

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Cliniche Veterinarie

Ciclo XXV

Settore Concorsuale di afferenza: **05/E1**

Settore Scientifico disciplinare: **BIO/12**

**Parametri emato-biochimici e contaminanti
ambientali in Tartarughe e Chirotteri**

Candidato:

Dr.ssa Annunziata Cannavacciuolo

Coordinatore Dottorato

**Chiar.mo Prof. Paolo Famigli
Bergamini**

Relatore

Prof.ssa Gloria Isani

Correlatore

Dr. Giorgio Fedrizzi

Esame finale anno 2013

INDICE

SINTESI	5
CAPITOLO 1	6
EMATOLOGIA, BIOCHIMICA CLINICA, ELETTROFORESI PROTEICA, MACRO E MICROELEMENTI IN ESEMPLARI DI <i>TESTUDO SPP</i>	6
INTRODUZIONE	7
1. CENNI DI BIOLOGIA DELLE TARTARUGHE TERRESTRI MEDITERRANEE	9
2. CONSERVAZIONE E LEGISLAZIONE	12
3. DIAGNOSTICA DI LABORATORIO NEI RETTILI	13
3.1. CENNI DI EMATOLOGIA	13
3.2. CENNI DI BIOCHIMICA CLINICA.....	16
3.3. CENNI DI ELETTROFORESI	19
4. ELEMENTI ESSENZIALI E NON ESSENZIALI	22
5. MATERIALI E METODI	26
5.1. AREA DI STUDIO	26
5.2. ANIMALI	26
5.3. PRELIEVO DI SANGUE	27
5.4. EMATOLOGIA	28
5.5. BIOCHIMICA CLINICA.....	29
5.6. ELETTROFORESI DELLE PROTEINE PLASMATICHE	30
5.7. MACRO E MICROELEMENTI ESSENZIALI E NON ESSENZIALI.....	30
5.8. ANALISI STATISTICA	32
6. RISULTATI	34
6.1. DATI BIOMETRICI	34
6.2. EMATOLOGIA	35
6.3. BIOCHIMICA CLINICA.....	40
6.4. CONFRONTO TRA ANALIZZATORI AUTOMATIZZATI OLYMPUS AU400 E VETSCAN	45
6.5. ELETTROFORESI PROTEINE PLASMATICHE.....	52
6.6. MACRO E MICROELEMENTI NEL PLASMA DI <i>T. HERMANNI</i>	56
7. DISCUSSIONI	65
7.1. EMATOLOGIA	65
7.2. BIOCHIMICA CLINICA.....	66
7.3. ELETTROFORESI PROTEINE PLASMATICHE.....	68
7.4. MACRO E MICROELEMENTI ESSENZIALI E NON ESSENZIALI.....	70
8. CONCLUSIONI	73
9. BIBLIOGRAFIA	74
CAPITOLO 2	86
CONTAMINANTI IN ESEMPLARI URBANI DI CHIROTTERI DEL GENERE <i>TADARIDA TENIOTIS</i>	86
INTRODUZIONE	87
CENNI DI BIOLOGIA DI <i>TADARIDA TENIOTIS</i>	90
1. CONSERVAZIONE E LEGISLAZIONE	93
2. MATERIALI E METODI	94
2.1. AREA DI STUDIO E CAMPIONI BIOLOGICI.....	94
2.2. DETERMINAZIONE DEGLI ELEMENTI ESSENZIALI E NON ESSENZIALI.....	97
2.3. DETERMINAZIONE DELLE DIOSSINE E DEI PCB	98
2.4. DETERMINAZIONE DELLE SOSTANZE PERFLUORAALCHILICHE (PFOA/PFOs)	99
2.5. ANALISI STATISTICA	100
3. RISULTATI	101
3.1. DATI BIOMETRICI	101
3.2. ELEMENTI ESSENZIALI E NON ESSENZIALI IN <i>TADARIDA TENIOTIS</i>	103
3.3. DIOSSINE E PCB	110
3.4. PFAS	127
4. DISCUSSIONI	128

4.1.	MACRO E MICRO ELEMENTI	128
4.2.	DIOSSINE E PCB	135
4.3.	PFAS	137
5.	<i>CONCLUSIONI</i>	<i>138</i>
6.	<i>BIBLIOGRAFIA</i>	<i>139</i>

SINTESI

La biochimica clinica dei rettili e dei cheloni in particolare, non ha ottenuto al momento lo stesso livello di attenzione rivolto ai mammiferi. Con il presente lavoro viene proposta la valutazione dei più importanti parametri ematologici e biochimici in campioni di sangue di *Testudo hermanni* al fine di facilitare l'interpretazione dei dati di laboratorio e la diagnosi di eventuali patologie. A questo scopo, sono stati calcolati gli intervalli di riferimento di questi parametri in individui clinicamente sani e sono state analizzate le influenze di fattori ambientali e fisiologici. Sono state inoltre determinate le concentrazioni di alcuni importanti elementi chimici sia essenziali che non essenziali.

Su campioni di chiroterro del genere *Tadarida teniotis* sono state determinate le concentrazioni di PCB DL, PCB NDL, PCDD/F, PFAS e di elementi chimici essenziali e non, al fine di valutare: il possibile livello di contaminazione in relazione alla specie e all'habitat, la prevalenza e/o il rapporto delle classi di composti nel caso di una possibile contaminazione, la eventuale fonte di contaminazione. A quanto ci risulta, il nostro lavoro rappresenta il primo tentativo di analizzare su vasta scala le concentrazioni di questi inquinanti in una popolazione di pipistrelli residenti in un'area urbana. Tra i vari contaminanti esaminanti in questo studio, il Pb e le diossine possono costituire un serio problema per *Tadarida teniotis*.

CAPITOLO 1

**EMATOLOGIA, BIOCHIMICA CLINICA,
ELETTROFORESI PROTEICA, MACRO E
MICROELEMENTI IN ESEMPLARI DI
*TESTUDO SPP***

INTRODUZIONE

Testudo hermanni spp è attualmente considerata in via di estinzione a livello globale (European Reptile Specialist Group 1996, (Vilardell *et al* 2008). In particolare *T. hermanni* è in pericolo in Francia (Corbett 1989), Spagna (Pleguezuelos *et al.*, 2002) e in Italia (Mazzotti 2004). Dal 2002 è stata inserita sul Turtle Conservation " Extinction Row " e più recentemente è stata inserita nella Lista Rossa della IUNC come specie a rischio su scala globale (IUNC 2009).

Un crescente numero di rettili, soprattutto tartarughe, è tenuto come animali domestici esposti a cambiamenti ambientali ed alimentari che possono condizionarne il loro stato di salute e di benessere. Come proposto da un recente manuale Sivae (2012), “la scelta di un animale da compagnia non convenzionale non è sempre supportata da adeguata conoscenza delle necessità specie-specifiche”. Nella gestione di un chelone mantenuto in condizioni di cattività risulta utile poter valutare lo stato clinico attraverso valutazioni biochimiche ed ematologiche. Questa esigenza si rende necessaria soprattutto in animali che per loro natura e conformazione anatomica sono di difficile valutazione clinica. Molti fattori intrinseci, come il sesso, l'età e lo stato fisiologico, così come i fattori estrinseci, tra cui stagione, luogo e metodo di prelievo del campione ematico rendono necessaria una standardizzazione degli intervalli di riferimento in rettili come le tartarughe (Lopez-Olvera *et al.*, 2003) in quanto la sede del prelievo può modificare alcuni parametri emato-biochimici (Cuadrado , 2003).

Un altro aspetto che va considerato quando si riportano e si interpretano dati biochimici è che i risultati possono variare anche in base a fattori come il metodo di cattura e contenimento, il tipo di campione (siero/plasma/sangue intero), il sito di prelievo o il metodo analitico usato per eseguire le analisi (Bolten *et al*, 1992; 1992; Mylniczenko *et al.*, 2006). Risulta quindi necessario standardizzare le tecniche di raccolta del sangue. Quando infine i risultati sono ottenuti utilizzando differenti analizzatori è necessario valutare le metodologie usate ed è utile conoscere se ci sono variazioni consistenti tra esse.

Attualmente, studi sulla biochimica del sangue in *T. hermanni* sono limitati, anche se questa specie è spesso tenuto come animale domestico e mancano gli intervalli di riferimento per molti parametri ematologici e biochimici. Gli obiettivi di questo

lavoro sono quindi stati: 1) ottenere dati sui principali parametri emato-biochimici, inclusa l'elettroforesi delle proteine plasmatiche, in *T. hermanni spp*; 2) calcolare gli intervalli di riferimento per i parametri studiati; 3) analizzare le fonti di variabilità al fine di sviluppare linee guida per una corretta interpretazione campioni dei dati biochimico-clinici in esemplari clinicamente sani e in diverse condizioni ambientali (stagione) e fisiologiche (età, sesso); 4) confrontare due analizzatori automatizzati usati in laboratorio per la biochimica clinica (Olympus AU400 e VetScan)

Nella seconda parte della sperimentazione abbiamo rivolto la nostra attenzione allo studio dei più importanti elementi essenziali e non essenziali mediante spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS), una tecnica molto sensibile e in grado di determinare elementi presenti anche in concentrazioni inferiori a una parte per miliardo. Molti degli elementi chimici naturalmente presenti nell'ambiente sono essenziali per le funzioni fisiologiche sia negli esseri umani che nella fauna selvatica. Tuttavia, le attività antropiche, come ad esempio estrazione, fusione, e la combustione di combustibili fossili, svolgono un ruolo importante in tutto il mondo nella redistribuzione dei metalli in aria, suolo, acqua e cibo (Goyer e Clarkson, 2001). Per le loro caratteristiche biologiche e il basso tasso metabolico i rettili, come le tartarughe, possono essere in grado di metabolizzare meno o detossificare i contaminanti rispetto agli uccelli o i mammiferi e possono dunque essere utili come *biomonitors* per la contaminazione ambientale (Hall, 1980).

