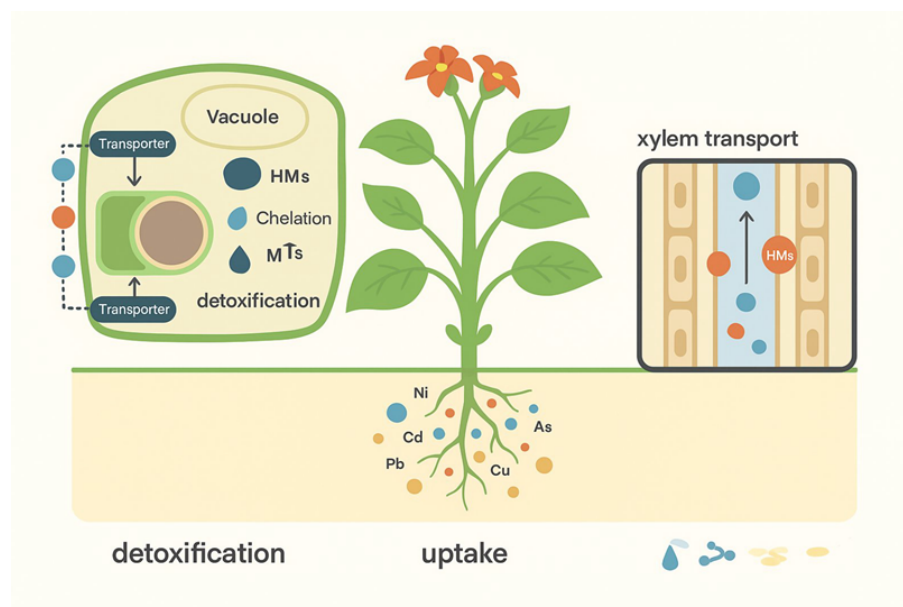


Figura 1.34 Meccanismo di bonifica all'interno del tessuto vegetale



5. Fito-rizofiltrazione

Tecnologia innovativa di biorisanamento che sfrutta la capacità naturale delle piante di assorbire, accumulare e detossificare gli inquinanti presenti nell'acqua attraverso l'apparato radicale. Questo processo non solo mitiga l'inquinamento ambientale, ma promuove anche pratiche sostenibili nella gestione delle risorse idriche.

Meccanismi di fitorizofiltrazione

Le piante utilizzano diversi meccanismi per filtrare gli inquinanti, tra cui: assorbimento radicale, traslocazione, trasformazioni biochimiche, rizodegradazione (Juhasz, 2000).

Benefici della fitorizofiltrazione

La fitorizofiltrazione offre numerosi vantaggi per la bonifica ambientale e la gestione delle acque (Figura 1.35).

1. **Efficacia in termini di costi:** rispetto ai metodi di bonifica tradizionali, come lo scavo o il trattamento chimico, la fitorizofiltrazione è generalmente più economica. Richiede minori investimenti energetici e infrastrutturali, il che la rende un'opzione praticabile per applicazioni su larga scala.
2. **Sostenibilità ambientale:** questo metodo sfrutta processi biologici naturali, riducendo la dipendenza da sostanze chimiche sintetiche e minimizzando l'impatto ecologico. Promuove la biodiversità e può migliorare la salute del suolo.
3. **Versatilità:** la fitorizofiltrazione può essere applicata a un'ampia gamma di contaminanti, inclusi metalli pesanti, inquinanti organici e nutrienti in eccesso. Questa versatilità ne consente l'utilizzo in diversi ambienti, dai siti industriali alle aree urbane.
4. **Valore estetico:** l'integrazione delle piante nelle strategie di bonifica può migliorare l'aspetto estetico dei siti contaminati. Gli spazi verdi possono migliorare la biodiversità locale e offrire opportunità ricreative per le comunità.



5. **Coinvolgimento e formazione della comunità:** i progetti di fitorizofiltrazione possono favorire il coinvolgimento della comunità e aumentare la consapevolezza sui problemi ambientali, promuovendo un senso di amministrazione e responsabilità.
6. **Sequestro del carbonio:** le piante utilizzate nella fitorizofiltrazione possono sequestrare il carbonio, contribuendo a mitigare il cambiamento climatico e migliorando al contempo la sostanza organica del suolo.
7. **Riduzione dei costi di trattamento delle acque:** migliorando la qualità dell'acqua alla fonte, la fitorizofiltrazione può alleviare il carico sugli impianti di trattamento delle acque, con conseguente riduzione dei costi operativi.

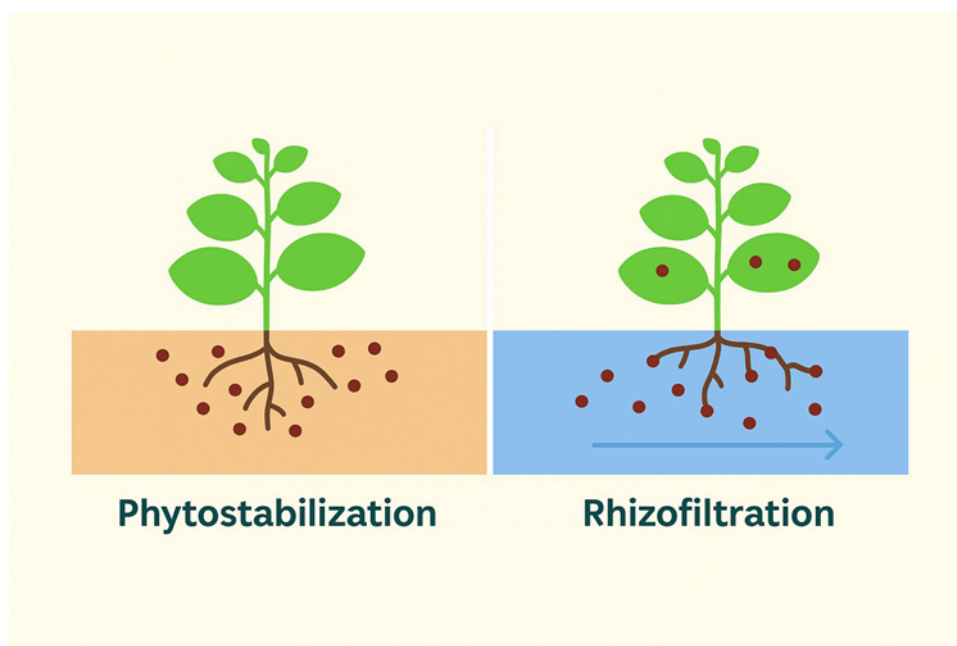


Figura 1.35 L'effetto della fitostabilizzazione e della rizofiltrazione

Fonte: originale

1.3 Assorbimento di metalli pesanti

Esistono diversi tipi di processi che consentono l'assorbimento e la traslocazione dei metalli pesanti nelle piante, tra cui l'assorbimento da parte dell'apparato radicale, il trasporto radice-germoglio, lo xilema e il sequestro (Yan et al., 2020).



Sebbene molti metalli pesanti esistano in forme solubili e siano facilmente assorbiti dalle piante, ne esistono anche in forme insolubili.

Le piante sviluppano diversi meccanismi per facilitare la disponibilità di questi metalli nel terreno.

Uno di questi meccanismi coinvolge la secrezione di composti chelanti da parte delle radici delle piante, rendendoli disponibili nel terreno (Dalvi e Bhalerao, 2013).

1. Assorbimento radicale

Il primo passaggio nell'assorbimento dei metalli pesanti avviene a livello delle radici delle piante. I metalli pesanti possono entrare nella pianta attraverso due vie principali:

- **Via apoplastica:** questa via prevede la diffusione passiva, in cui i metalli pesanti vengono assorbiti dai tessuti non viventi, principalmente attraverso le pareti cellulari e gli spazi intercellulari. La via apoplastica consente il movimento dei metalli senza attraversare le membrane plasmatiche delle cellule radicali, facilitandone un rapido assorbimento (Peer et al., 2005). Tuttavia, questa via è limitata a determinate forme e concentrazioni di metallo.
- **Via simplastica:** al contrario, la via simplastica è un processo di trasporto attivo, in cui i metalli pesanti si muovono attraverso le cellule viventi attraverso il citoplasma. Questo meccanismo richiede energia, tipicamente derivata dall'ATP, per trasportare i metalli attraverso le membrane plasmatiche. Questa via è fondamentale per l'assorbimento di micronutrienti essenziali e contribuisce a regolare l'omeostasi dei metalli all'interno della pianta (Fitzgerald et al., 2019).

2. Secrezione di composti chelanti

Le piante hanno sviluppato meccanismi per aumentare la biodisponibilità dei metalli pesanti nel suolo. Un meccanismo chiave è la secrezione di composti chelanti dagli essudati radicali. Questi composti, che includono acidi organici, amminoacidi e fitochelatine, si legano ai metalli pesanti, aumentandone la solubilità e facilitandone l'assorbimento (Dalvi e Bhalerao, 2013). Ad esempio, l'acido citrico e l'acido malico possono mobilitare efficacemente il ferro e altri ioni metallici, rendendoli più accessibili alle piante (Sato et al., 2018).



3. Formazione e immobilizzazione del complesso

Una volta assorbiti, i metalli pesanti formano complessi con vari chelanti nelle cellule radicali. Questi complessi possono essere immobilizzati negli spazi extracellulari o all'interno di organelli, impedendo ai metalli di esercitare effetti tossici sulle funzioni cellulari (Ali et al., 2013). La chelazione riduce la biodisponibilità dei metalli pesanti, consentendo alle piante di detossificarli e immagazzinarli in modo sicuro. Inoltre, il sequestro vacuolare è una strategia comune in cui i metalli vengono immagazzinati nei vacuoli, isolandoli ulteriormente dalle vie metaboliche (Yuan et al., 2015).

4. Trasporto allo xilema

Dopo l'immobilizzazione, gli ioni di metalli pesanti sequestrati nei tessuti radicali vengono trasportati allo stele, dove entrano nei vasi xilematici. Questa transizione è essenziale per il trasporto verso l'alto, poiché lo xilema conduce acqua e nutrienti disciolti dalle radici alle parti superiori della pianta (Thakur et al., 2016). Il movimento attraverso lo xilema facilita anche la distribuzione dei metalli necessari per le funzioni fisiologiche in vari tessuti vegetali.

6. Traslocazione attraverso lo xilema

Una volta nello xilema, i metalli pesanti vengono traslocati attraverso la pianta, raggiungendo steli, foglie e persino frutti. Questo processo è principalmente guidato dalla traspirazione, dove l'acqua evapora dalla superficie fogliare, creando una pressione negativa che attira l'acqua (e i metalli disciolti) verso l'alto (Kumar et al., 2022). L'efficienza della traslocazione può variare tra le diverse specie vegetali, con alcune specie che dimostrano una maggiore capacità di accumulo di metalli nelle parti aeree, fattore cruciale per gli sforzi di fitorisanamento.

7. Ruolo delle associazioni micorriziche

Molte piante instaurano anche relazioni simbiotiche con i funghi micorrizici, che migliorano l'assorbimento dei nutrienti, compresi i metalli pesanti. I funghi micorrizici aumentano la superficie radicale, migliorando la capacità della pianta di assorbire i metalli dal terreno. Questa relazione può portare a un migliore assorbimento e



traslocazione dei metalli, poiché i funghi possono solubilizzare nutrienti e metalli pesanti, rendendoli più accessibili alle radici delle piante (Smith e Read, 2008).

VIE DI ASSUNZIONE DEI METALLI PESANTI

L'assorbimento di questi metalli pesanti avviene attraverso due vie distinte e cruciali: apoplastica e simplastica. La via apoplastica rappresenta un meccanismo di diffusione passiva in cui i tessuti non viventi, come le pareti cellulari e gli spazi intercellulari, assorbono i metalli pesanti. Questo processo non richiede energia e consente il movimento degli ioni metallici attraverso gli spazi intercellulari, bypassando di fatto le membrane cellulari. Al contrario, la via simplastica prevede il trasporto attivo, in cui i metalli pesanti penetrano nei tessuti viventi, attraversando il citoplasma e le membrane cellulari delle cellule radicali. Questa via è energeticamente impegnativa in quanto utilizza ATP per facilitare il movimento degli ioni metallici, garantendo che i nutrienti essenziali e i metalli pesanti possano essere assorbiti selettivamente dalla pianta (Peer et al., 2005).

Una volta assorbiti, i metalli pesanti interagiscono con vari chelanti, composti organici in grado di formare complessi stabili con ioni metallici. Questi complessi si formano all'interno delle cellule radicali, immobilizzando i metalli pesanti negli spazi extracellulari o intracellulari. Questo processo è fondamentale in quanto impedisce ai metalli di interferire con le funzioni cellulari essenziali e riduce al minimo la loro tossicità per la pianta (Ali et al., 2013). Ad esempio, chelanti come le fitochelatine e le metallotioneine svolgono un ruolo essenziale nella detossificazione dei metalli pesanti e nel facilitarne l'accumulo nei vacuoli o nelle pareti cellulari.

Una volta sequestrati all'interno dello spazio cellulare, questi ioni di metalli pesanti vengono trasferiti alla stele, la parte centrale della radice dove si trova il tessuto vascolare. Da lì, si muovono attraverso lo xilema, un tipo di tessuto vascolare responsabile del trasporto di acqua e nutrienti, mentre risalgono attraverso le radici verso le parti aeree della pianta (Thakur et al., 2016). I vasi xilematici creano una rete continua che consente il movimento efficiente di acqua, nutrienti disciolti e metalli pesanti, essenziali per vari processi fisiologici.



Infine, questi metalli pesanti vengono traslocati attraverso i vasi xilematici e fuori dalle radici, diffondendosi ulteriormente nella struttura della pianta, compresi steli e foglie (Kumar et al., 2022). Questo processo di traslocazione non è semplicemente un evento passivo; è regolato in modo intricato dallo stato fisiologico della pianta e dalle condizioni ambientali. Fattori come i tassi di traspirazione, la disponibilità di nutrienti e la presenza di specifici trasportatori di metalli possono influenzare significativamente l'entità dell'assorbimento e della distribuzione dei metalli pesanti in tutta la pianta.

Comprendere queste vie di assunzione di metalli pesanti è fondamentale, soprattutto in un'epoca in cui l'inquinamento del suolo e dell'acqua è diffuso a causa di attività industriali, pratiche agricole e urbanizzazione. Come studenti universitari che studiano scienze ambientali, biologia o discipline correlate, è fondamentale comprendere le implicazioni dell'accumulo di metalli pesanti nelle piante, che non solo influisce sulla salute delle piante, ma pone anche rischi per la sicurezza alimentare e la salute umana lungo tutta la filiera alimentare. Inoltre, indagare i meccanismi alla base dell'assorbimento di metalli pesanti può contribuire allo sviluppo di strategie di fitorisanamento, in cui le piante vengono utilizzate per estrarre o stabilizzare i metalli pesanti da ambienti contaminati, contribuendo così al ripristino ecologico e alla sostenibilità (Pietrini, 2005).

LA FITOREMEDICINA COME SOLUZIONE

Attualmente, la fitodepurazione è diventata una soluzione tecnologica efficace e conveniente utilizzata per estrarre o rimuovere metalli inattivi e contaminanti metallici dal suolo contaminato.

Le piante con una capacità eccezionale di accumulo di metalli sono note come piante iperaccumulatrici (Trapp e Legind 2010).

Molte specie vegetali riescono ad assorbire dal suolo inquinanti come piombo, cadmio, cromo, arsenico e vari radionuclidi. Pertanto, una delle tecniche di fitorisanamento, la fitoestrazione, può essere utilizzata per rimuovere i metalli pesanti dal suolo sfruttando la sua capacità di assorbire metalli essenziali per la crescita delle piante (Fe, Mn, Zn, Cu, Mg, Mo e Ni).



Possono accumularsi anche alcuni metalli con funzione biologica sconosciuta (Cd, Cr, Pb, Co, Ag, Se, Hg) (Vamerali, et al., 2009).

Tabella 1.1 Tipi di piante e loro capacità di mediare i metalli pesanti

Plant species	plant tissue	Resistant metals
<i>Alyssum bertolonii</i>	Leaves, stem, roots	Ni
<i>Alnus firma</i>	Roots	Pb, Cu
<i>Brassica napus</i>	Roots	Pb
<i>Thlaspi caerulescens</i>	Stem, root	Zn, Cd
<i>Thlaspi goesingense</i>	Stem	Ni
<i>Solanum nigrum</i>	Roots, stems & leaves	Cu, Cd, Cr
<i>Arabis hirsute</i>	stems & leaves	Pb, Zn
<i>Brassica chinensis</i>	Roots	Cd, Pb
<i>Commelina communis</i>	Roots, stems and leaves.	Pb
<i>Elsholtzia splendens</i>	Roots, stem and leaves	Cu

I vantaggi della fitodepurazione sono l'efficienza nella riduzione degli inquinanti, il basso costo, l'applicabilità a un'ampia gamma di inquinanti e, in generale, il fatto che sia un metodo ecologico.

Allo stesso tempo, rappresenta un'opzione economicamente accettabile e più economica per la bonifica dell'inquinamento ambientale ed è particolarmente adatta per siti di grandi dimensioni che presentano livelli di contaminazione relativamente bassi.

Questa tecnologia ha recentemente attirato l'attenzione come alternativa innovativa ai metodi di trattamento più consolidati utilizzati nelle discariche di rifiuti pericolosi, poiché non richiede attrezzature costose o personale altamente specializzato.

È inoltre conveniente per la bonifica di grandi quantità di acqua con basse concentrazioni di contaminanti e per grandi aree con terreni superficiali da poco a moderatamente contaminati.



IMPIANTI DI BONIFICA IN NATURA

Diverse specie vegetali hanno dimostrato la capacità di bonificare ambienti contaminati attraverso meccanismi quali la fitodegradazione, la fitodepurazione e la fitostabilizzazione (Tabella 1).

Girasole

- **Contaminanti:** metalli pesanti (piombo, cadmio, uranio).
- **Meccanismo:** i girasoli sono noti per la loro capacità di assorbire e immagazzinare metalli pesanti nei loro tessuti. Studi hanno dimostrato che possono estrarre efficacemente metalli pesanti da terreni contaminati, rendendoli preziosi per il biorisanamento (Brown et al., 2003).

Salice

- **Contaminanti:** metalli pesanti e inquinanti organici.
- **Meccanismo:** salici hanno un esteso apparato radicale che favorisce l'assorbimento di contaminanti dal suolo e dall'acqua. La loro capacità di supportare l'attività microbica nella rizosfera ne migliora ulteriormente l'efficacia nella fitorisanazione (Huang et al., 2008).

Senape indiana

- **Contaminanti:** metalli pesanti (piombo, cadmio, selenio).
- **Meccanismo:** questa specie è un noto iperaccumulatore di metalli pesanti. La ricerca indica che la senape indiana può assorbire quantità significative di metalli pesanti, rendendola utile per la bonifica del suolo (Kumar et al., 2011).

Canna comune

- **Contaminanti:** nutrienti (azoto, fosforo) e inquinanti organici.
- **Meccanismo:** la canna palustre è efficace nel filtrare gli inquinanti dall'acqua e nel migliorarne la qualità grazie al suo esteso apparato radicale. Il suo ruolo nelle zone umide artificiali ne evidenzia l'utilità nel trattamento delle acque reflue (Vymazal, 2011).



Coriandolo

- **Contaminanti:** metalli pesanti (piombo, cadmio).
- **Meccanismo:** il coriandolo ha dimostrato di avere un potenziale nell'assorbire metalli pesanti dai terreni contaminati, rendendolo un candidato per la bonifica dei terreni urbani (Jabeen et al., 2015).

Queste piante fungono da strumenti naturali per la bonifica ambientale, offrendo un mezzo sostenibile ed efficace per combattere la contaminazione del suolo e dell'acqua. La loro capacità di assorbire, stabilizzare e detossificare gli inquinanti non solo migliora la salute ambientale, ma contribuisce anche alla biodiversità e al ripristino degli ecosistemi. L'utilizzo di queste specie negli interventi di bonifica può apportare benefici ecologici affrontando al contempo le sfide della contaminazione.

1.4 Bibliografia

Ali H, Khan E, Sajad MA. Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. *Chemosphere*. 2013;91(7):869–81.

Attallah ER, Barakat DA, Maatook GR, Ashour-Badawy HA. Validation of a quick and easy (QuEChERS) method for determination of pesticide residues in dried herbs. *J Food Agric Environ*. 2012;10(1):755–62.

Bottomley P, Sutherland MW, Wilson BA, Rognoni B, Kelly A, Percy CD. Soil solarisation delivers near-zero levels of *Fusarium pseudograminearum* in cereal crown rot reference sites. *Crop Prot*. 2024;185:106887.

Brown SL, Chaney RL, Angle JS, Baker AJM. Phytoremediation potential of plants for removing heavy metals from soil. *Environ Pollut*. 2003;122(1):163–75.

Bursić V. Optimizacija hromatografskih metoda i određivanje ostataka fungicida u plodovima krastavca [doctoral dissertation]. Novi Sad: University of Novi Sad, Faculty of Agriculture; 2011.

Cheng H. Root exudation and rhizosphere interactions in heavy metal contamination. *Environ Pollut*. 2002;120(3):1251–60.

Clemens S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*. 2001;212(4):475–86.



- Core J. Quechers method catches pesticide residues. *Agric Res Mag*. 2003;51(7):9.
- Dalvi AA, Bhalerao SA. Response of plants towards heavy metal toxicity: an overview of avoidance, tolerance and uptake mechanism. *Ann Plant Sci*. 2013;2(9):362–8.
- del Pilar Martínez-Diz M, Díaz-Losada E, Andrés-Sodupe M, Bujanda R, Maldonado-González MM, Ojeda S, et al. Field evaluation of biocontrol agents against black-foot and Petri diseases of grapevine. *Pest Manag Sci*. 2021;77(2):697–708.
- Dietrich P, Cesarz S, Eisenhauer N, Roscher C. Effects of steam sterilization on soil abiotic and biotic properties. *Soil Org*. 2020;92(2):99–108.
- Dixon DP. Glutathione S-transferases in plants: a role in the detoxification of xenobiotics. *J Exp Bot*. 1998;49(325):1–13.
- Dobrosavljević B. LC-MS/MS analiza ostataka pesticida u paprikama [master's thesis]. Novi Sad: University of Novi Sad, Faculty of Agriculture; 2014.
- Elmore CL, Katan J. Soil solarization: a sustainable approach to soil-borne disease management. *Annu Rev Phytopathol*. 1998;36:1–20.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). Available from: <https://www.eppo.int/>
- European Commission. Commission Regulation (EU) No 283/2013 of 1 March 2013 setting data requirements for active substances under Regulation (EC) No 1107/2009. *Off J Eur Union*. 2013. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=CELEX:32013R0283>
- European Commission. Commission Regulation (EU) No 547/2011 of 8 June 2011 on the implementation of Regulation (EC) No 1107/2009 with regard to labelling requirements for plant protection products. *Off J Eur Union*. 2011.
- European Food Safety Authority (EFSA). Guidance on the assessment of exposure of operators, workers, residents and bystanders in risk assessment for plant protection products. *EFSA J*. 2014;12(10):3874.
- European Food Safety Authority (EFSA). Guidance on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in edge-of-field surface waters. *EFSA J*. 2013;11(7):3290.



European Food Safety Authority (EFSA). Risk assessment for birds and mammals. *EFSA J.* 2009;7(12):1438.

European Parliament and Council of the European Union. Regulation (EC) No 1107/2009 on placing plant protection products on the market. *Off J Eur Union.* 2009 Nov 24.

European Parliament and Council. Regulation (EC) No 1272/2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures. *Off J Eur Union.* 2008.

FIS Database. *List of registered plant protection products as of April 5, 2023.* Ministry of Agriculture of Croatia. Available from: <https://fis.mps.hr/trazilicaszb/>

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). *FAO guidelines for pesticide formulation specifications.* 2nd ed. Rome: FAO; 2010. Available from: <http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/pests/jmps/manual/en/>

Ghosh M. Phytoremediation of petroleum hydrocarbons. *Environ Pollut.* 2008;155(2):225–37.

Glick BR. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnol Adv.* 2010;28(3):367–74.

Hossain MA. Phytoremediation: a green technology to remediate heavy metal-contaminated soil and water. In: Gupta DK, Sandalio LM, editors. *Heavy metal toxicity and tolerance in plants.* Berlin: Springer; 2012. p. 295–326.

Huang H, Zeng G, Liang J, Xu P, Zhang C. Long-term willows for phytoremediation of contaminated soil. *Environ Sci Pollut Res.* 2008;15(5):377–84.

Jabeen R, Ahmad A, Iqbal M. Phytoremediation of heavy metals using coriander (*Coriandrum sativum* L.) plants. *Ecol Eng.* 2015;84:44–9.

Jamiołkowska A. Natural compounds as elicitors of plant resistance against diseases and new biocontrol strategies. *Agronomy.* 2020;10(2):173.

Kumar PBAN, Dushenkov V, Motto H, Raskin I. Phytoextraction of heavy metals by Indian mustard. *Environ Sci Technol.* 2011;31(9):223–7.

Kumar S, Chhabra V, Bishnoi U. Translocation mechanism of heavy metal in plant roots: concepts and conflicts—a review. *Pharma Innov J.* 2022;7:2320–9.

Lamichhane JR, Dürr C, Schwanck AA, Robin MH, Sarthou JP, Cellier V, et al. Integrated management of damping-off diseases: a review. *Agron Sustain Dev.* 2017;37(2):10.



Lesueur C, Maestroni B. Comparison of QuEChERS-based methods for the analysis of 600 pesticides in fruit and vegetables using GC-MS/MS and LC-MS/MS. *10th Eur Pesticide Residue Workshop*, Dublin, Ireland; 2014. p. 130.

Li X, Zhang Y, Chen J, Wang Q. Soil-borne pathogens and global crop losses: challenges and advances. *Front Microbiol.* 2023;14:1182932.

Luvisi A, Panattoni A, Materazzi A. Heat treatments for sustainable control of soil viruses. *Agron Sustain Dev.* 2015;35(2):657–66.

McGrath SP, Zhao FJ. Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. In: Singh A, Ward OP, editors. *Bioremediation: theory and applications*. New York: Springer; 2003. p. 141–69.

McGrath SP. Phytoremediation of polluted soils: mechanisms and applications. *Int J Phytoremediation.* 2001;3(2):1–11.

Ministry of Agriculture, Republic of Croatia. *Manual for safe handling and application of plant protection products*. Zagreb: Ministry of Agriculture; 2014. Available from: https://savjetodavna.mps.hr/wp-content/uploads/2018/11/Priru%C4%8Dnik-za-sigurno-rukovanje-i-primjenu-sredstava-za-za%C5%A1titu-bilja_9_2_2015.pdf

Nazarov PA, Baleev DN, Ivanova MI, Sokolova LM, Karakozova MV. Infectious plant diseases: etiology, current status, problems and prospects in plant protection. *Acta Naturae.* 2020;12(3):46–59.

Newman LA, Reynolds CM. Phytodegradation of organic compounds. *Curr Opin Biotechnol.* 2004;15(3):225–30.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Maximum residue limit calculator. Available from: <https://www.oecd.org/en/data/tools/maximum-residue-limit-calculator.html>

Pandit MA, Kumar J, Gulati S, Bhandari N, Mehta P, Katyal R, et al. Major biological control strategies for plant pathogens. *Pathogens.* 2022;11(2):273.

Peer WA, Baxter IR, Richards EL, Freeman JL, Murphy AS. Phytoremediation and hyperaccumulator plants. In: Tamas MJ, Martinoia E, editors. *Molecular biology of metal homeostasis and detoxification: from microbes to man*. Berlin: Springer; 2005. p. 299–340.



Pietrini F. Mycorrhizal fungi and their role in the absorption of heavy metals. In: Varma A, editor. *Mycorrhizal symbiosis: plant nutrition*. Berlin: Springer; 2005. p. 69–83.

Prasad MNV. Phytoremediation of heavy metals: recent techniques and applications. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2003;23(1):1–12.

Pravilnik o izmjenama i dopunama Pravilnika o postupku registracije sredstava za zaštitu bilja. *Narodne novine*. 2009;119/2935.

Pravilnik o metodama uzorkovanja za provedbu službene kontrole ostataka pesticida u i na proizvodima biljnog i životinjskog podrijetla. *Narodne novine*. 2008;77/2550.

Pravilnik o postupku registracije sredstava za zaštitu bilja. *Narodne novine*. 2007;57/1849.

Pravilnik o razvrstavanju, označavanju, obilježavanju i pakiranju opasnih kemikalija. *Narodne novine*. 2011;64/11.

Pravilnik o sastavu, djelokrugu i načinu rada Povjerenstva za sredstva za zaštitu bilja i ostatke sredstava za zaštitu bilja. *Narodne novine*. 2009;67/1603.

Punja ZK, Scott C, Lung S. Several *Pythium* species cause crown and root rot on cannabis (*Cannabis sativa* L.) plants grown under commercial greenhouse conditions. *Can J Plant Pathol*. 2022;44(1):66–81.

Ramón A. Soil steaming to reduce the incidence of soil-borne diseases, weeds and insects. *Missouri Produce Growers Bulletin*. 2020. Available from: <https://ipm.missouri.edu/mpg/2020/11/steaming-ra/>

Raskin I, Kumar PBAN, Dushenkov S, Salt DE. Bioconcentration of heavy metals by plants. *Curr Opin Biotechnol*. 1994;5(3):285–90.

Scher S, Christensen FM, Wittmer IK, Stamm C, Singer H. Opinion on the toxicity and assessment of chemical mixtures. *Eur Comm Sci Comm Environ Health Risks*. 2012. Available from: https://health.ec.europa.eu/document/download/d6ba67e3-15cf-4ee8-88d4-e856906857f6_en

Scott C, Punja ZK. Biological control of *Fusarium oxysporum* causing damping-off and *Pythium myriotylum* causing root and crown rot on cannabis (*Cannabis sativa* L.) plants. *Can J Plant Pathol*. 2023;45(3):238–52.

Sharma P. Cytochrome P450 enzymes and their role in the biodegradation of environmental contaminants. *Environ Toxicol Chem*. 2012;31(2):456–67.



Sidhu K. *Trichoderma*: a biopesticide. CABI BioProtection Portal. 2024. Available from: <https://bioprotectionportal.com/resources/trichoderma-a-biopesticide/>

Singh OV, Labana S, Pandey G, Budhiraja R, Jain RK. Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2003;61(5):405–12.

Smith SE, Read DJ. *Mycorrhizal symbiosis*. 3rd ed. London: Academic Press; 2008.

Thakur S, Singh L, Wahid ZA, Siddiqui MF, Atnaw SM, Din MF. Plant-driven removal of heavy metals from soil: uptake, translocation, tolerance mechanism, challenges, and future perspectives. *Environ Monit Assess*. 2016;188(4):206.

Trapp S, Legind CN. Uptake of organic contaminants from soil into vegetables and fruits. In: Swartjes FA, editor. *Dealing with contaminated sites: from theory towards practical application*. Dordrecht: Springer; 2010. p. 369–408.

Vamerali T, Bandiera M, Mosca G. Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land—a review. *Environ Chem Lett*. 2010;8(1):1–7.

Vangronsveld J, Cunningham SD, editors. *Phytoremediation of contaminated soils and water*. Totowa (NJ): Humana Press; 2009.

Vassilev A, Nikolova A, Koleva L, Licheva P. Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils. In: Ahmad P, Prasad MNV, editors. *Soil remediation and plants: prospects and challenges*. Amsterdam: Elsevier; 2013. p. 161–86.

Vymazal J. Constructed wetlands for wastewater treatment: five decades of experience. *Environ Sci Technol*. 2011;45(1):61–9.

Wittmer IK, Scheidegger R, Bader HP, Singer H, Stamm C. Loss rates of urban biocides can exceed those of agricultural pesticides. *Sci Total Environ*. 2011;409(5):920–32.

Woo SL, Hermosa R, Lorito M, Monte E. *Trichoderma*: a multipurpose, plant-beneficial microorganism for eco-sustainable agriculture. *Nat Rev Microbiol*. 2023;21(5):312–26.

Zakon o održivoj uporabi pesticida. *Narodne novine*. 2014;14/14.

Zakon o provedbi Uredbe (EZ) br. 396/2005 o maksimalnim razinama ostataka pesticida u i na hrani i hrani za životinje biljnog i životinjskog podrijetla. *Narodne novine*. 2013;80/13.



