



RADIONUCLIDI DI ORIGINE ANTROPICA

Metodo di screening in LCS su muscolo

PIETRO CAZZOLA¹, EMILIANA BALLOCCI¹, ANDREA CARRARA¹, MARTINO CAZZORLA¹, MASSIMO PLATINI²¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sezione di Vercelli² Servizio Veterinario, ASL - VC

I radionuclidi sparsi sul territorio negli incidenti nucleari, come quello occorso a Chernobyl nel 1986, assieme a quelli derivati dagli esperimenti nucleari in atmosfera degli anni '50 e '60, rappresentano un rischio per la salute non solo a causa dell'irraggiamento di cui sono fonte nell'immediato della loro ricaduta, ma soprattutto per la tossicità espletata per ingestione a seguito del loro ingresso nella catena alimentare [7, 8, 14, 17].

Va ricordato che in queste condizioni la loro azione è particolarmente rilevante e subdola agendo soprattutto a livello cellulare ed esplicando un'azione essenzialmente mutagena, teratogena e oncogena.

Le vie di ingresso nella catena alimentare, tali da coinvolgere direttamente la salute umana, possono essere identificate essenzialmente in tre:

- l'assunzione dei radioisotopi da parte dei vegetali che vengono direttamente consumati dall'uomo;
- l'assunzione dei radioisotopi da parte dei vegetali che vengono poi utilizzati come foraggi per il bestiame, il che conduce alla produzione di alimenti di origine animale contaminati;
- la contaminazione dell'acqua tellurica con conseguente trasporto dei radionuclidi all'uomo sia attraverso il consumo diretto, sia con l'ingresso nei vegetali come precedentemente descritto.

Quest'ultima strada, in realtà, risulta importante solo in concomitanza con l'emergenza poiché è fonte di diffusione degli isotopi radioattivi, presenti come sali solubili, prima che questi vengano fissati nel terreno; infatti, la loro presenza nell'acqua è temporalmente variabile per cui la loro concentrazione, trattandosi di una via di trasporto molto rapida, risulta condizionata al momento del prelievo.

Dalle informazioni bibliografiche risulta che la contaminazione attualmente riscontrabile nel nostro Paese sia imputabile soprattutto al Cesio 137 e allo Stronzio 90; si rilevano anche tracce di altri elementi radiogeni a elevata massa atomica che, comunque, non sembrano rivestire grande importanza nella sicurezza alimentare [1, 6, 12].

La situazione, nelle nostre regioni, è caratterizzata da livelli generalmente molto bassi, tali da non destare preoccupazioni, ma con la presenza di rari picchi, imprevisti e incontrollati, come hanno dimostrato alcuni lavori [1, 2, 12].

I radioisotopi di cui stiamo parlando sono sostanzialmente degli elementi metallici che, dal punto di vista biologico, vanno a sostituire, rispettivamente, il Potassio e il Calcio per cui verranno ritrovati, sia nei vegetali sia negli erbivori, in quei distretti propri di questi elementi, in proporzioni determinate dal loro rapporto con l'elemento stabile, legati a molecole anioniche di diversa natura e funzione biochimica.

Nel passaggio di uno e, talvolta, due anelli della catena alimentare può avvenire sia una diminuzione della loro biodisponibilità, ad esempio per diluizione o salificazione con anioni scarsamente assimilati dall'organismo, sia un aumento della



Foto 1. Contatore a scintillazione liquida "Packard Tri-Carb 1900 aggiornato a 2500.



argomenti

Numero 1 - Marzo 2013

stessa e del valore biologico dei radioisotopi presenti. Trattandosi di metalli chimicamente del tutto simili agli isotopi stabili, possono essere legati a svariate molecole organiche di interesse biochimico, ciascuna con un destino metabolico diverso e, quindi, con diversa capacità di assunzione e compartimentazione da parte degli organismi coinvolti [16].

Va da sé che la difesa della salute umana [5] dalla contaminazione per via alimentare comporta non solo l'identificazione di tutti i cibi che li contengono, cosa non facile trattandosi di situazioni poco frequenti, non prevedibili e difficili da evidenziare, ma, per gli alimenti di origine animale, l'identificazione delle dinamiche ambientali attraverso cui questi passano da un organismo all'altro e delle cinetiche biochimiche che, legandoli a composti organici diversi nelle diverse condizioni, determinano possibilità patologiche nettamente diverse nel consumatore finale variandone la reale biodisponibilità nei diversi anelli della catena alimentare.

Al fine di poter controllare la dinamica di questi fenomeni, in un precedente lavoro è stata proposta, per il latte, una metodica di screening [3] che, nonostante non consenta l'individuazione specifica dei radioisotopi interessati e necessiti di un'ulteriore conferma spettrometrica, ha dimostrato la capacità di evidenziare la presenza di radioattività di origine antropica eccedente quella di fondo, normalmente presente, su un numero di campioni abbastanza rilevante.

Inoltre, la sperimentazione già effettuata ha dimostrato l'affidabilità di questo sistema di controllo che si basa su una valutazione preventiva della radioattività totale in scintillazione liquida e una conferma e quantizzazione spettrometrica del ^{137}Cs , indicatore di contaminazione di origine antropica, solo sui campioni risultati dubbi.

Nel presente lavoro si propone un analogo approccio metodologico per la carne, cioè screening iniziale e conferma spettro-

Tabella 1. Correlazioni tra tSIE e % di efficienza su muscoli bovini con aggiunta di ^{90}Sr ; efficienza % media = 231,7.

| x (tSIE) | y (% Eff) |
|----------|-----------|
| 234,86 | 221,6 |
| 192,84 | 235,2 |
| 164,39 | 231,9 |
| 142,14 | 233,5 |
| 132,36 | 235,2 |
| 119,77 | 232,8 |

Tabella 2. Correlazioni tra tSIE e % di efficienza su muscoli bovini con aggiunta di ^{137}Cs ; efficienza % media = 110,12.

| x (tSIE) | y (% Eff) |
|----------|-----------|
| 230,58 | 109,4 |
| 221,64 | 110,2 |
| 215,66 | 110,6 |
| 204,98 | 109,3 |
| 196,40 | 110,4 |
| 193,94 | 110,8 |

Riquadro 1. Reagenti e apparecchiature utilizzati nella prova sperimentale.