Abbiamo quindi utilizzato gli stessi campioni di plasma per determinare le concentrazioni di 13 elementi essenziali e 4 non essenziali. Gli obiettivi di questa seconda parte della sperimentazione sono stati: 1) definire gli intervalli di concentrazione dei macro e microelementi nel plasma di *T. hermanni*; 2) stabilire le relazioni tra i vari elementi e/o l'indipendenza delle variabili considerate; 3) infine abbiamo confrontato i dati dei vari elementi con le analisi ematologiche, biochimiche ed elettroforetiche

1. CENNI DI BIOLOGIA DELLE TARTARUGHE TERRESTRI MEDITERRANEE

L'ordine delle Testuggini o Cheloni è il più antico ordine di rettili, si pensa risalga a circa 200 milioni di anni fa con il ritrovamento di fossili appartenenti al pleistocene (Bonfiglio, 1990). Le tartarughe occupano habitat terrestri, semiacquatici, d'acqua dolce, salmastra e marini. Nonostante si contino attualmente poco più di 300 specie (www.itis.gov), la loro struttura anatomica è rimasta sostanzialmente invariata, e rappresenta uno dei maggiori successi dal punto di vista evolutivo (www.aae.it). Questo successo evolutivo non ha tuttavia risparmiato numerose specie dall'estinzione. Molte tartarughe (di terra soprattutto) sono attualmente a rischio di estinzione. Tra i tanti fattori che stanno seriamente minacciando la sopravvivenza delle popolazioni di tartarughe ricordiamo: la distruzione degli habitat, il prelievo indiscriminato degli esemplari presenti in natura per fini commerciali, i metodi di agricoltura non tradizionali e gli incendi che stanno seriamente minacciando la sopravvivenza delle popolazioni selvatiche.

Con il termine Cheloni si intendono sia tartarughe (acquatiche) che testuggini terrestri. La tassonomia dei Cheloni è in continua revisione anche grazie ai numerosi studi genetici condotti sulle varie popolazioni, che hanno contribuito a modificare i criteri di classificazione. Per questo è difficile fornire una classificazione univoca.

L'Italia può vantare una lunga tradizione nell'allevamento delle tartarughe terrestri; sono stati infatti ritrovati carapaci di tartarughe nelle tombe etrusche, e anche i Romani amavano possedere tartarughe in giardino.

Le più comuni testuggini mediterranee presenti in Italia sono: *Testudo hermanni*, *Testudo marginata* e *Testudo graeca* (Tabella 1.1 e Figura 1.1). La specie *Testudo hermanni hermanni* (*Thh*) è originaria del sud dell'Europa, ma in tutte le aree la distribuzione delle popolazioni è discontinua. L'habitat naturale è rappresentato dalle foreste di querce più in generale dalla macchia mediterranea. Il peso medio degli adulti è compreso tra 2 e 5 Kg nei soggetti adulti; le dimensioni variano tra 14 cm nei maschi e 16,5 nelle cm femmine. La maturità sessuale in cattività viene raggiunta dai maschi a una lunghezza di 8-9 cm e dalle femmine a una lunghezza

di 12-13 cm. Le tartarughe presentano una attività circadiana diurna, con termoregolazione per irradiazione, essendo cioè specie Eliotrope. La durata della vita varia da 60 a 100 anni. Il letargo, della durata di circa 20 settimane, avviene da ottobre/novembre a febbraio/marzo. Per prepararsi al letargo le tartarughe sospendono l'alimentazione alcune settimane prima. L'accoppiamento avviene tra aprile e maggio, con la schiusa dei piccoli ad agosto/settembre (Dauner e Vaini, 2002). Qualora la schiusa fosse posticipata a periodi freddi il piccolo può andare in letargo all'interno dell'uovo e schiudere la primavera successiva.

Figura 1.1 . Schema di classificazione dei cheloni

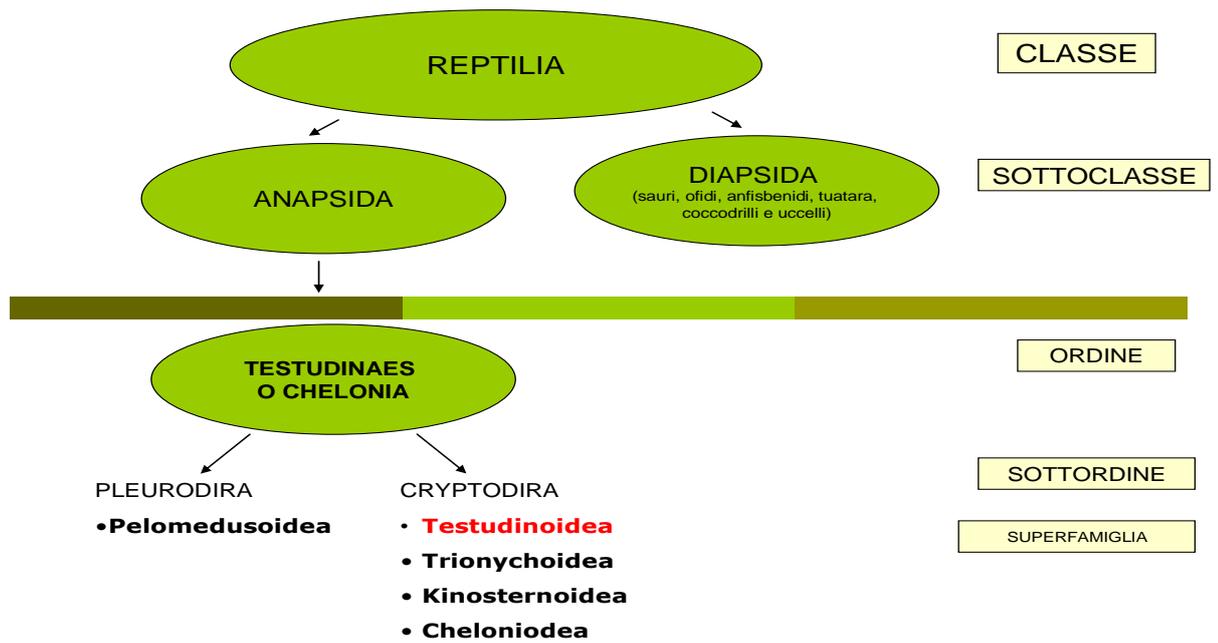


Tabella 1.1 Classificazione tassonomica di *Testudo* spp (www.itis.gov, modificato)

<i>Animalia</i> – Animal, animaux, animals	
Phylum	<i>Chordata</i> – cordés, cordado, cordate
Subphylum	<i>Vertebrata</i> – vertebrado, vertébrés, vertebrates
Class	<i>Reptilia</i> Laurenti, 1768 – répteis, reptiles, Reptiles
Order	<i>Testudines</i> Linnaeus, 1758 – terrapins, tortoises, tortues, Turtles
Family	<i>Testudinidae</i> Batsch, 1788 – Tortoises
Genus	<i>Testudo</i> Linnaeus, 1758 – Palearctic Tortoises
Species	<i>Testudo hermanni</i> GMELIN, 1789 <i>Testudo hermanni hermanni</i> GMELIN 1789 <i>Testudo hermanni boettgeri</i> MOJSISOVICS, 1889 <i>Testudo graeca</i> LINNAEUS, 1758 <i>Testudo horsfieldii</i> GRAY, 1844 <i>Testudo marginata</i> SCHOEPFF, 1792

2. CONSERVAZIONE E LEGISLAZIONE

La legge n. 201/2010 definisce come animale da compagnia “ogni animale tenuto, o destinato ad essere tenuto dall’uomo, in particolare presso il suo alloggio domestico, per suo diletto e compagnia”.

Attualmente a scopo di compagnia c’è un interesse crescente non solo per cani e gatti ma anche per specie “esotiche” o “non convenzionali”. La domesticazione di questi animali spesso non è accompagnata da corrette conoscenze specie-specifiche, e perciò per questi nuovi pet vengono proposte Linee guida per una corretta gestione (Sivae, 2012). Questi nuovi pet, tra cui ritroviamo le testuggini, sono soggetti inoltre a normative comunitarie ed internazionali che ne regolamentano il commercio. Tra queste si cita la Convenzione di Washington (CITES, Appendice II), a cui hanno aderito 175 Paesi e che è stata recepita in Europa con il Regolamento CEE n.338/97. L’Italia ha aderito nel 1992 (Legge 150/92 e successive modifiche) per porre fine al traffico di animali e preservare il patrimonio genetico delle diverse specie (elencate nei D.M 18/5/92 e D.M. 19/4/96) demandandone le competenze a più amministrazioni. Quello maggiormente coinvolto nella gestione della certificazione di possesso e deputato a svolgere controlli e sanzioni è il Servizio CITES del Corpo Forestale dello Stato. Le nascite devono essere registrate nel Registro di detenzione e denunciate al Corpo Forestale dello Stato. Nonostante questo abbia comportato difficoltà applicative nella detenzione di tartarughe, la loro diffusione in cattività non è risultata disincentivata. Nel momento in cui la l’animale selvatico diventa Pet, devono essere disponibili appropriate cure mediche.