Zhang D, Yan D, Cheng H, Fang W, Huang B, Wang X, et al. Effects of multi-year biofumigation on soil bacterial and fungal communities and strawberry yield. *Environ Pollut.* 2020;256:113415.

Zhao FJ. Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils by plants: selection and evaluation. *Environ Sci Technol.* 2002;36(10):2322–7.

Ziedan ES. A review of the efficacy of biofumigation agents in the control of soil-borne plant diseases. *J Plant Prot Res.* 2022;62(1):1–10.



CAPITOLO 2. LA RESISTENZA ANTIMICROBICA RISULTANTE DALLA SELEZIONE NATURALE ESACERBATA DA FATTORI UMANI E I METODI GREEN INNOVATIVI PER COMBATTERLA

2.1 Introduzione

La crescente resistenza dei batteri agli antibiotici, insieme alla crescente frequenza di trattamenti inefficaci per le infezioni, evidenzia l'urgente necessità di identificare le cause alla base di questo problema e di esplorare strategie per mitigarlo e migliorare i risultati del trattamento. Un fattore ampiamente riconosciuto che contribuisce al fallimento del trattamento è la pressione selettiva esercitata dai farmaci, in particolare quando gli antibiotici vengono scelti in modo improprio o somministrati a dosi subterapeutiche. Ciò può portare alla sopravvivenza di popolazioni batteriche resistenti o all'attivazione di meccanismi di resistenza [Cantón, 2011]. Di conseguenza, è fondamentale utilizzare gli antibiotici in modo appropriato, solo in caso di infezioni batteriche confermate e a dosi che massimizzino la probabilità di successo terapeutico.

Nelle fasi iniziali dell'infezione, soprattutto nei casi gravi, si inizia comunemente una terapia empirica. Questa prevede la selezione di un antibiotico in base a fattori quali la sede dell'infezione, le condizioni cliniche del paziente, l'anamnesi, le patologie concomitanti e la funzionalità degli organi. L'antibiotico scelto deve essere efficace contro i patogeni più probabili, i cui profili di prevalenza e sensibilità sono generalmente noti grazie ai dati epidemiologici derivati da analisi retrospettive di numerosi studi microbiologici. Ove possibile, la terapia antibiotica empirica deve essere preceduta dalla raccolta di campioni per l'esecuzione di test microbiologici. I risultati di questi test servono quindi a convalidare le decisioni terapeutiche iniziali e a guidare il passaggio alla terapia mirata. Pertanto, i risultati microbiologici forniscono un valido supporto per la selezione dell'antibiotico ottimale sia negli approcci terapeutici empirici che in quelli mirati.

L'identificazione accurata del patogeno, che talvolta include la quantificazione per grammo o millilitro di campione, combinata con dati analitici e clinici, costituisce la base per una diagnosi definitiva dell'infezione. Gli antibiogrammi, d'altra parte, offrono



indicazioni sulla selezione dei farmaci che si prevede siano clinicamente efficaci contro i batteri identificati. In genere, gli antibiogrammi includono valutazioni qualitative della suscettibilità o resistenza batterica, insieme a informazioni sui meccanismi di resistenza rilevati. Per molte infezioni, tali dati sono sufficienti per interrompere la terapia antibiotica inefficace e sostituirla con agenti a cui i batteri sono sensibili.

Tuttavia, nei pazienti gravemente malati, con infezioni croniche, pregressa esposizione ad antibiotici o con una storia di fallimento terapeutico, è essenziale una guida microbiologica più precisa per facilitare la selezione ottimale dell'antibiotico. Due metodi comunemente utilizzati per valutare la sensibilità batterica sono il test di sensibilità mediante diffusione su disco di Kirby-Bauer e la determinazione della Concentrazione Minima Inibente (MIC). Il metodo di Kirby-Bauer è ampiamente applicato come test qualitativo standardizzato, economico e rapido per orientare la terapia empirica iniziale. Successivamente, il test della MIC fornisce una misura quantitativa più precisa dell'efficacia antibiotica, particolarmente utile per personalizzare la terapia in infezioni complesse o resistenti. Sebbene la determinazione della MIC sia consolidata da tempo, storicamente veniva eseguita sporadicamente; tuttavia, ora è sempre più inclusa nei test di routine. Ciononostante, l'uso pratico dei risultati della MIC per ottimizzare la terapia rimane limitato e talvolta, nonostante i costi più elevati rispetto ai metodi qualitativi, il test della MIC non viene pienamente utilizzato.

2.2 Tipologie di test e protocolli di lavoro

Protocollo del test di suscettibilità alla diffusione del disco Kirby-Bauer

Storia

La pubblicazione sulla penicillina di Alexander Fleming nel 1928 è una pietra miliare nella storia della medicina. Con la scoperta di nuovi composti antimicrobici, si prevedeva che le malattie infettive sarebbero state debellate grazie all'uso di questi antimicrobici [Jorgensen et al., 2007]. Sfortunatamente, lo sviluppo di resistenza batterica a questi antimicrobici ha rapidamente indebolito questo ottimismo e ha portato i medici a richiedere al laboratorio di microbiologia di testare il patogeno di un paziente contro varie concentrazioni di un dato antimicrobico per determinarne la sensibilità o la resistenza a quel farmaco. Il metodo originale per determinare la



sensibilità agli antimicrobici si basava su metodi di diluizione in brodo [Jorgensen et al., 2007], che sebbene siano ancora oggi il gold standard, richiedono molto tempo per essere eseguiti. Ciò ha spinto lo sviluppo di una procedura di diffusione su disco per la determinazione della sensibilità dei batteri agli antimicrobici. All'inizio degli anni '50, la maggior parte dei laboratori di microbiologia clinica negli Stati Uniti aveva adottato il metodo della diffusione su disco per determinare la suscettibilità dei batteri agli antimicrobici. Ogni laboratorio modificò la procedura in base alle proprie esigenze, tra cui l'utilizzo di diversi tipi di terreno, concentrazione dell'inoculo, tempo di incubazione, temperatura di incubazione e concentrazione del composto antimicrobico. L'interpretazione della suscettibilità e della resistenza si basava esclusivamente sulla presenza o assenza di una zona di inibizione attorno al disco, e due o tre diverse concentrazioni dello stesso antimicrobico venivano regolarmente testate contro il patogeno [Bauer et al., 1959].

Molti ricercatori pubblicarono varianti della procedura, dando origine a protocolli multipli che generarono una diffusa confusione [Bauer et al., 1959; Kirby et al., 1959]. Nel 1956, WMM Kirby e i suoi colleghi della Facoltà di Medicina dell'Università di Washington e del King County Hospital proposero un metodo a disco singolo per i test di sensibilità antimicrobica [Winn et al., 2006]. La mancanza di standardizzazione per la determinazione della sensibilità batterica continuò a rappresentare un problema per tutti i primi anni '60. Kirby e il suo collega, AW Bauer, esaminarono approfonditamente la letteratura sui test di sensibilità. Consolidarono e aggiornarono tutte le precedenti descrizioni del metodo di diffusione su disco e pubblicarono i loro risultati [Bauer et al., 1966]. Questa pubblicazione ha portato l'Organizzazione Mondiale della Sanità a costituire un comitato nel 1961 per gettare le basi per lo sviluppo di una procedura standardizzata per il test di suscettibilità del singolo disco antimicrobico [Jorgensen et al., 2007].

Il risultato fu una procedura standardizzata per il test di suscettibilità alla diffusione su disco, da allora in poi chiamata test di suscettibilità alla diffusione su disco di Kirby-Bauer [Bauer et al., 1966]. Attualmente, il Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) è responsabile dell'aggiornamento e della modifica della procedura originale di Kirby e Bauer attraverso un processo di consenso globale. Ciò garantisce l'uniformità della tecnica e la riproducibilità dei risultati man mano che i patogeni



sviluppano nuovi meccanismi di resistenza e nuovi antimicrobici vengono sviluppati per combattere questi organismi. Le linee guida interpretative per le dimensioni delle zone sono incluse nelle loro pubblicazioni (CLSI, 2006). La pubblicazione del CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard 9th Edition, rappresenta lo standard per i laboratori clinici che eseguono oggi i test di suscettibilità.

Scopo

Lo scopo del test di suscettibilità mediante diffusione su disco di Kirby-Bauer è determinare la sensibilità o la resistenza di batteri patogeni aerobi e anaerobi facoltativi a vari composti antimicrobici, al fine di assistere il medico nella scelta delle opzioni terapeutiche per i suoi pazienti. L'organismo patogeno viene coltivato su agar Mueller-Hinton in presenza di vari dischi di carta da filtro impregnati di antimicrobico. La presenza o l'assenza di crescita attorno ai dischi è una misura indiretta della capacità di quel composto di inibire quell'organismo.

Teoria

La determinazione della resistenza batterica agli antimicrobici è una parte importante della gestione delle infezioni nei pazienti. Il metodo di diffusione su disco di Kirby e Bauer è stato standardizzato e rappresenta una valida alternativa ai metodi di diluizione in brodo per i laboratori che non dispongono delle risorse necessarie per utilizzare i più recenti metodi automatizzati per i test di microdiluizione in brodo. Quando un disco di carta da filtro da 6 mm impregnato con una concentrazione nota di un composto antimicrobico viene posizionato su una piastra di agar Mueller-Hinton (MH), l'acqua viene immediatamente assorbita dall'agar nel disco. L'antimicrobico inizia a diffondersi nell'agar circostante. La velocità di diffusione attraverso l'agar non è rapida quanto la velocità di estrazione dell'antimicrobico dal disco, pertanto la concentrazione di antimicrobico è massima in prossimità del disco e si verifica una riduzione logaritmica della concentrazione all'aumentare della distanza dal disco [Jorgensen et al., 2007].

La velocità di diffusione dell'antimicrobico attraverso l'agar dipende dalle proprietà di diffusione e solubilità del farmaco nell'agar MH [Bauer et al., 1966] e dal



peso molecolare del composto antimicrobico. Le molecole più grandi diffonderanno a una velocità inferiore rispetto ai composti con peso molecolare inferiore. Questi fattori, combinati, fanno sì che ciascun antimicrobico abbia una dimensione unica della zona di breakpoint, che indica la suscettibilità a quel composto antimicrobico. Se la piastra di agar è stata inoculata con una sospensione del patogeno da testare prima del posizionamento dei dischi sulla superficie dell'agar, si verifica una crescita simultanea dei batteri e la diffusione dei composti antimicrobici. La crescita si verifica in presenza di un composto antimicrobico quando i batteri raggiungono una massa critica e possono sopraffare gli effetti inibitori del composto antimicrobico. Il tempo stimato necessario a una sospensione batterica per raggiungere la massa critica è di 4-10 ore per i patogeni più comunemente isolati, ma è caratteristico di ciascuna specie ed è influenzato dal terreno di coltura e dalla temperatura di incubazione [Jorgensen et al., 2007]. La dimensione della zona di inibizione della crescita è influenzata dalla profondità dell'agar, poiché l'antimicrobico diffonde in tre dimensioni, quindi uno strato superficiale di agar produrrà una zona di inibizione più ampia rispetto a uno strato più profondo. Il punto in cui viene raggiunta la massa critica è dimostrato da un cerchio di crescita batterica nettamente delimitato attorno al disco. La concentrazione del composto antimicrobico a questo margine è chiamata concentrazione critica ed è approssimativamente uguale alla concentrazione inibitoria minima ottenuta nei test di sensibilità in diluizione in brodo. La dimensione della zona osservata in un test di diffusione su disco non ha alcun significato di per sé [Jorgensen et al., 2007]. L'interpretazione della resistenza e della sensibilità agli antimicrobici viene determinata attraverso test in vivo su sangue e urine per calcolare il livello ottenibile di un dato antimicrobico che determina la risoluzione di un'infezione. Queste informazioni sono correlate alle dimensioni delle zone che determinano gli standard interpretativi. Gli standard interpretativi attuali sono disponibili nel Clinical Laboratory Standards Institute Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved Standards 9th Edition [CLSI 2006].

RICETTA

Soluzione salina sterile in provette da 2 ml

da 18 a 24 ore

Vortice standard McFarland

da 0,5



Tamponi sterili con carta Wickerham

Piastre di agar Mueller-Hinton, 100 mm o 150 mm Inoculando

Calibro o righello Dischi antibiotici Bact-cinerato

Pinzette Tamponi imbevuti di alcol

Distributore di dischi antibiotici (facoltativo) da 35°C a 37°C

^a Gli organismi raccomandati per scopi di garanzia della qualità sono *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Livello di biosicurezza (BSL) 2), *Escherichia coli* ATCC 25922 (BSL 1) e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (BSL 2) (www.atcc.org), poiché la zona di inibizione per questi organismi è nota. Poiché le dimensioni della zona sono note per questi organismi, se ne raccomanda l'uso in ambito didattico, sebbene l'uso di batteri sconosciuti dovrebbe essere integrato nell'esperienza didattica. Per i test di controllo qualità, le dimensioni della zona per questi tre organismi sono riportate sul foglietto illustrativo di qualsiasi disco antimicrobico acquistato.

^b La selezione dell'antimicrobico si basa sul tipo di organismo testato e sulla fonte dell'isolato (sangue, urina, ferita, ecc.). Consultare le tabelle degli standard interpretativi per gli antimicrobici suggeriti da utilizzare in questo esercizio.

Note aggiuntive

Agar Mueller-Hinton

L'agar MH è considerato il terreno migliore da utilizzare per i test di sensibilità di routine sui batteri non esigenti per i seguenti motivi:

- Mostra una riproducibilità accettabile da lotto a lotto per i test di suscettibilità
- È povero di sulfonamidi, trimetoprim e inibitori della tetraciclina
- Supporta una crescita soddisfacente della maggior parte dei patogeni non fastidiosi
- Sono stati raccolti numerosi dati ed esperienze riguardanti i test di suscettibilità eseguiti con questo mezzo [Winn et al., 2006].

Si prega di notare che l'uso di terreni diversi dall'agar Mueller-Hinton può dare luogo a risultati errati. Si noti inoltre che solo i batteri aerobi o facoltativi che crescono bene su agar MH non integrato devono essere testati utilizzando questo protocollo. Gli organismi esigenti richiedono agar MH integrato con nutrienti aggiuntivi e richiedono



una modifica a questo protocollo. Né gli integratori né le modifiche procedurali sono discussi in questo protocollo di base.

L'agar MH può essere acquistato come piastre di agar preparate da Remel (Lenexa, KS), BD BBL (Franklin Lakes, NJ) o qualsiasi altro fornitore di piastre di agar preparate. Seguire le raccomandazioni del produttore per la conservazione delle piastre preparate. L'agar MH può anche essere preparato da terreni disidratati disponibili presso aziende come Remel, BD BBL o qualsiasi altro fornitore di terreni disidratati. Assicurarsi di preparare il terreno secondo le istruzioni del produttore.

Formula per agar Mueller-Hinton per litro di acqua purificata [DIFCO 1984]

Manzo, Infuso da	300.0 g
Casaminoacido, tecnico	17.5 g
Amido	1.5 g
Agar	17.0 g

- Sospendere i componenti sopra elencati in 1 litro di acqua purificata. Mescolare accuratamente. Riscaldare agitando frequentemente e far bollire per 1 minuto per sciogliere completamente i componenti. Autoclavare a 121 °C per 15 minuti. Dispensare come desiderato. Lasciare solidificare a temperatura ambiente, quindi conservare a 4-8 °C. L'agar Mueller-Hinton è stabile per circa 70 giorni (secondo Remel Technical Services, 1 settembre 2009) dalla data di preparazione. Ogni laboratorio dovrebbe verificare la qualità e la funzionalità di ciascun lotto di terreno preparato testando ceppi noti di organismi contro ciascun composto antimicrobico utilizzato all'avvicinarsi della data di scadenza di 70 giorni.
- Se si preparano le piastre di agar MH da terreni disidratati, le piastre devono essere versate fino a una profondità di 4 mm (circa 25 ml di agar liquido per piastre da 100 mm e 60 ml di agar liquido per piastre da 150 mm, ma in ogni caso fino a una profondità misurata di 4 mm). Piastre troppo superficiali produrranno risultati di falsa sensibilità poiché il composto antimicrobico si



diffonderà più del dovuto, creando zone di inibizione più ampie. Al contrario, piastre versate a una profondità >4 mm produrranno risultati di falsa resistenza.

- Il pH dell'agar MH dovrebbe essere compreso tra 7,2 e 7,4 a temperatura ambiente dopo la solidificazione e dovrebbe essere testato quando il terreno viene preparato per la prima volta. Se il pH è 7,4, potrebbero verificarsi risultati opposti.
- Un eccesso di timidina o timina può invertire gli effetti inibitori dei sulfonamidi e del trimetoprim, dando luogo a zone di inibizione più piccole e meno distinte, o addirittura a nessuna zona.
- Una concentrazione errata di cationi bivalenti (calcio e magnesio) influenzerà i risultati dei test con aminoglicosidi e tetracicline contro *Pseudomonas aeruginosa*. Una concentrazione eccessiva di cationi ridurrà le dimensioni delle zone, mentre una bassa concentrazione le aumenterà. Un eccesso di calcio aumenterà le dimensioni delle zone di *P. aeruginosa* contro la daptomicina. Un eccesso di ioni zinco può ridurre le dimensioni delle zone dei carbapenemi contro *P. aeruginosa*.
- L'agar MH deve essere testato con ceppi noti di organismi almeno settimanalmente per verificare che i terreni e i dischi funzionino come previsto..

Dischi di suscettibilità agli antibiotici

I dischi antimicrobici possono essere acquistati presso qualsiasi fornitore affidabile, come Remel, Oxoid o BD BBL. Sono confezionati in cartucce a molla contenenti 25 o 50 dischi e possono essere ordinati singolarmente o in confezioni da 10 cartucce. La corretta conservazione di questi dischi è essenziale per ottenere risultati riproducibili.

Le cartucce sigillate contenenti dischi di carta preparati commercialmente devono essere conservate a 8 °C o congelate a -14 °C in un congelatore non autosbrinante. Lasciare che i dischi raggiungano la temperatura ambiente prima di rimuovere l'involucro protettivo in plastica. Una volta aperte, conservare le cartucce in un contenitore contenente essiccante per non più di 1 settimana.



I distributori di dischi semiautomatici sono disponibili presso aziende come Remel, Oxoid e BD BBL. Si prega di notare che le cartucce di un'azienda potrebbero non essere compatibili con i distributori di un'altra azienda.



Figura 2.1 Esempi di antibiotici

I distributori di dischi semiautomatici sono disponibili presso aziende come Remel, Oxoid e BD BBL. Si prega di notare che le cartucce di un'azienda potrebbero non essere compatibili con i distributori di un'altra azienda.



Figura 2.2 Distributori di dischi semiautomatici

Standard McFarland

Gli standard McFarland sono sospensioni di solfato di bario o particelle di lattice che consentono il confronto visivo della densità batterica. Standard preparati commercialmente sono disponibili presso aziende come Remel o BD BBL. Questi spesso includono una scheda Wickerham, una piccola scheda contenente linee nere parallele. Uno standard McFarland 0,5 equivale a una sospensione batterica contenente tra 1×10^8 e 2×10^8 UFC/ml di *E. coli*.

È possibile preparare internamente uno standard McFarland pari a 0,5 come descritto di seguito.

1. Aggiungere un'aliquota di 0,5 ml di BaCl_2 0,048 mol/litro (1,175% peso/vol $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 99,5 ml di H_2SO_4 0,18 mol/litro (1% vol/vol) mescolando costantemente per mantenere una sospensione.



2. Verificare la corretta densità dello standard di torbidità misurando l'assorbanza con uno spettrofotometro con cammino ottico di 1 cm e cuvetta adatta. L'assorbanza a 625 nm dovrebbe essere compresa tra 0,08 e 0,13 per lo standard McFarland 0,5.
3. Trasferire la sospensione di solfato di bario in aliquote da 4 a 6 ml in provette con tappo a vite delle stesse dimensioni di quelle utilizzate per la standardizzazione degli inoculi batterici.
4. Chiudere ermeticamente i tubi e conservare al buio a temperatura ambiente.

Utilizzo dello standard McFarland nella procedura Kirby-Bauer.

1. Prima dell'uso, agitare energicamente lo standard di solfato di bario su un agitatore vortex meccanico e verificare che la soluzione standard presenti un aspetto uniformemente torbido. Sostituire lo standard se compaiono particelle di grandi dimensioni. Se si utilizza uno standard composto da particelle di lattice, mescolare capovolgendo delicatamente, non su un agitatore vortex.
2. Mentre lo studente aggiunge colonie batteriche alla soluzione salina nella fase di "preparazione dell'inoculo" della procedura, deve confrontare la sospensione risultante con lo standard McFarland. Questo si fa tenendo sia la provetta dello standard che quella dell'inoculo una accanto all'altra, a non più di 2,5 cm dalla superficie del cartoncino Wickerham (in presenza di luce adeguata), e confrontando l'aspetto delle linee attraverso entrambe le sospensioni. Non tenere le provette a filo con il cartoncino. Se la sospensione batterica appare più chiara dello standard McFarland 0,5, è necessario aggiungere altri organismi alla provetta dalla piastra di coltura. Se la sospensione appare più densa dello standard McFarland 0,5, è necessario aggiungere ulteriore soluzione salina alla provetta dell'inoculo per diluire la sospensione alla densità appropriata. In alcuni casi può essere più semplice ricominciare da capo piuttosto che continuare a diluire una sospensione batterica troppo densa per l'uso.



Figura 2.3 Misurazione della densità

PROTOCOLLO

Preparazione della piastra Mueller-Hinton

1. Lasciare che una piastra di agar MH (una per ogni organismo da testare) raggiunga la temperatura ambiente. È preferibile lasciare le piastre nella custodia di plastica durante il riscaldamento per ridurre al minimo la condensa.
2. Se la superficie dell'agar presenta liquido visibile, posizionare la piastra capovolta e socchiusa sul coperchio per consentire al liquido in eccesso di drenare dalla superficie dell'agar ed evaporare. Le piastre possono essere posizionate in un incubatore a 35 °C o in una cappa a flusso laminare a temperatura ambiente fino a completa asciugatura (solitamente 10-30 minuti).
3. Etichettare in modo appropriato ogni piastra di agar MH per ogni organismo da testare.



Preparazione dell'inoculo

1. Utilizzando un'ansa o un ago sterile per inoculazione, toccare quattro o cinque colonie isolate dell'organismo da testare.
2. Sospendere l'organismo in 2 ml di soluzione salina sterile.
3. Agitare la provetta con la soluzione salina per creare una sospensione liscia.
4. Regolare la torbidità di questa sospensione a uno standard McFarland di 0,5 aggiungendo altro organismo se la sospensione è troppo leggera o diluendo con soluzione salina sterile se la sospensione è troppo pesante.
5. Utilizzare questa sospensione entro 15 minuti dalla preparazione.

Note aggiuntive

Preparazione dell'inoculo

Affinché i risultati siano validi, gli organismi da testare devono essere nella fase logaritmica di crescita. Si raccomanda di effettuare le sottocolture degli organismi da testare il giorno precedente.

Non utilizzare mai densità di inoculo estreme. Non utilizzare mai brodo di coltura notturno non diluito o altri inoculi non standardizzati per l'inoculazione delle piastre.

Se l'organismo è difficile da sospendere direttamente in una sospensione liscia, è necessario utilizzare il metodo di crescita per la preparazione degli inoculi. Tuttavia, tutti gli organismi raccomandati elencati in questa procedura producono sospensioni lisce con poca difficoltà. Consultare il documento del Clinical Laboratory Standards Institute [CLSI 2006] per il metodo di crescita per la preparazione degli inoculi, se necessario.

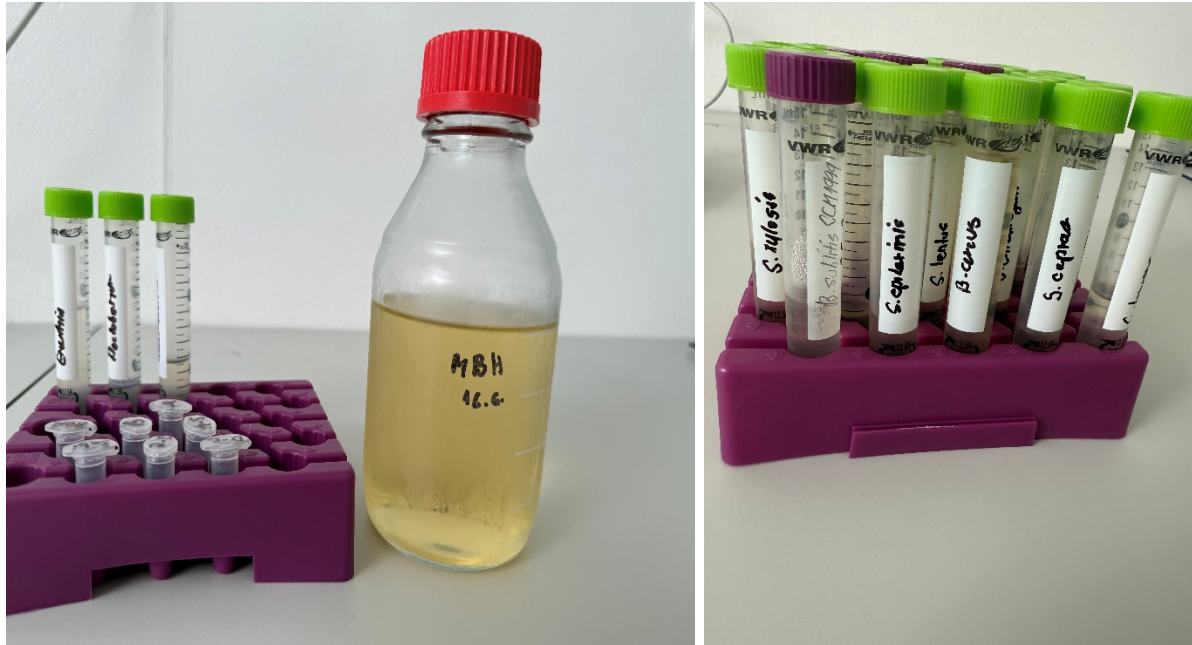


Figura 2.4 MH agar, sospensione batterica

Inoculazione della piastra MH

1. Immergere un tampone sterile nella provetta di inoculo.
2. Ruotare il tampone contro il lato della provetta (sopra il livello del liquido) esercitando una pressione decisa per rimuovere il liquido in eccesso. Il tampone non deve essere bagnato.
3. Inoculare la superficie asciutta di una piastra di agar MH strisciando il tampone tre volte sull'intera superficie dell'agar; ruotare la piastra di circa 60 gradi ogni volta per garantire una distribuzione uniforme dell'inoculo).
4. Bordare la piastra con il tampone per raccogliere il liquido in eccesso).
5. Gettare il tampone in un contenitore appropriato.
6. Lasciando il coperchio leggermente socchiuso, lasciare la piastra a temperatura ambiente per almeno 3-5 minuti, ma non più di 15 minuti, in modo che la superficie della piastra di agar si asciughi prima di procedere alla fase successiva.

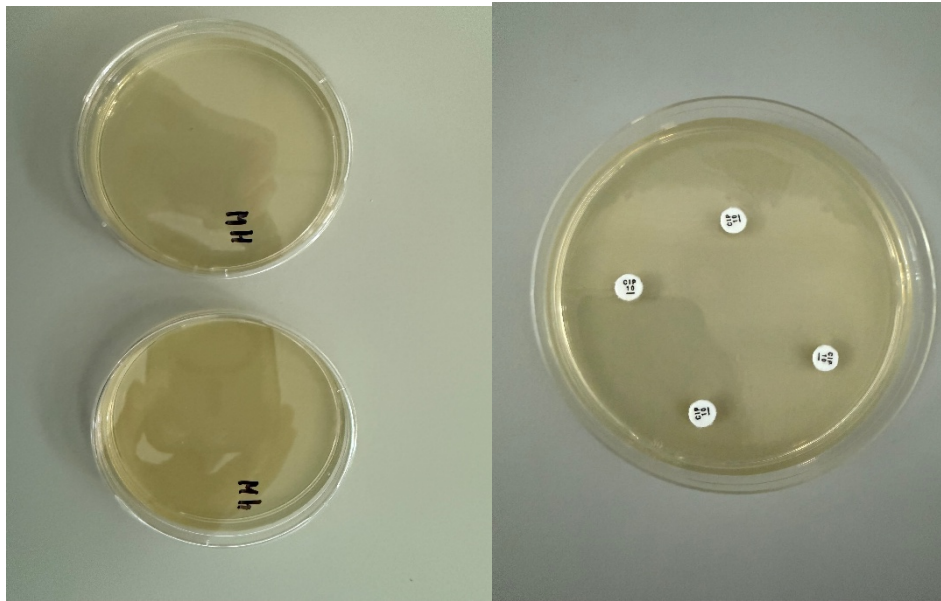


Figura 2.5 piastre MH, applicazione ATB

Posizionamento dei dischi antibiotici

1. Posizionare i dischi impregnati di antimicrobico appropriati sulla superficie dell'agar, utilizzando una pinza per distribuire ciascun disco antimicrobico uno alla volta, oppure un distributore multidisco per distribuire più dischi contemporaneamente. (Vedere i passaggi da a. a d. per l'uso del distributore multidisco o i passaggi da e. a g. per il posizionamento dei singoli dischi con una pinza.

a. Per utilizzare un distributore multidisco, posizionare la piastra di agar MH inocolata su una superficie piana e rimuovere il coperchio.

b. Posizionare il dispenser sulla piastra di agar e premere con decisione lo stantuffo una volta per distribuire i dischi sulla superficie della piastra.

c. Sollevare il dispenser dalla piastra e, utilizzando una pinza sterilizzata con un tampone imbevuto di alcol o una fiamma con alcol isopropilico, toccare ciascun disco sulla piastra per garantire il completo contatto con la superficie dell'agar. Questa operazione deve essere eseguita prima di riposizionare il coperchio della piastra Petri, poiché l'elettricità statica potrebbe far sì che i dischi si riposizionino sulla superficie dell'agar o aderiscano al coperchio.



d. Non spostare il disco una volta che è entrato in contatto con la superficie dell'agar, anche se non si trova nella posizione corretta, perché parte del farmaco inizia a diffondersi immediatamente al contatto con l'agar.

e. Per aggiungere i dischi uno alla volta alla piastra di agar utilizzando le pinze, posizionare la piastra MH sul modello fornito in questa procedura. Sterilizzare le pinze pulendole con un tampone sterile imbevuto di alcol e lasciandole asciugare all'aria oppure immergendole nell'alcol e accendendole.

f. Utilizzando le pinze, rimuovere con cautela un disco dalla cartuccia.

g. Rimuovere parzialmente il coperchio della piastra Petri. Posizionare il disco sulla piastra sopra uno dei punti scuri del modello e premere delicatamente il disco con la pinza per garantire il completo contatto con la superficie dell'agar. Richiudere il coperchio per ridurre al minimo l'esposizione della superficie dell'agar all'aria ambiente.

h. Continuare a posizionare un disco alla volta sulla superficie dell'agar finché tutti i dischi non sono stati posizionati come indicato nei passaggi f. e g. sopra.

2. Una volta posizionati tutti i dischi, riposizionare il coperchio, capovolgere le piastre e posizionarle in un incubatore a 35 °C per 16-18 ore. Quando si testa *Staphylococcus* contro oxacillina o vancomicina, o *Enterococcus* contro vancomicina, incubare per 24 ore prima della lettura.