Reagenti

- Cocktail di scintillazione "Insta-Gel" (PerkinElmer).
- Serie di standard non quenziati della Ditta PerkinElmer per la calibrazione automatica del contatore a scintillazione liquida.
- Soluzione standard di Stronzio 90 "ISOTRAK SIZ44" contenente 200 ($\pm 1\%$) kBq (Bequerel = unità di misura della radioattività corrispondente alle disintegrazioni nucleari per secondo) di ^{90}Sr in 5 ml corrispondenti a 40 Bq/ μl .
- Soluzione di Lavoro I di ^{90}Sr : 100 μl di soluzione Standard (ISOTRAK SIZ44) si diluiscono con 1900 μl di HCl 0,1N (1: 20) ottenendo un'attività di 2 Bq/ μl corrispondente a 120 DPM / μl (Disintegrazioni Per Minuto = unità di misura della radioattività corrispondente alle disintegrazioni nucleari per minuto).
- Soluzione di lavoro II di ^{90}Sr : 100 μl di soluzione di Lavoro I si diluiscono con 1900 μl di H₂O ultra pura (1: 20) ottenendo una soluzione contenente 0,1 Bq/ μl corrispondente a 6 DPM/ μl .
- Soluzione di lavoro III di ^{90}Sr : 200 μl di soluzione di Lavoro II si diluiscono con 1800 μl di H₂O ultra pura (1: 10) ottenendo una soluzione contenente 0,01 Bq/ μl corrispondente a 0,6 DPM/ μl .
- Soluzione standard di Cesio 137 "CSR (EUROSTANDARD CZ s.r.o.)" contenente 185,0 ($\pm 1\%$) kBq di ^{137}Cs in 5 ml corrispondenti a 37 Bq/ μl .
- Soluzione di lavoro I di ^{137}Cs : 50 μl di soluzione standard (CSR - EUROSTANDARD CZ s.r.o.) si diluiscono con 1950 μl di HCl circa 0,1 N (1: 40) ottenendo un'attività di 0,925 Bq/ μl .
- Soluzione di lavoro II di ^{137}Cs : 200 μl di soluzione di lavoro I si diluiscono con 1800 μl di HCl 0,1 N (1: 10) ottenendo una soluzione contenente 0,0925 Bq/ μl .
- Soluzione Standard di calibrazione QCYB41 certificata (Isotrak - AEA Technology QSA).
- Soluzione di EDTA: 1 gr di EDTA sale bisodico e 250 μl di Tween 20 vengono sciolti in 100 ml di H₂O ultra pura.

Apparecchiature

- Contatore a scintillazione liquida "Packard Tri-Carb 1900 aggiornato a 2500".
- Spettrometro gamma Ortec 905-4 con detector NaI da 3 x 3 pollici.

metrica sui campioni superiori al cut off ambientale, sperimentando il sistema, peraltro applicabile su diverse matrici grazie all'incenerimento che distrugge le sostanze organiche dei tessuti eliminando possibili interferenze, sia su muscolo bovino, per il controllo delle produzioni dei macelli, sia su quello di cinghiali che, come si evince da dati presenti in letteratura [1, 2], rappresentano un alimento a probabile rischio di contaminazione da radionuclidi.



Tabella 3. CPS/kg rilevate in 3 campioni, a diversa quantità di ⁹⁰Sr aggiunto (A-B-C), determinati in sestuplo in 3 momenti diversi.

| Campione A | | | Campione B | | | Campione C | | |
|------------|--------|--------|------------|---------|---------|------------|---------|---------|
| 83,140 | 86,251 | 85,343 | 97,462 | 99,620 | 97,751 | 528,457 | 538,344 | 520,857 |
| 85,768 | 88,529 | 86,972 | 110,237 | 108,965 | 104,152 | 521,406 | 546,550 | 543,659 |
| 93,431 | 90,564 | 91,065 | 108,093 | 104,673 | 102,618 | 548,403 | 556,356 | 566,132 |
| 89,518 | 87,689 | 88,518 | 111,949 | 110,547 | 107,250 | 564,085 | 563,144 | 565,000 |
| 95,365 | 92,357 | 89,934 | 104,992 | 102,491 | 102,131 | 556,078 | 561,576 | 561,180 |
| 85,115 | 82,030 | 82,265 | 103,663 | 101,677 | 102,129 | 541,796 | 530,834 | 537,871 |

Materiali

I materiali utilizzati in questa prova sperimentale sono riportati nel riquadro 1.

Metodi

Metodica di screening in LSC

Per lo screening si è adottato il metodo di lettura per scintillazione liquida (LSC) poiché, con questa tecnica, anche i radioisotopi gamma emittenti, come il ¹³⁷Cs, vengono letti con un'efficienza molto alta mentre lo ⁹⁰Sr, l'⁹⁰Y in equilibrio ed eventuali altri beta emittenti ad alta energia producono una radiazione Cerenkov che consente letture particolarmente sensibili e con notevole efficienza [9, 10, 15].

Dovendo valutare la presenza di tutti i radionuclidi di origine antropica è stato necessario comprendere nella lettura tutte le emissioni beta e gamma per cui è stata utilizzata una finestra di lettura da 15 a 2.000 keV; la taratura del sistema e la valutazione dell'affidabilità del metodo sono state effettuate su campioni fortificati preparati per aggiunta di standard certificati di Stronzio 90 o Cesio 137 a muscolo bovino, risultato negativo a una valutazione preliminare.

Non essendo possibile la correzione dell'efficienza di lettura senza conoscere lo specifico radionuclide né in presenza contemporanea di molti elementi radioattivi, si è scelto di tarare il sistema specificamente in CPS/Kg (Colpi Per Secondo = unità di misura generica consistente nei lampi luminosi per secondo emessi dal campione), cioè in funzione dell'attività totale del campione.

L'efficienza di lettura nelle diverse condizioni di elementi attivi beta e gamma emittenti è stata valutata determinando l'effetto di quantità scalari di matrice su una quantità conosciuta di standard certificati di ⁹⁰Sr e di ¹³⁷Cs, particolarmente presenti nelle recenti contaminazioni antropiche e costruendo le curve di compensazione rispettivamente degli effetti del quenching e della radiazione Cerenkov per il primo e delle perdite nelle condizioni di lettura del secondo; inoltre le curve sono state usate per la determinazione di esattezza/recupero su campioni di muscolo adizionati di quantità note dei due isotopi.

Preparazione del campione

10 gr di tessuto muscolare esente da grasso e stroma connettivale, tagliuzzati con le forbici, vengono pesati, con approssimazione

< al 5%, in crogiolo, si essicca prima a 105 - 120 °C per 1 h e poi a 190 °C per 2 - 3 ore, si brucia sotto cappa su fornellino elettrico e si mineralizza in muffola a 450 °C per una notte (minimo 15 ore); si umettano le ceneri con 100 µl di HNO₃ conc. + 1 ml di H₂O ultra

pura, si scalda a ebollizione incipiente su fornellino elettrico fino a secco e si riporta in muffola a 450 °C fino a ceneri bianche.

Si riprendono le ceneri con 3 ml di soluzione al 5% di ac. Formico riscaldando in stufa a 60 °C X 15' - 30', si trasferisce il tutto in vials di polietilene e si aggiungono, quindi, 5 ml della soluzione di EDTA riscaldando in stufa a 60 °C per 1 h; si raccoglie il liquido nei precedenti vials lavando con 3 ml di H₂O ultra pura.