3. DIAGNOSTICA DI LABORATORIO NEI RETTILI

I parametri che il medico veterinario deve valutare per una corretta gestione dell'animale sono principalmente: FISIOLÓGICI (corretta gestione), PATOLOGICI (valutazione clinica, anche attraverso esami di laboratori specie-specifici), COMPORTAMENTALI (rispetto delle caratteristiche etologiche), ETICI (salvaguardia del benessere animale).

I rettili hanno un volume di sangue totale più basso rispetto ai mammiferi di massa simile, pari al 5-8% del loro peso corporeo (Smits *et al*, 1985), e il 10% di questo volume può essere prelevato con sicurezza da animali sani (tra 0,5-0,8 ml in un animale di 100 gr). L'anticoagulante di scelta nei cheloni è il litio eparina in quanto l'EDTA può causare emolisi (Jacobson 1993, Muro *et al* 1998).

3.1. CENNI DI EMATOLOGIA

I rettili sono diventati sempre più popolari come animali domestici e si trovano inoltre spesso in ambienti quali zoo e parchi naturali. La valutazione ematologica dei rettili è uno strumento diagnostico indispensabile nella pratica veterinaria esotica. La diversità dei rettili, le loro caratteristiche fisiologiche peculiari e gli effetti di fattori intrinseci ed estrinseci richiedono una particolare conoscenza di questa specie per la corretta interpretazione dell'emocromo. Abbinando l'esame ematologico e biochimico con la valutazione clinica è possibile ottenere utili informazioni per la diagnosi e il monitoraggio della malattia, indirizzando il veterinario verso una terapia o verso ulteriori test diagnostici (Stacy, 2011). Avendo i rettili fisiologia e comportamento unici, molti stati di malattia cronica vengono evidenziati soltanto in fase avanzata. Inoltre, diverse condizioni fisiologiche e ambientali possono costantemente variare questi parametri, rendendo difficile stabilire il significato clinico dello scostamento dai valori di riferimento. Nell'interpretazione di un risultato bisognerebbe considerare l'animale in toto (eccetto casi come il rinvenimento di emoparassiti, etc), tenendo ben presente il principio: "trattare il paziente, non lo striscio ematico" (Pendl, 2004). L'emogramma può subire notevoli influenze in base a: età, sesso,

ambiente, temperatura, specie, stato di salute, stato riproduttivo, livelli di stress, sito di prelievo, colorazione dello striscio ematico, stagione, stato di ibernazione, condizioni di allevamento/detenzione, stato ormonale, errori tecnici (Campbell 2006, Dickinson *et al* 2002, Sykes 2008).

Bisogna tener presenti le interferenze tra ambiente e sistema immunitario dei rettili per poter impostare una terapia efficace (Campbell, 1996, Frye 1991), in quanto la risposta immunitaria potrebbe essere condizionata dalla stagione dell'anno. Da ciò si deduce come sia complesso definire intervalli di riferimento interni specie-specifici. Altri fattori esterni che influenzano la risposta infiammatoria nei rettili sono: malnutrizione, stress e terapie con corticosteroidi (Frye 1991). Anche l'emoglobina, il cui valore è strettamente legato all'ematocrito nelle tartarughe, può subire variazioni in funzione delle condizioni ambientali; basti pensare ad esempio alla disponibilità di acqua per le tartarughe terrestri (Rangel-Mendoza *et al.*, 2009, Christopher *et al.*, 1999).

La valutazione ematologica di routine nei rettili prevede i seguenti parametri (Tabella 3.1.1):

- ematocrito (PCV)
- la concentrazione di emoglobina (Hb)
- conteggio globuli rossi (RBC)
- indici eritrocitari
- conta totale dei globuli bianchi (WBC)
- conta differenziale dei leucociti
- valutazione della morfologia delle cellule del sangue

Uno degli aspetti più impegnativi della ematologia diagnostica nei rettili è la accuratezza della conta cellulare, a causa dello scarso numero di studi e della mancanza di valori di riferimento per determinate specie (Sykes 2008, Dickinson 2002, Nardini *et al*, 2013).

Poiché i rettili hanno globuli rossi nucleati, la conta dei leucociti deve essere fatta manualmente. Quest'ultima potrebbe risentire di più fonti di errore, compresa la miscelazione inadeguata, la linfo-diluizione oppure gli errori nel differenziare i leucociti dalle piastrine (che pure sono nucleate). Errati conteggi manuali possono

portare ad una errata interpretazione del leucogramma. Conteggi manuali sono quindi necessari ai fini della determinazione accurata della conta leucocitaria.

Tabella 3.1.1. Parametri ematologici - quadro generale (tratta da Pendl H. "Corso di ematologia di uccelli e rettili", Corso Scivac, Cremona 11-2004, p.3- Modificata)

TIPO CELLULARE	<u>PARAMETRI QUANTITATIVI</u>
<i>ERITROCITI</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Volume cellulare compresso (PCV) • Conta totale eritrociti (TRBC) • Contenuto di emoglobina (Hb) • Volumi corpuscolari medi (MCV, MCH, MCHC)
<i>LEUCOCITI</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Conta totale leucociti (TWBC) • Formula leucocitaria (conta differenziale)
<i>TROMBOCITI</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Conta Trombociti (TTC)
	<u>PARAMETRI QUALITATIVI</u>
	<ul style="list-style-type: none"> • Morfologia cellulare • Presenza di parassiti • Presenza di inclusioni • Alterazioni cromatiche

Tabella 3.1.2: Classificazione dei leucociti nelle tartarughe

Classificazione LEUCOCITI

GRANULOCITI	MONONUCLEATI
Eterofili	Linfociti
Basofili	Plasmacellule
Eosinofili	Monociti

Gli eritrociti maturi sono di forma ovale con il margine del nucleo irregolare (Frye 1991, Campbell 2006). Gli eritrociti vengono prodotti dal midollo osseo e da siti extramidollari come il fegato e la milza (Frye, 1991). I reticolociti possono essere osservati usando una nuova colorazione di blu di metilene e rappresentano il 2,5 % (o meno) del normale RBC (Campbell, 2006).

Gli eterofili sono i granulociti più comuni nel sangue dei rettili e sono analoghi ai neutrofili. Sono rotondi, possono avere pseudopodi e hanno un citoplasma chiaro

(Frye 1991). Il nucleo è rotondo, eccentrico e può essere bilobato (Strik 2007, Wilkinson 2004), i granuli sono eosinofili.

Gli eosinofili sono di forma e dimensione simile agli eterofili. Essi hanno un nucleo eccentrico, e i loro granuli eosinofili (di solito sferici, diversamente da quelli ovali o allungati degli eterofili) costituiscono una caratteristica morfologica distintiva (Frye 1991, Campbell 2006).

I basofili sono piccoli granulociti con granuli scuri basofili che oscurano il nucleo non lobato localizzato centralmente (Frye 1991, Campbell 2006).

I linfociti sono morfologicamente simili a quelli dei mammiferi (Campbell 2006, Saint Girons 1970). Non presentano granuli, possono essere piccoli o grandi, hanno un alto rapporto nucleo-citoplasma, con citoplasma basofilo. Queste cellule possono avere particelle fagocitate o eritrociti (Frye, 1991, Wilkinson, 2004)

Anche i monociti sono simili a quelli dei mammiferi. Sono spesso dei grandi leucociti, con margini cellulari e nucleari variabili. I monociti di molti rettili non squamati contengono granuli azzurrofilari, e perciò queste cellule possono essere riportate come “azzurrofilari” o monociti azzurrofilari, ma sono una variazione dei normali monociti piuttosto che un tipo cellulare distinto (Campbell 2006, Harr *et al* 2001). Invece, gli azzurrofilari dei serpenti sono tipi cellulari distinti, la cui funzione è simile a quella dei neutrofilari (Alleman *et al*, 1999). Gli azzurrofilari dei serpenti hanno granuli più fini e nuclei rotondi, se confrontati con i monociti azzurrofilari degli altri rettili che hanno granuli più ruvidi e nuclei lobulati (Alleman *et al* 1992).

I trombociti sono piccole cellule ovali basofile con un nucleo centrale basofilo e un citoplasma blu pallido o poco colorato (Frye 1991, Cambell 2006). È importante distinguere tra i piccoli linfociti e i trombociti quando si fa una conta differenziale. I piccoli linfociti sono più rotondi con citoplasma più scuro e la cromatina più addensata nei suoi nuclei rispetto ai trombociti (Strike *et al* 2007, Wilkinson 2004).

3.2. CENNI DI BIOCHIMICA CLINICA

I parametri biochimici più comunemente analizzati su siero/plasma includono: enzimi (AST, ALT, LDH, ALP, CK), metaboliti (acido urico, urea, creatinina, glucosio), elettroliti (calcio, fosforo, sodio, potassio, cloro), proteine totali.