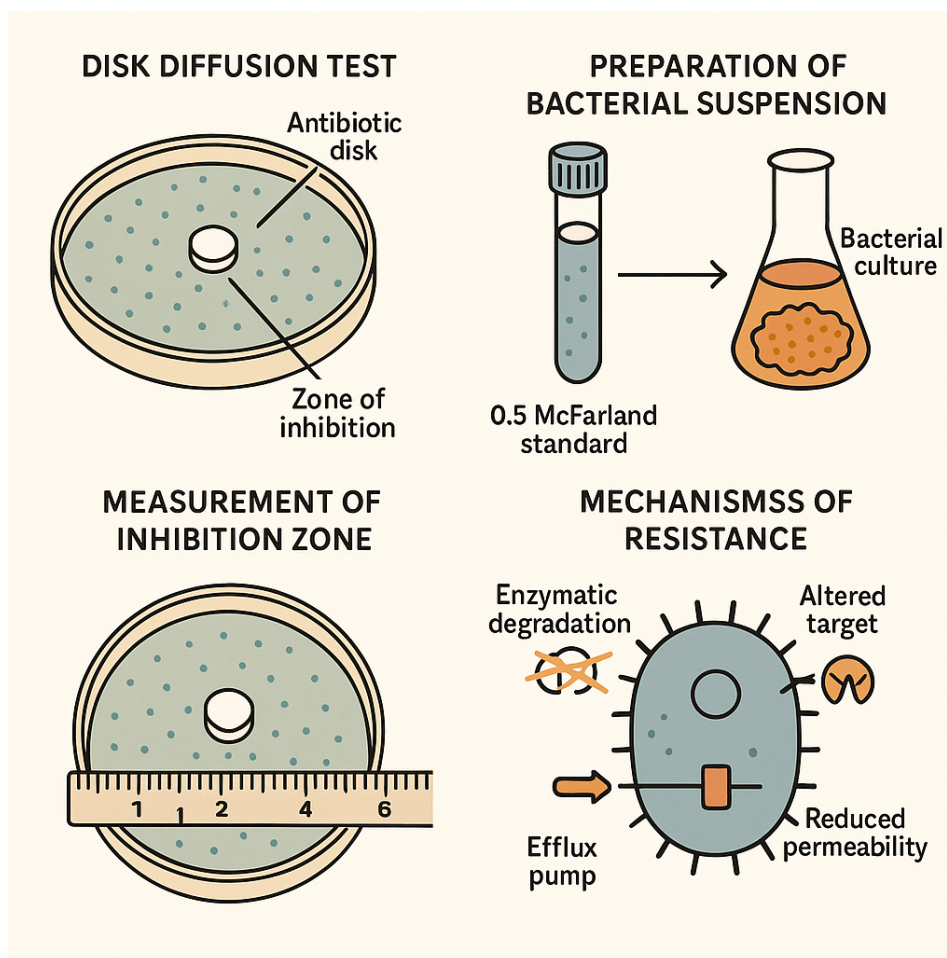


Figura 2.6 Schema del metodo di diffusione del disco

Note aggiuntive

Posizionamento del disco

I dischi non devono essere posizionati a una distanza inferiore a 24 mm (da centro a centro) sulla piastra di agar MH. Normalmente, non si dovrebbero posizionare più di 12 dischi su una piastra da 150 mm o più di 5 dischi su una piastra da 100 mm. Tuttavia, i distributori semiautomatici di dischi contengono rispettivamente 16 e 8 dischi e potrebbero non mantenere la spaziatura raccomandata di 24 mm da centro a centro. Il modello fornito in questo protocollo mantiene la spaziatura raccomandata di 24 mm da centro a centro e consente il posizionamento di un massimo di 8 dischi sulla piastra.

Bisogna evitare di posizionare i dischi vicino al bordo del piatto, poiché le zone non saranno completamente rotonde e potrebbero essere difficili da misurare.



Ogni disco deve essere premuto con una pinza per garantire il contatto completo con la superficie dell'agar, altrimenti potrebbero formarsi zone irregolari.

Se la superficie dell'agar viene in qualche modo interrotta (un disco che penetra nella superficie, linee visibili presenti a causa della pressione eccessiva del tampone contro la piastra durante l'inoculazione, ecc.), la forma della zona potrebbe essere alterata.

Quando stampi il modello da utilizzare nel tuo laboratorio di microbiologia, assicurati che il diametro del cerchio sul modello sia uguale a quello delle piastre di agar Mueller-Hinton che utilizzi in laboratorio (100 mm). Se necessario, puoi utilizzare la funzione "riduci" o "ingrandisci" di una fotocopiatrice per modificare le dimensioni del modello. Puoi anche creare il tuo modello disegnando un cerchio attorno a una piastra di agar Mueller-Hinton su un foglio di carta. Aggiungi i segni di posizionamento in base al numero di dischi che intendi utilizzare nella sessione di laboratorio, mantenendo la spaziatura consigliata come indicato sopra.

Incubazione delle piastre

È richiesto un intervallo di temperatura di $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Si noti che temperature superiori a 35°C potrebbero non consentire il rilevamento dello *Staphylococcus* resistente alla meticillina.

Non incubare le piastre in CO_2 poiché ciò diminuirà il pH dell'agar e causerà errori dovuti al pH errato del terreno.

I risultati possono essere letti dopo 18 ore di incubazione, a meno che non si stia testando *Staphylococcus* contro oxacillina o vancomicina, o *Enterococcus* contro vancomicina. Leggere i risultati per gli altri dischi antimicrobici, quindi reincubare la piastra per un totale di 24 ore prima di refertare vancomicina o oxacillina.



Misurazione delle dimensioni dell'area

1. Dopo l'incubazione, misurare le dimensioni delle zone al millimetro più vicino utilizzando un righello o un calibro; includere il diametro del disco nella misurazione.
2. Quando si misurano i diametri delle zone, arrotondare sempre al millimetro successivo.
3. Tutte le misurazioni vengono effettuate a occhio nudo, osservando il retro della piastra di Petri. Tenere la piastra a pochi centimetri da una superficie nera non riflettente illuminata con luce riflessa.
4. Osservare la piastra utilizzando una linea di vista verticale diretta per evitare qualsiasi parallasse che potrebbe causare errori di lettura.
5. Registrare la dimensione della zona sul foglio di registrazione.
6. Se la posizione del disco o la dimensione della zona non consentono di leggere il diametro della zona, misurare dal centro del disco a un punto sulla circonferenza della zona in cui è presente un bordo distinto (il raggio) e moltiplicare la misurazione per 2 per determinare il diametro.
7. La crescita fino al bordo del disco può essere segnalata come una zona di 0 mm.
8. Gli organismi come *Proteus mirabilis*, che sciamano, devono essere misurati in modo diverso rispetto agli organismi che non sciamano. Ignorare il sottile velo dello sciame e misurare il margine esterno in una zona di inibizione altrimenti ovvia.
9. Colonie distinte e separate all'interno di una zona di inibizione evidente non devono essere considerate sciamature. Queste colonie sono organismi mutanti più resistenti al farmaco in esame, oppure la coltura non era pura e si tratta di un organismo diverso. Se si determina mediante test ripetuti che il fenomeno si ripete, l'organismo deve essere considerato resistente a quel farmaco.



Misurazione delle dimensioni dell'area

Se la piastra è stata inoculata correttamente e tutte le altre condizioni sono corrette, le zone di inibizione dovrebbero essere uniformemente circolari e si formerà un prato di crescita confluyente.

Se sulla piastra sono visibili singole colonie, l'inoculo era troppo leggero e il test deve essere ripetuto.

Il margine della zona deve essere considerato l'area che non presenta alcuna crescita evidente e visibile, rilevabile a occhio nudo. Non utilizzare un dispositivo di ingrandimento per osservare i bordi della zona.

Quando si misura la zona di inibizione per gli organismi che sciamano (ad esempio, *Proteus* sp.), bisogna ignorare il sottile velo di crescita sciamante in una zona di inibizione altrimenti ovvia.

Con il trimetoprim e i sulfamidici, gli antagonisti nel terreno possono consentire una leggera crescita; pertanto, ignorare la leggera crescita (20% o meno del prato di crescita) e misurare il margine più evidente per determinare il diametro della zona [CLSI, 2006].

Consigli pratici e misure di sicurezza

Consigli pratici per principianti

- **Contaminazione:** garantire sempre la sterilità di strumenti, terreni e superfici di lavoro. La contaminazione può causare risultati poco chiari o imprecisi, come una crescita imprevista all'interno delle zone di inibizione o al di fuori delle aree di inoculazione. Lavorare sotto una cappa a flusso laminare quando possibile e utilizzare pipette e guanti sterili.
- **Preparazione dell'inoculo:** una densità dell'inoculo non corretta può portare a interpretazioni errate. Un inoculo troppo denso può ridurre le zone di inibizione, mentre un inoculo troppo diluito può ingrandirle. Confrontare sempre la sospensione batterica con lo standard McFarland 0,5 e apportare le opportune correzioni.



- **Conservazione dei dischi antibiotici:** conservare i dischi nella loro confezione originale a 2-8 °C in un ambiente asciutto. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti. Una conservazione impropria può causare la perdita di efficacia antibiotica e risultati dei test imprecisi.
- **Segnali di tests non validi:**
 - ✓ Distribuzione batterica non uniforme sull'agar (grumi o spazi vuoti visibili).
 - ✓ Zone di inibizione poco chiare, sfocate o dalla forma irregolare.
 - ✓ Cambiamenti nel colore del terreno dopo l'inoculazione o l'incubazione.
 - ✓ I dischi non aderiscono correttamente alla superficie dell'agar o cambiano posizione

Misure di sicurezza

- **Livelli di biosicurezza (BSL):** determina il livello di biosicurezza necessario a seconda del microrganismo (da BSL-1 a BSL-3). Utilizzare indumenti protettivi, guanti e respiratori come richiesto dalle normative quando si maneggiano batteri patogeni.
- **Manipolazione di materiali infettivi:** maneggiare tutti i campioni e le colture con la massima cautela per prevenire l'esposizione o la diffusione di agenti patogeni.
- **Smaltimento dei rifiuti:** smaltire le pipette usate, le anse di inoculazione, le piastre e i materiali contaminati secondo i protocolli istituzionali, in genere mediante autoclavaggio o disinfezione chimica.
- **Equipaggiamento protettivo personale (PPE):** indossare sempre guanti, occhiali protettivi e camici da laboratorio. Per procedure che generano aerosol o per lavorare con agenti patogeni ad alto rischio, prendere in considerazione l'uso di visiere protettive e lavorare all'interno di cappe di sicurezza biologica.

Interpretazione e comunicazione dei risultati

L'interpretazione accurata dei risultati dei test di sensibilità agli antibiotici è fondamentale per indirizzare un'efficace terapia antimicrobica. Sia la diffusione su disco di Kirby-Bauer che la determinazione della MIC forniscono informazioni essenziali sulla sensibilità o resistenza dei patogeni batterici agli antibiotici. Una



corretta lettura e refertazione dei risultati garantisce che i medici selezionino il trattamento più appropriato, riducendo al minimo gli insuccessi terapeutici e lo sviluppo di resistenza.

1. Utilizzo delle linee guida CLSI

Utilizzando le linee guida CLSI pubblicate, determinare la sensibilità o la resistenza dell'organismo a ciascun farmaco testato (vedere Tabelle 1, 2 e 3). Queste linee guida forniscono valori di breakpoint specifici (diametri di zona per la diffusione su disco e valori di MIC per la diluizione in brodo) per diverse specie batteriche e agenti antimicrobici. Si noti che organismi diversi richiedono criteri interpretativi diversi, quindi è essenziale fare riferimento alla tabella corretta per ciascun patogeno testato. Le tabelle abbreviate fornite sono adattate agli organismi suggeriti dall'autore e ai dischi antimicrobici adatti all'uso didattico e di routine.

2. Registrazione dei risultati

Per ciascun agente antimicrobico testato, indicare sulla scheda di registrazione se la dimensione della zona di inibizione misurata o il valore di MIC classificano l'isolato come sensibile (S), intermedio (I) o resistente (R). Questa classificazione semplifica la comunicazione e il processo decisionale, garantendo indicazioni chiare per il trattamento clinico. La registrazione accurata di queste categorie è fondamentale per un'interpretazione affidabile dei dati e ulteriori analisi epidemiologiche.

3. Segnalazione ai medici

In genere, ai medici vengono riportate solo le categorie di interpretazione qualitativa (S, I, R) del test di diffusione su disco di Kirby-Bauer, non le misurazioni del diametro della zona grezza. Questa pratica previene l'interpretazione errata dei dati grezzi e facilita decisioni terapeutiche standardizzate. I valori di MIC, sebbene più quantitativi, vengono interpretati anche in base ai breakpoint e riportati nello stesso formato qualitativo per la rilevanza clinica.

4. Dischi antimicrobici e dimensioni delle zone consigliate

Per gli ambienti didattici, viene fornita una batteria di dischetti antibiotici consigliati per ridurre al minimo la varietà di antimicrobici necessari per testare diversi gruppi batterici.



La selezione di dischetti appropriati, in conformità con le raccomandazioni del CLSI, garantisce la riproducibilità e la pertinenza dei risultati. Docenti e personale di laboratorio possono modificare la selezione dei dischetti in base all'epidemiologia locale, alla disponibilità e alle specifiche esigenze cliniche. L'uso coerente dei dischetti raccomandati favorisce la comparabilità dei risultati tra laboratori e nel tempo.

Tabella 2.1 Standard interpretativi del diametro della zona per le specie di
Staphylococcus [CLSI 2006]

specie di Staphylococcus (diametro della zona, mm intero più vicino)			
	Resistente	Intermedio	Suscetibile
Cefazolin (30 µg)	≤ 14	15-17	≥ 18
Clindamycin (2 µg)	≤ 14	15-20	≥ 21
Erythromycin (15 µg)	≤ 13	14-22	≥ 23
Gentamicin (10 µg)	≤ 12	13-14	≥ 15
Oxacillin (1 µg)	≤ 10	11-12	≥ 13
Penicillin G (10 µg)	≤ 28	--	≥ 29
Tobramycin (10 µg)	≤ 12	13-14	≥ 15
Vancomycin (30 µg)	--	--	≥ 15

Tabella 2.2 Standard interpretativi del diametro della zona per *Pseudomonas aeruginosa* e altri bacilli Gram-negativi non fermentanti [CLSI 2006]

***Pseudomonas aeruginosa* e altri batteri Gram-negativi non fermentanti**
(diametro della zona, mm intero più vicino)

	Resistente	Intermedio	Suscetibile
Amikacin (30 µg)	≤ 14	15-16	≥ 17
Cefoperazone (75 µg)	≤ 15	16-20	≥ 21
Cefotaxime (30 µg)	≤ 14	15-22	≥ 23
Gentamicin (10 µg)	≤ 12	13-14	≥ 15
Piperacillin (100 µg)	≤ 17	..	≥ 18
Tetracycline (30 µg)	≤ 14	15-18	≥ 19
Ticarcillin (75 µg)	≤ 14	--	≥ 15
Tobramycin (10 µg)	≤ 12	13-14	≥ 15

Tabella 2.3 Standard interpretativi del diametro della zona per *E. coli* e altri bacilli
Gram-negativi enterici [CLSI 2006]

***Escherichia coli* e altri batteri Gram-negativi**



(diametro della zona, mm intero più vicino)

	Resistente	Intermedio	Suscettibile
Amikacin (30 µg)	≤ 14	15-16	≥ 17
Ampicillin (10 µg)	≤ 13	14-16	≥ 17
Cefazolin (30 µg)	≤ 14	15-17	≥ 18
Gentamicin (10 µg)	≤ 12	13-14	≥ 15
Tetracycline (30 µg)	≤ 14	15-18	≥ 19
Ticarcillin (75 µg)	≤ 14	15-19	≥ 20
Trimethoprim (5 µg)	≤ 10	11-15	≥ 16
Tobramycin (10 µg)	≤ 12	13-14	≥ 15

Interpretazione dei risultati del test di diffusione del disco di Kirby-Bauer The

Il metodo di diffusione su disco di Kirby-Bauer determina la suscettibilità batterica misurando il diametro della zona di inibizione attorno ai dischi di antibiotico posti sull'agar piastre inoculate con l'organismo in esame.

Misurazione:

Dopo l'incubazione (tipicamente 16-18 ore a 35 ± 2 °C), utilizzare un righello o un calibro per misurare il diametro della zona trasparente in cui la crescita batterica è stata inibita, in millimetri (mm). Misurare da un bordo all'altro dell'area trasparente, incluso il diametro del disco.

Correlazione con la suscettibilità:

La dimensione della zona di inibizione riflette l'efficacia dell'antibiotico contro l'organismo testato. Zone più grandi indicano generalmente una maggiore suscettibilità, mentre zone più piccole o assenti indicano resistenza.

Utilizzo dei punti di interruzione:

I diametri delle zone misurate devono essere confrontati con criteri interpretativi standardizzati forniti da organizzazioni come CLSI o EUCAST. Questi breakpoint sono specifici per specie batteriche e antibiotici.

Categorizzazione:

in base alle dimensioni della zona, i batteri vengono classificati come:



- **Sensibile (S):** è probabile che il patogeno sia inibito da concentrazioni antibiotiche raggiungibili utilizzando il dosaggio standard.
- **Intermedio (I):** I patogeno può essere inibito se sono possibili dosi più elevate o una maggiore esposizione, oppure se l'antibiotico si concentra nel sito dell'infezione.
- **Resistente (R):** è improbabile che il patogeno venga inibito dall'antibiotico a concentrazioni raggiungibili e si dovrebbe prendere in considerazione una terapia alternativa.

Fattori che influenzano la dimensione della zona:

Le dimensioni delle zone possono essere influenzate dalla profondità dell'agar, dalla densità dell'inoculo, dalle condizioni di incubazione e dalle proprietà di diffusione degli antibiotici. Il rigoroso rispetto dei protocolli di analisi standardizzati è essenziale per ottenere risultati affidabili.

Esempio:

Per *Escherichia coli* testato contro ciprofloxacina:

- Diametro della zona ≥ 21 mm = Suscettibile
- Diametro della zona 16–20 mm = Intermedio
- Diametro della zona ≤ 15 mm = Resistente

Una misurazione della zona di 23 mm classificherebbe l'isolato come suscettibile.

Consigli pratici per principianti

Quando si eseguono test di sensibilità agli antibiotici, i principianti spesso si imbattono in alcune insidie comuni. Essere consapevoli di queste può migliorare l'affidabilità e l'accuratezza dei risultati:

- **Contaminazione:** lavorare sempre in un ambiente pulito e utilizzare strumenti sterili per prevenire la contaminazione da microbi ambientali. I contaminanti possono portare a una crescita imprevista e a un'interpretazione errata dei risultati.
- **Preparazione errata dell'inoculo:** la densità della sospensione batterica deve corrispondere il più possibile allo standard McFarland 0,5. Inoculi troppo densi possono portare a zone di inibizione falsamente ridotte o a MIC più elevate;



sospensioni troppo diluite possono dare una sensibilità falsamente aumentata. Verificare sempre la torbidità utilizzando uno standard McFarland o uno spettrofotometro.

- **Conservazione impropria dei dischi:** i dischi antibiotici devono essere conservati secondo le istruzioni del produttore, solitamente refrigerati e protetti da umidità e luce. I dischi scaduti o conservati in modo improprio possono perdere efficacia, influenzando i risultati del test.
- **Distribuzione non uniforme dell'inoculo:** garantire una distribuzione uniforme dell'inoculo sulle piastre di agar. I prati irregolari possono produrre zone di inibizione irregolari, difficili da misurare con precisione.
- **Condizioni di incubazione non uniformi:** mantenere la temperatura precisa (solitamente $35\pm 1^{\circ}\text{C}$) e il tempo di incubazione come da protocollo. Eventuali deviazioni possono alterare la crescita batterica e l'attività antibiotica..

Segnali di test non validi

Prestare attenzione agli indicatori che suggeriscono che il test potrebbe non essere valido:

- **Crescita batterica diffusa o sparsa:** invece di un prato uniforme, le colonie sparse possono indicare una scarsa preparazione dell'inoculo o una contaminazione.
- **Zone di inibizione poco chiare o sfocate:** i bordi delle zone difficili da definire possono complicare l'interpretazione. Ciò può essere dovuto a una profondità dell'agar inappropriata, a condizioni di incubazione inadeguate o a una qualità non ottimale del disco antibiotico.
- **Cambiamenti insoliti del colore dell'agar:** la decolorazione o il colore inaspettato del terreno di coltura possono indicare contaminazione o degradazione del terreno di coltura.

Concentrazione minima inibente MIC

La concentrazione minima inibente (MIC) si riferisce alla quantità più bassa di una sostanza antibatterica, misurata in mg/L (o $\mu\text{g/mL}$), che arresta completamente la



crescita visibile di un ceppo batterico in condizioni di laboratorio (in vitro) rigorosamente controllate [EUCAST, 1998].

Metodi per determinare la MIC

Di solito vengono impiegati i seguenti approcci:

- **Tecniche di diluizione:**
 - Su terreno agar solido
 - Nei terreni di coltura liquidi
 - Microdiluizione (metodo micro)
 - Microdiluizione (metodo macro)
- **Tecniche di gradiente:**
 - Utilizzo di strisce impregnate con un gradiente di concentrazione di antibiotico noto.

Tecniche di diluizione

Secondo EUCAST [2020], la microdiluizione in brodo è generalmente raccomandata, ad eccezione di fosfomicina e mecillina, per le quali è preferibile la diluizione in agar. Al contrario, le linee guida americane CLSI [2018] consentono l'uso intercambiabile di metodi di diluizione in brodo o in agar per la maggior parte delle specie batteriche e degli antibiotici. Tuttavia, esistono eccezioni specifiche: i ceppi di *Haemophilus influenzae* e antibiotici come colistina e daptomicina richiedono la diluizione in brodo esclusivamente per la determinazione della MIC. La fosfomicina, in linea con le linee guida EUCAST, viene valutata mediante diluizione in agar. Inoltre, CLSI consiglia l'uso di terreno HTM per *H. influenzae* al posto del brodo MH-F raccomandato da EUCAST. Per i test MIC, tutte le procedure quantitative utilizzano il terreno di coltura Mueller-Hinton (MH), sia in piastre di agar (MHA) che in brodo (MHB). Talvolta, il terreno di coltura viene integrato con additivi come il 5% di sangue di cavallo lisato o altri componenti a seconda della specie batterica o della classe di antibiotici. Per i batteri anaerobi, viene utilizzato agar Brucella arricchito con emina (5 µg/mL), vitamina K (1 µg/mL) e sangue di cavallo lisato al 5% [CLSI, 2018; Nagayama et al., 2008].

Le soluzioni di lavoro degli antibiotici devono essere preparate come diluizioni seriali doppie, con l'intervallo di concentrazione selezionato in base al farmaco specifico e



tenendo conto dei breakpoint MIC stabiliti per i ceppi di riferimento [ISO 20776-1, 2016]. Le diluizioni seriali devono seguire i protocolli delineati nelle linee guida pertinenti [ISO 20776-1, 2016] e quelli raccomandati da EUCAST [2000].

Nel metodo di microdiluizione in brodo, queste soluzioni antibiotiche diluite al doppio vengono dispensate nei pozzetti delle piastre da microtitolazione. Queste piastre possono essere utilizzate immediatamente per il test della MIC o conservate in sacchetti di plastica sigillati a temperature pari o inferiori a -60 °C per un massimo di tre mesi [ISO 20776-1, 2016]. Un'eccezione è la tigeciclina, per la quale il test della MIC deve essere eseguito entro 12 ore dalla preparazione del brodo Mueller-Hinton (MHB), a causa dell'accumulo di ossigeno nel tempo che ne riduce l'attività [EUCAST, 1998, 2000, 2020; Wiegand et al., 2008].

Per il metodo di diluizione in agar, 1 mL di ciascuna diluizione antibiotica viene aggiunto a 19 mL di agar Mueller-Hinton fuso (MHA) mantenuto a 45–50 °C, quindi versato in piastre Petri da 9 cm [EUCAST, 2000].

Inoculo batterico

La sospensione batterica utilizzata per il test deve essere preparata da colonie morfologicamente simili coltivate per una notte su un terreno non selettivo, solido o liquido. Le dimensioni dell'inoculo target per ciascun metodo sono:

- Microdiluizione del brodo: 5×10^5 CFU/mL [ISO 20776-1, 2016]
- Diluizione dell'agar: 1×10^4 CFU per spot [EUCAST, 2000, Andrews, 2001]

Per preparare queste sospensioni, viene prima realizzata una sospensione standard da 0,5 McFarland.

Per la microdiluizione in brodo, la sospensione McFarland 0,5 viene diluita 1:100 a circa 1×10^6 UFC/mL mescolando 9,9 mL di brodo con 0,1 mL della sospensione McFarland 0,5. Da questa, 50 µL vengono aggiunti ai pozzetti contenenti 50 µL di soluzione antibiotica, oppure, in alternativa, 10 µL di inoculo vengono aggiunti a 100 µL di antibiotico diluito. Quando si utilizzano piastre antibiotiche liofilizzate commerciali, 50 µL di sospensione McFarland 0,5 vengono aggiunti a 10 mL di brodo per ottenere l'inoculo desiderato. Per *Streptococcus pneumoniae*, 100 µL di sospensione McFarland 0,5 vengono trasferiti a 10 mL di brodo per raggiungere 5×10^5 UFC/mL [EUCAST, 2003].



Nel metodo di diluizione in agar, la sospensione McFarland 0,5 viene diluita 1:10 in soluzione salina o brodo e 1 μ L di questa diluizione viene depositato su piastre di agar contenenti diluizioni seriali di antibiotico [EUCAST, 2000].

L'inoculazione deve avvenire entro 30 minuti dalla preparazione per mantenere la vitalità cellulare. Le piastre e le colture in brodo vengono incubate a 35 ± 1 °C per 18-24 ore in condizioni aerobiche. Un'incubazione più lunga (24 ore) è raccomandata per i ceppi di glicopeptidi, oxacillina, *Streptococcus* spp. e *Haemophilus* spp. [EUCAST, 2003]. Fanno eccezione *Neisseria* spp., che richiedono un'atmosfera al 5% di CO₂, e gli anaerobi, che richiedono condizioni anaerobiche fino a 48 ore [EUCAST, 2020].

Controllo di qualità

La corretta preparazione dell'inoculo influisce in modo critico sull'affidabilità del test MIC. La torbidità della sospensione a 0,5 McFarland viene verificata mediante assorbanza spettrofotometrica a 625 nm, che dovrebbe essere compresa tra 0,08 e 0,13 [EUCAST, 2020; Wiegand et al., 2008]. Inoltre, la densità dell'inoculo nei pozzetti della micropiastre viene controllata seminando 10 μ L dal pozzetto di controllo della crescita su terreno solido e incubando; la crescita di 20-80 colonie conferma la densità target di 5×10^5 UFC/mL [ISO 20776-1, 2016].

Le misure di controllo qualità includono anche la verifica della sterilità del terreno, della vitalità del ceppo e dei valori MIC del ceppo di riferimento, come specificato dalle linee guida EUCAST e CLSI [EUCAST, 2020; CLSI, 2018]. I valori MIC per i ceppi di riferimento devono rientrare negli intervalli accettati per convalidare i risultati dei test.

Risultati della lettura

La MIC è definita come la più bassa concentrazione di antibiotico che inibisce completamente la crescita batterica visibile. Nella diluizione in agar, la crescita minima, come 1-2 colonie o una leggera velatura, viene ignorata [Andrews, 2001; EUCAST, 2000].

Nella microdiluizione in brodo, per alcuni antibiotici si applicano criteri di lettura speciali. Per gli agenti batteriostatici (ad esempio, cloramfenicolo, tetraciclina, clindamicina) contro i batteri Gram-positivi e per tigeciclina o eravaciclina contro i batteri Gram-negativi, la crescita puntiforme sul fondo dei pozzetti viene ignorata. Per



il trimetoprim-sulfametossazolo, la MIC viene letta alla concentrazione più bassa che inibisce $\geq 80\%$ della crescita rispetto al controllo [EUCAST, 2020].

Per facilitare la lettura può essere utilizzato il colorante resazurina; cambia colore in risposta all'attività metabolica batterica [Elshikh et al., 2016]. I test con modelli di crescita incoerenti richiedono la ripetizione.

Effetto Eagle

L'effetto Eagle descrive un aumento paradossale della sopravvivenza batterica a concentrazioni di antibiotici battericidi superiori a quelle ottimali, segnalato per la prima volta per la penicillina da Harry Eagle nel 1948 [Jarrad et al., 2018; Prasetyoputri et al., 2019]. Questo fenomeno è stato osservato per diverse classi di antibiotici e varie specie batteriche e può portare al fallimento del trattamento a causa di sovradosaggio. I meccanismi non sono completamente compresi, ma potrebbero coinvolgere un aumento della produzione di beta-lattamasi, una ridotta espressione della proteina legante la penicillina o stress ossidativo [McKay et al., 2009].

Metodo del gradiente

Il metodo del gradiente utilizza strisce impregnate di antibiotico con gradienti di concentrazione predefiniti (E-test) per semplificare la determinazione della MIC. Sebbene rapido e semplice, il suo utilizzo per i test di sensibilità alla colistina e alla vancomicina è diminuito a causa di risultati inaffidabili [EUCAST, 2020; CLSI, 2018]. I valori di MIC della colistina sono spesso sottostimati dai test del gradiente a causa della scarsa diffusione e interazione con i materiali delle strisce [Karvanen et al., 2017; Satlina, 2019]. Simili preoccupazioni esistono per il test della MIC della fosfomicina. Le agenzie di regolamentazione hanno limitato i metodi a gradiente per alcuni antibiotici, sebbene la ricerca continui a migliorarne l'affidabilità, inclusa l'integrazione di calcio nei terreni di coltura [Gwozdzinski et al., 2018; Green et al., 2020].

Interpretazione della MIC

I valori MIC vengono confrontati con i breakpoint clinici di organizzazioni come EUCAST e CLSI per classificare i ceppi come sensibili, intermedi o resistenti [EUCAST, 2020; CLSI, 2018]. Questi breakpoint considerano dati farmacologici,



microbiologici e clinici e vengono aggiornati periodicamente [Kahlmeter et al., 2014, 2015]. L'interpretazione della MIC guida le decisioni terapeutiche cliniche e informa ulteriori indagini sui meccanismi di resistenza.

A differenza dei metodi qualitativi, il valore di MIC consente di valutare il grado di sensibilità o resistenza batterica a un antibiotico. Questa informazione ha un'importanza epidemiologica e clinica significativa, ma richiede un'interpretazione attenta. Confrontare direttamente i valori di MIC di diversi antibiotici per determinare a quale ceppo sia più sensibile è fuorviante. Tale pratica presuppone erroneamente che l'antibiotico con la MIC più bassa sia sempre il più efficace.

EUCAST ha migliorato la valutazione della sensibilità introducendo nuovi criteri interpretativi che differenziano due livelli di sensibilità. Il primo corrisponde a regimi posologici standard, mentre il secondo si applica a valori di MIC più elevati che richiedono una maggiore esposizione agli antibiotici. L'entità della MIC influenza gli indici farmacocinetici/farmacodinamici (PK/PD) cruciali per il successo della terapia. È importante notare che i ceppi con MIC prossime ai breakpoint, sebbene classificati come sensibili a dosi standard, possono segnalare un potenziale fallimento della terapia e l'emergere di resistenza. Ad esempio, i ceppi di *Salmonella enterica* sierotipo Typhi con MIC $\leq 0,06$ mg/L presentano una mutazione nel gene *gyrA* associata allo sviluppo di resistenza ai fluorochinoloni [Jorgensen et al., 2015; Ezadi et al., 2019]. Allo stesso modo, le MIC della vancomicina pari a 2 mg/L nelle infezioni da *S. aureus* sono associate a un aumento del rischio di fallimento della terapia nonostante la classificazione di suscettibilità [van Hal et al., 2012].

Perché il grado di suscettibilità è importante? Più un ceppo è suscettibile, maggiore è la probabilità che la sua MIC scenda al di sotto del valore di soglia epidemiologica (ECOFF), indicando l'assenza di sottopopolazioni resistenti e riducendo il rischio di fallimento del trattamento. Un'elevata suscettibilità aumenta anche le possibilità di raggiungere concentrazioni terapeutiche di antibiotico anche in pazienti con parametri farmacocinetici alterati. La conoscenza dei gradi di suscettibilità all'interno degli ospedali supporta la gestione degli antibiotici identificando farmaci con valori di MIC₉₀ prossimi ai breakpoint, il che può giustificare un uso empirico limitato per ridurre al



minimo la selezione di resistenza [Doron et al., 2011; Kuti, 2016; Morency-Potvin et al., 2017; Mölstad et al., 2017].

Sfortunatamente, molti ospedali non dispongono di dati cumulativi sulla distribuzione delle MIC perché i valori effettivi di MIC (piuttosto che approssimazioni di sistemi automatizzati) vengono raramente misurati di routine e solo per antibiotici selezionati. Ciononostante, i team di stewardship possono collaborare con i laboratori di microbiologia per monitorare le tendenze di sensibilità, soprattutto laddove i fallimenti terapeutici sono frequenti nonostante i risultati di sensibilità. Tali dati aiutano a personalizzare le liste di terapia empirica e i regimi posologici. Ad esempio, Kuti et al. hanno implementato infusioni prolungate di meropenem e cefepime continue in una terapia intensiva sulla base di MIC elevate, migliorando i risultati del trattamento [Kuti, 2016]. Hanno anche incorporato linezolid per ceppi di MRSA con MIC di 1,5-2 mg/L dopo il fallimento della terapia con vancomicina ad alte dosi, riducendo la mortalità e la degenza ospedaliera [Kuti, 2016]. Trasferire tali approcci senza un contesto epidemiologico locale non è consigliabile.