Letture in LSC

Le ceneri dei campioni portate in soluzione come descritto, tal quali o addizionate degli standard nei casi previsti, si agitano con 10 ml di cocktail di scintillazione fino alla formazione di gel.

Le determinazioni, lette con la sottrazione automatica del bianco rappresentato da 10 ml di H₂O ultra pura agitati con la soluzione scintillante, sono state effettuate con contatore per scintillazione liquida "Packard Tri-Carb 2500" (foto 1), calibrato prima delle letture con il programma automatico in dotazione



Foto 2. Spettrometro gamma Ortec 905-4 con detector NaI da 3 x 3 pollici.



argomenti

Numero 1 - Marzo 2013

utilizzante la serie di standard non “quenciati” della Ditta PerkinElmer, programmato come segue:

- tempo di lettura di 100 minuti o 2 Sigma = < 2,5 %;
- regione di lettura da 15 a 2000 keV;
- correzione dei fenomeni di luminescenza;
- monitoraggio dell'eterogeneità del campione;
- correzione dei campioni colorati;
- *High Sensitivity Count Mode*;
- controllo delle cariche elettrostatiche;
- sottrazione del bianco posto nella prima posizione;
- applicazione del AEC (*Automatic Efficiency Correction*);
- indicatore di quench: tSIE/AEC.

Curva di compensazione del quenching e della radiazione “Cerenkov” per lo ⁹⁰Sr

Al fine di dimostrare la validità del sistema, è stata studiata la relazione tra fenomeni di quench e radiazione Cerenkov con l'efficienza delle letture; la stessa curva di compensazione di questi due effetti, specifica per lo ⁹⁰Sr, che ne è scaturita è stata utilizzata per trasformare i risultati da CPM (Colpi Per Minuto = dato grezzo letto dallo strumento e consistente nei lampi di luce per minuto emessi dal campione) alla concentrazione reale (Bq/Kg) del radionuclide al fine di poter quantizzare l'esattezza/recupero del metodo per questo isotopo.

La matrice standard viene preparata partendo da 4 aliquote da 10 gr di tessuto muscolare di bovino, controllato preventivamente in spettrometria gamma (foto 2) per garantire l'assenza di radionuclidi da contaminazione, trattati in 4 crogioli come previsto nella preparazione del campione; il prodotto della dissoluzione delle ceneri di tutti e 4 i campioni e l'acqua di lavaggio dei crogioli vengono raccolte in un cilindro graduato e portate a 30 ml con H₂O ultra pura.

Si allestisce poi, in 6 vials, una curva con 0-2-4-6-8-10 ml della precedente soluzione addizionati, rispettivamente, di 10-8-6-4-2-0 ml di H₂O ultra pura; a ciascuno, si aggiungono 50 µl di soluzione di lavoro I di ⁹⁰Sr, corrispondente a circa

6.000 DPM di radioisotopo, quindi si prosegue contando, senza sottrazione del bianco, ma con l'aggiustamento della regione di conteggio (AEC), come previsto nel manuale dello strumento per effettuare la curva di quenching. I dati ottenuti dal plottaggio della curva e in particolare i valori di efficienza % e di tSIE (trasformata dell'Indice Spettrale dello standard Esterno = indicatore quantitativo di quench) sono stati riportati in tabella 1 e sottoposti ad analisi di regressione lineare.

Curva di compensazione per il ¹³⁷Cs

Essendo il Cesio 137 soprattutto un gamma emittente, nelle letture in LSC il fenomeno del quenching e l'effetto Cerenkov incidono in misura minore e diventa evidente la perdita nel conteggio dovuta a schermature e assorbimenti di energia che, nonostante la propagazione del segnale in ogni direzione secondo la geometria della sfera, comportano un abbassamento del numero di scintillazioni conteggiate rispetto alle reali disintegrazioni.

Anche in questo caso esiste una relazione tra tSIE letto con la correzione automatica dello spettro (AEC) e utilizzato come parametro indicatore dell'effetto dalla matrice presente alla lettura e l'efficienza %. Analogamente a quanto avvenuto per lo Stronzio, si è provveduto a effettuare una curva onde poter valutare

Tabella 4. Tavola riepilogativa e quella di calcolo dell'analisi della varianza dei campioni a radioattività totale A senza aggiunta di ⁹⁰Sr standard.

| CAMPIONE A | | | | | | |
|---------------------------------|------------------|--------------|--------------|-----------------|----------------------------------|---------------|
| Analisi varianza | | | | | | |
| <i>Origine della variazione</i> | <i>SQ</i> | <i>gdt</i> | <i>MQ</i> | <i>F</i> | <i>Valore di significatività</i> | <i>F crit</i> |
| Tra gruppi | 5,73 | 2 | 2,86 | 0,18 | 0,84 | 3,68 |
| In gruppi | 236,28 | 15 | 15,75 | | | |
| Totale | 242,01 | 17 | | | | |
| Riepilogo concentrazione | | | | | | |
| <i>Gruppi</i> | <i>Conteggio</i> | <i>Somma</i> | <i>Media</i> | <i>Varianza</i> | | |
| Colonna 1 | 6 | 532,34 | 88,72 | 23,97 | | |
| Colonna 2 | 6 | 527,42 | 87,9 | 12,92 | | |
| Colonna 3 | 6 | 524,1 | 87,35 | 10,37 | | |

Tabella 5. Tavola riepilogativa e quella di calcolo dell'analisi della varianza dei campioni a radioattività totale B con aggiunta di una bassa quantità di ⁹⁰Sr standard.

| CAMPIONE B | | | | | | |
|---------------------------------|------------------|--------------|--------------|-----------------|----------------------------------|---------------|
| Analisi varianza | | | | | | |
| <i>Origine della variazione</i> | <i>SQ</i> | <i>gdt</i> | <i>MQ</i> | <i>F</i> | <i>Valore di significatività</i> | <i>F crit</i> |
| Tra gruppi | 34,89 | 2 | 17,44 | 0,94 | 0,41 | 3,68 |
| In gruppi | 277,15 | 15 | 18,48 | | | |
| Totale | 312,04 | 17 | | | | |
| Riepilogo concentrazione | | | | | | |
| <i>Gruppi</i> | <i>Conteggio</i> | <i>Somma</i> | <i>Media</i> | <i>Varianza</i> | | |
| Colonna 1 | 6 | 636,39 | 106,07 | 27,4 | | |
| Colonna 2 | 6 | 627,97 | 104,66 | 18,44 | | |
| Colonna 3 | 6 | 616,03 | 102,67 | 9,59 | | |



Tabella 6. Tavola riepilogativa e quella di calcolo dell'analisi della varianza dei campioni a radioattività totale C con aggiunta di quantità elevate di ⁹⁰Sr standard.