- **AST** (aspartatoaminotransferasi) - È un enzima presente in molti tessuti e quindi non organo-specifico. La valutazione di questo parametro richiede la contemporanea valutazione di CK e LDH per la sua interpretazione. Negli animali questo enzima si trova in alte concentrazioni nella muscolatura (cardiaca e scheletrica), negli eritrociti, nel fegato e nel rene. In corso di setticemie o batteriemie, aumenti di AST possono essere associati a necrosi cellulare di diversi tessuti (Avanzi *et al.*, 2008). Nei cheloni questo enzima si trova soprattutto nel muscolo cardiaco e nel fegato, ma non nella muscolatura striata. Un suo aumento è spesso associato ad un aumento della CK (Innis *et al.*, 2009).
- **ALP** (fosfatasi alcalina) - Questo enzima ha un'ampia distribuzione tissutale e un suo aumento potrebbe essere associato ad una malattia epatobiliare o ad un aumento dell'attività osteoclastica. I valori sono infatti maggiori nei giovani rispetto agli adulti (Dickinson *et al.*, 2002). Nei cheloni la fonte principale sembra essere soprattutto il tessuto osseo.
- **ALT** (Alanina amino transferasi) - negli animali domestici è un enzima tipico del fegato. Sono presenti isoenzimi anche a livello di muscolo cardiaco e di rene, ma in quantità inferiori. Nei cheloni si trova maggiormente a livello renale e non è un parametro molto indicativo, a causa dei bassi valori in circolo (Knotkova *et al.*, 2000; Innis *et al.*, 2009).
- **CK** (creatinchinasi) – E' un enzima di derivazione soprattutto muscolare. È utile valutarlo in associazione a AST e LDH (AST e/o LDH elevati e CK normale probabile danno epatobiliare). Un suo aumento potrebbe essere causato da danni muscolari da prelievo. Nelle Tartarughe, i valori sono più alti soprattutto in estate (Zaias *et al.*, 2006).
- **LDH** (lattico deidrogenasi) - È un enzima presente in numerosi tessuti tra cui muscolo scheletrico e cardiaco, rene, ossa, pancreas, eritrociti e polmone. Il suo aumento può essere associato a danni dei diversi tessuti elencati, compresa la distruzione eritrocitaria e il danno tissutale da prelievo (Zaias *et al.*, 2006; Innis *et al.*, 2009).
- **BUN** (urea) - L'urea nei rettili ha un significato diverso rispetto ai mammiferi. Poiché i rettili sono prevalentemente uricotelici, il normale valore di azoto ureico nel plasma è basso. I valori potrebbero essere maggiori nelle

testuggini dei climi aridi alle quali potrebbe servire per aumentare l'osmolalità e ridurre la perdita idrica. La vescica, in cui avviene il riassorbimento di liquidi quando è necessario, è permeabile all'urea ma non all'acido urico. Un aumento dell'urea potrebbe essere causato da patologie renali, azotemia prerenale, diete contenenti alti livelli di urea o disidratazione. La BUN non è dunque utile per la valutazione della funzionalità renale.

- **ACIDO URICO** - È il principale prodotto catabolico di proteine e azoto non proteico nei cheloni. Nei rettili terrestri l'80-90 % dell'azoto viene escreto sotto forma di acido urico; nelle specie acquatiche è invece circa il 10% (soprattutto urea e ammoniaca). Un suo aumento è indice di danno renale grave. Fisiologicamente si trova aumentato in primavera al risveglio dal letargo e a metà estate. Un suo aumento potrebbe inoltre essere associato a disidratazione. Nei rettili carnivori i valori sono tendenzialmente maggiori rispetto a quelli erbivori, con un picco soprattutto dopo i pasti.

- **GLUCOSIO** - Questo parametro può subire variazioni in funzione di vari fattori quali la specie, lo stato di nutrizione e le condizioni ambientali. Nei cheloni si osserva una variazione stagionale con incremento in estate (Zaias *et al.*, 2006; Rangel-Mendoza *et al.*, 2009). Le cause più comuni di ipoglicemia sono invece la sindrome da anoressia post-letargo, la malnutrizione, la setticemia e le epatopatie gravi. Anche nei cheloni sembra che lo stress possa provocare un aumento della glicemia.

- **CREATININA** - È un metabolita che deriva dal catabolismo della creatina. Solitamente viene escreta a livello renale e non viene riassorbita. Un suo aumento potrebbe essere indice di grave disidratazione o malattie renali. Nei cheloni non ha grande significato diagnostico per valutare la funzionalità renale (Innis *et al.*, 2009).

- **ELETTROLITI** - Il sodio nei cheloni è inversamente proporzionale al grado di idratazione dell'animale (Christopher *et al.*, 1999). Un aumento del sodio potrebbe indicare disidratazione, insufficiente assunzione o eccessiva perdita d'acqua, alte temperature. Un iponatremia può indicare perdite gastrointestinali (es: diarree), renali o iatrogene (fluido terapia). Tra gli elettroliti, calcio e fosforo sono molto importanti. In estate, le femmine hanno valori di calcio e fosforo maggiori dei maschi, probabilmente a causa delle

modificazioni legate all'ovodeposizione (Eatwell, 2009; Deem *et al.*, 2009). I livelli di calcio dipendono dalla quantità di calcio nella dieta, dalla funzionalità renale ed endocrina (paratormone, calcitonina ed ormoni sessuali). Il calcio si trova in parte legato alla proteine trasportatrici (albumine), in parte non legato. La concentrazione di albumina influenza il calcio. Il calcio realmente attivo è quello ionico (non legato), che rappresenta il 40-50 % del calcio totale. Nella medicina dei rettili è molto importante valutare il rapporto calcio-fosforo, in quanto potrebbe avere un maggiore significato rispetto al valore assoluto dei due elementi. Il corretto rapporto ematico dovrebbe essere 2:1. Nel caso in cui vi sia un aumento del calcio e una diminuzione del fosforo si può ipotizzare un iperparatiroidismo primario. Una diminuzione del calcio ed un aumento del fosforo con rapporto Ca-P invertito può essere dovuta a patologia renale. Infine se si riscontra una diminuzione del calcio ed un aumento del fosforo senza inversione del rapporto Ca-P, può dipendere da iperparatiroidismo secondario renale o nutrizionale.

- **PROTEINE PLASMATICHE** - La valutazione delle proteine totali offre importanti informazioni su varie patologie e sullo stato di nutrizione degli animali. Esse rivestono inoltre un ruolo nel mantenimento della volemia. Le principali cause di ipoproteinemia possono essere: anoressia, malnutrizione, malassorbimento, nefropatie, perdite ematiche, epatopatie, enteropatie protido-disperdenti. L'ipoproteinemia si verifica invece in caso di disidratazione, durante la vitellogenesi (per aumento delle albumine) o in seguito a processi infiammatori cronici (aumento delle globuline).

3.3. CENNI DI ELETTROFORESI

Il metodo di analisi più comunemente impiegato per lo studio delle proteine plasmatiche è l'elettroforesi, una tecnica analitica che utilizza un campo elettrico per separare molecole cariche. La separazione può avvenire su vari supporti, quelli più comunemente utilizzati in ambito clinico sono l'acetato di cellulosa e l'agarosio.

Attraverso l'elettroforesi su gel di agarosio, è possibile suddividere le proteine in gruppi omogenei, che appariranno come bande dopo la colorazione, sfruttando

differenze di dimensione e polarità. Essendo le proteine sostanze anfotere la carica elettrica dipenderà dal pH della soluzione in cui si trovano, esiste un pH detto punto isoelettrico, caratteristico per ogni proteina, al quale ogni proteina ha carica netta nulla. L'elettroforesi viene quindi fatta correre a un pH basico per cui la maggioranza delle proteine presenta cariche negative e migra, dalla zona di deposizione, verso l'anodo.

La mobilità elettroforetica dipende dunque dal pH, dal tipo di supporto impiegato, dall'intensità del campo elettrico, dalla carica e dalle dimensioni delle proteine.

Nei mammiferi le proteine plasmatiche si suddividono generalmente in 6 zone che comprendono nell'ordine, passando dal polo positivo a quello negativo, albumina α_1 , α_2 , β_1 , β_2 e γ globuline (Figura 3.3.2 e 3.3.2). A parte la banda dell'albumina, alle altre bande corrispondono differenti proteine, ad esempio in zona α_2 , troviamo α_2 macroglobulina, alcune lipoproteine e l'aptoglobina (Figura 3.3.1).