L'uso di antibiotici con basse MIC può migliorare l'efficacia del trattamento; tuttavia, il fallimento dell'eradicazione può comunque verificarsi a causa di eteroresistenza, tolleranza o persistenza, fenomeni distinti dalla classica resistenza. L'eteroresistenza coinvolge piccole sottopopolazioni resistenti che crescono sotto pressione antibiotica mentre la maggior parte viene uccisa; queste sottopopolazioni sono spesso non rilevabili nei test standard, ma possono apparire come colonie all'interno delle zone di inibizione nei test a gradiente. È stata segnalata in *S. aureus*, *Klebsiella* spp., *E. coli*, *P. aeruginosa* e altri, soprattutto con antibiotici come colistina o fosfomicina [Band et al., 2019; Tsuji et al., 2019]. Si raccomandano strategie di dosaggio appropriate, tra cui dosi di carico e terapie combinate, per contrastare l'eteroresistenza.

La tolleranza descrive popolazioni batteriche che sopravvivono ad alte concentrazioni di antibiotici senza crescere, spesso a causa di mutazioni genotipiche o stati fenotipici. Tali batteri presentano MIC invariate ma una ridotta capacità battericida (rapporto MBC/MIC >32) [Band et al., 2019, Li et al., 2011]. La persistenza coinvolge una piccola frazione di cellule dormienti che sopravvivono al trattamento antibiotico, complicando gli sforzi di eradicazione [Band et al., 2019, Li et al., 2011]. Questi fenomeni mettono a dura prova la terapia nonostante l'apparente suscettibilità in vitro.



I valori di MIC sono cruciali per l'ottimizzazione della terapia antibiotica mirata quando analizzati insieme ai parametri farmacocinetici: volume di distribuzione, emivita, clearance, concentrazioni di picco e di valle e area sotto la curva. Questi variano in base a fattori individuali e nel tempo. Nelle infezioni da Gram-negativi resistenti, l'individuazione di meccanismi di resistenza (ad esempio, carbapenemasi) orienta il trattamento. EUCAST e CLSI concordano sul fatto che la presenza di meccanismi di resistenza non precluda l'uso di carbapenemi se la suscettibilità basata sulla MIC è confermata. Per gli Enterobacteriaceae produttori di carbapenemasi, il meropenem rimane un agente chiave a dosi elevate e infusioni prolungate, spesso in combinazione con altri antibiotici a seconda della suscettibilità e della categoria di MIC (S o I). Per i ceppi con MIC più elevate, vengono utilizzate terapie combinate e nuovi agenti mirati a specifici enzimi di resistenza. I ceppi pan-resistenti richiedono regimi multifarmaco, con i valori di MIC che guidano la scelta dei farmaci meno resistenti [Fritzenwanker et al., 2018; Tsuji et al., 2019; Tumbarello et al., 2012].

Gli indici farmacocinetici/farmacodinamici (PK/PD) correlano l'efficacia dell'antibiotico con la MIC. In genere, l'efficacia dipende da:

(1) Tempo al di sopra della MIC ($T > MIC$): la percentuale di intervallo di dosaggio durante il quale i livelli di farmaco superano la MIC. Un $T > MIC$ vicino al 100% è correlato al successo del trattamento, soprattutto nei pazienti immunocompromessi e nelle infezioni Gram-negative. Per i carbapenemi e i batteri Gram-positivi, soglie inferiori possono essere sufficienti [Sinnollareddy et al., 2012; Turnidge et al., 1998]. MIC inferiori facilitano il raggiungimento di $T > MIC$ con dosaggio standard; MIC più elevate possono richiedere aggiustamenti della dose o terapie alternative. Solo le concentrazioni di farmaco libero (non legato) contribuiscono all'efficacia. L'aumento dei livelli di farmaco ben al di sopra della MIC non offre alcun beneficio aggiuntivo per gli antibiotici tempo-dipendenti [Muller et al., 2018; Tam et al., 2020].

Diventa più facile cogliere la relazione tra la MIC e il raggiungimento dell'indice PK/PD quando l'interazione viene presentata in forma grafica e anche con una delle formule matematiche per il calcolo di $T > MIC$ proposte da Turnidge nel 1998 [Masich et al., 2018]:



$$\%T_{C>MIC} = \ln \left[\frac{\text{Dose}}{V_d \times MIC} \right] \times \left[\frac{t_{1/2}}{0.693} \right] \times \left[\frac{100}{DI} \right]$$

dove: $\ln$ —logaritmo naturale, V_d —volume di distribuzione (L/kg), (kg), $t_{1/2}$ —emivita sierica (ore), costante di velocità di eliminazione (h⁻¹), DI = intervallo di dosaggio (ore).

(2) C_{max}/MIC è un parametro caratteristico degli antibiotici la cui efficacia dipende dalla concentrazione massima che è molte volte maggiore della MIC (min. 8–10×) e non dal tempo in cui viene mantenuta al di sopra della MIC [Heffernan et al., 2018]. Tuttavia, come per il parametro discusso in precedenza, valori di MIC più bassi hanno maggiori probabilità di soddisfare la condizione di efficacia per questi antibiotici riducendo al contempo il rischio di concentrazioni tossiche.

(3) AUC/MIC ($\int AUC/MIC$): caratterizza gli antibiotici dipendenti dal tempo e dalla concentrazione [Abdul-Aziz e Roberts, 2020; Pea et al., 2005; Salem et al., 2014; Tam et al., 2018; Tsala et al., 2018; Xie et al., 2017]. Come per i due parametri precedenti, il valore MIC influenzerà l'effetto del farmaco.

Calcolo dell'indice AUC/MIC

La formula per calcolare il rapporto AUC/MIC , considerando il valore MIC [Mohr et al., 2004], è:

$$\frac{AUC}{MIC} = \ln \left[\frac{\text{Dose}}{V_d \times MIC} \right] \times \left[\frac{t_{1/2}}{0.693} \right] \times \left[\frac{24}{DI} \right]$$

dove: $\ln$ —logaritmo naturale, V_d —volume di distribuzione (L/kg), $t_{1/2}$ —emivita sierica (ore), DI —intervallo di dosaggio (ore).

Utilizzo dei parametri PK nella previsione dell'efficacia clinica

Quando si applicano parametri farmacocinetici (PK) per predire l'efficacia degli antibiotici, è importante selezionare valori specifici per gruppi di pazienti (ad esempio, pazienti in terapia intensiva, pazienti con polmonite nosocomiale, bambini, donne in gravidanza) o, idealmente, dati PK personalizzati per il paziente. Tuttavia, la



misurazione individuale della PK è complessa [Parthasarathy et al., 2018]. Sono disponibili analizzatori immunoenzimatici automatizzati per le concentrazioni sieriche di antibiotici principalmente per vancomicina e aminoglicosidi [Parthasarathy et al., 2018], pertanto vengono comunemente utilizzati parametri PK basati sulla popolazione. Sfortunatamente, la maggior parte dei dati PK disponibili deriva da volontari sani, mentre i pazienti malati presentano spesso una PK alterata, che influenza gli esiti del trattamento.

Sfide nella combinazione dei dati MIC e PK

Per determinare accuratamente gli indici farmacocinetici/farmacodinamici (PK/PD), le misurazioni della MIC dovrebbero coincidere con le concentrazioni sieriche di antibiotico dopo la somministrazione, il che è praticamente difficile a causa delle rapide variazioni della concentrazione del farmaco, mentre la MIC è una misurazione statica. La determinazione accelerata della MIC migliorerebbe l'ottimizzazione della terapia, in modo simile ai test di sensibilità rapidi effettuati direttamente da emocolture positive mediante diffusione su disco [EUCAST, 2020]. Sebbene siano stati esplorati metodi di MIC diretta che utilizzano strisce a gradiente [Bianco et al., 2019; Hong et al., 1996; Kontopidou et al., 2011], non hanno ricevuto l'approvazione EUCAST o CLSI.

Attualmente, i valori di MIC₉₀ derivati da dati epidemiologici cumulativi possono essere utilizzati in attesa dei risultati individuali di MIC. Metodi statistici come le simulazioni Monte Carlo stimano la probabilità di raggiungere indici farmacocinetici/farmacodinamici ottimali sulla base dei dati farmacocinetici di popolazione e dei valori di MIC. Queste simulazioni aiutano a valutare gli aggiustamenti del dosaggio per una terapia efficace [EUCAST, 2020]. Sono necessari aggiornamenti continui di questi modelli per riflettere l'evoluzione delle condizioni cliniche e dei regimi posologici.

Limitazioni del test MIC

Limitazioni del test MIC

I test di sensibilità antimicrobica, comprese le determinazioni della MIC, valutano le interazioni dirette tra patogeno e farmaco in vitro e non tengono conto di fattori dell'ospite quali distribuzione del farmaco, legame proteico, funzione degli organi,



risposta immunitaria, nutrizione o trattamenti concomitanti, tutti fattori che influenzano i risultati clinici [Doern e Brecher, 2011; Falagas et al., 2012; Mouton et al., 2018; Puttaswamy et al., 2018]. Pertanto, la sola sensibilità non garantisce il successo terapeutico.

Valori di MIC più elevati sono correlati a un aumento del rischio di fallimento del trattamento, anche quando i ceppi sono classificati come sensibili. Ad esempio, l'efficacia della vancomicina contro *Staphylococcus aureus* diminuisce significativamente a livelli di MIC ≥ 1 mg/L [Kullar et al., 2011; Maclayton et al., 2006; Moise-Broder et al., 2004; Sakoulas et al., 2004]. L'interpretazione clinica della MIC richiede l'integrazione con i parametri farmacocinetici, richiedendo una collaborazione multidisciplinare tra microbiologi, farmacologi e clinici.

Le determinazioni della MIC comportano variabilità; misurazioni ripetute possono differire fino a due volte, influenzando la classificazione della suscettibilità e le decisioni sul dosaggio [Doern e Brecher, 2011]. Inoltre, i risultati della MIC rappresentano inoculi standardizzati, non tenendo conto della variabilità della carica batterica nei siti di infezione, che può influenzare la resistenza in vivo e gli esiti del trattamento [Mouton et al., 2018; Puttaswamy et al., 2018]. Anche la virulenza del ceppo, non riflessa dalla MIC, influisce sull'efficacia della terapia [Doern e Brecher, 2011].

Tempistica e utilizzo pratico dei dati MIC

I risultati della MIC richiedono in genere 3-5 giorni, creando un divario tra la richiesta del test e la sua disponibilità. Nel frattempo, le caratteristiche e le sensibilità dei patogeni possono evolversi, complicando le decisioni terapeutiche [Doern e Brecher, 2011]. Ciononostante, i dati cumulativi sulla MIC rimangono preziosi per orientare la terapia empirica e la stewardship antibiotica, a condizione che derivino da isolati di infezione, non da colonizzazione o contaminazione, per evitare conclusioni fuorvianti.

La MIC è attualmente il miglior parametro disponibile per valutare l'efficacia antibiotica contro i ceppi batterici. Nonostante la standardizzazione del metodo, i valori di MIC possono variare di $\pm$ una diluizione, solitamente senza impatto clinico; tuttavia, i valori prossimi ai breakpoint richiedono un'interpretazione attenta per la classificazione della resistenza e la selezione della terapia ottimale.



L'integrazione della MIC con parametri farmacocinetici personalizzati può migliorare notevolmente i risultati del trattamento. Sebbene la misurazione diretta dei parametri farmacocinetici/farmacodinamici sia complessa e spesso inaccessibile, le simulazioni Monte Carlo forniscono stime utili che collegano la MIC alle strategie di dosaggio. L'introduzione di due categorie di sensibilità da parte di EUCAST facilita il dosaggio personalizzato in base alla MIC.

La determinazione in laboratorio della MIC rimane impegnativa e dispendiosa in termini di tempo. Anche valori di MIC precisi non sempre possono predire il successo clinico a causa di meccanismi non rilevabili come eteroresistenza, tolleranza o persistenza, che contribuiscono al fallimento del trattamento nonostante la scelta ottimale dell'antibiotico.

I valori di MIC sono cruciali per ottimizzare la terapia antibiotica mirata se analizzati insieme ai parametri farmacocinetici e farmacodinamici. La **farmacocinetica (PK)** si riferisce al modo in cui l'organismo assorbe, distribuisce, metabolizza ed elimina l'antibiotico, influenzando le concentrazioni del farmaco nel sito di infezione. I parametri PK importanti includono il volume di distribuzione (V_d), l'emivita sierica ($t_{1/2}$), la clearance, le concentrazioni di picco e di valle e l'area sotto la curva concentrazione-tempo (AUC). Questi parametri variano da paziente a paziente a seconda di fattori quali età, peso, funzionalità d'organo e stato della malattia.

La **farmacodinamica (PD)**, d'altra parte, studia il modo in cui l'antibiotico agisce sui batteri, il suo meccanismo d'azione e la relazione tra concentrazione del farmaco e uccisione batterica o inibizione della crescita. La combinazione di PK e PD (denominata PK/PD) aiuta a determinare il regime di dosaggio ottimale per massimizzare l'efficacia dell'antibiotico riducendo al minimo la tossicità e lo sviluppo di resistenza.

Integrando i valori MIC con i singoli parametri PK e PD, i medici possono personalizzare meglio la terapia antibiotica per ottenere l'eradicazione batterica più efficace.



Confronto tra i metodi Kirby-Bauer e MIC (facoltativo)

Sia il metodo di diffusione su disco di Kirby-Bauer sia quello della concentrazione minima inibente (MIC) sono strumenti essenziali nei test di sensibilità antimicrobica, ciascuno con i suoi vantaggi e limiti.

Vantaggi di Kirby-Bauer:

- Semplice, conveniente e ampiamente accessibile.
- Richiede attrezzature specialistiche minime e competenze tecniche.
- Adatto per lo screening rapido della suscettibilità batterica nei laboratori clinici di routine.

Svantaggi di Kirby-Bauer:

- Fornisce solo risultati qualitativi (Sensibile, Intermedio, Resistente).
- Meno preciso per gli antibiotici con finestre terapeutiche ristrette o quando l'ottimizzazione del dosaggio è fondamentale.
- I risultati possono essere influenzati dalle variazioni nella profondità dell'agar, nelle dimensioni dell'inoculo e nelle condizioni di incubazione.

Vantaggi della MIC:

- Fornisce una misurazione quantitativa dell'attività antibiotica, fornendo la concentrazione più bassa che inibisce la crescita batterica.
- Consente regolazioni precise del dosaggio, soprattutto in caso di infezioni complicate o resistenti.
- Supporta l'integrazione con dati farmacocinetici/farmacodinamici (PK/PD) per una terapia ottimizzata.

Svantaggi della MIC:

- Richiede più lavoro e tempo.
- Richiede attrezzature specializzate e personale formato.
- Costo generalmente più elevato rispetto alla diffusione su disco.

Quando utilizzare ciascun metodo

Il test di Kirby-Bauer è preferito per lo screening di suscettibilità di routine su larga scala grazie alla sua semplicità e al rapporto costo-efficacia. Il test della MIC è



raccomandato quando sono necessari dati quantitativi precisi per il processo decisionale clinico, come in caso di infezioni gravi, fallimenti terapeutici o infezioni causate da organismi multifarmacoresistenti.

Discussione / Esempi pratici

L'interpretazione dei test di sensibilità antimicrobica deve tenere conto sia della metodologia di laboratorio che del contesto clinico. Alcune considerazioni pratiche includono:

- Un isolato batterico può essere classificato come sensibile da Kirby-Bauer ma avere una MIC vicina al punto di interruzione della resistenza, il che richiede un'attenta interpretazione clinica.
- La variabilità nella densità dell'inoculo, nella composizione dell'agar o nel tempo di incubazione può causare risultati incoerenti della diffusione su disco. È essenziale attenersi scrupolosamente ai protocolli standardizzati.
- Meccanismi di resistenza come l'eteroresistenza o la persistenza batterica possono portare al fallimento del trattamento nonostante la suscettibilità in vitro.
- Errori quali la contaminazione del disco, la conservazione impropria o la preparazione errata dell'inoculo possono invalidare i risultati del test.

Esempi concreti dimostrano che la correlazione dei dati di laboratorio con gli esiti dei pazienti migliora il successo della terapia e informa la gestione degli antibiotici.

Conclusione

Un test di sensibilità antimicrobica accurato è fondamentale per un'efficace gestione delle infezioni e per una gestione efficace degli antibiotici. Comprendere i punti di forza e i limiti dei metodi Kirby-Bauer e MIC garantisce un'adeguata selezione del test e un'interpretazione dei risultati adeguata. Il controllo di qualità continuo, la standardizzazione dei metodi e la collaborazione interdisciplinare sono fondamentali per ottimizzare l'uso degli antibiotici e combattere la resistenza.



2.3 Bibliografia

Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48 Suppl 1:5–16.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966;45(4):493–6.

Bauer AW, Perry DM, Kirby WM. Single-disc antibiotic-sensitivity testing of staphylococci; an analysis of technique and results. *AMA Arch Intern Med.* 1959;104(2):208–16.

Cantón R, Morosini MI. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35(5):977–91.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.* CLSI document M100. 26th ed. Wayne (PA): CLSI; 2016.

CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically.* CLSI document M07. 11th ed. Wayne (PA): CLSI; 2018.

DIFCO Laboratories. *Difco Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures.* 10th ed. Detroit (MI): Difco Laboratories; 1984.

Doern GV, Brecher SM. The clinical predictive value (or lack thereof) of the results of in vitro antimicrobial susceptibility tests. *J Clin Microbiol.* 2011;49(9 Suppl):S11–4.

Doron S, Davidson LE. Antimicrobial stewardship. *Mayo Clin Proc.* 2011;86(11):1113–23.

Elshikh M, Ahmed S, Funston S, Dunlop P, McGaw M, Marchant R, Banat IM. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnol Lett.* 2016;38(6):1015–9.

EUCAST. *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters.* Version 12.0. Växjö (Sweden): EUCAST; 2022.

EUCAST. *Guidance documents for antimicrobial susceptibility testing.* Växjö (Sweden): EUCAST; 2020. Available from: <https://www.eucast.org>

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). *Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution.* Clin Microbiol Infect. 2000;6(9):509–15.



Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Adjustment of dosing of antimicrobial agents for bodyweight in adults. *Lancet*. 2012;379(9815):248–56.

Fritzenwanker M, Imirzalioglu C, Herold S, Wagenlehner FM, Zimmer KP, Chakraborty T. Treatment options for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Antibiotics (Basel)*. 2018;7(3):88.

Green DA, Chen J, Fulmer Y, Chou S. Antibiotic resistance in non-fermenting Gram-negative bacteria. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(8):602.

Gwozdinski K, Maczynska B, Kepa M, Lechowicz L, Stefaniuk E, Hryniewicz W, et al. Differences in susceptibility testing methods for antibiotics: disk diffusion vs. automated systems. *Pol J Microbiol*. 2018;67(4):475–82.

Heffernan AJ, Sime FB, Lipman J, Roberts JA. Individualizing therapy to minimize bacterial multidrug resistance. *Drugs*. 2018;78(7):693–707.

Hong MC, Hsueh PR, Hsu K. Clinical significance of bacteriuria in catheterized patients. *J Formos Med Assoc*. 1996;95(8):589–94.

ISO 20776-1:2019. *Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices – Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases*. Geneva: International Organization for Standardization; 2019.

Jarrad AM, Karoli T, Blaskovich MAT, Cooper MA. Optimization of antibiotic compounds using structure–activity relationships. *Future Med Chem*. 2018;10(9):901–21.

Jorgensen JH, Turnidge JD. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In: Murray PR, editor. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington (DC): ASM Press; 2007. p. 1152–72.

Jorgensen JH, Turnidge JD. Susceptibility testing methods and interpretive criteria. In: Jorgensen JH, Pfaller MA, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 11th ed. Washington (DC): ASM Press; 2015. p. 1253–73.

Kahlmeter G. The 2014 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) guideline. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(3):255–9.



- Karvanen M, Malmberg C, Lagerbäck P, Friberg LE, Cars O. Integration of PK/PD and susceptibility testing in antimicrobial resistance studies. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23(5):306–11.
- Kontopidou F, Plachouras D, Papadomichelakis E, Poulakou G, Skoutelis A, Armaganidis A, Giamarellou H. Colonization and infection by *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in intensive care unit patients in Greece. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(11):1792–7.
- Kullar R, Goff DA. Transformation of antimicrobial stewardship programs through technology and informatics. *Infect Dis Clin North Am.* 2014;28(2):291–300.
- Kuti JL, Nightingale CH, Nicolau DP. Optimizing pharmacodynamic target attainment using Monte Carlo simulation. *Pharmacotherapy.* 2006;26(9):1320–32.
- Li B, Webster TJ. Bacteria antibiotic resistance: New challenges and opportunities for implant-associated orthopedic infections. *J Orthop Res.* 2018;36(1):22–32.
- Maclayton DO, Suda KJ, Hamilton LA, McDuffie RD. Infectious disease pharmacotherapy and therapeutic drug monitoring. *Clin Pharmacokinet.* 2006;45(5):391–411.
- Masich AM, Martirosov DM, Lodise TP. Current approach to antimicrobial pharmacodynamics in clinical practice. *Infect Dis Clin North Am.* 2018;32(2):319–35.
- McKay GA, Beaulieu S, Arhin FF, Belley A, Moeck G, Pelletier J, Parr TR Jr. Time-kill kinetic studies of novel anti-MRSA agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(2):737–40.
- Mohr JF, Murray BE. Point-counterpoint: implications of vancomycin MIC “creep”. *Clin Infect Dis.* 2007;45(4):439–40.
- Moise-Broder PA, Forrest A, Birmingham MC, Schentag JJ. Pharmacodynamics of vancomycin and other glycopeptides in patients with *Staphylococcus aureus* lower respiratory tract infections. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(13):925–42.
- Mölstad S, Löfmark S, Carlin K, Erntell M, Aspevall O, Blad L, et al. Lessons learned from 20 years of the Swedish strategic programme against antibiotic resistance. *Bull World Health Organ.* 2017;95(11):764–73.
- Morency-Potvin P, Schwartz DN, Weinstein RA. Antimicrobial stewardship: how the microbiology laboratory can right the ship. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30(1):381–407.



Mouton JW, Brown DF, Apfalter P, Cantón R, Giske CG, Ivanova M, et al. The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting clinical MIC breakpoints: the EUCAST approach. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(9):806–12.

Muller AE, Theuretzbacher U, Mouton JW. Use of old antibiotics now and in the future from a pharmacokinetic/pharmacodynamic perspective. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(9):803–5.

Nagayama A, Nagata M, Oka T. Comparative study of MIC determination methods for macrolides. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(2):341–5.

Parthasarathy R, Martinez M, Gupta A, Ng J. Analytical approaches for therapeutic drug monitoring of antibiotics: current practice and future directions. *Clin Biochem.* 2018;60:18–28.

Pea F, Viale P, Cojutti P, Del Favero A, Furlanut M. Therapeutic drug monitoring of antibacterials in critically ill patients: a tool for improving therapy. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(9):925–45.

Prasetyoputri A, Fuhler GM, Wijmenga C, Netea MG, Pandey R, de Jong DJ. Pathogen persistence and antibiotic tolerance mechanisms. *Front Immunol.* 2019;10:2728.

Puttaswamy SK, Kandasamy K, Pokhrel M, Mohan R. Newer methods for antibiotic susceptibility testing. *J Clin Diagn Res.* 2018;12(6):DC17–21.

Sakoulas G, Moellering RC Jr. Increasing antibiotic resistance among MRSA: current trends and future options. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14 Suppl 3:16–23.

Salem AHA, Houshmand G, Alnahhas F, Alsalem A. Combination therapy for multidrug-resistant Gram-negative infections. *Infect Drug Resist.* 2014;7:337–42.

Satlina T, Roberts JA, Udy AA. Strategies to optimize antimicrobial therapy in critically ill patients. *Curr Opin Infect Dis.* 2019;32(6):587–93.

Sinnollareddy MG, Roberts MS, Lipman J, Roberts JA. Pharmacokinetic–pharmacodynamic considerations for antibiotic therapy in critically ill patients. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2012;5(6):731–48.

Tam VH, Ledesma KR, Chang KT, Weston JS, Caeiro JP, Garey KW. Determining pharmacodynamic targets of glycopeptides and lipopeptides against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(3):e01686-17.



Tam VH, Louie A, Deziel MR, Liu W, Drusano GL. The relationship between quinolone exposures and resistance amplification is characterized by an inverted U: a new paradigm for optimizing pharmacodynamics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(2):744–7.

Tsuji BT, Pogue JM, Zavascki AP, Paul M, Daikos GL, Forrest A, et al. International consensus guidelines for the optimal use of the polymyxins. *Pharmacotherapy.* 2019;39(1):10–39.

Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, Trecarichi EM, Tumietto F, Marchese A, et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin Infect Dis.* 2012;55(7):943–50.

Turnidge J, Paterson DL. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):391–408.

van Hal SJ, Fowler VG Jr. Is it time to replace vancomycin in the treatment of MRSA infections? *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(4):355–61.

Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc.* 2008;3(2):163–75.

Winn W Jr, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th ed. Philadelphia (PA): Lippincott Williams & Wilkins; 2006.

Xie J, He Z, Lv S, Wang S. Comparative evaluation of methods for detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Front Microbiol.* 2017;8:914.



CAPITOLO 3. GLI EFFETTI TOSSICI DEI CONTAMINANTI SUL CORPO UMANO E I METODI GREEN INNOVATIVI PER RIDURLI

3.1 Introductione

La produzione sostenibile di prodotti naturali, attraverso un'attenta selezione delle risorse vegetali e la conservazione dei loro principi attivi, offre percorsi promettenti per mitigare gli effetti tossici dei contaminanti ambientali sul corpo umano, costituendo un pilastro di strategie verdi innovative per la riduzione dell'inquinamento.

In tutto il mondo, le sostanze tossiche ambientali e i contaminanti chimici sono emersi come una seria e crescente sfida per la salute pubblica. Provengono da un'ampia gamma di attività umane, tra cui la produzione industriale, l'agricoltura intensiva, la combustione di combustibili fossili e la cattiva gestione dei rifiuti, e sono ora presenti nell'aria, nel suolo, nell'acqua e persino nella catena alimentare. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS 2023) ha riferito che nel 2016, quasi un quarto di tutti i decessi e le malattie a livello mondiale erano legati a fattori ambientali che potevano essere prevenuti, come l'inquinamento chimico e i rifiuti pericolosi.

Le conseguenze di questi inquinanti sulla salute umana spaziano da effetti a breve termine, come difficoltà respiratorie e irritazioni cutanee, a condizioni croniche e potenzialmente letali. Si ritiene che l'inquinamento atmosferico da solo causi oltre cinque milioni di vittime ogni anno (Università di Augusta, 2023). Alcune sostanze chimiche possono agire come cancerogene, teratogene o mutagene, causando danni biologici permanenti.

L'esposizione avviene attraverso molteplici vie: respirando aria contaminata, consumando cibo e acqua inquinati o tramite contatto cutaneo (Sokan-Adeaga et al., 2023). Una volta assorbite, queste sostanze possono danneggiare organi vitali come polmoni, cuore, fegato, reni, cervello e organi riproduttivi, con i bambini, gli anziani e le donne in gravidanza più vulnerabili (Balbus et al., 2013).

Il problema non è solo medico, ma anche economico. Si stima che l'avvelenamento da piombo da solo costi all'economia globale circa 6.000 miliardi di dollari all'anno, pari a circa il 6,9% del PIL mondiale (OMS 2023). Nel 2019, si stima che i bambini sotto i



cinque anni abbiano perso complessivamente 765 milioni di punti di QI a causa dell'esposizione al piombo (Banca Mondiale, 2023), con conseguenze durature per lo sviluppo umano e la produttività.

Si prevede che il cambiamento climatico peggiorerà la situazione alterando i modelli di rilascio e distribuzione degli inquinanti e la vulnerabilità umana (Balbus et al., 2013). Questi cambiamenti potrebbero modificare i profili di rischio, rendendo essenziale rivalutare le attuali strategie di valutazione e gestione dei rischi per la salute ambientale.

Questo capitolo esamina il modo in cui i contaminanti ambientali influiscono sul corpo umano e presenta approcci ecologici innovativi volti a ridurre l'impatto, supportando la visione globale di un futuro senza inquinamento (UNEP, 2023).

3.2 Effetti tossici sul corpo umano

Inquinamento chimico

L'uso di sostanze chimiche è aumentato drasticamente in alcuni settori, in particolare nell'industria, nell'agricoltura e nei trasporti. Dal 1950 sono state sintetizzate più di 140.000 nuove sostanze chimiche e pesticidi; oltre 3.000 di queste vengono utilizzate in quantità molto elevate (oltre 300.000 kg all'anno), disperse nell'ambiente e a cui sono esposti tutti gli esseri viventi.

L'esposizione umana avviene attraverso l'aria che respiriamo, l'acqua che beviamo o con cui ci laviamo, il cibo che mangiamo, la terra che tocchiamo, gli utensili che utilizziamo, i detersivi, i cosmetici, ecc.

Siamo esposti praticamente ovunque: a casa, a scuola, al lavoro, nei parchi, in campagna, al mare e in montagna, e durante i viaggi. Meno del 45% di queste sostanze è stato studiato per la tossicità di base e meno del 10% per gli effetti sui bambini.

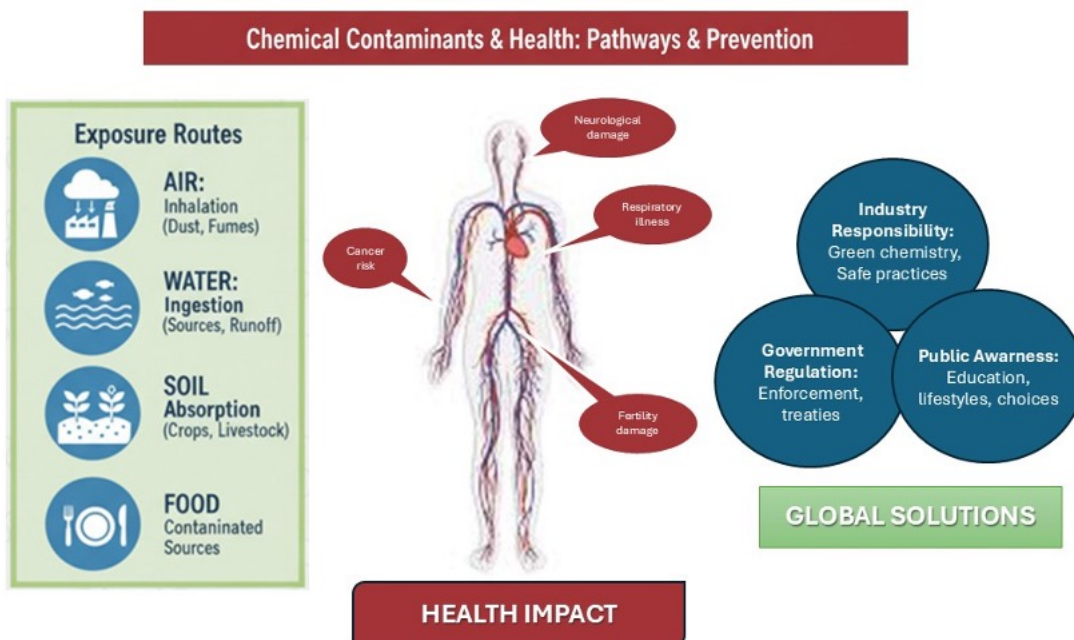


Figura 3.1 Inquinanti chimici e salute: percorsi di esposizione e strategie di prevenzione a livello globale

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, i 10 maggiori rischi chimici per la salute pubblica sono: piombo, amianto, mercurio, arsenico, benzene, diossine, pesticidi altamente tossici, cadmio, fluoro e sostanze fissate nel particolato in generale. Le sostanze chimiche possono causare effetti negativi sulla salute, spesso dovuti a un'esposizione prolungata.