| CAMPIONE C | | | | | | |
|---------------------------------|------------------|--------------|--------------|-----------------|----------------------------------|---------------|
| Analisi varianza | | | | | | |
| <i>Origine della variazione</i> | <i>SQ</i> | <i>gdt</i> | <i>MQ</i> | <i>F</i> | <i>Valore di significatività</i> | <i>F crit</i> |
| Tra gruppi | 140,61 | 2 | 70,3 | 0,28 | 0,76 | 3,68 |
| In gruppi | 3825,98 | 15 | 255,07 | | | |
| Totale | 3966,59 | 17 | | | | |
| Riepilogo concentrazione | | | | | | |
| <i>Gruppi</i> | <i>Conteggio</i> | <i>Somma</i> | <i>Media</i> | <i>Varianza</i> | | |
| Colonna 1 | 6 | 3260,23 | 543,37 | 264,65 | | |
| Colonna 2 | 6 | 3296,8 | 549,47 | 172,11 | | |
| Colonna3 | 6 | 3294,7 | 549,12 | 328,44 | | |

Tabella 7. Esattezza/recupero ⁹⁰Sr. Bq/kg rilevati nei due campioni fortificati a livelli diversi e nel muscolo senza aggiunte; valori netti (sottratti del negativo), concentrazione attesa ed errore %.

| | Bq/kg lorde | Bq/kg nette | Bq/kg teoriche | Errore% |
|-------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|----------------|
| Media Muscolo (-) | 38,00 | - | - | - |
| Muscolo (+) | 544,18 | 506,18 | 463,05 | 9,31% |
| Muscolo (+++) | 1944,02 | 1906,02 | 1852,21 | 2,91% |

Tabella 8. Esattezza/recupero ¹³⁷Cs. Bq/kg rilevati nei due campioni fortificati a livelli diversi e nel muscolo senza aggiunte; valori netti (sottratti del negativo), concentrazione attesa ed errore %.

| | Bq/kg lorde | Bq/kg nette | Bq/kg teoriche | Errore% |
|-------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|----------------|
| Media Muscolo (-) | 70,6 | - | - | - |
| Muscolo (+) | 554,5 | 483,9 | 449,7 | 7,61%% |
| Muscolo (+++) | 1830,5 | 1759,9 | 1798,8 | - 2,16% |

le variazioni di efficienza dovute alla presenza di ceneri nel vial nonché calcolare l'esattezza/recupero del metodo per il ¹³⁷Cs quale elemento gamma emittente.

La matrice standard viene preparata partendo da 4 aliquote da 10 gr di tessuto muscolare di bovino, controllato preventivamente in spettrometria gamma per garantire l'assenza di radionuclidi da contaminazione, trattati in 4 crogioli come previsto nella preparazione del campione; il prodotto della dissoluzione delle ceneri di tutti e 4 i campioni e l'acqua di lavaggio dei crogioli vengono raccolte in un cilindro graduato e portate a 30 ml con H₂O ultra pura.

Si pipettano in vials da scintillazione 0-2-4-6-8-10 ml del prodotto della digestione di cui sopra aggiungendo rispettivamente 10-8-6-4-2-0 ml di H₂O ultra pura, si aggiungono, in ciascuno, 100 l di soluzione I di standard di ¹³⁷Cs corrispondente a circa 5.550 D.P.M. per vials, quindi si aggiungono 10 ml di scintillatore, si mantiene al buio per almeno 1 h e si prosegue con la lettura, senza sottrazione del bianco, come previsto dal manuale del BETA-COUNTER Packard per effettuare la curva di quenching.

I dati ottenuti dal plottaggio della curva e in particolare i valori di efficienza % e di tSIE (trasformata dell'Indice Spettrale dello standard Esterno = indicatore quantitativo di quenching), corretto dall'aggiustamento della regione di conteggio (AEC), sono

stati riportati in tabella 2 e sottoposti ad analisi di regressione lineare.

Precisione: riproducibilità intralaboratorio

Si preparano 6 campioni di carne per ognuno dei 3 livelli di fortificazione previsti (totale 18 campioni) pesando in crogiolo, per ciascuno di essi, 10 gr di muscolo bovino, controllato preventivamente per garantire l'assenza di radionuclidi da contaminazione.

Si procede quindi come descritto nella preparazione del campione trasferendo in vial la soluzione/sospensione ottenuta dalla mineralizzazione, si aggiungono rispettivamente circa A=0 - B=20 - C=500 Bq/kg di standard certificato di ⁹⁰Sr, contenuti rispettivamente in circa 50 µl di H₂O ultra pura, 20 µl di sol. III di standard di ⁹⁰Sr e 50 µl di solu-

zione II di standard di ⁹⁰Sr, quindi, dopo riposo al buio di almeno 1 ora, si leggono per 3 volte in tempi diversi i vials contro bianco, rappresentato da 10 ml di H₂O ultra pura + 10 ml di scintillatore.

Le letture in CPS/Kg, rappresentate dall'attività totale del muscolo standard + quelle dovute allo ⁹⁰Sr aggiunto, delle 3 sedute analitiche in cui sono state testate in sestuplo vengono riportate nelle tabelle 4, 5 e 6 da cui si effettua l'analisi della varianza (ANOVA) per ciascun livello di radioattività.

Si calcola quindi, per ogni livello di radioattività totale, lo scarto tipo di ripetibilità (sr) e riproducibilità (Sr) intralaboratorio e la sua % rispetto ai valori medi rilevati.

Minima Attività Rilevabile (MAR)

Poiché non è possibile disporre di campioni di carne esenti da radioattività perché in tutti i materiali sono sempre presenti radionuclidi naturali e i residui di antiche contaminazioni non evidenziabili né quantizzabili, si è proceduto su un campione di muscolo bovino, controllato preventivamente per garantire l'assenza di radionuclidi da contaminazione antropica recente.

La MAR è stata calcolata, per ⁹⁰Sr e ¹³⁷Cs, dalle oscillazioni del risultato, in CPS/kg, ottenuto nel campione dosato per 3 volte diverse in sestuplo nel corso delle prove di riproducibilità intra-



argomenti

Numero 1 - Marzo 2013

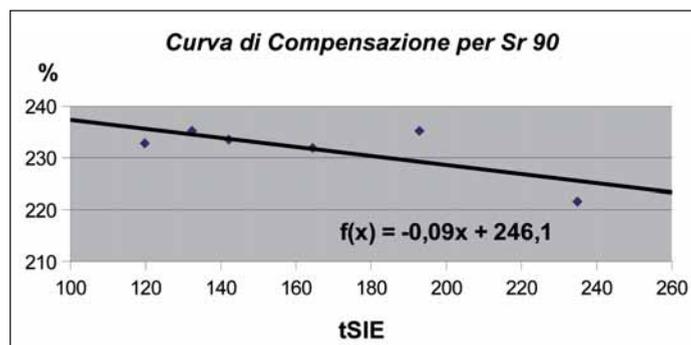


Figura 1. Curva di Compensazione per ^{90}Sr ottenuta per aggiunta di quantità scalari di matrice (diminuzione del tSIE con l'aumento della matrice aggiunta) e concentrazioni costanti di ^{90}Sr .