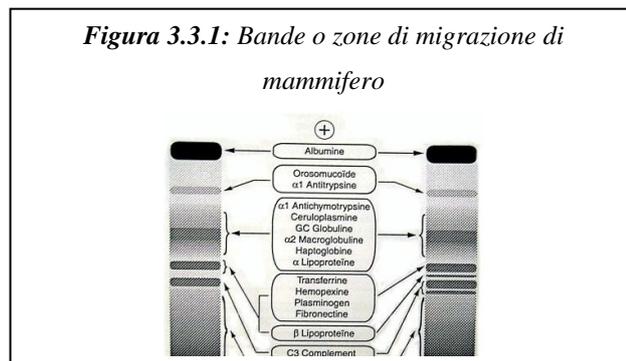
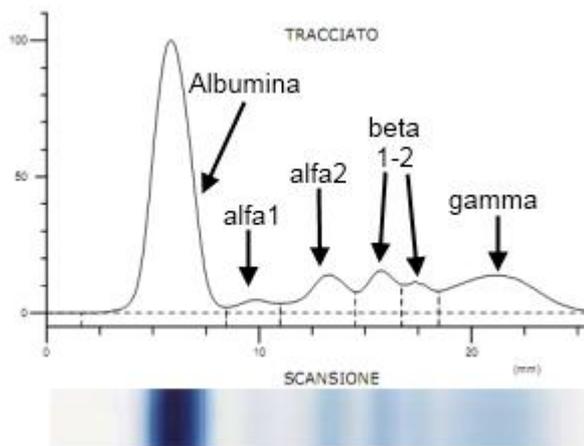


Figura 3.3.2: Tracciato elettroforetico di mammifero



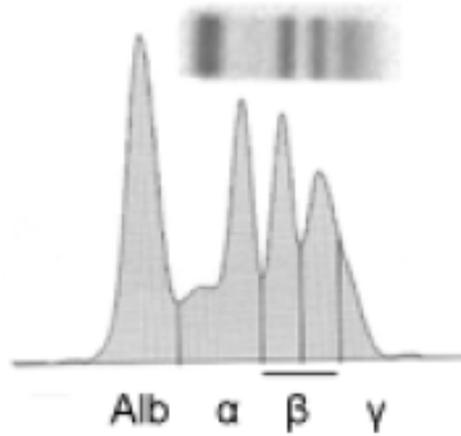


Figura 3.3.3: Tracciato elettroforetico di mammifero

I dati relativi all'elettroforesi delle proteine plasmatiche delle tartarughe sono molto scarsi. In Figura3.3.3 è riportato il profilo elettroforetico di *Trachemys scripta* (Gimenez *et al.*, 2010) dal quale risulta evidente la differenza con il profilo elettroforetico dei mammiferi.

4. ELEMENTI ESSENZIALI E NON ESSENZIALI

Circa 90 dei 118 elementi della tavola periodica sono metalli (www.IUPAC.It). I metalli sono tipicamente solidi, lucidi, malleabili, duttili e conduttori elettrici, manifestano inoltre la caratteristica di cedere elettroni e trasformarsi in ioni positivi (eccetto il Boro). I non metalli possono essere gassosi, liquidi o solidi non conduttori con la proprietà di acquisire elettroni e trasformarsi in ioni positivi, con caratteristiche dunque fisiche e chimiche opposte ai metalli. Ci sono infine anche gruppi intermedi di elementi conosciuti come metalloidi (As, B, Si, Ge, Sb, Te) che hanno caratteristiche fisiche e chimiche intermedie tra i metalli e i non metalli. Le caratteristiche metalliche di questi elementi diminuiscono e quelle non metalliche aumentano, con l'aumentare della valenza elettronica.

Per diverse ragioni, inclusa l'attività umana, alcuni elementi chimici si sono concentrati in certi ambienti, mentre in altri sono meno rappresentati (Merian, 1991). Questa differente distribuzione ha conseguenze importanti sui livelli di metalli presenti negli alimenti e negli organismi.

Per quanto riguarda gli elementi presenti nei sistemi biologici non esiste una classificazione univoca e soddisfacente. Un metodo utilizzato dai nutrizionisti li suddivide in macro e microelementi; un altro metodo, preferibile da un punto di vista biochimico, prevede invece la seguente suddivisione:

- 1) Elementi essenziali che formano soprattutto legami covalenti; si tratta di C,H,N,P e S e corrispondono quasi completamente ai macroelementi;
- 2) Elementi essenziali che generalmente non formano legami covalenti e che svolgono le loro funzioni spesso in forma ionica (Na, K, Cl, Mg, Ca, Fe, Z, Cu, Mn, Co, Mo, V, Se, B, I, Cr, F).
- 3) Elementi che non svolgono al momento funzioni note nei sistemi biologici e che quindi vengono studiati soprattutto per la loro tossicità (Cd, Pb, Hg, Sn, As e Al).

Gli elementi dei gruppi 2 e 3 sono quasi tutti metalli considerati microelementi

Le funzioni dei macro e micro elementi si possono riassumere in modo schematico in tre gruppi: 1) come costituenti di ossa e denti, 2) come sali solubili nei fluidi corporei e nelle cellule e 3) come componenti di proteine, tra le quali molti enzimi. I macroelementi giocano un ruolo maggiore nei primi due gruppi,

mentre i microelementi soprattutto nelle funzioni enzimatiche. Molte proteine che agiscono come catalizzatori biologici hanno bisogno della presenza di un gruppo prostetico non proteico, che contiene uno o più atomi di metallo, oppure solamente più semplicemente di uno ione. Ad esempio, il Fe si trova nel gruppo prostetico di enzimi che agiscono nei processi cellulari di ossidazione-riduzione, il Mo si trova come componente essenziale delle molibdopterina, cofattore di molti importanti enzimi, lo Zn, agisce da attivatore di più di 300 enzimi coinvolti in molteplici processi biologici. Gli elementi traccia sono anche presenti in altri importanti componenti funzionali come ormoni e vitamine. La produzione e l'immagazzinamento dell'ormone insulina nelle cellule beta del pancreas ad esempio coinvolge lo Zn, l'emoglobina e la mioglobina contengono Fe, la cobalamina o Vitamina B12 contiene Co. I "metalli traccia" quali Cu, Zn, Mn, Fe, e Co a basse concentrazioni sono dunque i essenziali per l'organismo, ma possono risultare notevolmente tossici a concentrazioni elevate. Per questo motivo le loro concentrazioni sono mantenute sotto stretto controllo da sofisticati meccanismi omeostatici che coinvolgono specifiche proteine di trasporto a livello delle membrane, ligandi che ne regolano il traffico intracellulare, proteine di deposito e sistemi di escrezione e trasporto a livello ematico (Andreani *et al.*, 2008; Vallee *et al.*, 1993; Prohaska e Gybina, 2004; Tapiero H e Tew KW, 2003).

Nessun ruolo biologico funzionale all'organismo è svolto invece da elementi definiti non essenziali o tossici e presenti nell'organismo in seguito a contaminazioni, quali ad esempio Pb, Cd, Hg che risultano dannosi per gli organismi anche a concentrazioni molto basse. Tra tutte le proteine coinvolte nel metabolismo dei metalli traccia, sia essenziali che tossici le metallotioneine (MT) giocano senza dubbio un ruolo molto importante. Le MT sono piccole proteine ubiquitarie ricche di residui di cisteina in grado di legare con alta affinità metalli traccia sia essenziali (Zn e Cu) che non essenziali (Cd e Hg). Presentano diverse isoforme nei tessuti e svolgono essenzialmente tre importanti funzioni: 1) deposito di Cu e Zn, 2) disintossicazione di Cd e Hg e 3) azione protettiva antiossidante (Palmiter, 1998; Carpenè *et al.*, 2007).

Le attività antropiche, quali estrazione, fusione, e la combustione di combustibili fossili hanno assunto un ruolo importante nella crescente distribuzione a livello mondiale di metalli in aria, suolo, acqua e cibo. Trenta metalli, entrambi essenziali e non essenziali, sono noti per avere effetti tossici (Goyer e Clarkson, 2001).

I fattori che influenzano l'accumulo dei metalli nei tessuti possono essere: l'ambiente e l'alimentazione, il clima e le stagioni, l'età e il sesso e la presenza e l'interazione tra diversi metalli. L'ambiente gioca un ruolo fondamentale nei fenomeni di accumulo di metalli pesanti nei vari organi e tessuti. La contaminazione del suolo ha importanza soprattutto nelle specie erbivore. Le piante possono assorbire dal terreno piccole quantità di metalli come piombo, mercurio e cadmio e bioaccumularli fino a raggiungere concentrazioni anche molto elevate (WHO 1992).

Va inoltre considerato il pH del suolo; ad una sua diminuzione in seguito a precipitazioni acide, la solubilità e la tendenza alla mobilizzazione di molti metalli aumenta (De Voogt *et al.*, 1980; Løbersli *et al.*, 1991) con conseguente incremento di assunzione di questi elementi chimici da parte delle piante. Un'altra fonte di contaminazione è rappresentata dall'aria in prossimità di industrie, miniere o altre fonti. Anche zone non industrializzate possono essere contaminate da elementi quali cadmio e piombo in quanto in grado di essere trasportati dall'aria, oppure attraverso corsi d'acqua (Peterson e Alloway, 1979; Frosly *et al.*, 1984; Frank, 1986; Munk *et al.*, 2002).

Il clima e la stagione possono influire sulle concentrazioni dei metalli nei tessuti; come è stato osservato da Pokorny e Ribarič-Lasnik (2002) in uno studio sui caprioli, i livelli di Pb e Hg erano maggiori a fine estate-inizio autunno rispetto a quelli riscontrabili in inverno. Queste variazioni non sono legate alla stagione di per se quanto alla variazione quali-quantitativa dei vegetali, con un aumento di alcuni taxa vegetali, come i funghi, che potrebbero rappresentare una via importante per l'assunzione di metalli pesanti nell'organismo dei mammiferi.

Alcuni metalli come il Cd subiscono nei tessuti un costante incremento con l'età, non osservato per il Pb (Wolkers *et al.*, 1994); altri come Zn, Cu e Fe possono non subire evidenti aumenti in funzione dell'età ma risentire dell'effetto accumulo target negli organi bersaglio (Hyvarinen e Nygren, 1993).