Le diossine e le sostanze diossina-simili, compresi i policlorobifenili (PCB), sono considerate inquinanti organici persistenti (POP), ovvero persistono nell'ambiente, si accumulano negli organismi viventi e possono essere dannose per la salute. Si trovano spesso in regioni remote del mondo perché vengono trasportate dall'acqua, dall'aria e da altri mezzi su lunghe distanze dalla loro fonte. Le sostanze chimiche che agiscono come interferenti endocrini sono particolarmente pericolose per la salute.

Inquinamento da farmaci

I farmaci, pur essendo estremamente utili e talvolta essenziali per la sopravvivenza, sono diventati motivo di preoccupazione in tutto il mondo in quanto contaminanti



ambientali "emergenti" (contaminanti che fino ad ora non avevano destato preoccupazione, ovvero si potrebbe parlare di una "preoccupazione emergente"). Questo perché il loro uso sempre più diffuso ha portato alla loro dispersione nell'ambiente, poiché i residui possono diffondersi durante la produzione, l'uso (eliminati nelle urine, nelle feci, nel sudore) e lo smaltimento.

Residui di vari tipi di farmaci (ormoni, farmaci antitumorali, antidepressivi, antibiotici, ecc.) sono stati trovati nelle acque superficiali, nelle falde acquifere, nell'acqua potabile, nel suolo, nell'aria e nella fauna selvatica di tutto il mondo. Le quantità dei singoli farmaci sono minime, ma le molecole (ovvero i principi attivi contenuti nei vari farmaci) presenti sono numerose, la loro distribuzione ambientale è globale e animali e persone sono esposti a numerose miscele di queste sostanze per lunghi periodi.

Tutto ciò solleva preoccupazioni sul fatto che anche a concentrazioni minime – livelli di nanogrammi (un milionesimo di grammo) o microgrammi (un milionesimo di grammo) per litro – i farmaci e i loro residui possano rappresentare un rischio per la salute umana, soprattutto perché sono già noti significativi effetti avversi sugli animali. Non è facile individuare la fonte primaria di inquinamento.

La maggior parte dei farmaci che assumiamo viene eliminata attraverso l'urina, le feci o il sudore, finendo quindi nelle acque reflue. Molti farmaci vengono applicati sotto forma di creme, lozioni e cerotti medicati, e la parte che non viene assorbita dalla pelle viene eliminata durante la doccia o il bagno, finendo nuovamente nelle acque reflue. Una parte dei farmaci inutilizzati e scaduti che riempiono il tipico armadietto dei medicinali di ogni casa italiana non viene smaltita correttamente. Anche gli ospedali e le case di cura private possono essere una fonte di inquinamento; infatti, sono strutture in cui vengono utilizzati molti farmaci, e i sistemi di depurazione delle acque reflue sono spesso inadeguati a filtrare queste sostanze. Le aziende farmaceutiche sono una fonte significativa di inquinamento, sebbene non tutte nella stessa misura.

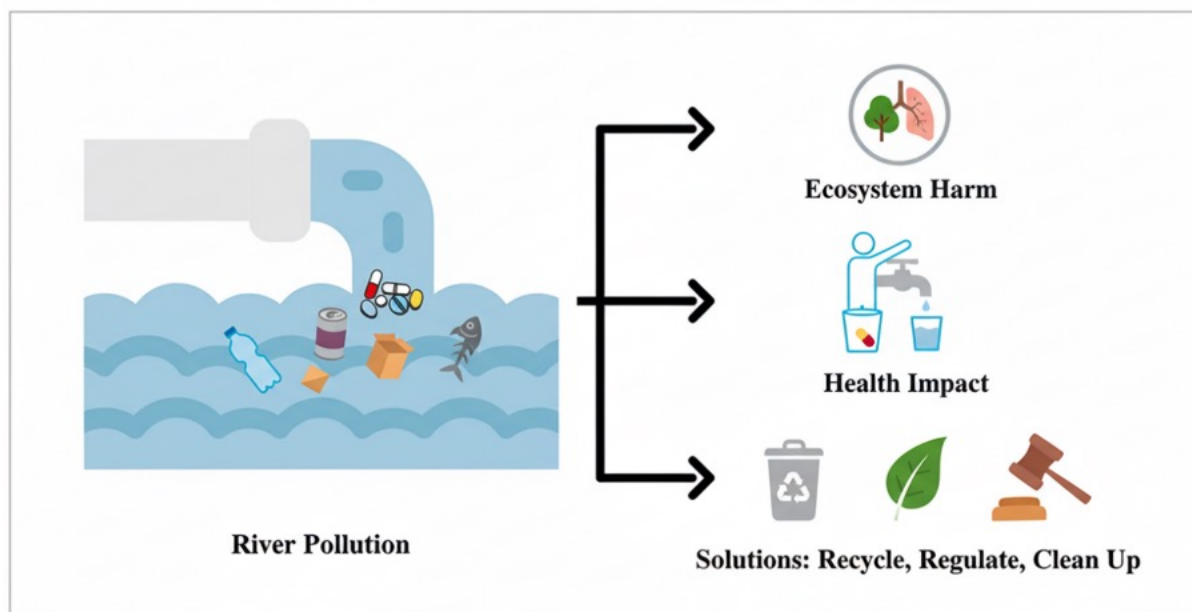


Figura 3.2. Inquinamento farmaceutico e obiettivi di sviluppo sostenibile

I farmaci sono progettati per essere biologicamente attivi (ovvero per agire sulle cellule dell'organismo) anche a basse concentrazioni, per durare a lungo e spesso non sono biodegradabili (ovvero non si degradano rapidamente nell'ambiente). Pertanto, tendono a persistere nell'ambiente e ad accumularsi (bioaccumularsi) nel biota, ovvero nei vari organismi animali o vegetali che vivono in un ecosistema. Recenti ricerche hanno dimostrato che i farmaci si accumulano negli invertebrati acquatici, per poi essere ingeriti dai pesci, che a loro volta possono essere consumati dall'uomo.

Questo fenomeno, noto come "biomagnificazione", contamina la catena alimentare. Non è facile studiare gli effetti di quantità minime di farmaci sull'organismo umano. Gli effetti cronici (dovuti a un'esposizione prolungata) potrebbero essere dovuti ad alterazioni minori, non facili da individuare nel tempo.

Quando, dopo molti anni, il danno diventa evidente, non è sempre possibile stabilire se esista una correlazione tra l'esposizione al farmaco e il disturbo di cui soffre una persona. L'effetto cumulativo di quantità anche minime di prodotti farmaceutici nell'acqua potabile è preoccupante, in particolare tra le fasce di popolazione più vulnerabili (bambini, donne in gravidanza, persone con disabilità, ecc.).



L'aspetto più temuto, i cui effetti sono già evidenti, è l'esposizione ambientale indiretta agli antibiotici, che può creare batteri resistenti agli antibiotici e quindi esporre gli esseri umani al rischio di infezioni da batteri non trattabili. Nonostante l'incertezza sugli effetti sulla salute umana, esistono prove considerevoli che i farmaci presenti nell'acqua influenzino la vita acquatica e non solo! Molti studi riportano effetti chiari e significativi dovuti alla contaminazione da farmaci dell'acqua e dell'ambiente, come la femminilizzazione dei pesci e la sterilità delle rane causata dai residui della pillola anticoncezionale. Studi sui pesci a monte e a valle degli impianti di trattamento delle acque reflue hanno rilevato un numero maggiore di pesci femmine e intersessuali a valle. In Pakistan, il diclofenac (un potente antinfiammatorio) ha causato la morte di molte migliaia di avvoltoi che si nutrono di carcasse contaminate dal farmaco. Il diclofenac, alle concentrazioni riscontrate in acqua dolce, causa anche lesioni ai reni e alle branchie delle trote. La sulfadiazina, un antimicrobico utilizzato nell'allevamento suino, causa resistenza agli antibiotici nei batteri del suolo.

Inquinamento da plastica

Il rilascio nell'ambiente di particelle derivate dalla plastica, ovvero microplastiche (da 0,1 a 5.000 micrometri (μm)) e nanoplastiche (da 0,001 a 0,1 μm , ovvero da 1 a 100 nanometri), rappresenta un problema globale.

Le microplastiche e le nanoplastiche sono diffuse in tutti gli ecosistemi marini e terrestri.

L'esposizione umana può avvenire attraverso l'ingestione di pesce, molluschi, ostriche, cozze, acqua contaminata, sale o persino attraverso l'inalazione di aria contaminata. Preoccupano le elevate concentrazioni di sostanze pericolose e interferenti endocrini che possono essere ingerite attraverso le microplastiche, come il bisfenolo A (dagli imballaggi), i policlorobifenili (PCB) e gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA)..

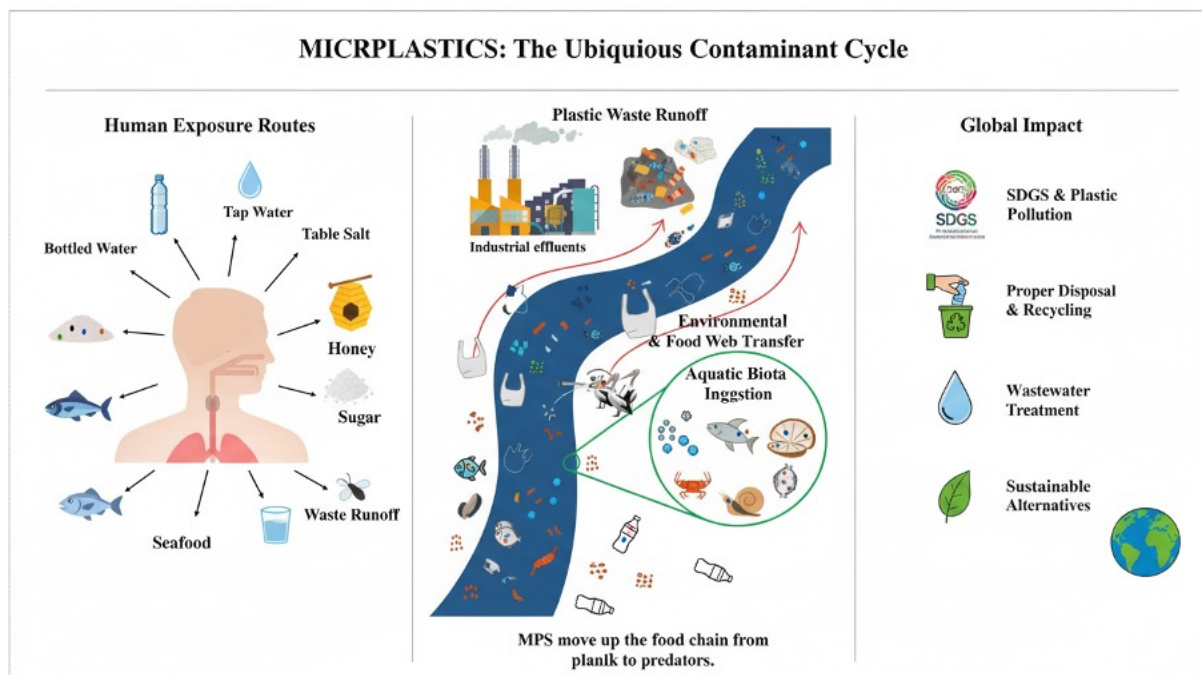


Figura 3.3 Inquinamento da micro(nano)plastiche e salute umana

Altri

L'influenza degli inquinanti ambientali sulla salute umana è ampia e complessa, e costituisce il fulcro della tossicologia ambientale, una disciplina dedicata a comprendere come le sostanze chimiche, agendo singolarmente o in combinazione, possano danneggiare gli organismi viventi nel tempo (Shetty, 2023). Anche a basse concentrazioni, molte sostanze possono interagire in modi che amplificano il loro potenziale tossico, rendendo l'esposizione a lungo termine particolarmente rischiosa.

Impatti tossicologici generali

Gli inquinanti sono stati collegati a un ampio spettro di malattie, tra cui cancro, cardiopatia ischemica, broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), ictus, disturbi neurologici e mentali e diabete (Shetty, 2023). Alcuni contaminanti si accumulano selettivamente in determinati organi, raggiungendo concentrazioni interne superiori a quelle riscontrate nell'ambiente circostante. Questo processo di bioaccumulo può, nel corso degli anni, causare danni significativi e talvolta irreversibili agli organi (Alharbi, 2018).



Esempi notevoli di sostanze nocive includono:

- DDT – un pesticida storicamente utilizzato contro i parassiti agricoli e ancora applicato in alcune regioni dell’Africa, dell’Asia e dell’America Latina.
- Furani: composti derivanti dalla cottura ad alta temperatura, da alcuni processi chimici e da alcuni prodotti di consumo come i materiali di imballaggio.
- Diossine: sottoprodotti tossici di processi industriali o eventi naturali come incendi boschivi ed eruzioni vulcaniche.
- Composti organici volatili (COV): sostanze chimiche che evaporano facilmente e che si trovano in vernici, solventi, carburanti, materiali da costruzione e detergenti.
- Aldeidi, ad esempio la formaldeide, utilizzata nei prodotti in legno pressato, nei tessuti e nei cosmetici.
- Metalli pesanti volatili, come il vapore di mercurio proveniente da attività industriali, dalla combustione del carbone o dalla decomposizione dei rifiuti.
- Idrocarburi clorurati: presenti in alcuni solventi e prodotti per la pulizia.
- Droghe.

In alcuni casi, le sostanze sono innocue nella loro forma originale, ma diventano tossiche dopo la conversione metabolica all'interno dell'organismo. I metaboliti risultanti possono essere ancora più dannosi, a volte con proprietà cancerogene..

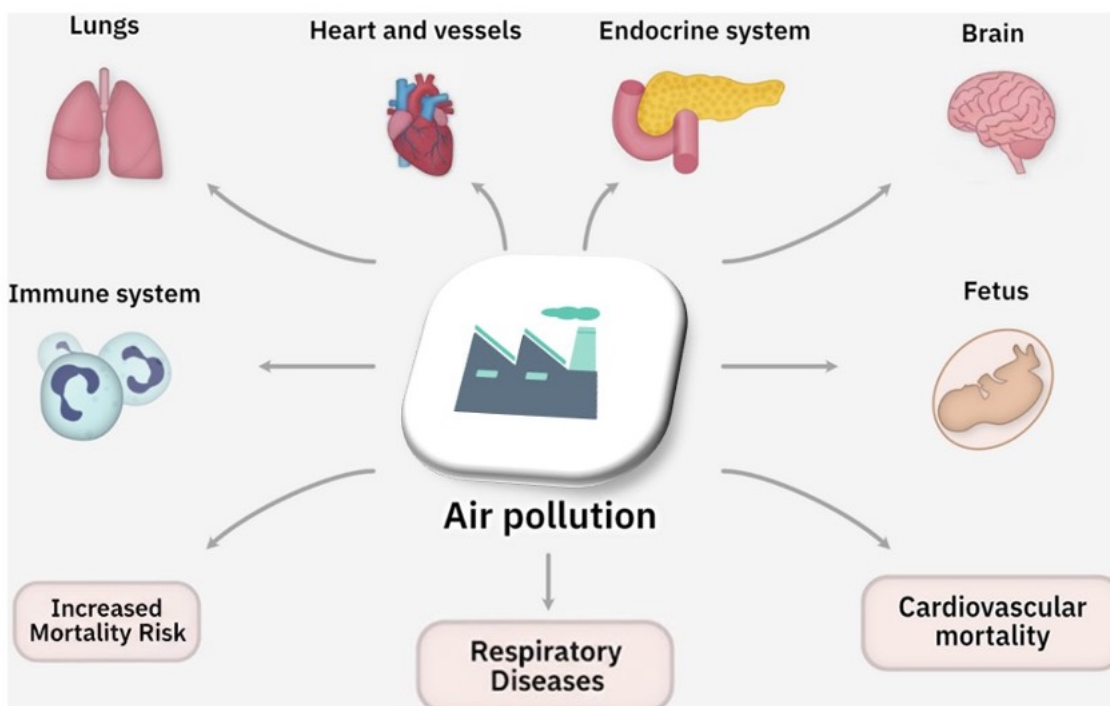


Figura 3.4 Effetti negativi dell'inquinamento atmosferico sulla salute umana

Impatti su specifici sistemi di organi

Sistema respiratorio

Gli inquinanti atmosferici, come monossido di carbonio, ozono (O_3), biossido di azoto (NO_2), biossido di zolfo (SO_2), particolato e metalli pesanti, possono causare malattie respiratorie sia acute che croniche, tra cui bronchite, polmonite, BPCO e asma (Shetty, 2023). L'esposizione prolungata può causare danni strutturali permanenti ai polmoni, ostacolare la crescita polmonare nei bambini e aumentare il rischio di cancro ai polmoni (Schraufnagel, 2019).

L'ambiente è una fonte di esposizioni potenzialmente dannose per la salute umana. Si stima che circa il 7% del carico annuo di malattia in Europa sia associato a fattori di rischio ambientali. In particolare, numerosi studi hanno evidenziato il ruolo dannoso dell'inquinamento atmosferico, documentando un ampio spettro di effetti sulla salute. Con una stima di 7 milioni di morti premature, l'inquinamento atmosferico è considerato la principale causa ambientale di malattia e morte a livello mondiale. Il termine "inquinamento atmosferico" si riferisce a una miscela di gas e particelle contenuta



nell'aria che respiriamo. L'inquinamento atmosferico è generato sia dalle attività umane (emissioni dei veicoli a motore, processi industriali, riscaldamento degli edifici) sia da eventi naturali (incendi boschivi, eruzioni vulcaniche, tempeste di polvere). Gli inquinanti atmosferici possono essere trasportati per migliaia di chilometri, influenzando la qualità dell'aria anche in luoghi distanti dalla loro fonte. Tuttavia, i livelli di inquinamento sono generalmente più elevati nelle aree vicine alla fonte di emissione. Si stima che oggi oltre il 90% delle persone che vivono in aree urbane sia esposto a livelli di inquinanti atmosferici superiori a quelli indicati dalle Linee Guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS).

Gli inquinanti atmosferici possono essere classificati come primari o secondari, a seconda di come si formano. Gli inquinanti primari sono emessi direttamente da processi indotti dall'uomo, come il monossido di carbonio emesso dai gas di scarico di un veicolo a motore o l'anidride solforosa emessa dalle fabbriche. Gli inquinanti secondari si formano quando gli inquinanti primari reagiscono nell'atmosfera. Un inquinante secondario molto importante è l'ozono, che deriva da reazioni chimiche tra gli inquinanti primari e la luce solare.

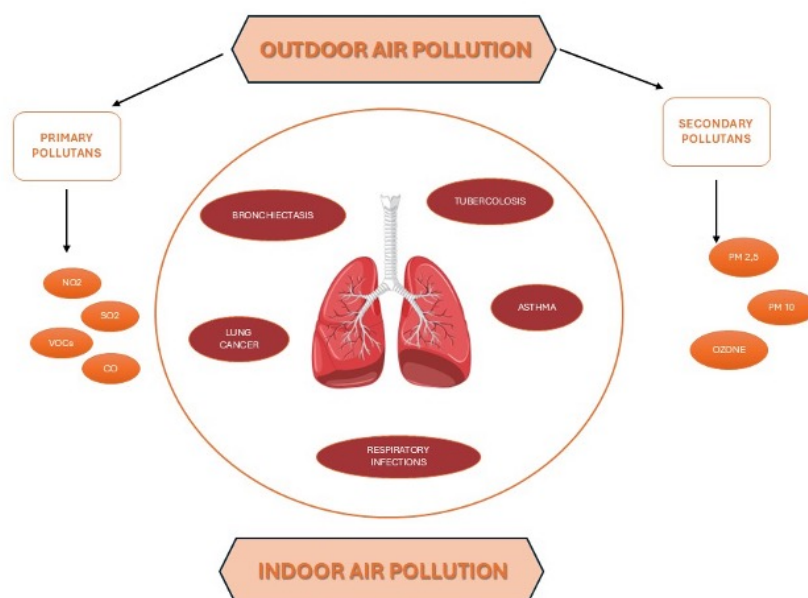


Figura 3.5 Esposizione all'inquinamento atmosferico: il fattore di rischio (in)visibile per le malattie respiratorie



Oltre all'inquinamento esterno, anche l'inquinamento interno rappresenta un rischio significativo per la salute. La qualità dell'aria interna è influenzata da fonti di inquinamento sia esterne che interne. Le fonti esterne derivano da inquinanti esterni che tipicamente penetrano attraverso le finestre aperte, mentre le fonti interne possono derivare da processi di combustione o includere materiali da costruzione, mobili e prodotti per la pulizia della casa di uso comune. L'ambiente interno contribuisce quindi in modo significativo all'esposizione agli inquinanti, molti dei quali hanno una concentrazione maggiore negli ambienti interni rispetto a quelli esterni.

Sistema cardiovascolare

Diversi studi hanno dimostrato che l'inquinamento atmosferico non colpisce solo i polmoni, ma può anche danneggiare il cuore. Ora, un nuovo studio internazionale fa un ulteriore passo avanti, dimostrando come non solo l'inquinamento dell'aria, ma anche quello del suolo e dell'acqua siano strettamente correlati alle malattie cardiovascolari (Münzel, 2025). Il particolato fine ($PM_{2.5}$) e inquinanti simili possono restringere i vasi sanguigni, indebolire il muscolo cardiaco e promuovere processi infiammatori che contribuiscono all'aterosclerosi, all'ipertensione e agli infarti (Dai, 2024). A livello globale, si stima che l'inquinamento atmosferico sia responsabile del 19% dei decessi per cause cardiovascolari e del 21% dei decessi per ictus (Schraufnagel, 2019).

L'inquinamento causato da metalli pesanti, pesticidi e micro e nanoplastiche può danneggiare il sistema cardiovascolare, causando stress ossidativo, infiammazioni e alterando i ritmi circadiani.

L'esposizione a sostanze chimiche tossiche, come metalli pesanti, solventi, diossine e pesticidi, può verificarsi sul posto di lavoro, attraverso prodotti domestici comuni o attraverso la contaminazione ambientale, contribuendo alla disfunzione dei vasi sanguigni e allo sviluppo di malattie cardiovascolari. La contaminazione del suolo è una minaccia molto meno visibile per la salute umana rispetto all'aria inquinata, ma prove crescenti dimostrano che gli inquinanti presenti nel suolo e nell'acqua possono danneggiare la salute cardiovascolare. Ciò avviene attraverso alcuni meccanismi

centrali che sono stati identificati come fattori chiave nel processo aterosclerotico, come l'infiammazione del sistema vascolare e l'aumento dello stress ossidativo.

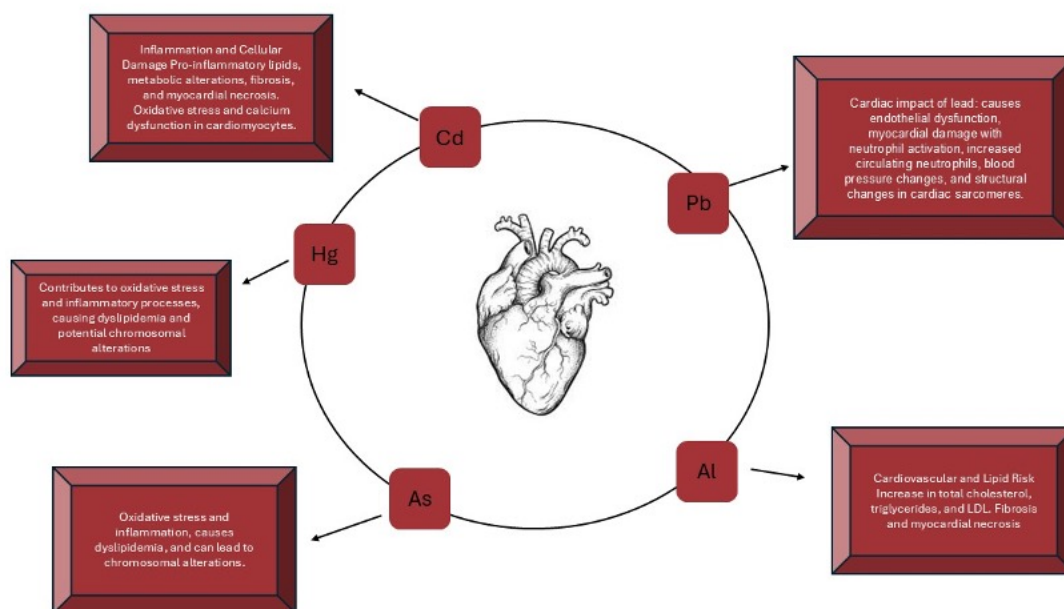


Figura 3.6 Impatto dell'inquinamento ambientale sulle malattie cardiovascolari

Sistema nervoso

Il sistema nervoso è vulnerabile all'inquinamento e all'esposizione ambientale a sostanze nocive, note come neurotossine. Gli effetti di queste molecole possono compromettere il funzionamento e l'integrità del tessuto nervoso, al punto da contribuire allo sviluppo di alcuni disturbi del sistema nervoso.

Si stima che circa il 30% di tutte le sostanze chimiche sintetiche abbia proprietà neurotossiche e, sfortunatamente, la maggior parte delle sostanze utilizzate o rilasciate nell'ambiente non ha prove concrete della loro sicurezza.

Le neurotossine ambientali sono numerose e comprendono, ad esempio, i pesticidi piretroidi e organoclorurati, nonché le nanoplastiche.

Gli inquinanti presenti nell'aria sono associati a una riduzione delle prestazioni cognitive nei bambini e a un aumento del rischio di demenza e ictus negli anziani (Dai,



2024). Si ritiene che questi effetti derivino dallo stress ossidativo e dall'infiammazione del tessuto neurale, che possono accelerare i processi neurodegenerativi.

L'esposizione e il conseguente eccessivo accumulo di metalli nell'organismo possono avere ripercussioni tossicologiche. In particolare, eventi acuti accidentali o, più frequentemente, esposizioni ambientali o occupazionali possono avere un impatto negativo sul sistema nervoso. I metalli più comunemente implicati sono mercurio, piombo, arsenico, cadmio e manganese.

Le principali fonti di esposizione includono acqua o cibo contaminati, esposizione professionale (ad esempio, acciaierie), amalgama dentale, fumo, leghe metalliche, pigmenti, batterie, insetticidi e tinture per capelli.

Diversi studi evidenziano una possibile associazione degli organofosfati con alcune malattie neurodegenerative. Queste sostanze possono interferire con la funzione neuronale e l'azione dei neurotrasmettitori, oltre a promuovere lo stress ossidativo e la neuroinfiammazione, ovvero l'infiammazione del sistema nervoso. Inoltre, alcune ricerche suggeriscono che l'esposizione agli organofosfati possa aumentare il rischio di risposte autoimmuni in alcune persone, potenzialmente influenzando la struttura e la funzione della trasmissione nervosa.



AIR POLLUTION & NEURODEGENERATION: The Microglia Link

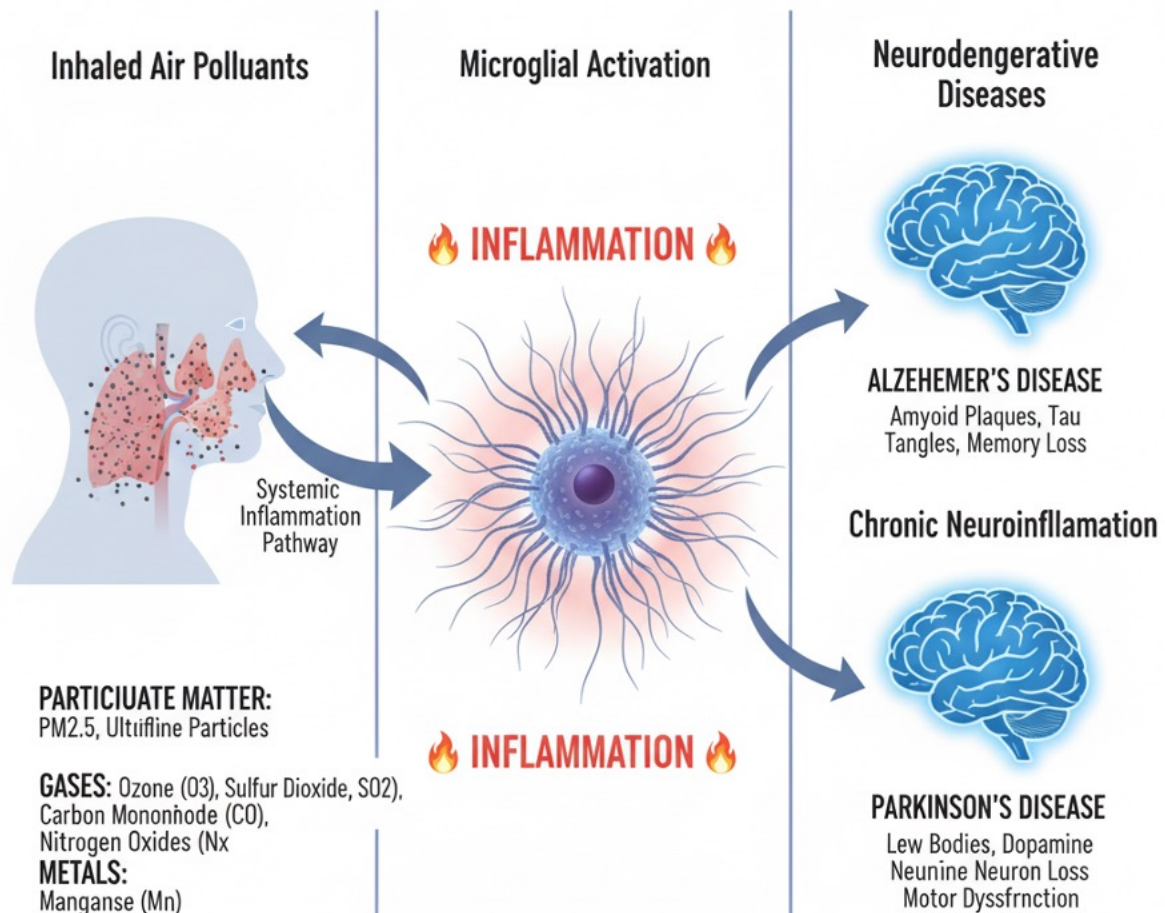


Figura 3.7 L'inquinamento atmosferico aumenta la neuroinfiammazione, in particolare l'attivazione della microglia, che potrebbe essere un meccanismo chiave coinvolto nell'AD e nel PD indotti dall'inquinamento atmosferico

Sistema endocrino

Un gruppo specifico di contaminanti noti come interferenti endocrini (EDC) può interferire con la produzione ormonale, il metabolismo e il legame con i recettori (Kumar, 2020). L'esposizione è stata associata a problemi riproduttivi e dello sviluppo, alterazioni del sistema immunitario e un aumento del rischio di tumori ormono-sensibili.



Gli interferenti endocrini (IE) includono un'ampia gamma di sostanze chimiche in grado di alterare l'equilibrio ormonale degli organismi viventi, compresi gli esseri umani. Gli IE interferiscono con i normali segnali biochimici rilasciati dalle ghiandole endocrine del nostro corpo, che regolano funzioni estremamente delicate: il sistema immunitario, la funzione di alcune ghiandole endocrine (ad esempio, la tiroide), il metabolismo, le funzioni riproduttive e le funzioni neuropsichiatriche.

Le patologie indotte dall'esposizione frequente a dosi minime di interferenti endocrini includono: disturbi della tiroide e dello sviluppo neurologico (disturbi cognitivi, comportamentali e relazionali), aumento del tasso di aborto spontaneo, riduzione della fertilità, anomalie genitali e riproduttive, endometriosi, obesità e diabete di tipo 2, tumori e malattie immunomediate. Gli interferenti endocrini agiscono in modo insidioso, anche a dosi minime, in particolare durante fasi cruciali dello sviluppo, come la vita intrauterina o la prima infanzia. L'esposizione agli interferenti endocrini può anche causare alterazioni dei gameti (spermatozoi e ovuli), con conseguenti rischi per la salute che potrebbero essere trasmessi di generazione in generazione. Le sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino includono diossine, PCB (policlorobifenili) e vari pesticidi, nonché sostanze presenti nell'ambiente quotidiano e nei prodotti di consumo, come ritardanti di fiamma, ftalati e bisfenolo A.