I dati sperimentali riportati sulla curva sono poi stati analizzati con la regressione lineare ottenendo un coefficiente di correlazione:

$$R = -0,74$$

che rappresenta un valore di R indicativo di una retta di equazione:

$$y = -0,09x + 246,1$$

inoltre, la pendenza m risulta essere:

$$m = -0,09$$

che dimostra una correlazione abbastanza modesta, ma pur ascrivibile a una retta con una pendenza minima negativa, cioè volta in favore di un aumento di efficienza alla diminuzione del tSIE che indica un progressivo aumento dell'effetto-matrice.

laboratorio.

Si calcola, quindi, la SD (Deviazione Standard) delle CPS/Kg ottenute e la MAR applicando la seguente formula:

$$\text{MAR} = \frac{2,33 * \delta}{\epsilon}$$

dove: δ = DS dell'attività rilevata nelle 6 X 3 letture
 ϵ = efficienza di conteggio calcolata per ciascun radioisotopo (CPS/Bq).

Esattezza / Recupero ^{90}Sr

Si preparano 2 campioni di carne standard come sopra trasferendo in vial la soluzione, si aggiungono rispettivamente 50 e 200 μl di soluzione di lavoro II (463,05 e 1.852,21 Bq/kg teorici com-

Tabella 9. Relazione tra i risultati in LSC (CPS/kg) e la presenza di ^{137}Cs rilevato in spettrometria γ (Bq/kg), nei muscoli di bovino.

| LSC | Spettrometria |
|---------|-------------------------|
| CPS/kg | ^{137}Cs Bq/kg |
| 77,741 | < 0,433 |
| 83,541 | < 0,427 |
| 84,397 | < 0,381 |
| 84,894 | < 0,348 |
| 92,490 | < 0,383 |
| 97,003 | < 0,430 |
| 110,597 | 8,16 |
| 121,654 | 20,02 |

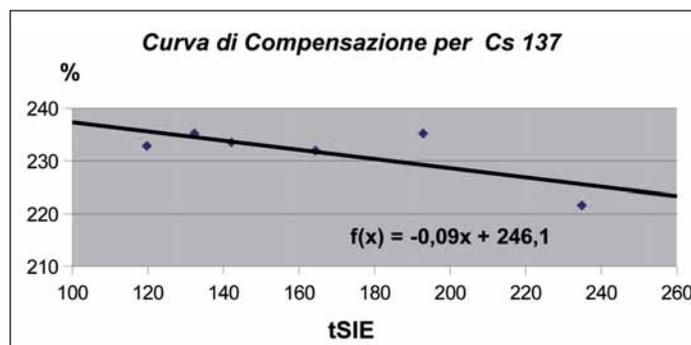


Figura 2. Curva di compensazione ottenuta per aggiunta di quantità scalari di matrice (diminuzione del tSIE con l'aumento della matrice aggiunta) e concentrazioni costanti di ^{137}Cs .

I dati sperimentali riportati sulla curva sono poi stati analizzati con la regressione lineare ottenendo, pur con uno scarso indice di correlazione, un retta di equazione:

$$y = -0,02x + 114,45$$

con coefficiente di correlazione:

$$R = -0,48$$

con pendenza m :

$$m = -0,02$$

che dimostra una pendenza minima negativa, cioè volta in favore di un aumento di efficienza alla diminuzione del tSIE cioè all'aumentare dell'effetto-matrice.

prensivi del calcolo del decadimento) e si leggono contro bianco sulla curva predisposta per lo ^{90}Sr ; si sottrae a ciascuno il valore medio in Bq/kg ricavato dalla lettura dei sei campioni di carne senza aggiunte testati nella prova di riproducibilità intralaboratorio e si calcola la % di recupero rispetto ai Bq/kg attesi.

Tabella 10. Relazione tra i risultati in LSC (CPS/kg) e la presenza di ^{137}Cs rilevato in spettrometria γ (Bq/kg), nei muscoli di cinghiale.

| LSC | Spettrometria |
|----------|-------------------------|
| CPS/kg | ^{137}Cs Bq/kg |
| 70,875 | < 0,435 |
| 78,666 | < 0,398 |
| 79,186 | < 0,412 |
| 83,604 | < 0,444 |
| 86,120 | < 0,383 |
| 87,514 | < 0,405 |
| 88,782 | < 0,609 |
| 95,946 | < 0,608 |
| 96,353 | < 0,611 |
| 97,418 | < 0,403 |
| 105,498 | < 0,386 |
| 102,006 | 2,300 |
| 102,077 | 3,025 |
| 130,088 | 9,783 |
| 136,684 | 20,680 |
| 106,137 | 22,414 |
| 166,402 | 29,560 |
| 1094,360 | 814,340 |



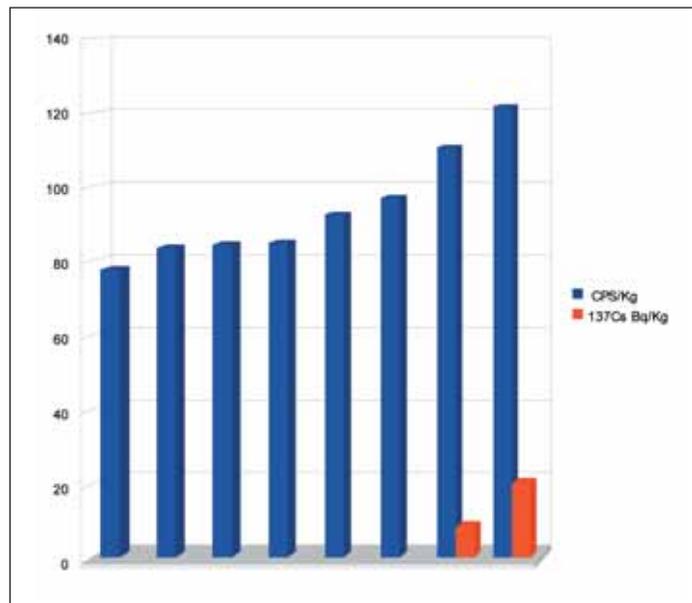


Figura 3. Relazione tra i CPS/Kg determinati in LSC e i Bq/Kg di ¹³⁷Cs, nei muscoli bovini.