Infine un altro importante aspetto che influenza l'assorbimento è rappresentato dalle interazioni tra metalli: ad esempio l'influenza dello Zn sull'assorbimento del Cd (Venugopal e Luckey, 1978). Allo stesso modo il Cd e Pb, possono interferire nell'assorbimento e nel metabolismo di Zn, Cu, Ca e Fe, (Lee e Jones, 1976; Doyle e Spaulding, 1978; Webb, 1979; Friberg *et al.*, 1986; Tsuchiya, 1986; Huebers *et al.*, 1987; Kunifuji *et al.*, 1987).

Molta enfasi è stata posta sulla ricerca di specie adatte a fungere da bioindicatori per la contaminazione ambientale. L'importante ruolo dei rettili come bioindicatori potrebbe ricondursi a caratteristiche quali: vita sedentaria, ritardata maturità sessuale, ampia distribuzione geografica, vasta gamma di strategie alimentari, longevità (Gibbons, 1990a) suggerendone l'impiego in studi tossicologici (Hopkins, 2000). Gli animali a vita lunga con ritardata maturità sessuale possono essere esposti all'ambiente per lunghi periodi di tempo, Inoltre, la maggior parte dei rettili occupa un livello trofico elevato, aumentando così la probabilità di esposizione a contaminanti inferiore. Infine, nelle tartarughe così come in molti altri rettili il sesso è condizionato dalla temperatura (TSD), fenomeno questo utile per valutare variazioni di temperatura globali derivanti da fenomeni naturali o da inquinamento ambientale (Ferguson e Joanen, 1982).

5. MATERIALI E METODI

5.1. AREA DI STUDIO

Sono state identificate 5 differenti zone di campionamento distribuite sul territorio della provincia di Bologna. I siti sono localizzati in località: Medicina, Castel San Pietro Terme, Ozzano, Bologna, Monte Pastore. Tutti i siti sono situati in prossimità dei vari centri abitati, con disponibilità di aree recintate per il ricovero degli esemplari di *Testudo*.

5.2. ANIMALI

Sono state impiegate 34 tartarughe sane del genere *Testudo hermanni spp* mantenute in condizioni di libertà o semi libertà in ambiente controllato. L'alimentazione era costituita da piante autoctone spontanee e in parte anche da ortaggi destinati al consumo umano.

Per gli animali, tutti adulti, sono state rispettate le condizioni fisiologiche ed alimentari della specie.

Il sesso delle tartarughe è stato determinato mediante morfologia della coda e del piastrone (Willemsen *et al* 2003). In questo studio sono state incluse 20 femmine e 14 maschi, di peso compreso fra 466 e 2192 grammi.

Durante le visite cliniche di routine eseguite all'inizio dell'estate e all'inizio dell'autunno le tartarughe sono state esaminate al fine di escludere malattie manifeste e traumi. Durante le visite sono stati ispezionati: occhi, narici, zona timpanica, cavità orale, cloaca, piastrone e carapace. È stata eseguita la palpazione della cavità celomatica attraverso la regione pre-femorale. Gli animali con segni clinici di debilitazione o di malattie o traumi non sono stati inclusi nel nostro studio.

Dopo l'esame ispettivo, sono stati prelevati campioni di sangue da esemplari di peso superiore a 0,5 kg e con un'età stimata 6-35 anni, è stata misurata la lunghezza del carapace (CCL). Per ogni animale è stata compilata una scheda anamnestica recante i seguenti dati: specie, età, sesso, peso, sede di prelievo, lunghezza della coda, del piastrone e del carapace, larghezza del piastrone e del carapace, stato di nutrizione, ambiente, alimentazione; sono state annotate anche

informazioni riguardo l'ibernazione e la temperatura ambientale, e note anamnestiche (malattie pregresse).

Tutte le procedure sperimentali sono state approvate dal Comitato Etico e Scientifico dell'Università di Bologna e sono state effettuate in conformità con la legislazione europea in materia di protezione dei animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri.

Tre esemplari, oltre ai 34 sani, hanno mostrato evidenza clinica di patologia e vengono riportati separatamente come esempio di potenziale uso dei parametri biochimico-clinici e di elettroforesi delle proteine.

Caso 1: Una femmina di 34 anni, che durante la visita clinica post-ibernazione presentava tumore in regione cervicale.

Caso B: Una femmina di 30 anni, durante la visita clinica post-ibernazione presentava anoressia e astenia e scarso trofismo muscolare.

Caso C: Un maschio di 7 anni, durante la visita clinica post-ibernazione presentava frattura dell'omero.

5.3. PRELIEVO DI SANGUE

Il prelievo ematico è stato effettuato attraverso la contenzione manuale degli animali, senza sedazione. I campioni di sangue per le analisi biochimiche ed ematologiche sono stati raccolti usando aghi di calibro 23 (G) dalla vena giugulare (n = 11) e/o dalla dorsale cervicale sinusale (n=23) evitando accuratamente la linfo-diluizione del sangue (figure 5.3.1 e 5.3.2). È stato prelevato un volume di sangue massimo dello 0,5% del peso corporeo.

Sono stati eseguiti tre differenti strisci ematici da ogni esemplare, prelevando una goccia di sangue direttamente dalla siringa ed immediatamente dopo il prelievo, prima cioè che il campione venisse in contatto con l'anticoagulante. I tre strisci ematici sono stati effettuati per valutare tre differenti colorazioni, una colorazione Diff-Quik, e due colorazioni di tipo Romanowsky, May Grünwald-Giemsa e Wright.

I campioni di sangue destinati alle analisi biochimiche ed elettroforetiche, sono stati posti in provette contenenti litio eparina come anticoagulante e conservati in frigo per un tempo massimo di 6 ore.

Un'ulteriore aliquota di plasma è stata impiegata per la determinazione di macro e micro elementi essenziali e non essenziali mediante ICP-MS.

Sono state inoltre analizzati 23 campioni di plasma di *T. hermanni boettgeri* avuti per gentile concessione del Dott. Giordano Nardini e precedentemente sottoposti ad analisi dei parametri biochimici attraverso l'impiego della metodica VetScan al fine di eseguire un confronto tra metodiche (metodica automatizzata Olympus vs metodica VetScan). Sono stati prelevati campioni di sangue da vena giugulare di 8 femmine e 15 maschi adulti, di peso compreso tra 740 e 2300 grammi. I campioni sono stati sottoposti ad analisi mediante VetScan immediatamente dopo il prelievo, il plasma è stato invece analizzato mediante analizzatore automatico Olympus 12 h dopo il prelievo.

Figura 5.3.1: prelievo da vene giugulare



Figura 5.3.2. Prelievo da seno cervicale dorsale



5.4. EMATOLOGIA

I parametri ematologici analizzati sono stati ematocrito ed emoglobina. Le analisi ematologiche sono state effettuate in doppio e i valori sono rappresentati dalla media di entrambi. L'ematocrito e la concentrazione di emoglobina sono state determinate entro 6 ore post-raccolta rispettivamente con una centrifuga microematocrito (ALC International) a 14.000 g per 5 minuti e con un contatore di cellule automatizzato (Cell Abbott Dyn 3500) secondo il metodo ciano-metaemoglobina sul lisato.

I tre strisci ematici sono stati fatti asciugare all'aria e sono stati colorati con tre diversi kit commerciali: una colorazione Diff-Quik, e due colorazioni di tipo Romanowsky, May Grünwald-Giemsa e Wright.

Sono stati valutati i globuli bianchi (WBC), classificati come eterofili, linfociti, eosinofili e basofili. È stata infine eseguita una valutazione morfologica dei globuli rossi (RBC) e delle piastrine.

5.5. BIOCHIMICA CLINICA

Le analisi biochimiche sono state eseguite sul plasma. Quest'ultimo è stato separato dopo centrifugazione dei campioni a 1200 g per 10 minuti e il risultante sopranatante è stato conservato a 4° C per 24 ore per la successiva analisi.

È stato scelto un profilo biochimico standard comprendente: **glucosio, urea, creatinina, acido urico, proteine totali, albumina**, aspartato aminotransferasi (**AST**) (CE 2.6.1.1), alanina aminotransferasi (**ALT**) (CE 2.6.1.2), fosfatasi alcalina (**ALP**) (EC 3.1.3.1), creatininchinasi (**CK**) (EC 2.7.3.2), latticodeidrogenasi (**LDH**) (EC 1.1.1.27), **Ca, P, Na, K e Cl**; i parametri selezionati sono stati determinati utilizzando kit disponibili commercialmente (Olympus Reagent Systems, life Olympus e Material Science Europe GmbH, Hamburg, Germania) con un analizzatore automatico per la biochimica clinica (Olympus AU400, Mishima Olympus Co. Ltd, Shizuoka, Giappone).

23 campioni di sangue di *Testudo hermanni boettgeri* sono stati utilizzati per effettuare il confronto tra due analizzatori automatizzati (Olympus AU400 e VetScan). Sono stati determinati i seguenti parametri: **glucosio, urea, creatinina, acido urico, proteine totali, albumina, globulina** (valore calcolato), aspartato aminotransferasi (**AST**), fosfatasi alcalina (**ALP**), creatina chinasi (**CK**), **Ca, P, Na, K**. È stato impiegato il plasma, ottenuto come descritto in precedenza, per la determinazione mediante analizzatore Olympus, mentre con VetScan il sangue intero è stato analizzato mediante il rotore "Profilo rettili/volatili" VetScan® Plus. VetScan è un analizzatore portatile che impiega 100 µl di sangue deposto in un rotore e processato in aliquote multiple; le analisi biochimiche del campione sono completate in 15 minuti. L'analizzatore usa metodiche spettrofotometriche per e calcolare la concentrazione degli analiti.