LACCASE-MEDIATED BIOTRANSFORMATION OF EDCS

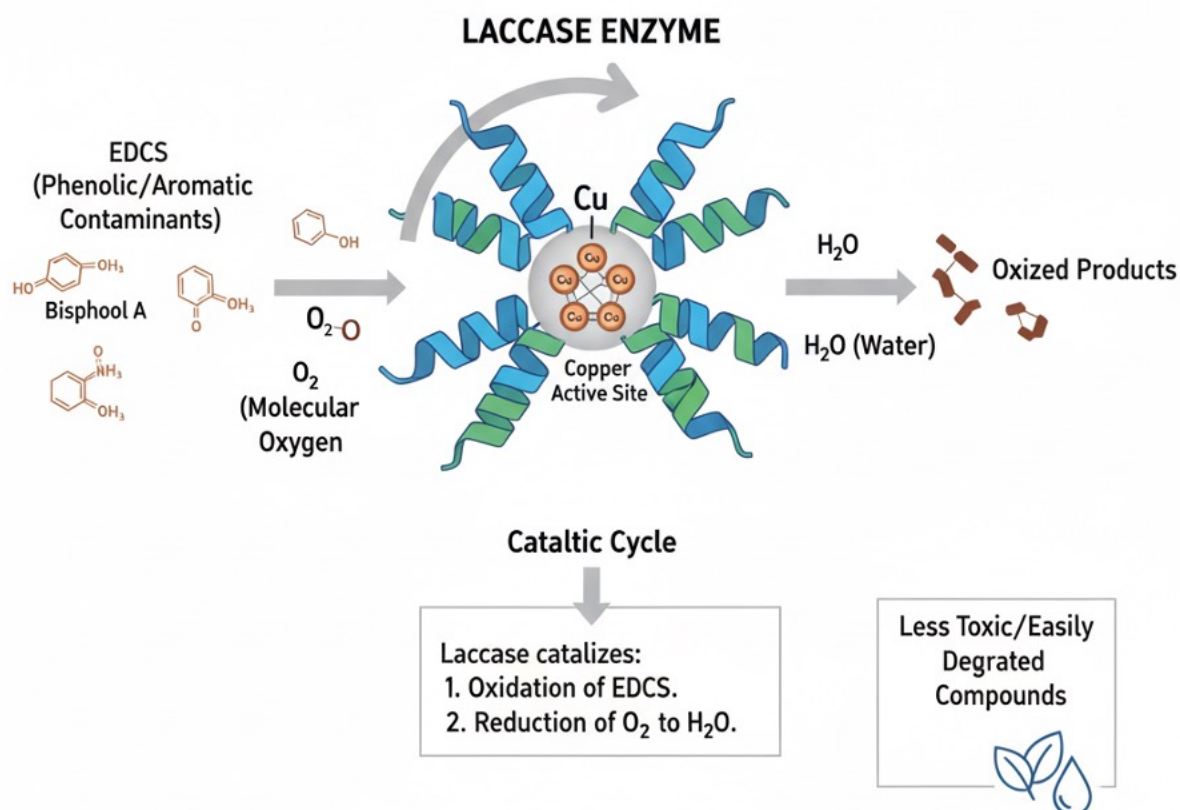


Figura 3.8 Sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino (EDC) nelle matrici ambientali

Malattie e disturbi cronici

Malattie respiratorie: l'esposizione prolungata all'inquinamento è un importante fattore di rischio per la BPCO e l'asma ed è collegata a un aumento della mortalità dovuta a queste patologie.

Disturbi metabolici: gli inquinanti possono indurre stress ossidativo e infiammazione, portando a resistenza all'insulina e a una maggiore probabilità di diabete di tipo 2 (Dai, 2024).



Disturbi neurologici: l'esposizione continua è collegata al morbo di Alzheimer, alla demenza e ad altre patologie degenerative del cervello attraverso meccanismi infiammatori e ossidativi.

Cancro: il particolato fine ($PM_{2.5}$) è riconosciuto come cancerogeno e contribuisce allo sviluppo di tumori ai polmoni, alla vescica e ad alcuni tumori pediatrici (Schraufnagel, 2019).

Interruzione endocrina: gli interferenti endocrini possono alterare i tempi della pubertà, compromettere la fertilità, ridurre la qualità dello sperma e aumentare il rischio di neoplasie maligne ormono-sensibili (Kumar, 2020).

In sintesi, i contaminanti ambientali influiscono sulla salute umana attraverso molteplici vie, spesso colpendo più di un sistema organico contemporaneamente. L'interazione tra diversi inquinanti può intensificarne gli effetti nocivi, sottolineando l'urgente necessità di politiche integrate per la salute ambientale e strategie di controllo dell'inquinamento.

3.6 Percorsi di esposizione

Comprendere come i contaminanti ambientali penetrano nell'organismo umano è essenziale per valutare e mitigare accuratamente i rischi per la salute associati. Questa sezione descrive i principali meccanismi attraverso i quali i tossici ambientali vengono rilasciati, trasportati e infine raggiungono le popolazioni umane.

Rilascio e trasporto nell'ambiente

I contaminanti possono essere introdotti nell'ambiente attraverso processi industriali, attività agricole, smaltimento dei rifiuti e altre azioni antropiche. Una volta rilasciati, possono attraversare diversi compartimenti ambientali:

- **Aria** - Gli inquinanti possono essere emessi direttamente nell'atmosfera o volatilizzarsi dal suolo e dall'acqua. Le correnti d'aria possono trasportare queste sostanze su lunghe distanze (Agenzia per la protezione ambientale degli Stati Uniti, 2024a).



- Acqua - I contaminanti possono entrare in fiumi, laghi e oceani tramite scarico diretto, deflusso superficiale o lisciviazione nelle falde acquifere. I corpi idrici non solo fungono da sistemi di trasporto, ma fungono anche da punti di esposizione umana (Agenzia per la protezione dell'ambiente degli Stati Uniti, 2024b).
- Suolo e sedimenti - Gli inquinanti possono depositarsi e accumularsi nel suolo attraverso la deposizione atmosferica o l'irrigazione con acqua contaminata. Il suolo può fungere da riserva a lungo termine, rilasciando successivamente i contaminanti nell'aria o nell'acqua (Alharbi et al., 2018).

Vie di esposizione umana

Gli esseri umani possono essere esposti a sostanze tossiche ambientali attraverso tre vie principali:

- Inalazione - Respirazione di aria contaminata contenente gas, vapori, aerosol o particolato. L'aria interna può essere influenzata anche quando gli inquinanti esterni si infiltrano negli edifici (United States Environmental Protection Agency, 2024c).
- Ingestione - Ingestione di contaminanti presenti in cibo, acqua potabile o particelle di terreno e polvere. Ciò include l'ingestione accidentale di terreno nei bambini e il trasferimento di residui dalla mano alla bocca (Agenzia per la protezione ambientale degli Stati Uniti, 2024b; Dipartimento dei servizi ambientali del New Hampshire, 2024).
- Contatto cutaneo - Contatto diretto della pelle con terreno, acqua o prodotti di consumo contaminati contenenti sostanze chimiche pericolose. L'esposizione professionale è un fattore che contribuisce frequentemente all'assorbimento cutaneo (New Hampshire Department of Environmental Services, 2024).

Fattori che influenzano l'esposizione

L'entità e la gravità dell'esposizione dipendono da diversi fattori:

- Durata: l'esposizione a breve termine (acuta) e a lungo termine (cronica) influisce in modo diverso sugli esiti sanitari.
- Intensità: concentrazioni più elevate di contaminanti aumentano il rischio potenziale.
- Frequenza: l'esposizione ripetuta può aggravare gli effetti sulla salute.



- Suscettibilità individuale: alcuni gruppi, tra cui donne incinte, bambini, anziani e individui immunodepressi, sono più vulnerabili (New Hampshire Department of Environmental Services, 2024).

Bioaccumulo e biomagnificazione

Gli inquinanti organici persistenti e i metalli pesanti possono accumularsi nei tessuti corporei nel tempo attraverso il bioaccumulo. Quando questi contaminanti attraversano la catena alimentare, possono aumentare la loro concentrazione a livelli trofici più elevati, un processo noto come biomagnificazione (Agenzia per la protezione dell'ambiente degli Stati Uniti, 2024b).

Valutazione dell'esposizione

La valutazione dell'esposizione umana implica:

- Identificazione delle fonti di contaminazione
- Tracciamento del trasporto e del destino ambientale
- Determinazione dei punti e dei percorsi di esposizione
- Definizione delle popolazioni a rischio

Queste valutazioni consentono di classificare i percorsi di esposizione come completati, potenziali o eliminati, fornendo la base per strategie efficaci di gestione del rischio (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2024).

3.3 Valutazione dei contaminanti

I cambiamenti climatici, l'inquinamento ambientale, la perdita di biodiversità e l'uso non sostenibile delle risorse naturali rappresentano collettivamente rischi significativi per la salute umana, animale e degli ecosistemi. Queste minacce includono malattie infettive e non trasmissibili, resistenza antimicrobica e scarsità d'acqua. Garantire un pianeta sano per tutti richiede un monitoraggio, una segnalazione, una prevenzione e una bonifica più efficaci dell'inquinamento che colpisce aria, acqua, suolo e materie prime (Commissione Europea, 2021).



La portata del problema dell'inquinamento può essere notevolmente ridotta attraverso un'azione governativa decisa, infrastrutture avanzate e l'applicazione di tecnologie moderne. Tuttavia, il raggiungimento dell'obiettivo di un ambiente pulito è ostacolato da diverse sfide, tra cui l'insufficiente coinvolgimento del pubblico nelle iniziative di controllo dell'inquinamento e le inadeguatezze dei sistemi di gestione ecologica.

Per affrontare efficacemente l'inquinamento è necessario ricorrere alle soluzioni tecnologiche più innovative e condurre ricerche mirate per comprendere meglio i meccanismi attraverso i quali i contaminanti si accumulano nell'ambiente.

La contaminazione alimentare rimane un problema critico, poiché elevate concentrazioni chimiche nei prodotti commestibili rappresentano gravi rischi per la salute. I contaminanti negli alimenti possono essere naturalmente presenti nell'ambiente o introdotti attraverso le attività umane. Inoltre, la contaminazione può verificarsi in diversi punti della filiera alimentare: durante la produzione, la lavorazione, il confezionamento, il trasporto e lo stoccaggio (Rather et al., 2017).

Le sfide legate alla sicurezza alimentare possono essere raggruppate in quattro categorie principali:

- Sicurezza microbiologica
- Sicurezza chimica
- Igiene personale
- Igiene ambientale

Con la globalizzazione del commercio alimentare, il cibo è diventato una delle principali vie di esposizione umana a microrganismi patogeni responsabili di malattie trasmesse da alimenti, potenzialmente introdotti in diverse fasi della filiera. Tracciare e individuare questi agenti patogeni, in particolare i batteri, fino alle loro fonti rimane una sfida per produttori, trasformatori, distributori e consumatori.

La sicurezza alimentare e la nutrizione sono strettamente interconnesse. Il cibo non sicuro può innescare un circolo vizioso di malattie e malnutrizione, colpendo in modo sproporzionato neonati, bambini piccoli, anziani e individui con problemi di salute.



Poiché le filiere alimentari si estendono ormai su più confini nazionali e regionali, garantire la sicurezza alimentare nel XXI secolo richiederà una forte collaborazione tra governi, produttori, fornitori, distributori e consumatori (Fung et al., 2018).

Negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi metodi analitici per la rilevazione di contaminanti in diverse matrici. Poiché i contaminanti sono spesso presenti a concentrazioni estremamente basse, è richiesto un limite di rilevabilità molto basso e la preparazione del campione diventa essenziale per ridurre gli effetti della matrice nell'analisi alimentare. La preparazione del campione può comportare diverse fasi, come filtrazione, regolazione del pH, estrazione, purificazione e arricchimento, per garantire che gli analiti vengano rilevati a livelli di concentrazione adeguati.

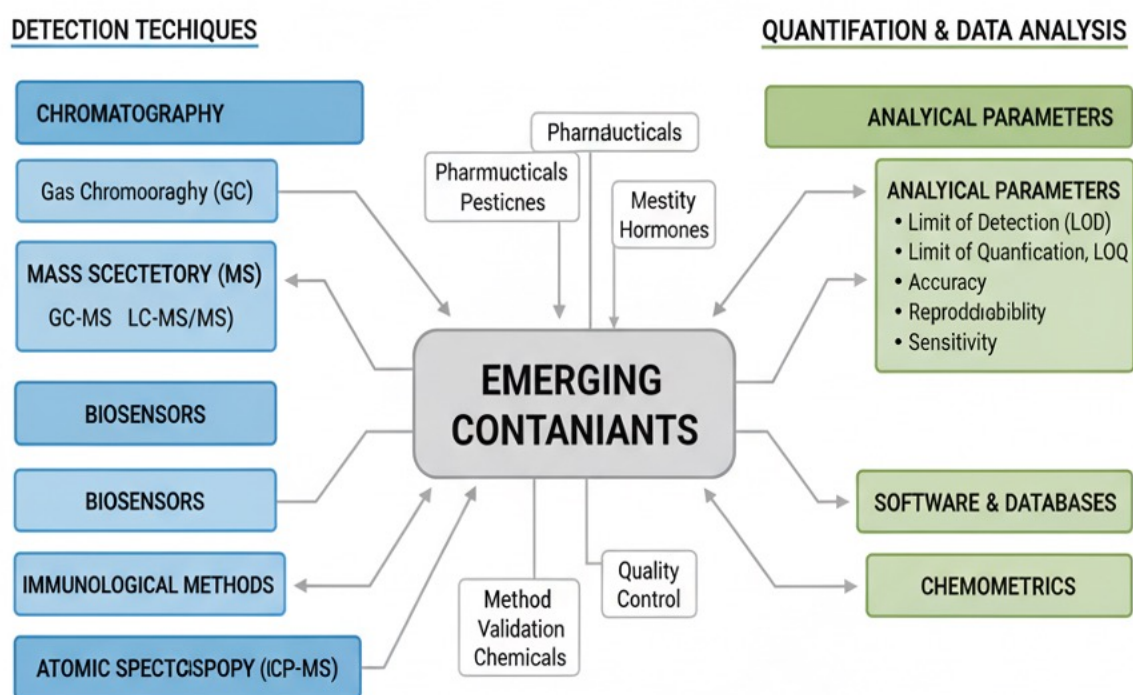


Figura 3.9 Tecniche per il rilevamento e la quantificazione dei contaminanti emergenti

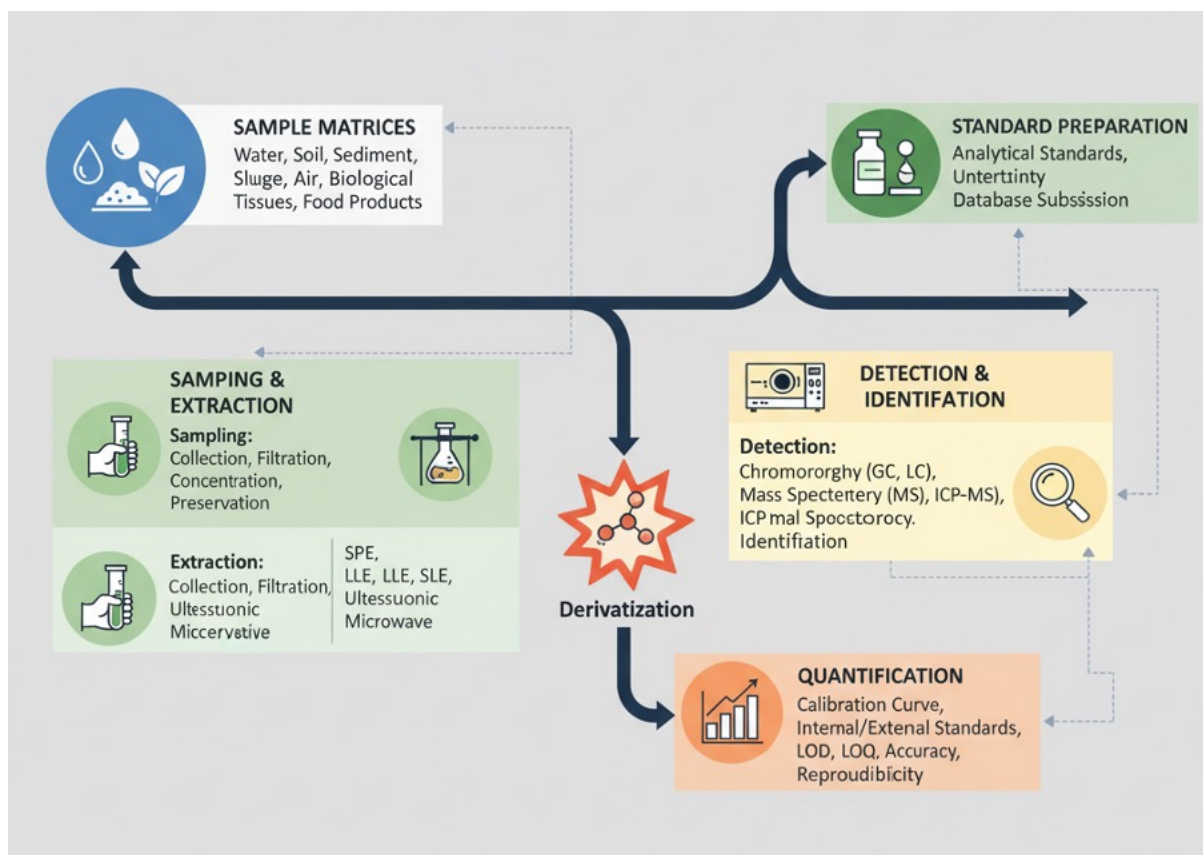


Figura 3.10 Flusso di lavoro generale per l'analisi dei contaminanti

È ora disponibile un'ampia gamma di tecniche di preparazione dei campioni, tra cui l'estrazione con fluido supercritico, l'estrazione in fase solida, la microestrazione in fase solida, l'estrazione assistita da microonde, l'estrazione liquido-liquido, la microestrazione in fase liquida, l'estrazione con liquido pressurizzato e l'estrazione con assorbimento tramite barra di agitazione (Guo et al., 2019).

3.4 Metodi ecologici innovativi per ridurre gli effetti tossici dei contaminanti

La chimica verde, nota anche come chimica sostenibile, è un approccio moderno alle scienze chimiche che si è evoluto significativamente a partire dagli anni '90. È definita come "l'uso di tecniche e metodologie chimiche che riducono o eliminano l'uso o la generazione di materie prime, prodotti, sottoprodotti, solventi e reagenti pericolosi per la salute umana o l'ambiente" (Agenzia per la Protezione Ambientale degli Stati Uniti). Questa filosofia si basa essenzialmente sulla sostenibilità, racchiusa in dodici principi fondamentali:



- Prevenzione – Evitare di generare rifiuti anziché trattarli o smaltirli dopo la loro creazione.
- Economia atomica – Progettare metodi di sintesi per incorporare la maggior quantità possibile di materiali di partenza nel prodotto finale.
- Sintesi meno rischiosa – Impiegare processi che utilizzano e generano sostanze con la minima tossicità.
- Progettare sostanze chimiche più sicure – Preservare la funzionalità chimica riducendo al minimo la tossicità.
- Solventi e ausiliari più sicuri – Evitare sostanze ausiliarie (ad esempio, solventi) ove possibile o renderle non pericolose quando necessario.
- Efficienza energetica – Ridurre al minimo il fabbisogno energetico; eseguire le reazioni a temperatura e pressione ambiente quando possibile.
- Materie prime rinnovabili – Utilizzare materie prime rinnovabili anziché esauribili quando tecnicamente ed economicamente fattibile.
- Ridurre i derivati – Evitare fasi di derivatizzazione non necessarie che richiedono reagenti aggiuntivi e generano rifiuti.
- Catalisi – Utilizzare reagenti catalitici, più efficienti di quelli stechiometrici.
- Progettare per la degradazione – Assicurarsi che i prodotti si decompongano in sostanze innocue al termine del loro ciclo di vita.
- Analisi in tempo reale – Sviluppare tecniche di monitoraggio per rilevare e prevenire sostanze pericolose durante la lavorazione.
- Chimica intrinsecamente più sicura – Selezionare sostanze e forme di processo che riducano il rischio di incidenti come esplosioni o rilasci.

Alternative sostenibili alla rimozione convenzionale degli inquinanti

La crescente presenza di inquinanti, tra cui metalli pesanti, composti organici, prodotti farmaceutici e contaminanti emergenti, comporta rischi significativi per l'ambiente e la salute pubblica. I metodi di rimozione tradizionali, come la precipitazione chimica, lo scambio ionico e la filtrazione a membrana, spesso presentano dei limiti, tra cui costi elevati, elevato fabbisogno energetico e generazione di inquinanti secondari.

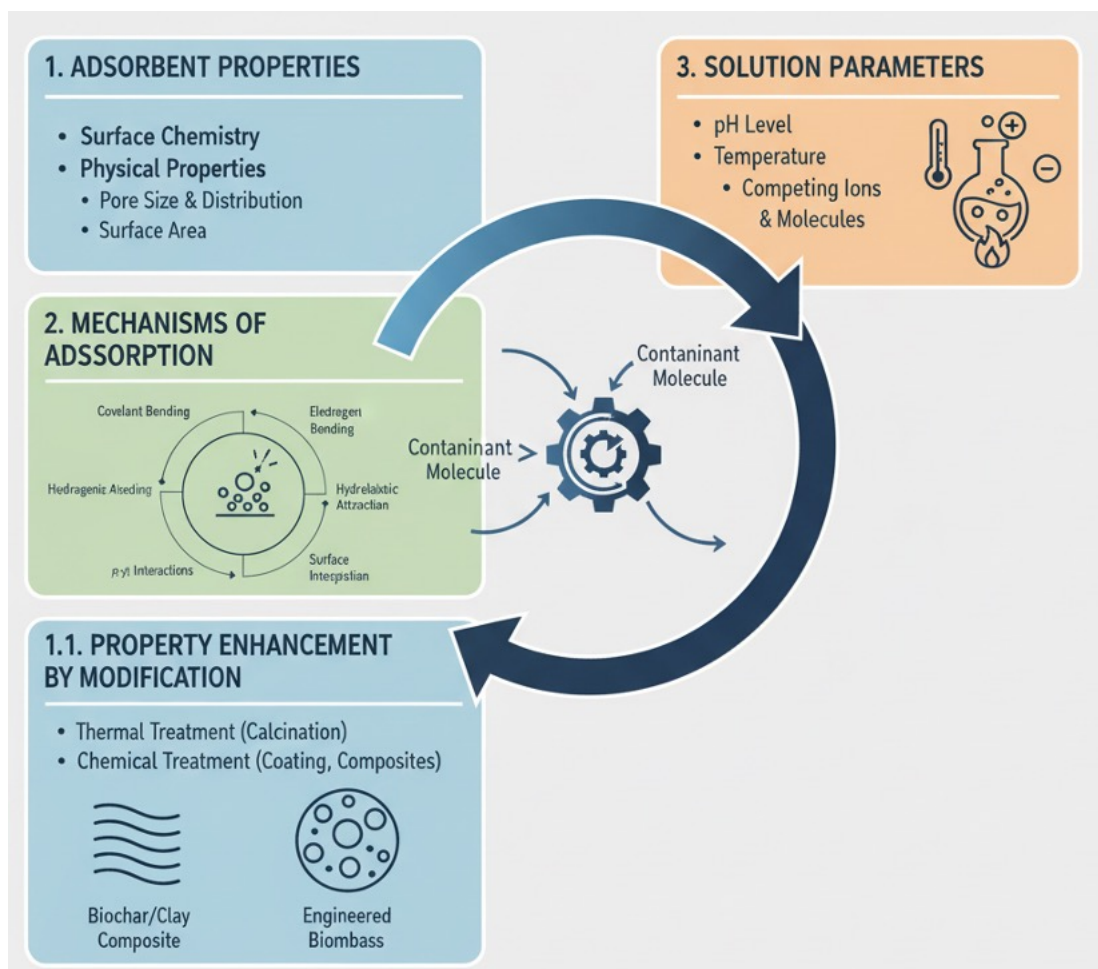


Figura 3.11 Fattori che influenzano la capacità di adsorbimento degli adsorbenti a basso costo

Ricerche recenti evidenziano il potenziale degli adsorbenti non convenzionali come alternative più sostenibili. Materiali come la nanocellulosa, i nanocompositi a base di chitosano e le strutture metallo-organiche (MOF) hanno mostrato prestazioni superiori in termini di capacità di adsorbimento, selettività e riutilizzabilità, rendendoli interessanti per applicazioni ambientali (Akhtar et al., 2024).

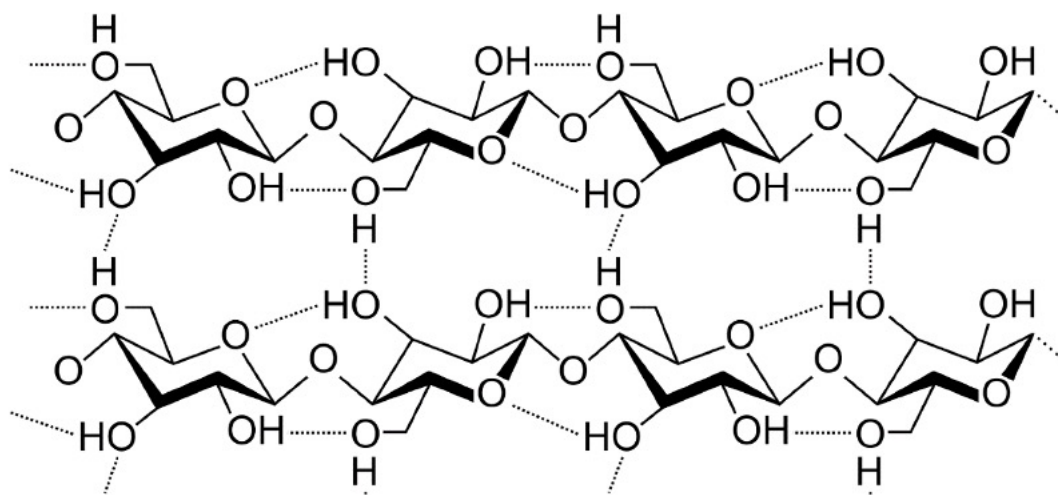


Figura 3.12 Struttura chimica della cellulosa e dei suoi legami idrogeno

Soluzioni di chimica verde

1. Solventi e condizioni di reazione più sicuri

La sostituzione di solventi pericolosi con alternative più sicure rappresenta un'importante innovazione nella chimica verde. Ad esempio, le vernici a base d'acqua hanno sostituito i rivestimenti a base di solvente, eliminando i fumi tossici e riducendo l'inquinamento atmosferico senza compromettere le prestazioni. L'esecuzione di reazioni chimiche a temperatura e pressione ambiente riduce ulteriormente il consumo energetico e minimizza i rischi.

Le vernici a base d'acqua hanno ampiamente sostituito i rivestimenti a base di solvente in molte applicazioni a causa di preoccupazioni ambientali e sanitarie. Le normative governative incentrate sulla riduzione dei composti organici volatili (COV) hanno guidato questo cambiamento, poiché le vernici a base d'acqua emettono una quantità significativamente inferiore di COV. Mentre un tempo le vernici a base di solvente erano lo standard, le alternative a base d'acqua sono ora preferite per la loro minore tossicità, i tempi di asciugatura più rapidi e il ridotto impatto ambientale.

2. Materie prime rinnovabili



La chimica verde privilegia le materie prime derivate da risorse rinnovabili, come i sottoprodotti agricoli, rispetto ai combustibili fossili o ai materiali estratti. Ciò riduce l'impatto ambientale, preserva le risorse non rinnovabili e spesso si traduce in prodotti più biodegradabili. Una materia prima o una materia prima dovrebbe essere rinnovabile anziché esaurirsi ogniqualvolta ciò sia tecnicamente ed economicamente possibile. La natura produce circa 170 miliardi di tonnellate di biomassa vegetale all'anno, di cui attualmente utilizziamo circa il 3,5% per il fabbisogno umano. Si stima che sarebbero necessari circa 40 miliardi di tonnellate di biomassa, pari a circa il 25% della produzione annuale, per generare completamente un'economia basata sulla bioenergia. La sfida tecnica nell'uso di tali materie prime rinnovabili è sviluppare processi a basso consumo energetico e non tossici per convertire la biomassa in sostanze chimiche utili in modo da non generare più carbonio di quanto ne venga rimosso "dal nulla".

3. Catalisi ed economia atomica

I catalizzatori consentono alle reazioni di avvenire in modo efficiente con il minimo spreco, spesso sostituendo i reagenti stechiometrici utilizzati in eccesso. Allo stesso tempo, progettare reazioni per un'elevata economia atomica garantisce che la maggior parte dei materiali in ingresso venga incorporata nel prodotto finale. Un obiettivo primario della chimica verde è la minimizzazione o, preferibilmente, l'eliminazione degli sprechi nella produzione di prodotti chimici e affini. Ciò richiede un cambio di paradigma nel concetto di efficienza nella sintesi organica, da un approccio incentrato sulla resa chimica a uno che attribuisce valore alla minimizzazione degli sprechi. Qual è la causa degli sprechi? La chiave sta nel concetto di economia atomica: "i metodi di sintesi dovrebbero essere progettati per massimizzare l'incorporazione di tutti i materiali utilizzati nel processo nel prodotto finale".

4. Progettare per la degradazione

I prodotti sono sempre più progettati per degradarsi in sostanze innocue dopo l'uso, riducendo la persistenza nell'ambiente e i costi di gestione dei rifiuti pericolosi. I professionisti della chimica verde aspirano a ottimizzare la funzione commerciale di una sostanza chimica, riducendone al minimo i rischi e i pericoli. I compromessi o gli



approcci alternativi devono essere valutati quando le caratteristiche molecolari da progettare per la funzione commerciale si sovrappongono a quelle da progettare per ridurre i pericoli e i rischi.

Bonifica biologica dei metalli pesanti

La rapida industrializzazione ha intensificato la contaminazione da metalli pesanti nei suoli in tutto il mondo, ponendo gravi minacce ecologiche e sanitarie. La rimozione e la neutralizzazione di questi contaminanti è ora una priorità globale. La biobonifica, che utilizza microrganismi come batteri, microalghe, lieviti e funghi, sta guadagnando attenzione come alternativa ecologica ed economica, particolarmente efficace a basse concentrazioni di metalli (Maqsood et al., 2022).

Spesso, per ottenere risultati ottimali durante l'intero ciclo di trattamento dei metalli pesanti, vengono utilizzati metodi integrati che combinano processi fisico-chimici e biologici. Questi approcci ripristinano gli ambienti contaminati trasformandoli in sistemi più sani e vitali, riducendo al minimo gli effetti collaterali ambientali.

Tossicologia verde

Una disciplina emergente chiamata Tossicologia verde fornisce un quadro per integrare i principi della tossicologia nella progettazione di sostanze chimiche più sicure, riducendo così al minimo la potenziale tossicità il più presto possibile nella fase di produzione. La tossicologia verde unisce i principi della chimica verde con la tossicologia per garantire la sicurezza chimica fin dalle prime fasi di progettazione del prodotto (Maertens et al., 2024). Impiega moderne strategie di sperimentazione non animale, tra cui modelli computazionali in silico, previsioni basate sull'intelligenza artificiale e test basati su cellule umane, consentendo valutazioni dei rischi più rapide ed economiche rispetto ai tradizionali test sugli animali.