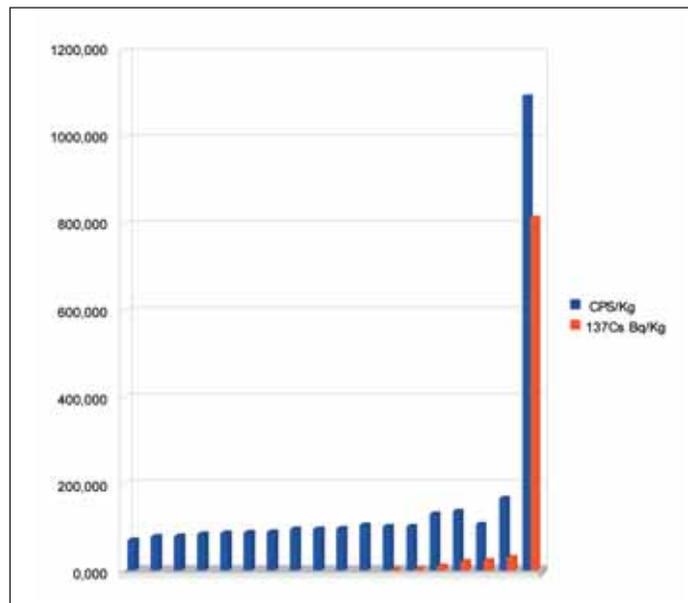


Figura 4. Relazione tra i CPS/Kg determinati in LSC e i Bq/Kg di ¹³⁷Cs, nei muscoli di cinghiale.

Esattezza / Recupero ¹³⁷Cs

Si preparano 2 campioni di carne standard come sopra, si aggiungono rispettivamente 50 e 200 µl di soluzione di lavoro II (449,7 e 1.798,8 Bq/kg teorici comprensivi del calcolo del decadimento) e si leggono contro bianco sulla curva del ¹³⁷Cs; si sottrae a ciascuno il valore in Bq/kg della carne senza aggiunte, letta contemporaneamente, e si calcola la % di recupero rispetto ai Bq/kg attesi.

Metodo di lettura in spettrometria gamma

Sono state standardizzate letture di circa 200 ml di muscolo, accuratamente sminuzzato con le forbici e pesato su bilancia tecnica, in contenitori di plastica effettuando, preventivamente, la calibrazione strumentale per questo volume e in questi recipienti, tanto per le energie quanto per l'efficienza, con la soluzione standard di calibrazione certificata QCYB41; tutti i campioni sono stati contati per 15 ore (54.000 secondi) e la quantizzazione è stata limitata al ¹³⁷Cs.

Determinazione sperimentale con i due metodi su campioni di carne

Sono stati controllati 26 campioni di muscolo, 8 di bovino e 18 di cinghiale, di cui la maggior parte appositamente prelevati durante i normali campionamenti effettuati dall'ASL mentre gli altri erano giunti in laboratorio per altre indagini. Sono stati tutti testati con i metodi descritti, tanto in LSC che in spettrometria gamma; i risultati sono stati riportati nelle tabelle 9 e 10 e comparati nelle figure 3 e 4.

Il numero maggiore di esami su cinghiale è stato deciso a seguito della maggior frequenza, in questi, di presenza di Cesio ¹³⁷ rilevato già dai primi esami.

Risultati e discussione

Curva di compensazione del quenching e della radiazione Cerenkov per lo ⁹⁰Sr

Nella tabella 1 vengono riportati i valori di tSIE e la % di efficienza; nella figura 1 viene riportato l'andamento della curva di compensazione ricavata.

Osservando la curva di compensazione si può notare come questa sia, in prima approssimazione e per il tratto considerato, ascrivibile praticamente a una retta parallela all'asse x e cioè le variazioni di tSIE, che rappresentano le modificazioni dell'effetto di quench dovute alla variazione della matrice, non cambiano l'efficienza di lettura se non in misura minima (da 221,6 % a 235,2 % con una variazione del 5,8 %).

Pertanto l'incidenza delle ceneri sulla lettura diretta è praticamente una costante, cioè al suo variare non si notano particolari modificazioni di conteggio, perché l'effetto di quench è compensato dalla radiazione Cerenkov.

Infatti, lo stesso effetto matrice assommato all'ambiente acquoso determinano una densità ottica del mezzo in grado, in equilibrio con il quenching, di moltiplicare mediamente per 2,32 il numero di CPM di lettura dello ⁹⁰Sr (tabella 1).

Tale elevata efficienza è conseguenza sia dell'effetto Cerenkov, quasi costante in tutti vials della curva, sia dell'apporto di radioattività naturale presente nelle ceneri, diverso in ogni vial perché proporzionale alla quantità di matrice aggiunta, permettendo così alla curva di compensare, in funzione delle caratteristiche del muscolo scelto come standard, anche la radioattività endogena media della carne.

L'effetto descritto, anche se limitato ai soli radioisotopi beta-emittenti ad alta energia, è comunque molto interessante in questa applicazione, poiché produce un'alta sensibilità del metodo





argomenti

Numero 1 - Marzo 2013

nei confronti di questo radionuclide pur garantendo anche il rilevamento del ^{137}Cs e degli altri elementi gamma emittenti.

Curva di compensazione per il ^{137}Cs

Nella tabella 2 vengono riportati i valori di tSIE e la % di efficienza; nella figura 2 viene riportato l'andamento della curva di compensazione ricavata.

Anche in questo caso la curva è ascrivibile a una retta parallela all'asse x e quindi, come per lo ^{90}Sr , le variazioni di tSIE non comportano, se non in misura minima, modifiche dell'efficienza di lettura (variabilità da 109,3 % a 110,8 % con una variazione del 1,3 %).

Per contro, la radioattività naturale presente nelle ceneri si somma, in maniera scalare proporzionale alla quantità di matrice presente in ogni vial della curva, a quella aggiunta attraverso lo standard di ^{137}Cs , costante in tutti i vials, per cui si giustificano efficienze superiori al 100% e come la curva sia in grado di compensare, nei campioni letti su di essa, i radioisotopi naturali, ovviamente in funzione di quelli contenuti nel muscolo bovino preso come standard.

Precisione: riproducibilità intralaboratorio

La tabella 3 riporta le CPS/kg rilevate in sestuplo, sottratte del bianco, di ciascuna delle concentrazioni di radioattività totale, A, B e C, dei campioni con aggiunta di ^{90}Sr come descritto.

Da tali dati si ricavano la tavola riepilogativa e quella di calcolo dell'analisi della varianza dei campioni a radioattività totale A (senza aggiunta di ^{90}Sr standard) (tabella 4) da cui si calcolano lo scarto tipo di ripetibilità (sr) e riproducibilità (Sr) intralaboratorio

$$sr = 3,97$$

$$Sr = 4,31$$

che percentualmente rispetto ai valori medi di radioattività totale risulta:

$$\text{scarto tipo \% di ripetibilità} = 4,51 \%$$

$$\text{Scarto tipo \% di riproducibilità} = 4,90 \%$$

La tavola riepilogativa e di calcolo dell'Analisi della Varianza dei campioni a radioattività totale B (aggiunta di quantità bassa di ^{90}Sr standard) sono consultabili nella tabella 5.