5.6. ELETTROFORESI DELLE PROTEINE PLASMATICHE

Su un'aliquota di plasma (10 μ l) di 24 campioni di *T. hermanni*, è stata eseguito il frazionamento della componente proteica su gel di agarosio 0,8% (HydraGel, Sebia). L'elettroforesi è stata eseguita a voltaggio costante (255 V) su un sistema automatizzato (Hydrasis, Sebia). I gel sono stati colorati con Amido Black. I gel colorati sono state scannerizzati con uno scanner (EPSON PERFECTION V700 PHOTO) ed i dati sono stati elaborati digitalmente. Attraverso il software PHORESIS 6.1.2 è stato possibile ottenere il profilo densitometrico e la valutazione quantitativa delle diverse frazioni proteiche.

Insieme ai campioni di plasma di *Testudo hermanni spp* sono stati fatti correre campioni di siero di cane, gatto, cavallo, bovino ed orata. Per l'identificazione delle frazioni proteiche, in assenza di dati di riferimento, è stato considerato il punto centrale della ferogramma, che è generalmente tra i picchi α_2 e β_1 . I subpicchi α e β sono stati considerati insieme nelle determinazione delle concentrazione e nelle percentuali delle varie frazioni proteiche.

In aggiunta anche 12 campioni di plasma di *Testudo hermanni boettgeri* sono stati sottoposti a frazionamento della componente proteica mediante elettroforesi su gel di agarosio. Seguendo le stesse procedure indicate nel paragrafo precedente

5.7. MACRO E MICROELEMENTI ESSENZIALI E NON ESSENZIALI

La determinazione dei seguenti elementi chimici nel plasma di *Testudo* (Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Zn, Cu, Se, Sr, Ni, Ba, Cr, Pb, As, Hg, Cd) è stata eseguita mediante spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP/MS). I campioni sono stati sottoposti a mineralizzazione per via umida con acido nitrico concentrato, i mineralizzati sono stati poi portati ad opportuno volume con soluzione acida ed analizzati mediante ICP-MS.

Il plasma è stato posto in tubi ("Digitubes") addizionati di HNO₃ concentrato. In seguito sono stati sottoposti a processo digestivo con applicazione di calore umido mediante Digestore aperto tipo Digi-Prep (SCP-Science) tarato a temperatura di

75 °C. Questo procedimento prevede una mineralizzazione della matrice organica a 75°C per 12 ore.

Al termine del processo digestivo i campioni sono stati portati ad opportuno volume per aggiunta di acqua deionizzata. Le soluzioni ottenute sono state diluite con una soluzione acquosa di HNO₃ al 2% con 0,5% di HCl.

Per ogni serie di analisi è stato mineralizzato un bianco trattato come i campioni e un materiale di riferimento certificato o a titolo noto. L'esito di tale lettura doveva essere pari al valore nominale ± l'incertezza di misura definita per il metodo stesso.

Per la determinazione analitica è stata utilizzata la tecnica della spettrometria di massa con sorgente al plasma (ICP-MS). È stato impiegato uno spettrometro di massa con sorgente al plasma (ICP-MS) modello 7700 a, Agilent HP interfacciato ad un autocampionatore, modello ASX-500, CETAC. Attraverso l'impiego di questa tecnica è possibile determinare la composizione elementare inorganica delle matrici biologiche presente in matrici differenti. La concentrazione dei vari elementi è stata determinata per interpolazione con la curva di calibrazione. La calibrazione dello strumento è stata effettuata mediante la lettura di standard esterni. Il calcolo quantitativo della concentrazione C (espressa in mg/kg) si ottiene dalla seguente formula:

$$C(\text{mg/kg}) = \frac{[\text{metallo (ng/ml)}] \times V1 \times V2}{\text{Peso} \times 1000}$$

Dove:

V1= fattore relativo alla diluizione operata

V2= eventuale successiva diluizione

La quantificazione è stata effettuata sull'isotopo più abbondante. La specificità caratteristica della spettrometria di massa e la possibilità di effettuare automaticamente l'analisi in presenza ed in assenza di gas ausiliario (elio) ha permesso la completa eliminazione di eventuali interferenti derivanti dalle matrici e dalla ionizzazione del plasma. Le concentrazioni dei vari elementi sono espresse in mg/l per Na, K, Ca, Mg e µg/l per gli altri. Il limite di quantificazione (LOQ) per ciascun elemento era: 2 µg/l (Pb, Cd), 5 µg/l (Fe, Zn, Cu, Se, Sr, Ni, Ba, Cr, As, Hg,) e 1 mg/l (Na, K, Ca, Mg). È stato effettuato un confronto tra metodiche

(ICP-MS/tecnica potenziometrica con analizzatore automatico Olympus AU400) nella determinazione del Na, del K e del Ca.

5.8. ANALISI STATISTICA

Sono stati analizzati 34 campioni per i parametri biochimici, mentre per i parametri ematologici sono stati analizzati 14 campioni, l'elettroforesi delle proteine è stata effettuata su 24 campioni per motivi tecnici (es. volume di sangue insufficiente).

Intervalli di riferimento - La normalità delle variabili è stata valutata con il Test D'Agostino-Pearson. Per valori di $p > 0,005$ è stato ritenuto che i dati avessero una distribuzione normale. Gli intervalli di riferimento sono stati calcolati come $\text{media} \pm 2 \text{ SE}$ per le variabili che hanno presentato una distribuzione normale e come range (minimo-massimo) per le variabili che hanno presentato una distribuzione non normale che sono stati visualizzati graficamente con un istogramma di frequenza. Gli istogrammi sono stati valutati visivamente e sono state eseguite trasformazioni di potenza.

Analisi dei dati - Le variabili normalmente distribuite sono state analizzate mediante ANOVA a due vie per determinare l'influenza dei fattori qualitativi sulle variabili stesse, vale a dire il sesso per i parametri ematologici e sesso e stagione per i valori biochimici. Prima di eseguire il test ANOVA è stato eseguito il test di uguaglianza della varianza di Levene al fine di valutare l'omogeneità dei gruppi analizzati. L'ipotesi per l'ANOVA è stata respinta se è stata evidenziata un'ipotesi nulla di Levene. Le variabili non normalmente distribuite sono state sottoposte a test non parametrico di Mann-Whitney. L'ipotesi nulla è che non erano presenti differenze tra i sessi o le stagioni. È stata usata analisi di regressione per valutare le correlazioni tra parametri biochimici rispetto all'età / peso.

È stato eseguito il test Bland-Altman per valutare la concordanza tra il verde bromo cresolo metodo colorimetrico e l'elettroforesi delle proteine per la quantificazione dell'albumina. È stata eseguita una analisi di regressione lineare per confrontare i valori con le variabili. Abbiamo infine eseguito l'analisi delle componenti principali (SPSS), per tutti gli elementi analizzati eccetto Cd, Hg, As. È stato calcolato il coefficiente di correlazione di Pearson per valutare la relazione (p-values) tra i vari elementi analizzati nei differenti siti di

campionamento. Le analisi statistiche sono state effettuate mediante il programma statistico MedCalc® versione 12.2.1 (*MedCalc Software, Mariakerke, Belgio*). È stato calcolato il coefficiente di correlazione di Pearson per valutare la relazione (p-values) tra i vari elementi analizzati nei differenti siti di campionamento.

6. RISULTATI

6.1. DATI BIOMETRICI

Sono state incluse in questo studio 34 tartarughe sane, tra queste, 14 erano maschi e 20 femmine. I parametri biometrici (età, massa corporea e CCL) sono riportati in tabella 6.1.1, sia per il totale dei campioni, sia suddivisi sulla base del sesso e della stagione. L'età degli animali analizzati variava da 6 a 35 anni, la massa corporea variava da 466 a 2192 g e il CCL da 18 a 28 cm. L'età e il CCL presentano distribuzioni normali, la massa corporea e CCL erano maggiori nei maschi che nelle femmine, ma le differenze non erano significative. Una significativa correlazione positiva ($p < 0,01$) è stata trovata tra l'età e massa corporea (grafico 6.1.1).