Figura 3.13 Tossicologia verde: collegare la chimica verde e la tossicologia moderna

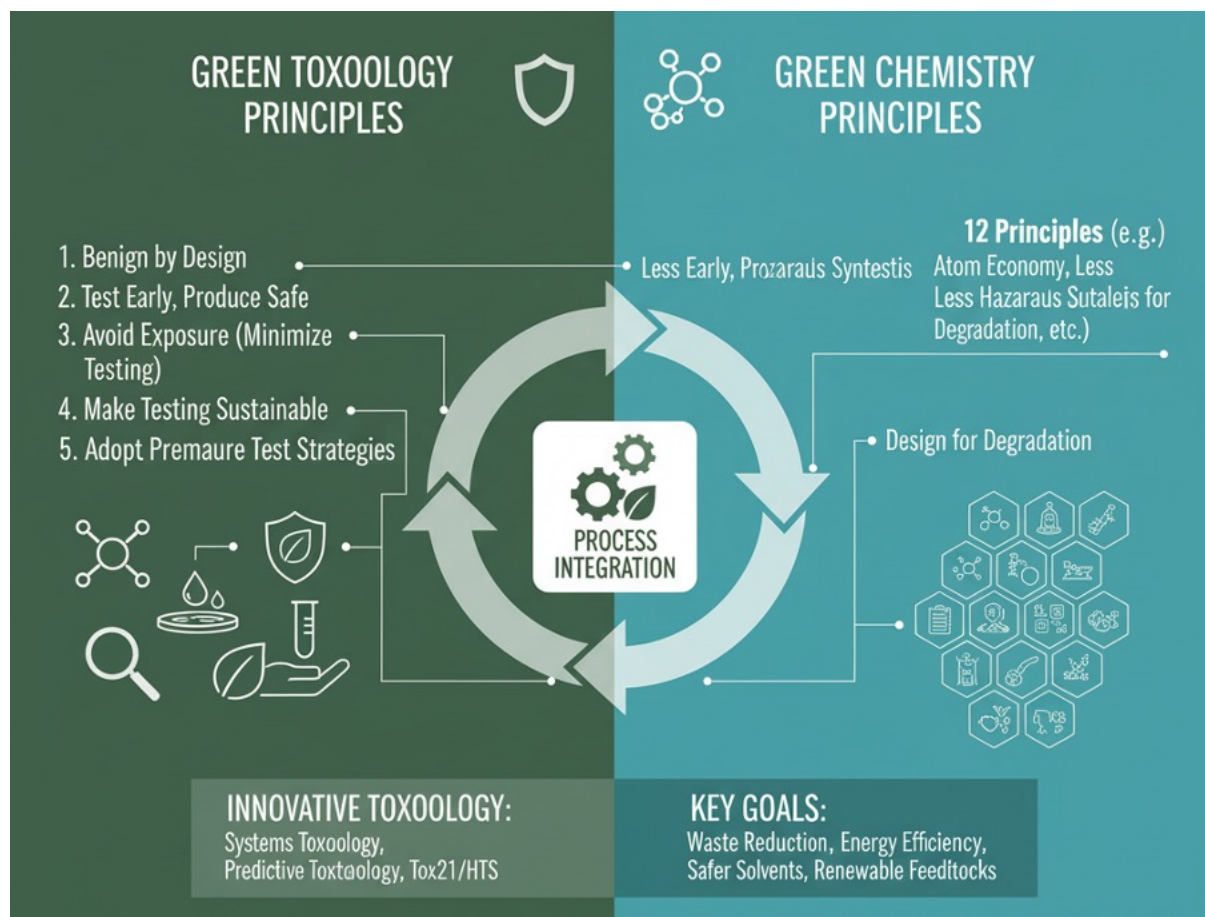


Figura 3.14 Principi di tossicologia verde e chimica verde e come si integrano nel processo di produzione chimica

Gli elementi chiave della tossicologia verde includono:

- Applicazione di metodi di test alternativi e convalidati.
- Integrazione di considerazioni sulla sicurezza fin dalle prime fasi della progettazione chimica.
- Valutazione degli impatti del ciclo di vita lungo le catene di approvvigionamento.
- Dare priorità alla prevenzione rispetto alla bonifica.
- Vantaggi della chimica e della tossicologia verdi
- Salute umana



- Aria e acqua più pulite grazie alla riduzione delle emissioni pericolose.
- Maggiore sicurezza sul lavoro nelle industrie chimiche.
- Prodotti di consumo e alimenti più sicuri.
- Ambientale
- Riduzione delle emissioni di gas serra, della formazione di smog e dell'assottigliamento dell'ozono.
- Riduzione al minimo del danno ecologico dovuto all'inquinamento chimico.
- Minore necessità di smaltimento di rifiuti pericolosi.
- Economico
- Maggiori rese di reazione e minori costi delle materie prime.
- Riduzione delle spese di smaltimento dei rifiuti.
- Maggiore efficienza degli impianti e risparmio energetico.
- Vantaggio competitivo grazie all'etichettatura ecologica dei prodotti.

Sfide e direzioni future

Sebbene la chimica verde e la tossicologia offrano chiari vantaggi, la loro adozione incontra ostacoli quali la convalida di nuovi metodi, l'accettazione normativa e la resistenza istituzionale al cambiamento. Le priorità future dovrebbero includere:

- Ampliare il portafoglio di metodi di test alternativi convalidati.
- Integrare i concetti di chimica verde nella formazione e nella pratica industriale.
- Creare incentivi politici per l'innovazione sostenibile.
- Rafforzare la collaborazione tra chimici, tossicologi e scienziati ambientali.

I metodi verdi innovativi rappresentano un percorso trasformativo per ridurre gli effetti tossici dei contaminanti sulla salute umana e sull'ambiente. Integrando i principi della chimica verde, adottando strategie di bonifica biologica e applicando i quadri di



riferimento della tossicologia verde, possiamo progettare e implementare processi chimici più sicuri e sostenibili. Questo approccio supporta una visione a lungo termine di un pianeta più pulito, più sano e più resiliente.

3.5 Bibliografia

Akhtar N, Khan A, Shah AA, Malik A, Al-Ghamdi AA, Alshahrani MY, et al. Nanocellulose, chitosan-based nanocomposites and MOFs for environmental remediation: recent advances and future prospects. *J Hazard Mater.* 2024;456:132769.

Alharbi O ML, Basheer AA, Khattab RA, Ali I. Health and environmental effects of persistent organic pollutants. *J Mol Liq.* 2018;263:442-53.

Augusta University. *Air pollution deaths and global burden summary* [Internet]. Augusta (GA): Augusta University; 2023. Available from: <https://www.augusta.edu/>

Balbus JM, Boxall AB, Fenske RA, McKone TE, Zeise L. Implications of global climate change for the assessment and management of human health risks of chemicals in the natural environment. *Environ Toxicol Chem.* 2013;32(1):62-78.

Bălă G-P, Riviş M, Ciomag V, Vâță D, Voiculescu M, Dăscălescu A-E, et al. Air pollution exposure—the (in)visible risk factor for respiratory diseases. *Environ Sci Pollut Res.* 2021;28(16):19615-28.

Dai W, Xu W, Zhou J, Zhang Y, Wang Q, Liu X, et al. Individual and joint exposure to air pollutants and patterns of multiple chronic conditions. *Sci Rep.* 2024;14:22733.

de Oliveira Souza H, Brandt EMF, de Jesus Antunes A, Zimmermann R, Vaz BG, Alvarenga G. Pharmaceutical pollution and sustainable development goals: going the right way? *Sustain Chem Pharm.* 2021;21:100428.

Eniola JO, Farombi EO, Adewuyi GO, Osi VS, Okareh OT, et al. Application of conventional and emerging low-cost adsorbents as sustainable materials for removal of contaminants from water. *Environ Sci Pollut Res.* 2023;30(38):88245-71.

European Commission. *Pathway to a healthy planet for all: EU action plan “Towards zero pollution for air, water and soil”* [Internet]. Brussels: European Commission; 2021 [cited 2025 Oct 24]. Available from: https://environment.ec.europa.eu/strategy/zero-pollution-action-plan_en



European Environment Agency (EEA). *How air pollution affects our health* [Internet]. Copenhagen: EEA; 2023. Available from: <https://www.eea.europa.eu/en/topics/in-depth/air-pollution/eow-it-affects-our-health>

Fu C, Liu H, Li H, Wang L, Zhang W, Li W, et al. Different components of air pollutants and neurological disorders. *Front Public Health*. 2022;10:959921.

Fung F, Wang HS, Menon S. Food safety in the 21st century. *Biomed J*. 2018;41(2):88-95.

Guo W, Pan B, Sakkiyah S, Yavas G, Ge W, Zou W, et al. Recent advances in sample preparation techniques for analysis of food contaminants. *Trends Food Sci Technol*. 2019;85:68-82.

He Y, Chen Z, Zhang X, Li J, Zhao Y, et al. Chitosan/nanocellulose-coated MOF nanocarriers for camptothecin delivery. *Int J Biol Macromol*. 2025;242:146601.

Ismanto A, Pratiwi R, Nurhayati E, Suwirma S, et al. Endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in environmental matrices: occurrence, fate, health impact, physico-chemical and bioremediation technology. *Environ Pollut*. 2022;302:119061.

Konduracka E, Rostoff P. Links between chronic exposure to outdoor air pollution and cardiovascular diseases: a review. *Environ Chem Lett*. 2022;20(5):2971-88.

Kumar M, Sarma DK, Shubham S, Kumawat M, Verma V, Prakash A, et al. Environmental endocrine-disrupting chemical exposure: role in non-communicable diseases. *Front Public Health*. 2020;8:553850.

Kumar R, Taki A, Sinha R, Prasad P, Kaur R, et al. Micro- and nanoplastics pollution and human health: how plastics can induce carcinogenesis to humans? *Chemosphere*. 2022;298:134267.

Maertens A, Luechtefeld T, Knight J, Hartung T. Alternative methods go green! Green toxicology as a sustainable approach for assessing chemical safety and designing safer chemicals. *ALTEX*. 2024;41(1):3-19.

Maqsood M, Basit A, Naz S, Javed MT, Zubair M, Rizwan M, et al. Microbial bioremediation of heavy metals: current status and future prospects. *Chemosphere*. 2022;291(Pt 1):132979.

Münzel T, Hahad O, Lelieveld J, et al. Soil and water pollution and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*. 2025;22:71-89.



Naidu R, Espinoza L, Ramanathan R, et al. Chemical pollution: a growing peril and potential catastrophic risk to humanity. *Environ Int.* 2021;156:106616.

New Hampshire Department of Environmental Services (NHDES). *Human exposure pathways: dermal contact* [Internet]. Concord (NH): NHDES; 2024. Available from: <https://www.des.nh.gov/>

New Hampshire Department of Environmental Services (NHDES). *Human exposure pathways: ingestion route* [Internet]. Concord (NH): NHDES; 2024. Available from: <https://www.des.nh.gov/>

Rather IA, Koh WY, Paek WK, Lim J. The sources of chemical contaminants in food and their health implications. *Front Pharmacol.* 2017;8:830.

Schraufnagel DE, Balmes JR, Cowl CT, De Matteis S, Jung SH, Mortimer K, et al. Air pollution and non-communicable diseases: a review by the Forum of International Respiratory Societies' Environmental Committee. *Chest.* 2019;155(2):417-26.

Scimeca M, Bonfiglio R, Tancredi V, Bonanno E. Impact of environmental pollution on cardiovascular diseases: from epidemiological to molecular evidence. *Heliyon.* 2024;10(18):e26038.

Shetty SS, D D, S H, Sonkusare S, Naik PB, Kumari NS, et al. Environmental pollutants and their effects on human health. *Heliyon.* 2023;9(9):e19496.

Shyamalagowri S, Sudhakar S, Senthilkumar P, et al. Techniques for the detection and quantification of emerging contaminants. *Phys Sci Rev.* 2023;8(9):2191-2218.

Sokan-Adeaga AA, Adeboye S, Adediran O, et al. Human exposure pathways and toxicological effects of environmental contaminants: a global review. *J Environ Health Sci Eng.* 2023;21(5):987-1003.

United Nations Environment Programme (UNEP). *Towards a pollution-free planet: global outlook and solutions* [Internet]. Nairobi: UNEP; 2023. Available from: <https://www.unep.org/resources/towards-pollution-free-planet>

United States Environmental Protection Agency (US EPA). *Basics of green chemistry* [Internet]. Washington (DC): US EPA; 2023. Available from: <https://www.epa.gov/greenchemistry/basics-green-chemistry>



United States Environmental Protection Agency (US EPA). *Benefits of green chemistry* [Internet]. Washington (DC): US EPA; 2023. Available from: <https://www.epa.gov/greenchemistry/benefits-green-chemistry>

United States Environmental Protection Agency (US EPA). *Environmental release and transport: air pathway overview* [Internet]. Washington (DC): US EPA; 2024. Available from: <https://www.epa.gov/air-research>

United States Environmental Protection Agency (US EPA). *Environmental release and transport: water pathway overview* [Internet]. Washington (DC): US EPA; 2024. Available from: <https://www.epa.gov/water-research>

United States Environmental Protection Agency (US EPA). *Exposure assessment tools by exposure route: inhalation* [Internet]. Washington (DC): US EPA; 2024. Available from: <https://www.epa.gov/expobox/exposure-assessment-tools-routes-inhalation>

United States Environmental Protection Agency (US EPA). *Exposure assessment tools by exposure route: ingestion* [Internet]. Washington (DC): US EPA; 2024. Available from: <https://www.epa.gov/expobox/exposure-assessment-tools-routes-ingestion>

World Bank. *The impact of lead exposure on human capital and the global economy: updated estimates* [Internet]. Washington (DC): World Bank; 2023. Available from: <https://blogs.worldbank.org/en/climatechange/chemical-pollution-next-global-crisis>

World Health Organization (WHO). *Climate change, pollution and health – Impact of chemicals, waste and pollution on human health* [Internet]. Geneva: WHO; 2023 Dec. Available from: <https://www.who.int/publications>

CAPITOLO 4. IL RUOLO DI UNA SANA NUTRIZIONE E IL CONSUMO APPROVATO DI INTEGRATORI ALIMENTARI SICURI - METODI INNOVATIVI DI APPROCCIO E VALUTAZIONE DELLA CONSAPEVOLEZZA

4.1 Introduzione

L'alimentazione è un pilastro della salute umana, che influenza la crescita, la competenza immunitaria, le prestazioni cognitive e il rischio di malattie infettive e non trasmissibili per tutta la vita. Eppure, il mondo si trova oggi ad affrontare un "doppio fardello" di malnutrizione: la denutrizione persiste mentre sovrappeso e obesità sono in forte aumento, come documentato nel Global Nutrition Report 2020 (Global Nutrition Report, 2020). Migliorare la qualità della dieta attraverso alimenti integrali – verdura, frutta, cereali integrali, legumi, frutta secca, semi e oli salutari – rimane la strategia più efficace per la popolazione, come riflesso nei principali quadri di orientamento dietetico (Dipartimento della Salute e dei Servizi Umani degli Stati Uniti e Dipartimento dell'Agricoltura degli Stati Uniti, 2020).

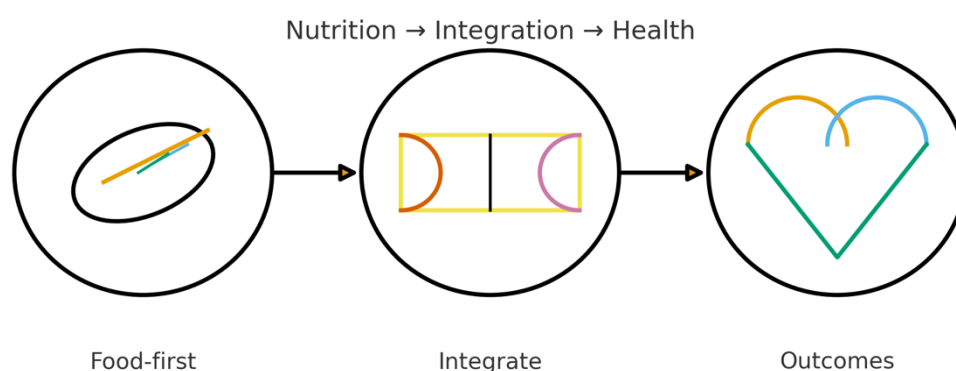


Figura 4.1 Rappresentazione schematica dell'integrazione nutrizionale nella salute umana

Qualità della dieta e prevenzione delle malattie

Robusti studi di coorte prospettici e studi randomizzati collegano modelli alimentari a base vegetale e ricchi di fibre a un minor rischio cardiometabolico. Una revisione sistematica e una meta-analisi complete su Lancet hanno rilevato che un maggiore apporto di fibre alimentari è associato a una riduzione del 15-30% del rischio relativo



di mortalità per tutte le cause e cardiovascolare e di incidenza del diabete di tipo 2; i benefici sono aumentati fino a circa 25-29 g/giorno di fibre (Reynolds et al, 2019). Parallelamente, lo studio randomizzato PREDIMED, rianalizzato nel 2018, ha dimostrato che una dieta mediterranea arricchita con olio extravergine di oliva o frutta secca ha ridotto gli eventi cardiovascolari maggiori rispetto a una dieta di controllo a basso contenuto di grassi (Estruch et al, 2018). Questi dati supportano la priorità degli alimenti vegetali minimamente trasformati, ricchi di fibre e polifenoli, come base sostenibile e di alto valore per la promozione della salute.

Sfruttare i bioattivi vegetali e la biodisponibilità

Le piante forniscono vitamine, minerali, fibre e migliaia di composti bioattivi (ad esempio, polifenoli, carotenoidi, glucosinolati). Il loro valore per la salute dipende non solo dal contenuto, ma anche dalla biodisponibilità, ovvero dalla capacità dei composti di essere rilasciati, assorbiti e raggiungere i bersagli. Semplici strategie alimentari possono migliorarne significativamente l'assorbimento. Ad esempio, l'aggiunta di alimenti ricchi di vitamina C ai pasti con ferro vegetale (non eme) aumenta l'assorbimento del ferro, come dimostrato da classici studi sull'equilibrio umano (Hallberg et al, 1989). Tali sinergie illustrano come l'ottimizzazione delle combinazioni e delle preparazioni alimentari possa amplificare i benefici dei principi attivi di origine vegetale.

Integratori alimentari: ruoli, limiti e regolamentazione

Gli integratori alimentari (vitamine, minerali, estratti vegetali, probiotici e altri) possono contribuire a correggere carenze specifiche e documentate o a soddisfare fabbisogni più elevati in determinate fasi della vita, ma non sostituiscono una dieta di alta qualità (Dipartimento della Salute e dei Servizi Umani degli Stati Uniti e Dipartimento dell'Agricoltura degli Stati Uniti, 2020). I quadri normativi differiscono: negli Stati Uniti, il Dietary Supplement Health and Education Act (DSHEA, 1994) classifica gli integratori come una categoria di alimenti; i produttori sono responsabili della sicurezza e dell'etichettatura e i prodotti generalmente immettono sul mercato senza l'approvazione preventiva della FDA (Congresso degli Stati Uniti, 1994). Nell'Unione Europea, la Direttiva 2002/46/CE armonizza le norme per gli integratori alimentari,



comprese le vitamine e i minerali consentiti e i requisiti di etichettatura (Parlamento e Consiglio europeo, 2002). Allo stesso tempo, le indagini post-commercializzazione hanno ripetutamente riscontrato adulterazioni di alcuni integratori con prodotti farmaceutici non dichiarati, sottolineando la necessità di vigilanza e di utilizzare prodotti verificati provenienti da produttori affidabili (Tucker et al, 2018).

Quando gli integratori sono chiaramente benefici

L'assunzione di 400 µg/giorno di acido folico per tutte le donne in età fertile, a partire da prima del concepimento fino al primo trimestre, riduce i difetti del tubo neurale ed è fortemente raccomandata dalle autorità sanitarie (U.S. Preventive Services Task Force, 2023). L'adeguatezza di iodio è essenziale per la funzionalità tiroidea e lo sviluppo neurologico; ferro e vitamina B12 richiedono un uso mirato in presenza di carenza o malassorbimento, guidato dalla valutazione clinica.

Situazioni in cui "di più" non è meglio

Per la prevenzione primaria in adulti generalmente sani, ampi studi randomizzati non mostrano alcuna riduzione complessiva di eventi cardiovascolari maggiori o cancro con l'integrazione di routine di vitamina D (Manson et al, 2019). Le decisioni relative all'integrazione dovrebbero essere personalizzate, integrando la carenza misurata, il contesto clinico e le considerazioni sul rapporto rischio-beneficio, non solo le affermazioni riportate sull'etichetta.

Priorità pratiche e sostenibili

1. Cibo al primo posto: puntare ad almeno 25-30 g/giorno di fibre alimentari da cereali integrali, legumi, verdura, frutta, noci e semi; questo livello è in linea con le riduzioni del rischio osservate nella meta-analisi di Lancet (Reynolds et al, 2019).
2. Dieta vegetariana: privilegiare pasti in stile mediterraneo ricchi di olio extravergine di oliva, noci, legumi, cereali integrali e prodotti ortofrutticoli in abbondanza, come supportato da PREDIMED (Estruch et al, 2018).
3. Integrazione mirata: utilizzare integratori basati sull'evidenza per esigenze definite, con particolare attenzione all'acido folico periconcezionale (U.S. Preventive Services Task Force, 2023).



4. Attenzione alle affermazioni: fare attenzione ai prodotti che promettono trattamenti per malattie o rapidi cambiamenti nella composizione corporea; L'adulterazione è stata documentata nelle categorie di perdita di peso, miglioramento sessuale e bodybuilding (Tucker et al, 2018).

5. Politiche e sistemi: il doppio peso della malnutrizione richiede ambienti e politiche alimentari che rendano gli alimenti ricchi di nutrienti accessibili e convenienti (Global Nutrition Report, 2020).

4.2 Fondamenti di una sana alimentazione

L'ottimizzazione delle risorse vegetali, attraverso un'attenta selezione delle specie, la conservazione dei composti bioattivi e l'uso di metodi di preparazione e assunzione efficaci, è alla base di un modello alimentare che favorisce la salute a lungo termine. L'enfasi su alimenti vegetali minimamente trasformati, ricchi di fibre, polifenoli, carotenoidi e grassi insaturi, allinea le scelte individuali con le linee guida della popolazione e gli obiettivi di sostenibilità (OMS, 2020; Lichtenstein et al., 2021).



Figura 4.2 Piatto equilibrato a base vegetale: elementi chiave di un'alimentazione sana, con cibi ricchi di nutrienti, minimamente lavorati, grassi di qualità e obiettivi dietetici basati su prove scientifiche.



Nutrienti essenziali e il loro ruolo

Una dieta sana fornisce sei gruppi di nutrienti fondamentali: proteine, carboidrati, grassi, vitamine, minerali e acqua, ognuno con funzioni fisiologiche distinte nel mantenimento dei tessuti, nel metabolismo energetico, nella struttura cellulare, nell'equilibrio idroelettrolitico e nella regolazione enzimatica. La qualità all'interno di questi gruppi è importante: carboidrati complessi e fibre alimentari supportano il controllo glicemico e la salute cardiometabolica; la sostituzione dei grassi saturi con grassi insaturi migliora il profilo lipidico; e un adeguato apporto di micronutrienti sostiene la funzione immunitaria, neuromuscolare e scheletrica (OMS, 2020; Hooper et al., 2020; Reynolds et al., 2019).

Principi di un modello alimentare equilibrato e orientato ai vegetali

L'equilibrio alimentare enfatizza la varietà, la densità dei nutrienti e un apporto energetico adeguato al fabbisogno, limitando al contempo gli alimenti altamente trasformati. Tra gli obiettivi ampiamente condivisi figurano il consumo di almeno 400 g/giorno di frutta e verdura, il mantenimento degli zuccheri liberi al di sotto del 10% dell'energia totale e la priorità alla qualità dei grassi, limitando quelli saturi ed eliminando i grassi trans industriali a favore degli oli insaturi. La sostituzione dei cereali raffinati con quelli integrali e la diversificazione delle fonti proteiche con legumi, frutta secca, semi e pesce migliorano ulteriormente la qualità complessiva della dieta (OMS, 2020; Aune et al., 2016; Lichtenstein et al., 2021).

Densità nutrizionale e qualità delle fibre

Gli alimenti ricchi di nutrienti forniscono più vitamine, minerali e composti bioattivi per caloria. Un maggiore apporto di fibre alimentari da cereali integrali, legumi, frutta e verdura è associato a una riduzione del 15-30% della mortalità per tutte le cause e a una ridotta incidenza di malattie coronariche, ictus, diabete di tipo 2 e cancro del colon-retto in studi di coorte prospettici; studi randomizzati mostrano una riduzione del peso corporeo, della pressione arteriosa sistolica e del colesterolo totale con un maggiore apporto di fibre. Obiettivi pragmatici di almeno 25-29 g/giorno sono supportati da evidenze aggregate e conferiscono ulteriori benefici alla funzionalità intestinale e all'infiammazione (Reynolds et al., 2019).



Qualità dei grassi e rischio cardiometabolico

Il passaggio dai grassi saturi a quelli polinsaturi riduce il rischio cardiovascolare. L'enfasi sugli alimenti vegetali ricchi di olio (noci, semi, olio d'oliva e altri oli vegetali) e sul pesce, limitando al contempo gli alimenti ricchi di acidi grassi saturi ed eliminando i grassi trans industriali, migliora il colesterolo LDL e gli endpoint clinici a valle, in linea con le linee guida sulla prevenzione globale e delle società specializzate (Hooper et al., 2020; Lichtenstein et al., 2021).

Modelli alimentari con dati sugli esiti clinici

I modelli alimentari che mettono in pratica questi principi dimostrano benefici a livello di evento. In un ampio studio spagnolo di prevenzione primaria, una dieta mediterranea integrata con olio extravergine di oliva o frutta secca ha ridotto gli eventi cardiovascolari maggiori rispetto a una dieta di controllo, sottolineando il valore di modelli alimentari incentrati sulla qualità, al di là del conteggio dei macronutrienti (Estruch et al., 2018; Lichtenstein et al., 2021).

Considerazioni sulla prevenzione del cancro

Sintesi autorevoli raccomandano il mantenimento di un peso corporeo sano; l'enfasi su cereali integrali, verdura, frutta e legumi; la limitazione di cibi ultra-processati, carni rosse e lavorate e alcol; ed evitare l'eccesso di sodio e zuccheri liberi per ridurre il rischio di diversi tumori. Queste strategie si integrano con le linee guida cardiometaboliche, illustrando i benefici trasversali di un modello alimentare minimamente processato e basato sui vegetali (WCRF/AICR, 2018).

Lavorazione degli alimenti e contesto alimentare

Oltre ai nutrienti totali, il livello di lavorazione e la matrice alimentare influenzano l'appetito e l'assunzione di energia. In uno studio crossover strettamente controllato, le diete ultra-processate ad libitum hanno portato a un maggiore apporto energetico e a un aumento di peso entro due settimane rispetto alle diete minimamente processate, equilibrate per calorie, macronutrienti, zuccheri, sodio e fibre offerti, suggerendo che consistenza, appetibilità e velocità di consumo possono indurre un consumo eccessivo passivo (Hall et al., 2019).



Implementazione, equità e prospettive lungo tutto il corso della vita

L'adozione dipende da convenienza e accesso, abilità culinarie, preferenze culturali e contesto alimentare. Misure pratiche e scalabili includono la creazione di pasti basati su verdure, cereali integrali e legumi; la scelta di frutta secca e semi non salati per gli spuntini; l'utilizzo di oli ricchi di grassi insaturi; la pianificazione di pesce settimanale; e la riserva di cereali raffinati, dolci e carni lavorate per un uso occasionale. Le misure di sanità pubblica che migliorano l'accesso ad alimenti sani e moderano la commercializzazione e la disponibilità di prodotti ultra-processati sono fondamentali per colmare le lacune in termini di equità nutrizionale lungo tutto il corso della vita (OMS, 2020; Lichtenstein et al., 2021).

4.3 Integratori alimentari: regolamentazione, sicurezza e valutazione scientifica

Gli integratori alimentari, chiamati anche integratori alimentari, sono fonti concentrate di nutrienti o altre sostanze bioattive destinate a integrare la dieta abituale quando l'assunzione abituale è inadeguata. Il loro utilizzo si è espanso in tutto il mondo, supportato dall'interesse dei consumatori per la salute preventiva e dalla crescita di prodotti contenenti vitamine, minerali, estratti vegetali, probiotici, acidi grassi omega-3 e altri composti. Nonostante l'ampia disponibilità, le questioni relative a qualità, sicurezza ed efficacia clinica rimangono centrali nella valutazione scientifica e nella supervisione normativa (NIH ODS, 2023).



Figura 4.3 Riepilogo visivo degli elementi chiave nella regolamentazione, sicurezza e valutazione scientifica degli integratori alimentari.

Quadro normativo

Negli Stati Uniti, gli integratori alimentari sono regolamentati come categoria di alimenti ai sensi del Dietary Supplement Health and Education Act (DSHEA, 1994). I produttori sono responsabili di garantire la sicurezza e la corretta etichettatura prima dell'immissione in commercio; la Food and Drug Administration (FDA) generalmente interviene post-commercializzazione per affrontare il problema dei prodotti adulterati o etichettati in modo errato, e verifica le notifiche di "nuovi ingredienti alimentari" con dati di sicurezza a supporto almeno 75 giorni prima dell'immissione in commercio (FDA, 2023). Gli stabilimenti devono conformarsi ai requisiti attuali delle Buone Pratiche di Fabbricazione (GMP) previsti dal 21 CFR Parte 111, che disciplinano i test di identità, la purezza, la concentrazione, la composizione e la tenuta dei registri, ma queste norme non costituiscono un'approvazione pre-commercializzazione e le mancanze di conformità possono comunque comportare una qualità variabile (FDA, 2007; FDA, 2023). Altre giurisdizioni regolano gli integratori come alimenti con specifiche norme di composizione ed etichettatura e in genere limitano le dichiarazioni di malattia a quelle autorizzate da revisioni delle prove; le affermazioni sulla struttura/funzione non devono essere fuorvianti e richiedono una dichiarazione di esclusione di responsabilità che il



prodotto non è destinato a diagnosticare, trattare, curare o prevenire malattie (FDA, 2023).

Considerazioni sulla sicurezza

La maggior parte degli integratori è ben tollerata se utilizzata secondo le istruzioni, tuttavia diversi aspetti di rischio richiedono attenzione. Difetti di qualità, come sostituzione, contaminazione o potenza variabile, sono stati documentati, in particolare in alcuni prodotti botanici; indagini con codice a barre del DNA hanno identificato casi di adulterazione o utilizzo di riempitivi che non sarebbero evidenti ai consumatori (Newmaster et al., 2013). Un'assunzione eccessiva al di sopra dei livelli massimi tollerabili può produrre tossicità; ad esempio, alte dosi di vitamina E nello studio SELECT sono state associate a un aumento del rischio di cancro alla prostata negli uomini (Klein et al., 2011). Le interazioni farmacocinetiche e farmacodinamiche sono ben descritte: l'erba di San Giovanni induce il CYP3A4 e la glicoproteina P, riducendo l'esposizione a molti farmaci; la vitamina K antagonizza il warfarin; calcio, ferro e magnesio possono compromettere l'assorbimento di alcuni antibiotici e dell'ormone tiroideo. Popolazioni particolari, tra cui donne in gravidanza o allattamento, bambini, anziani in politerapia e pazienti con malattie renali o epatiche, richiedono una valutazione del rischio personalizzata (NIH ODS, 2023). La sicurezza post-marketing si basa sulla segnalazione degli eventi avversi da parte di aziende farmaceutiche e medici ai sistemi della FDA, con azioni di controllo quando vengono identificati rischi gravi (FDA, 2023).

Valutazione scientifica dell'efficacia

Le affermazioni sugli integratori spaziano dalla correzione di carenze definite al supporto della salute generale o alla riduzione del rischio di malattia. Una valutazione approfondita segue i principi utilizzati in altre aree della scienza clinica: plausibilità biologica, caratterizzazione e standardizzazione del prodotto, farmacocinetica e biodisponibilità, studi clinici randomizzati controllati (RCT) con endpoint clinici rigidi e sintesi sistematica delle prove. Gli RCT di grandi dimensioni dimostrano la necessità di quesiti precisi e risultati appropriati. Nello studio VITAL, la vitamina D3 (2000 UI/die) e gli acidi grassi omega-3 marini (1 g/die di EPA+DHA) non hanno ridotto il composito



primario di cancro invasivo più eventi cardiovascolari maggiori in adulti generalmente sani, sebbene analisi secondarie abbiano suggerito modeste riduzioni dell'infarto miocardico per gli omega-3 e della mortalità per cancro dopo aver escluso il follow-up precoce, evidenziando la sfumatura dell'interpretazione dei sottogruppi e degli endpoint (Manson et al., 2019). Al contrario, le prove raccolte supportano alcuni utilizzi: i probiotici riducono il rischio di diarrea associata agli antibiotici in molti contesti, sebbene gli effetti dipendano dal ceppo, dalla dose e dalla popolazione (Goldenberg et al., 2017). Questi esempi mostrano perché le prove specifiche per prodotto, la standardizzazione e la trasparenza nella rendicontazione siano essenziali per tradurre le promesse meccanicistiche in raccomandazioni cliniche affidabili.