Da cui:

$$sr = 4,30$$

$$Sr = 5,99$$

che percentualmente rispetto ai valori medi di radioattività totale risulta:

$$\text{scarto tipo \% di ripetibilità} = 4,12 \%$$

$$\text{scarto tipo \% di riproducibilità} = 5,73 \%$$

La tavola riepilogativa e di calcolo dell'analisi della varianza dei campioni a radioattività totale C (aggiunta di quantità elevata di ^{90}Sr standard) sono riportati nella tabella 6.

Dalle tabelle riportate si ricava:

$$sr = 15,97$$

$$Sr = 18,04$$

che percentualmente rispetto ai valori medi di radioattività totale risulta:

$$\text{scarto tipo \% di ripetibilità} = 2,92 \%$$

$$\text{scarto tipo \% di riproducibilità} = 3,30 \%$$

Come si può notare, gli scarti tipo % di ripetibilità e di riproducibilità sono compresi in valori che in un solo caso superano di poco il 5 % e che vanno diminuendo all'aumentare dei tassi di radioattività dimostrando una buona attendibilità del metodo.

MAR

La Deviazione Standard ottenuta dai 6 X 3 conteggi effettuati sui campioni di carne senza aggiunte (A) è stata:

$$S. D. = 3,77$$

da cui i valori della MAR, calcolati secondo la formula riportata, risulta essere:

$$\text{per lo } ^{90}\text{Sr}: \text{MAR} = 3,79 \text{ Bq/kg};$$

$$\text{per il } ^{137}\text{Cs}: \text{MAR} = 7,98 \text{ Bq/gg}$$

Tale valore rappresenta il livello di radioattività totale minima sicuramente identificabile in un campione di muscolo con il metodo descritto.

Esattezza/recupero ^{90}Sr

I risultati dei Bq/kg rilevati nei due campioni fortificati a livelli diversi e nel muscolo senza aggiunte sono riportati nella tabella 7.

Come si può notare il recupero presenta un errore inferiore al 10 % per radioattività da Stronzio 90 vicina ai limiti legali e inferiore al 3 % quando questa è particolarmente elevata.

Esattezza / Recupero ^{137}Cs

I risultati dei Bq/kg rilevati nei due campioni fortificati a livelli diversi e nel muscolo senza aggiunte sono riportati nella tabella 8.

Anche in questo caso il recupero presenta un errore inferiore al 10% per radioattività da Cesio 137 dell'ordine dei limiti legali e inferiore al 3% quando questa è particolarmente elevata.

Determinazione sperimentale con i due metodi su campioni di carne

I valori determinati in scintillazione liquida, espressi in CPS/kg, con i corrispondenti rilevati in spettrometria gamma, in Bq/kg, sono stati riportati, nel caso dei campioni bovini, nella tabella 9 mentre nella 10 quelli dei reperti provenienti dai cinghiali; in rosso sono stati evidenziati i valori che si discostano, verso l'alto, sia in LSC che in Spettrometria gamma.

La distribuzione degli stessi, ordinata in maniera crescente, è stata illustrata da 2 grafici a canne d'organo (figura 3 e 4) riportanti i valori di radioattività totale CPS/kg e i corrispondenti Bq/kg di ^{137}Cs determinati allo spettrometro.

Come si può notare in ambedue le matrici, a valori bassi di radioattività totale corrisponde assenza di Cesio mentre questo risulta presente quando in scintillazione liquida si alzano i conteggi; tra queste due zone si identifica un'area di indeterminazione, particolarmente evidente nei muscoli di cinghiale, in



cui a CPS/kg relativamente alte (superiori a 100) non corrisponde la presenza dell'isotopo gamma-emittente. Pertanto è possibile stabilire un cut-off, identificabile a un livello di CPS/kg più basso di quello riscontrabile nei campioni contenenti Cesio e che comprenda un intervallo di sicurezza statisticamente accettabile, determinabile nelle diverse aree, in modo da confermare in spettrometria solo i campioni risultati elevati in scintillazione liquida.

Inoltre, pur su un numero così limitato di campioni, appare evidente come negli ungulati selvatici il ^{137}Cs sia presente con maggior frequenza e raggiunga concentrazioni più che ragguardevoli.

Conclusioni

Come già evidenziato per il controllo di screening del latte [3], anche il metodo in LSC su muscolo previo incenerimento risulta idoneo, per sensibilità, ripetibilità e riproducibilità, all'utilizzo come esame preliminare su campioni di routine seguito da conferma spettrometrica, molto più lunga e indaginosa, solo sui campioni risultati sospetti.

La preparazione del campione tessutale risulta più complessa e lunga rispetto a quella proposta a suo tempo per il latte, ma, essendo eseguibile contemporaneamente su almeno 10 – 20 campioni e comportando tempi netti di impegno tecnico abbastanza contenuti, risulta abbastanza efficace da un punto di vista produttivo e con una potenzialità abbastanza simile all'altra.

Le prove effettuate su campioni di campo hanno dimostrato che anche in questo caso esiste una buona relazione tra i campioni con radioattività totale elevata, determinata per LSC, e quelli contenenti Cesio, considerato marker di contaminazione antropica; l'unico caso in cui la Scintillazione Liquida mostrava valori elevati senza la dimostrazione della presenza del gamma-emittente, spiegabile con la presenza di quantità più elevate di radioisotopi naturali o beta-emittenti, risulta ininfluente in un programma di routine poiché i valori rilevati avrebbero indotto la conferma spettrometrica con conseguente ulteriore studio di quel reperto.

Infine, la valutazione di muscoli di diversa specie animale non modifica la capacità di risposta del metodo e le prime determinazioni su muscoli bovini e di cinghiali hanno mostrato, su quest'ultima matrice, un'incidenza della presenza di Cesio superiore a quella riscontrata nei bovini tanto per frequenza che per quantità; tale osservazione, pur essendo abbastanza evidente, richiede ulteriori conferme poiché il numero di campioni analizzati, delle due specie, risulta insufficiente a fornire una prova definitiva.

L'aumento della selvaggina nei territori della nostra Regione e, in particolare, dei cinghiali spinge a un incremento dell'attività venatoria e, di conseguenza, a un maggiore consumo delle loro carni. La prevenzione, uno dei principi sui quali si deve basare la sanità pubblica, deve tenere conto anche di questa variabile fin'ora non puntualmente controllata; ovvero il livello di contaminazione da radionuclidi, Cesio 137 e Stronzio 90 delle carni di cinghiale. Questo può essere meglio definito attraverso un'esecuzione completa dei campionamenti della matrice carne e degli

esami radiometrici. Potremmo così certificare, anche sotto il profilo radiometrico, la salubrità delle carni di cinghiali provenienti dall'attività venatoria e di selezione e garantirne il loro consumo [11].

Quantificare il livello massimo di contaminazione sarà necessario per determinare l'edibilità delle carni e si potranno studiare e mettere in atto provvedimenti compensativi per le carcasse che saranno classificate come non idonee.

Attualmente il livello massimo di contaminazione da Cesio 137 è di 600 Bq/kg ma viene considerato tale durante il manifestarsi di un'emergenza [11].

Ringraziamenti

I nostri ringraziamenti vanno a tutto il personale tecnico e amministrativo della Sezione di Vercelli dell'IZS per il supporto e la collaborazione che hanno consentito l'approccio sperimentale di questo lavoro.

Bibliografia

1. ARPA - Rapporto anni 2006-2009. La radioattività ambientale in Piemonte.
2. Brini C, Sala L, Magnoni M, Belletto B, Bertino S, Ghigne M, Serena E, Tripodi R. "Monitoraggio della radioattività in matrici e indicatori ambientali, prelevati nel territorio biellese (2006-2008) – Atti del convegno "Controllo ambientale degli Agenti Fisici: nuove prospettive e problematiche emergenti" - Vercelli, 24 - 27 marzo 2009.
3. Cazzola P, Carrara A, Bossi D, Montafia M, Manzone P, Balocchi E. Screening in LSC per individuare i punti critici di ingresso dei radionuclidi da contaminazione, Argomenti S.I.Ve.M.P. 2011; 1: 74 – 80.
4. Chalupnik S, Schönhofer F, Noakes J. Advances in Liquid Scintillation Spectrometry", LSC, 2005: 13–17.
5. F. Trenti – "Il ruolo della Medicina Veterinaria di Sanità Pubblica nella prevenzione delle contaminazioni da radionuclidi degli alimenti di origine animale" - Quaderni di veterinaria preventiva, 01 marzo 2009.
6. Giovani C, Garavaglia M. Struttura Operativa Semplice Fisica Ambientale Laboratorio Unico Regionale ARPA Friuli Venezia Giulia Protocolli per l'uso di indicatori di radioattività ambientale: sviluppo e risultati Arpa.
7. Health effects of the Chernobyl accident: an overview - Fact sheet N° 303, April 2006.
8. Mauro F, Padovani L. "Effetti biologici e sanitari dell'incidente di Chernobyl nelle popolazioni dell'ex URSS" - Atti del convegno "Dieci anni da Chernobyl" ANPA. 1996.
9. Mietelski JW, Gaca P, Bielec J. Optimization of counting conditions for Cerenkov radiation by LSC, by the Arizona Board of Regents on behalf of the University of Arizona, 2006.
10. National Diagnostics Laboratory Staff – "Principles and Applications of Liquid Scintillation Counting" - National Diagnostics, USA. 2004: 1-800-526-3867.
11. Perrone V, Platini M. Normativa di riferimento e reti di sor-



argomenti

Numero 1 - Marzo 2013

- veglanza - Quaderni di Veterinaria preventiva. 2009;1.
 12. Radionuclidi nella terra, nell'erba e nel latte da alpi ticinesi durante il 2008- Laboratorio cantonale- Bellinzona.
 13. Rusconi R, Azzellino A, Bellinzona S, Forte M, Gallini R, Sgorbati G. Assessment of drinking water radioactivity content by liquid scintillation counting: set up of high sensitivity and emergency procedures - Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2004; 379(2): 247-253.
 14. Stepanova E, Karmaus W, Naboka M, Vdovenko V, Mousseau T, Shestopalov VM, Vena J, Svendsen E, Underhill D, Patsides H. Exposure from the Chernobyl accident had adverse effects on erythrocytes, leukocytes, and, platelets in children in the Narodichesky region, Ukraine: A 6-year follow-up study -

- Environmental Health. 2008; 7: 21.
 15. Tovedal A, Nygren U, Ramebäck H. "Determination of ⁹⁰Sr in preparedness - Optimization of total analysis time for multiple samples" - Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry. 2008; 276 (2): 357-362.
 16. Trenti, M. Calamosca, M. Cipone - "Fattori di trasferimento e fattori di conversione dieta-carne e dieta-latte del ¹³⁷Cs nel bovino: possibilità applicative e limiti" - Atti della Società Italiana di Buiatria - Vol. XXI, 565- 573, 1990.
 17. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation - "Source and effects of ionizing radiation" - Report to the General Assembly with Scientific Annexes - 2008, Vol. I.

La tua
FORMAZIONE
a DISTANZA?

www.pviformazione.it

SCONTO 20%
per iscritti SIMeVeP

EPIDEMIOLOGIA E DIAGNOSTICA
AZIENDALE NELLA SINDROME
RIPRODUTTIVA E RESPIRATORIA DEL SUINO

19 crediti ECM

€ 160,93 (IVA 21% inclusa)
 Abbonati periodici PVI: € 96,56 (IVA 21% inclusa)
 Abbonati SIMeVeP: € 128,74 (IVA 21% inclusa)

| | | |
|---|---|---|
| <p>Eziologia</p> <p>Stabilità nell'ambiente</p> <ul style="list-style-type: none"> - Epidemiologia territoriale e trasmissione - Trasmissione verticale - Trasmissione orizzontale - Trasmissione in allevamento - Trasmissione tra gli allevamenti - Biosicurezza e disinfezione - Patogenesi e permanenza aziendale <p>Immunologia</p> <ul style="list-style-type: none"> - Immunità umorale - Immunità cellula-mediata - Immunità materna | <p>Manifestazioni cliniche</p> <p>Lesioni anatomo-patologiche</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lesioni post natali - Lesioni fetali <p>Diagnostica</p> <ul style="list-style-type: none"> - Analisi dei dati aziendali - Campionamento e materiali diagnostici - Ricerca del virus - Ricerca degli anticorpi <p>Classificazione delle aziende</p> <p>Controllo e prevenzione</p> <ul style="list-style-type: none"> - Schema organizzativo di un monitoraggio diagnostico | <ul style="list-style-type: none"> - Condizionamento dei lotti di scrofette da rimonta per la protezione contro la variante aziendale di PRRS - Stabilizzazione della scrofaia per prevenire la trasmissione dalle scrofe ai suinetti - Controllo della diffusione del virus nello svezzamento e nel magronaggio <p>Eradicazione</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tutto pieno/tutto vuoto dei riproduttori - Analisi e rimozione - Ciclo chiuso dei riproduttori - Depopolamento parziale |
|---|---|---|

L'elenco completo dei percorsi disponibili è su www.pviformazione.it nella sezione corsi ECM

PER INFORMAZIONI: segreteria.ecm@pointvet.it - Tel. 02.60.85.23.25 - Fax 02.66.82.866

* ECM obbligatori per i Veterinari Iblei professionisti e di Medicina Pubblica, come stabilito dalla Commissione Nazionale per la Formazione Continua del Ministero della Salute.