Garanzia di qualità e scelta informata

Poiché la conformità legale non garantisce le prestazioni del prodotto, programmi di qualità indipendenti possono contribuire a ridurre l'incertezza. La verifica di terze parti (ad esempio, il marchio di verifica della Farmacopea degli Stati Uniti) valuta le pratiche di produzione, l'identità e la potenza degli ingredienti, i contaminanti specifici e l'accuratezza delle etichette, offrendo un ulteriore livello di garanzia a medici e consumatori che selezionano prodotti per pazienti a rischio o per uso di ricerca (USP, 2021). Le migliori pratiche nell'assistenza clinica consistono nel dare priorità alle strategie che privilegiano l'alimentazione; confermare un'indicazione specifica per l'integrazione (carenza documentata, aumento del fabbisogno fisiologico, assunzione limitata, malassorbimento o uso terapeutico basato sull'evidenza); esaminare le interazioni farmaco-integratore; selezionare prodotti verificati con dosi appropriate che rispettino i livelli massimi di assunzione tollerabili; e monitorare i risultati e gli effetti avversi (NIH ODS, 2023; FDA, 2023).

Priorità politiche e di ricerca

Rafforzare la supervisione pre e post-commercializzazione, migliorare la trasparenza delle notifiche sui nuovi ingredienti alimentari, ampliare la sorveglianza analitica per gli adulteranti e facilitare studi clinici pragmatici su prodotti ben caratterizzati colmerebbe le lacune nelle evidenze. Per i prodotti botanici, estratti standardizzati con chemiotipi definiti e attenzione agli esaltatori di biodisponibilità sono necessari per garantire la



riproducibilità negli studi. Per i prodotti mirati al microbioma, l'etichettatura con risoluzione ceppo-specifica, le conte vitali durante la shelf-life e gli RCT specifici per endpoint miglioreranno l'interpretabilità (Goldenberg et al., 2017). L'allineamento tra enti regolatori, certificatori terzi, medici, ricercatori e industria può favorire un mercato in cui integratori sicuri, di alta qualità e basati sull'evidenza scientifica integrino, non sostituiscano, diete nutrizionalmente adeguate (FDA, 2023; NIH ODS, 2023).

4.4 Approcci innovativi all'educazione nutrizionale

Per affrontare le sfide globali della malnutrizione e dei modelli alimentari non salutari, sono necessari modelli educativi che vadano oltre la didattica, verso approcci basati sulla teoria, partecipativi e adattabili a diversi contesti culturali e socioeconomici. I programmi contemporanei combinano sempre più la scienza del cambiamento comportamentale, l'apprendimento pratico, la collaborazione con la comunità e gli strumenti digitali per migliorare la qualità della dieta e sostenere il cambiamento nel tempo (Michie et al., 2011; Bandura, 2004).

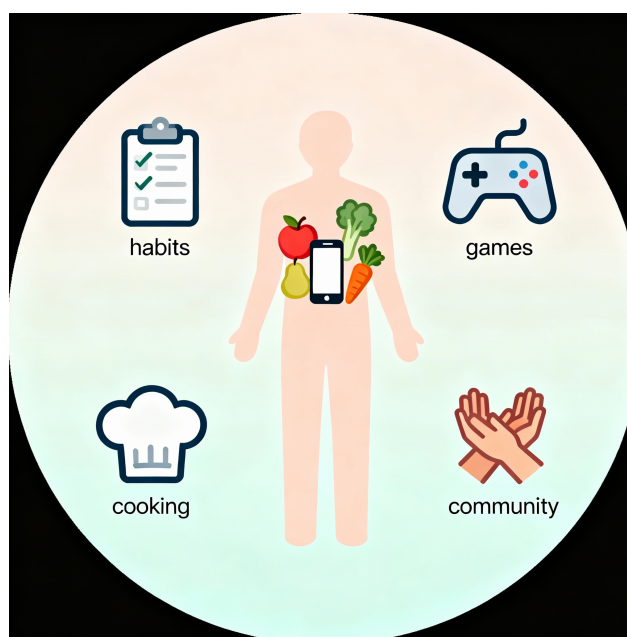


Figura 4.4 Elementi fondamentali dell'educazione alimentare moderna: abitudini, giochi, cucina e comunità



Progettazione basata sulla teoria e tecniche di cambiamento comportamentale

Un'educazione alimentare efficace si basa su quadri di riferimento consolidati per il cambiamento comportamentale che diagnosticano ciò che deve essere modificato per abitudini più sane – capacità, opportunità e motivazione – e quindi allineano le tecniche (fissazione degli obiettivi, automonitoraggio, feedback, problem-solving) a tali obiettivi (Michie et al., 2011). La teoria socio-cognitiva enfatizza ulteriormente l'autoefficacia, l'apprendimento basato sull'osservazione e le aspettative di risultato; gli interventi che sviluppano competenze (ad esempio, lettura delle etichette, pianificazione dei pasti), forniscono un modello di ruolo credibile e rafforzano i successi tendono a produrre effetti più forti e duraturi (Bandura, 2004). In pratica, ciò si traduce in programmi di studio che alternano la conoscenza alla pratica (ad esempio, sessioni di acquisto e cucina) e incorporano spunti di riflessione, pianificazione e supporto sociale.

Gamification e strumenti interattivi

Giochi seri e sfide gamificate possono rendere concetti nutrizionali complessi tangibili e intrinsecamente motivanti, in particolare per bambini, adolescenti e giovani adulti. Punti, livelli, feedback e missioni narrative trasformano la lettura delle etichette, la stima delle porzioni e la composizione dei pasti in apprendimento esperienziale. Prove meta-analitiche indicano che i giochi digitali per i comportamenti salutari possono migliorare la conoscenza della nutrizione e l'assunzione di cibo auto-rapportata, soprattutto se basati sulla teoria comportamentale e combinati con attività pratiche nel mondo reale (ad esempio, registrazione di foto, missioni di cucina) (DeSmet et al., 2014). Per massimizzare l'impatto, i progettisti dovrebbero specificare i comportamenti target (ad esempio, ≥ 5 porzioni al giorno di frutta e verdura), collegare le meccaniche a tali comportamenti (ad esempio, punti per porzioni verificate) e fornire feedback tempestivi e personalizzati.

Apprendimento pratico ed esperienziale

La formazione in ambito culinario, gli orti scolastici, le sessioni di degustazione e i workshop sensoriali traducono i consigli in competenze. I programmi che insegnano la mise-en-place, l'uso del coltello, la gestione del budget e le tecniche per risparmiare tempo riducono gli ostacoli pratici alla preparazione dei pasti a casa e sono associati



a una maggiore frequenza di cottura, a un maggiore consumo di frutta e verdura e a una migliore qualità della dieta negli adulti e nelle famiglie (Reicks et al., 2014). Gli approcci di educazione sensoriale (ad esempio, l'esplorazione guidata di gusto, consistenza e aroma) aiutano i bambini ad accettare una più ampia varietà di alimenti e possono aumentare la propensione a provare verdure e legumi non familiari (Reverdy et al., 2008). Integrare queste attività in contesti di routine – aule, centri comunitari, assistenza primaria – ne favorisce la diffusione e il mantenimento.

Approcci incentrati sulla comunità e culturalmente reattivi

L'educazione alimentare guidata dalla comunità sfrutta i leader locali, le tradizioni culinarie e le reti sociali per garantire rilevanza ed equità. La progettazione condivisa con i partecipanti, l'integrazione di alimenti culturalmente preferiti e l'erogazione guidata dai pari possono rafforzare la fiducia e l'adozione, affrontando al contempo le barriere strutturali (accessibilità, disponibilità, tempo) attraverso strategie complementari come buoni spesa, mercati mobili o cambiamenti predefiniti di "scelta sana" nelle mense. I testi fondamentali sottolineano che adattare i contenuti e l'erogazione alle norme della comunità, ai livelli di alfabetizzazione e agli ambienti alimentari è fondamentale per l'efficacia e la sostenibilità (Contento, 2016).

Apprendimento potenziato dalla tecnologia e supporto just-in-time

App mobili, coaching tramite SMS e moduli web estendono l'apprendimento oltre l'aula, forniscono indicazioni in tempo reale e consentono l'automonitoraggio (ad esempio, registri alimentari basati su foto, obiettivi gradualmente). Revisioni sistematiche su giovani adulti dimostrano che programmi di eHealth ben progettati possono migliorare i comportamenti alimentari, in particolare quando incorporano tecniche di cambiamento comportamentale (pianificazione delle azioni, suggerimenti, feedback) e funzionalità interattive anziché contenuti statici (Hutchesson et al., 2015). Per gli operatori sanitari, le piattaforme di e-learning supportano una formazione scalabile in consulenza, colloqui motivazionali e linee guida dietetiche, con risultati almeno pari a quelli dei formati tradizionali, migliorando al contempo flessibilità e portata (Vaona et al., 2018). I programmi dovrebbero affrontare l'equità digitale (accesso ai dispositivi, costi dei dati) e tutelare la privacy.



Implementazione, valutazione ed equità

Un'implementazione solida colma il divario tra efficacia e impatto nel mondo reale. Le pratiche chiave includono: (i) monitoraggio fedele dei componenti principali (ad esempio, numero e qualità delle sessioni di cucina), (ii) valutazione con metodi misti che abbina indici di qualità della dieta (ad esempio, porzioni di frutta/verdura, assunzione di cereali integrali, alimenti discrezionali) a mediatori comportamentali (autoefficacia, capacità di agire sul cibo) e (iii) attenzione alla portata e alla rappresentatività per età, genere, reddito e gruppi culturali. Costi e fattibilità dovrebbero essere monitorati insieme ai risultati per orientare l'espansione. I framework di cambiamento comportamentale incoraggiano un adattamento iterativo basato sul feedback locale, preservando al contempo i principi attivi identificati a priori (Michie et al., 2011; Contento, 2016).

Mettendo insieme: un modello integrato

I programmi più promettenti combinano componenti: un curriculum breve e basato sulla teoria per costruire "perché" e "come", supporti gamificati e mobili per sostenere la motivazione, cucina pratica ed esplorazione sensoriale per sviluppare le capacità e partnership con la comunità per affrontare le opportunità (accessibilità e convenienza). Quando questi livelli sono allineati, gli studi segnalano miglioramenti significativi nella conoscenza, nella scelta alimentare e nell'autoefficacia, con segnali precoci di una migliore qualità della dieta e di risultati correlati al peso nel tempo (DeSmet et al., 2014; Reicks et al., 2014; Hutchesson et al., 2015; Vaona et al., 2018; Contento, 2016; Reverdy et al., 2008).

4.5 Valutazione della consapevolezza nutrizionale

Valutare la consapevolezza nutrizionale è essenziale per determinare se l'educazione alimentare cambia davvero ciò che le persone fanno, credono e fanno. Una valutazione solida chiarisce quali messaggi vengono recepiti, dove persistono idee sbagliate e come la conoscenza sia correlata alle scelte alimentari e alla salute. Una valutazione efficace combina questionari psicometricamente validi con indicatori comportamentali e biologici complementari e sfrutta sempre più le tecnologie digitali per catturare l'apprendimento e le decisioni del mondo reale.



Fondamenti e costrutti fondamentali

La consapevolezza nutrizionale comprende conoscenze fattuali (ad esempio, fonti alimentari di nutrienti, raccomandazioni dietetiche), conoscenze procedurali (ad esempio, interpretazione delle etichette, pianificazione di pasti equilibrati) e conoscenze condizionali (quando e perché applicare le competenze). Poiché la conoscenza è solo uno dei fattori che determinano il comportamento, valutazioni di alta qualità considerano anche atteggiamenti, autoefficacia e vincoli ambientali, e verificano se una maggiore consapevolezza sia correlata a modelli di assunzione più sani e biomarcatori (Spronk et al., 2014).

Questionari standardizzati

Il General Nutrition Knowledge Questionnaire (GNKQ) è uno degli strumenti più utilizzati, che copre raccomandazioni dietetiche, scelte alimentari, fonti di nutrienti e collegamenti tra dieta e malattia; ha dimostrato affidabilità e validità di costrutto ed è stato adattato a diversi contesti culturali (Parmenter e Wardle, 1999). La versione rivista del GNKQ-R ha aggiornato il contenuto degli item per riflettere le linee guida dietetiche contemporanee, migliorandone la leggibilità e perfezionando le sottoscale per adulti in contesti diversi (Kliemann et al., 2016). Altri strumenti validati sono rivolti a popolazioni o domini specifici (ad esempio, atleti, caregiver) e lo sviluppo sistematico include in genere la generazione di item da linee guida, la revisione di esperti, interviste cognitive, test pilota e valutazione psicometrica (Hendrie et al., 2008; Trakman et al., 2017). Qualità psicometrica e misurazione moderna

Oltre alla coerenza interna e all'affidabilità test-retest, gli studi contemporanei applicano la teoria della risposta agli item e l'analisi di Rasch per ottimizzare la difficoltà e la discriminazione degli item, rilevare il funzionamento differenziale degli item in diverse lingue o fasce demografiche e consentire test adattivi al computer che abbreviano i tempi dei questionari senza sacrificare la precisione (Trakman et al., 2017). I test di invarianza della misurazione garantiscono che le differenze di punteggio osservate riflettano reali lacune di conoscenza piuttosto che artefatti di traduzione o culturali (Hendrie et al., 2008).

Indagini KAP complete



I quadri di riferimento di Conoscenze, Atteggiamenti e Pratiche (KAP) vanno oltre la conoscenza fattuale per rilevare convinzioni, barriere percepite e comportamenti auto-risportati. Le linee guida standardizzate dell'Organizzazione per l'Alimentazione e l'Agricoltura (FAO) forniscono modelli per il campionamento, la progettazione di questionari, la sperimentazione e l'analisi per migliorare la comparabilità tra programmi e paesi (FAO, 2014). Le indagini KAP sono particolarmente utili per gli interventi basati sulla comunità, in cui le norme culturali e gli ambienti alimentari influenzano fortemente le scelte.

Collegare la conoscenza al comportamento e alla salute

Per convalidare che "sapere di più" si traduca in "fare meglio", le valutazioni abbinano i punteggi di conoscenza a risultati oggettivi: richiami di 24 ore, questionari sulla frequenza alimentare o registri alimentari digitali per l'assunzione; antropometria (BMI, circonferenza vita); e biomarcatori come lipidi, glucosio o stato dei micronutrienti. Le prove meta-analitiche mostrano associazioni modeste ma costanti tra una maggiore conoscenza della nutrizione e modelli alimentari più sani: maggiore assunzione di frutta e verdura, minore assunzione di grassi saturi e migliore qualità complessiva della dieta (Spronk et al., 2014). Questi collegamenti rafforzano l'inferenza causale quando misurati longitudinalmente e aggiustati per fattori sociodemografici.

Valutazione potenziata dalla tecnologia

Le piattaforme mobili e web possono offrire brevi quiz, attività di lettura delle etichette e sfide just-in-time, rilevando l'accuratezza e la latenza delle risposte come ulteriori indicatori di padronanza. Le app facilitano anche la valutazione ecologica momentanea delle scelte alimentari e possono integrare scansioni di codici a barre o registri basati su foto; revisioni sistematiche riportano che strumenti digitali ben progettati possono migliorare la conoscenza della dieta e i comportamenti correlati, soprattutto quando sono integrati feedback e definizione degli obiettivi (Chen et al., 2017). L'analisi digitale (ad esempio, prestazioni a livello di elemento, tassi di completamento) supporta la rapida iterazione dei contenuti educativi.

Equità, cultura e contesto



La consapevolezza nutrizionale è influenzata da età, istruzione, reddito, alfabetizzazione alimentare e abitudini alimentari culturali. Le valutazioni dovrebbero includere elementi in linguaggio semplice, supporti visivi ed esempi specifici del contesto (ad esempio, alimenti base, porzioni consuete) e dovrebbero documentare la portata e le prestazioni nei sottogruppi per individuare lacune in termini di equità (Hendrie et al., 2008; FAO, 2014). La traduzione/retrotraduzione e le interviste cognitive riducono le interpretazioni errate, mentre i test di funzionamento degli elementi differenziali contribuiscono a garantire punteggi equi tra lingue e culture (Trakman et al., 2017).

Garanzia di qualità e reporting

Studi rigorosi preregistrano i protocolli; riportano affidabilità, validità e invarianza delle misurazioni; giustificano le regole di punteggio e i cut-point; e rivelano limitazioni come desiderabilità sociale, ipotesi e bias di selezione. Quando possibile, i disegni a metodi misti aggiungono profondità esplicativa esplorando perché alcuni preconcetti persistono nonostante le istruzioni (Hendrie et al., 2008).

Integrazione

Una strategia multi-metodo – questionari validati (GNKQ/GNKQ-R o strumenti specifici per la popolazione), moduli KAP, endpoint oggettivi su dieta e biomarcatori e prestazioni di compiti supportate dalla tecnologia – offre una visione completa della consapevolezza nutrizionale e delle sue conseguenze. Tali progetti consentono ai programmi di perfezionare i messaggi, personalizzare i supporti per i sottogruppi e dimostrare collegamenti significativi tra apprendimento, alimentazione più sana e marcatori clinici migliorati (Parmenter e Wardle, 1999; Kliemann et al., 2016; Spronk et al., 2014; FAO, 2014; Hendrie et al., 2008; Trakman et al., 2017; Chen et al., 2017).

4.6 Efficacia degli interventi nutrizionali innovativi

L'efficacia di interventi nutrizionali innovativi è stata esaminata in diverse popolazioni e contesti di erogazione, dimostrando che programmi ben progettati possono migliorare le conoscenze, modificare le scelte alimentari e produrre benefici clinici misurabili, sebbene gli effetti varino in base al contesto, all'intensità e alla durata del follow-up. Di seguito, vengono sintetizzate le evidenze relative ai principali approcci,



con attenzione ai meccanismi, alle considerazioni di implementazione e alle lacune che limitano la generalizzabilità.

Interventi potenziati dalla tecnologia

Gli strumenti di salute digitale (app mobili, portali, telemedicina) e i formati basati sul gioco possono aumentare il coinvolgimento e abbreviare i cicli di feedback tra comportamento e rinforzo. Una meta-analisi di giochi da tavolo per la salute ha riportato un ampio effetto complessivo sulle conoscenze relative alla salute ed effetti da piccoli a moderati sui comportamenti e sugli indicatori biologici, suggerendo che il gioco strutturato può tradurre l'apprendimento in azione quando i giochi incorporano obiettivi chiari e feedback (Gauthier, 2019). Un'analisi più ampia e un lavoro meta-analitico sugli interventi assistiti dalla tecnologia indicano che le piattaforme interattive sono costantemente efficaci per i risultati correlati al peso, ma mostrano effetti eterogenei sulla qualità della dieta, spesso dovuti a finestre di intervento brevi, endpoint dietetici non standardizzati e personalizzazione limitata (Chew et al., 2023). Le caratteristiche del programma che ne rafforzano l'impatto includono la definizione di obiettivi adattivi, suggerimenti tempestivi e l'integrazione con il coaching umano; al contrario, l'elevato carico di lavoro per l'utente e la stanchezza da notifiche compromettono l'aderenza e ne diluiscono gli effetti nel tempo (Chew et al., 2023).

Approcci mirati e per tutto il ciclo di vita

Gli interventi allineati alle finestre critiche (preconcepimento, gravidanza, infanzia, adolescenza) dimostrano rendimenti sproporzionati rispetto ai programmi per l'età adulta. L'integrazione bilanciata di energia e proteine durante la gravidanza riduce il basso peso alla nascita e migliora gli esiti del parto, sottolineando l'importanza di combinare l'educazione alimentare con una strategia di integrazione concreta e appropriata al contesto (Lassi et al., 2021). Gli ecosistemi digitali che curano risorse basate sull'evidenza per genitori e operatori sanitari possono estendere tali approcci; le prime valutazioni di piattaforme integrate segnalano una solida fattibilità e un forte coinvolgimento degli utenti, preparando il terreno per sperimentazioni basate sui risultati di crescita e alimentazione (Øverby et al., 2023). Nell'adolescenza, i modelli di "alfabetizzazione alimentare" multicomponente che combinano workshop, attività



esperienziali ed elementi digitali migliorano le conoscenze nutrizionali, riducono il mangiare emotivo e rafforzano l'autoregolamentazione, meccanismi che plausibilmente sostengono scelte più sane in condizioni di stress e influenza dei pari (Mancone et al., 2024).

Gestione delle malattie croniche

Tra gli adulti con patologie croniche legate all'alimentazione, la consulenza e il monitoraggio dietetico erogati digitalmente producono miglioramenti modesti ma clinicamente significativi nell'aderenza alla dieta mediterranea, nell'assunzione di frutta e verdura, nella riduzione del sodio, nei parametri antropometrici e nel controllo glicemico, effetti coerenti con l'automonitoraggio iterativo e la rendicontazione a distanza (Barnett et al., 2023). Questi risultati supportano l'integrazione di moduli nutrizionali nei percorsi di gestione delle malattie, sottolineando al contempo la necessità di follow-up più lunghi e di analisi del rapporto costo-efficacia per orientare il rimborso (Barnett et al., 2023).

Strategie di cambiamento comportamentale a livello sociale e comunitario

I programmi di comunicazione sul cambiamento comportamentale e sociale in ambito nutrizionale (NSBCC) che operano attraverso strutture comunitarie, utilizzando messaggi ripetuti e multicanale con dimostrazioni pratiche, hanno dimostrato un aumento dell'allattamento esclusivo al seno e miglioramenti negli indicatori di crescita infantile. Le dimensioni dell'effetto sono più forti quando la comunicazione è associata a fattori abilitanti (ad esempio, accesso al cibo, supporti per risparmiare tempo), evidenziando che la conoscenza da sola non è sufficiente in contesti con risorse limitate (Mahumud et al., 2022).

Meccanismi di azione e modificatori dell'effetto

In tutte le modalità, si ripresentano diversi fattori: (1) rilevanza e ripetizione (spinte, promemoria), (2) autoefficacia e competenze (lettura delle etichette, budgeting, preparazione dei pasti), (3) rinforzo sociale (pari, famiglie, leader della comunità) e (4) supporto strutturale (predefiniti salutari, accesso). La "dose" dell'intervento, l'adattamento ai contesti culturali e di alfabetizzazione e l'alfabetizzazione nutrizionale di base moderano costantemente i risultati (Chew et al., 2023; Mancone et al., 2024).



I programmi che abbinano l'istruzione a risorse tangibili (sussidi, integratori o scatole di cibo) mostrano effetti più ampi e duraturi (Lassi et al., 2021).

Implementazione, equità e sostenibilità

L'efficacia dipende dalla fedeltà (erogazione come previsto), dalla portata (chi partecipa) e dal mantenimento (continuazione post-sperimentazione). Il divario digitale, le barriere linguistiche e la variabilità negli ambienti alimentari possono amplificare le disuguaglianze se non affrontate in modo proattivo attraverso opzioni offline, contenuti multilingue e il collegamento ai supporti sociali (Chew et al., 2023; Mahumud et al., 2022). Per quanto riguarda la scalabilità, i design ibridi che combinano funzionalità automatizzate con un supporto umano leggero sembrano più convenienti, preservando al contempo l'aderenza (Barnett et al., 2023). Il monitoraggio di routine dovrebbe incorporare metriche stratificate in base all'equità e dati di processo incentrati sull'utente (tempo di coinvolgimento, tempestività di risposta) per guidare le correzioni a metà percorso (Øverby et al., 2023).

Misurazione e risultati

L'acquisizione di conoscenze a breve termine è comune, ma un cambiamento dietetico duraturo richiede un follow-up più lungo e endpoint armonizzati (ad esempio, indici di qualità della dieta standardizzati, dati oggettivi sull'acquisto o sull'assunzione). Ove possibile, l'abbinamento dell'autovalutazione con biomarcatori o misure basate su dispositivi connessi ne migliora la validità. Gli effetti di mantenimento sono più evidenti quando sono presenti punti di contatto "booster" post-intervento e supporti ambientali (Gauthier, 2019; Barnett et al., 2023).

Sintesi generale

Interventi nutrizionali innovativi, in particolare quelli interattivi, personalizzati e abbinati a fattori abilitanti strutturali, possono migliorare le conoscenze e produrre cambiamenti comportamentali e clinici significativi. Le evidenze più solide supportano il targeting per tutto il corso della vita, l'erogazione mista uomo-digitale e i modelli SBCC integrati nella comunità. I lavori futuri dovrebbero dare priorità a sperimentazioni più lunghe con progetti attenti all'equità, analisi del rapporto costo-efficacia e interoperabilità con i sistemi sanitari e sociali per sostenere l'impatto su larga scala (Chew et al., 2023;



Barnett et al., 2023; Mahumud et al., 2022; Lassi et al., 2021; Øverby et al., 2023; Mancone et al., 2024; Gauthier, 2019).

4.7 Bibliografia

Global Nutrition Report. Global Nutrition Report 2020: Action on equity to end malnutrition. Bristol (UK): Development Initiatives; 2020.

U.S. Department of Health and Human Services; U.S. Department of Agriculture. Dietary Guidelines for Americans, 2020–2025. 9th ed. Washington (DC): U.S. Government Printing Office; 2020.

Reynolds A, Mann J, Cummings J, Winter N, Mete E, Te Morenga L. Carbohydrate quality and human health: a series of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet*. 2019;393(10170):434-445.

Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet supplemented with extra-virgin olive oil or nuts. *N Engl J Med*. 2018;378(25):e34.

Hallberg L, Brune M, Rossander L. The role of vitamin C in iron absorption. *Am J Clin Nutr*. 1989;49(1):140-144.

U.S. Congress. Dietary Supplement Health and Education Act of 1994 (DSHEA). Public Law 103-417; 1994.

European Parliament and Council. Directive 2002/46/EC on the approximation of the laws of the Member States relating to food supplements. *Off J Eur Communities*. 2002;L183:51-57.

Tucker J, Fischer T, Upjohn L, Mazzera D, Kumar M. Unapproved pharmaceutical ingredients included in dietary supplements associated with FDA warnings. *JAMA Netw Open*. 2018;1(6):e183337.

U.S. Preventive Services Task Force. Folic acid supplementation to prevent neural tube defects: US Preventive Services Task Force recommendation statement. *JAMA*. 2023;330(5):471-477.

Manson JE, Cook NR, Lee IM, et al. Vitamin D supplements and prevention of cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 2019;380(1):33-44.



World Health Organization. Healthy diet. Geneva: WHO; 2020.

Hooper L, Martin N, Jimoh OF, Kirk C, Foster E, Abdelhamid AS. Reduction in saturated fat intake for cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020;5:CD011737.

Lichtenstein AH, Appel LJ, Vadiveloo M, et al. 2021 Dietary Guidance to Improve Cardiovascular Health. *Circulation*. 2021;144(23):e472-e487.

World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Diet, nutrition, physical activity and cancer: a global perspective. Continuous Update Project Expert Report. London: WCRF/AICR; 2018.

Aune D, Keum N, Giovannucci E, et al. Whole grain consumption and risk of cardiovascular disease, cancer, and mortality: systematic review and dose-response meta-analysis. *BMJ*. 2016;353:i2716.

Hall KD, Ayuketah A, Brychta R, et al. Ultra-processed diets cause excess calorie intake and weight gain: an inpatient randomized controlled trial. *Cell Metab*. 2019;30(1):67-77.e3.

U.S. Food and Drug Administration. Dietary supplements: overview of regulatory requirements and responsibilities. Silver Spring (MD): FDA; 2023.

U.S. Food and Drug Administration. Current Good Manufacturing Practice (CGMP) in manufacturing, packaging, labeling, or holding operations for dietary supplements: final rule. *Fed Regist*. 2007;72(121):34752-34958.

Newmaster SG, Grguric M, Shanmughanandhan D, Ramalingam S, Ragupathy S. DNA barcoding detects contamination and substitution in North American herbal products. *BMC Med*. 2013;11:222.

Klein EA, Thompson IM Jr, Tangen CM, Crowley JJ, Lucia MS, Goodman PJ, et al. Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA*. 2011;306(14):1549-1556.

Manson JE, Cook NR, Lee IM, Christen WG, Bassuk SS, Mora S, et al. Marine n-3 fatty acids and prevention of cardiovascular disease and cancer. *N Engl J Med*. 2019;380(1):23-32.

Goldenberg JZ, Lytvyn L, Steurich J, Parkin P, Mahant S, Johnston BC. Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*–associated diarrhea in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;12:CD006095.



United States Pharmacopeia (USP). USP Verified Mark—Dietary Supplements: program overview. Rockville (MD): USP; 2021.

National Institutes of Health, Office of Dietary Supplements. Dietary supplements: what you need to know. Bethesda (MD): NIH ODS; 2023.

Michie S, van Stralen MM, West R. The behaviour change wheel: A new method for characterising and designing behaviour change interventions. *Implement Sci.* 2011;6:42.

Bandura A. Health promotion by social cognitive means. *Health Educ Behav.* 2004;31(2):143-164.

DeSmet A, Van Ryckeghem D, Compernelle S, et al. A systematic review and meta-analysis of serious digital games for healthy lifestyle promotion. *Prev Med.* 2014;69:95-107.

Reicks M, Trofholz AC, Stang JS, Laska MN. Impact of cooking and home food preparation interventions among adults: a systematic review. *J Nutr Educ Behav.* 2014;46(2):105-117.

Reverdy C, Schlich P, Köster EP, Ginon E, Lange C. Effect of sensory education on willingness to taste novel food in children. *Food Qual Prefer.* 2008;19(5):580-590.

Contento IR. *Nutrition Education: Linking Research, Theory, and Practice.* 3rd ed. Burlington (MA): Jones & Bartlett; 2016.

Hutchesson MJ, Rollo ME, Krukowski R, et al. eHealth interventions for the prevention and treatment of overweight and obesity in adults: a systematic review with meta-analysis. *Int J Behav Nutr Phys Act.* 2015;12:35.

Vaona A, Banzi R, Kwag KH, et al. E-learning for health professionals. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018;1:CD011736.

Parmenter K, Wardle J. Development of a general nutrition knowledge questionnaire for adults in the UK. *Appetite.* 1999;33(3):295-306.

Kliemann N, Wardle J, Johnson F, Croker H. Reliability and validity of a revised version of the General Nutrition Knowledge Questionnaire (GNKQ-R). *Appetite.* 2016;99:66-74.

Spronk I, Kullen C, Burdon C, O'Connor H. Relationship between nutrition knowledge and dietary intake. *Nutr Diet.* 2014;71(3):313-330.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Guidelines for assessing nutrition-related knowledge, attitudes and practices (KAP). Rome: FAO; 2014.



Hendrie GA, Cox DN, Coveney J. Derivation of a diet quality index for an Australian population. *Appetite*. 2008;50(1):189-197.

Trakman GL, Forsyth A, Devlin BL, Belski R. Development and validation of a brief general nutrition knowledge questionnaire for athletes. *J Int Soc Sports Nutr*. 2017;14:18.

Chen J, Lieffers J, Bauman A, Hanning R, Allman-Farinelli M. The use of smartphone health apps and other mobile health technologies in dietetic practice: a three-country study of dietitians. *J Hum Nutr Diet*. 2017;30(4):439-452.

Gauthier A, Kato PM, Bul KCM, Dunwell I, Walker-Clarke A, Lameris P. Board games for health: a systematic literature review and meta-analysis. *Games Health J*. 2019;8(2):85-100.

Chew HSJ, Rajasegaran NN, Chng S. Effectiveness of interactive health-assistive technology interventions to improve healthy food choice: a systematic review and meta-analysis. *Br J Nutr*. 2023;130(7):1250-1259.

Lassi ZS, Padhani ZA, Rabbani A, Rind F, Salam RA, Das JK, Bhutta ZA. Balanced energy-protein supplementation during pregnancy and birth outcomes: systematic review and meta-analysis. *Nutrients*. 2021;13(2):E438.

Øverby NC, Hillesund ER, Helland SH, Medin AC, Sagedal LR, Bere E, et al. Evaluating the effectiveness and implementation of an integrated digital ecosystem for early-life nutrition: study protocol for a hybrid type 1 randomised controlled effectiveness-implementation trial (the Nutrition Now project). *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;13:1071489.

Mancone S, et al. Enhancing nutritional knowledge and self-regulation among adolescents: efficacy of a multifaceted food literacy intervention. [Final journal details to be added when available].

Barnett A, Wright CJ, Watson L, Wilson A, Weng S, Zhang J, et al. Dietary education delivered by digital health for improving diet quality and health outcomes in adults with diet-related chronic diseases: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients*. 2022;14(14):2872.

Mahumud MS, Rawal LB, Hossain G, Hossain MN, Hossain MR, Gow J. Social and behaviour change communication interventions and infant and young child feeding practices: a systematic review and meta-analysis. *Matern Child Nutr*. 2022;18(S1):e13264.



SPU
Slovenská
poľnohospodárska
univerzita v Nitre