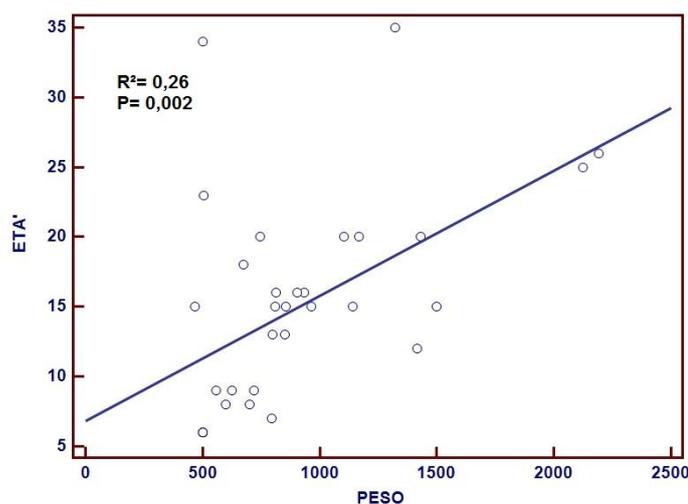
Tabella 6.1.1 Età (anni), massa corporea (g) e la lunghezza del carapace ricurvo (CCL) (cm) basato sul sesso e stagione

	Parametri	Range (min-max)	Media \pm SE	Mediana
Totale	Età ($n=34$) ^a	6-35	15 \pm 1	15
	Massa corporea ($n=34$) ^b	466-2192	886 \pm 69	800
	CCL ($n=24$) ^a	18.0-28.0	22.0 \pm 1.0	22.0
Maschi	Età ($n=14$)	6-25	16 \pm 2	15
	Massa corporea ($n=14$)	466-2122	907 \pm 131	774
	CCL ($n=10$)	18.0-28.0	22 \pm 0.5	21.0
Femmine	Età ($n=20$)	6-35	14 \pm 2	15
	Massa corporea ($n=20$)	500-2192	876 \pm 92	815
	CCL ($n=14$)	18.0-28.0	21.9 \pm 0.4	22.6
Autumn	Età ($n=20$)	9-35	18 \pm 1	16
	Massa corporea ($n=20$)	466-2192	970 \pm 108	834
	CCL ($n=20$)	18.0-28.0	22 \pm 1.0	22.0
Estate	Età ($n=14$)	6-20	10 \pm 2	8
	Massa corporea ($n=14$)	500-1500	774 \pm 111	650
	CCL ($n=14$)	21.0-25.0	23.0 \pm 1.0	22.0

^a Parametri a distribuzione normale ($P > 0.05$, D'Agostino-Pearson test)

^b Parametri a distribuzione non normale ($P < 0.05$, D'Agostino-Pearson test)

Figura 6.1.1. Correlazione fra massa corporea ed età degli individui



6.2. EMATOLOGIA

Il confronto tra le differenti colorazioni con cui è stato eseguito lo striscio ematico ha rilevato che con la colorazione Diff-Quick non vengono ben differenziate le componenti della linea bianca (WBC), in particolare gli esterofili; che presentano un citoplasma fumoso con spazi non colorati (Figura 6.2.2), mentre gli eritrociti si presentano con nucleo viola scuro e citoplasma blu. Al contrario, con la colorazione May Grünwald-Giemsa e quella di Wright tutte le cellule del sangue sono più facilmente identificate ed è facile valutarne la morfologia (Figura 6.2.4).

Gli eritrociti maturi si presentano di forma ovale con poli arrotondati e un citoplasma omogeneo blu-rosa (Figura 6.2.3).

I trombociti sono più piccoli (Figura 6.2.5 t), e di forma ovale con citoplasma trasparente e nucleo di colore blu. Talvolta è possibile trovarli aggregati. Il basso numero di piastrine sembra essere dovuto alla tendenza di queste cellule a raggrupparsi (Figura 6.2.4 b) ed alla loro fragilità.

I linfociti sono le cellule della seria bianca (WBC) più diffusi, sono di forma sferica, più o meno piccoli. Presentano un citoplasma omogeneo basofilo con nucleo compatto contenente cromatina aggregata, sono di colore più chiaro rispetto delle piastrine (Figura 6.2.5 l). I linfociti di grandi dimensioni sono stati occasionalmente rilevati con citoplasma fortemente basofilo e presenza di vacuoli che rendono il citoplasma disomogeneo.

Gli eterofili sono tra i più grandi leucociti con citoplasma contenente un numero variabile di granuli che con la colorazione May- Grünwald-Giemsa o di Wright appaiono di colore arancione. Il nucleo è ovale o allungato caratterizzato da un agglomerato di cromatina.

Gli eosinofili erano simili per dimensioni agli eterofili ma si differenziano per il nucleo eccentrico di colore blu-viola e il citoplasma ricco di granuli arancione-rosso.

Infine i basofili ne sono stati osservati pochi e sono stati identificati dalla presenza di granuli rotondi con colore variabile dal viola scuro al blu. Non sono stati osservati monociti.

I dati sulle concentrazioni di emoglobina ed ematocrito sono riportati in tabella 6.2.1 A causa della scarsità di dati, non sono stati calcolati gli intervalli di riferimento. Entrambi i parametri presentato distribuzioni normale e sono significativamente più elevati nei maschi rispetto alle femmine (Figura 6.2.1).

Figura 6.2.1. confronto fra i valori dell'ematocrito nei maschi (n=6) e nelle femmine (n=8)

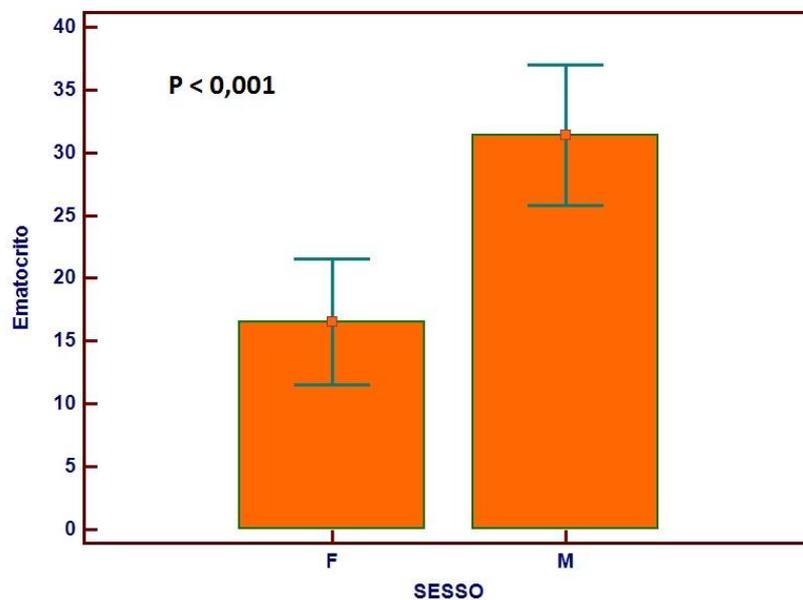


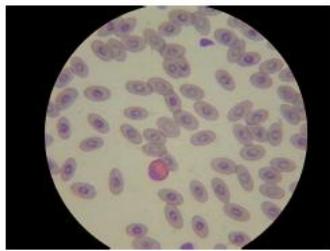
Tabella 6.2.1. Parametri ematologici in *T. hermanni*.

Analita		N	Media	Mediana	SE	Range (min-max)
Emoglobina ^a (g dL ⁻¹)	Totale	9	8.8	8.4	0.6	4.1-13.5
	Maschi	4	12.1	13.0	0.8	9.8-13.5
	Femmine***	5	6.2	5.0	0.9	4.1-8.4
	Vena giugulare	5	10.0	9.1	1.0	8.3-13.3
	Seno cervicale dorsale	4	7.0	5.2	2.2	4.1-13.5
Ematocrito ^{a, b} (%)	Totale	14	23	23	2	11-40
	Maschi	6	31	32	2	25-40
	Femmine*	8	17	14	2	11-28
	Vena giugulare	7	27	27	2	20-33
	Seno cervicale dorsale	6	15	13	2	11-26

*Significatività $P < 0.05$ ** Significatività $P \leq 0.01$ *** Significatività $P \leq 0.001$

^a Analiti normalmente distribuiti ($P > 0.05$, D'Agostino-Pearson test)

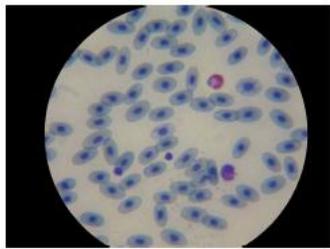
^b Analiti che presentano P -value al Test di Levene per l'uguaglianza della varianza inferiore a 0,05, quindi l'ipotesi per ANOVA a due vie non sono state soddisfatte.



a)

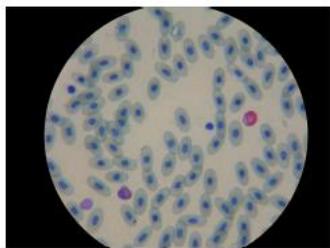
Figura 6.2.2. Striscio ematico di *Testudo hermanni* sp colorato con differenti protocolli (400 x)

a) Colorazione Diff-Quick



b) Colorazione May Grunwald-Giemsa

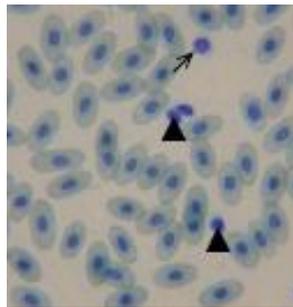
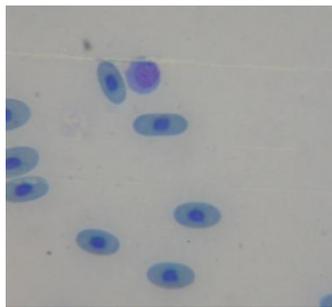
c) Colorazione di Wright



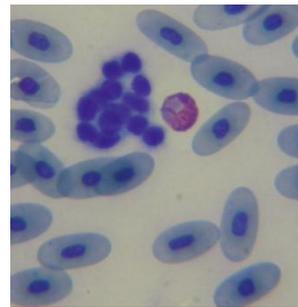
b)

c)

Figura 6.2.3. Eritrociti e eritrociti immaturi. Striscio ematico di *Testudo* spp. Colorazione di Wright (400X)



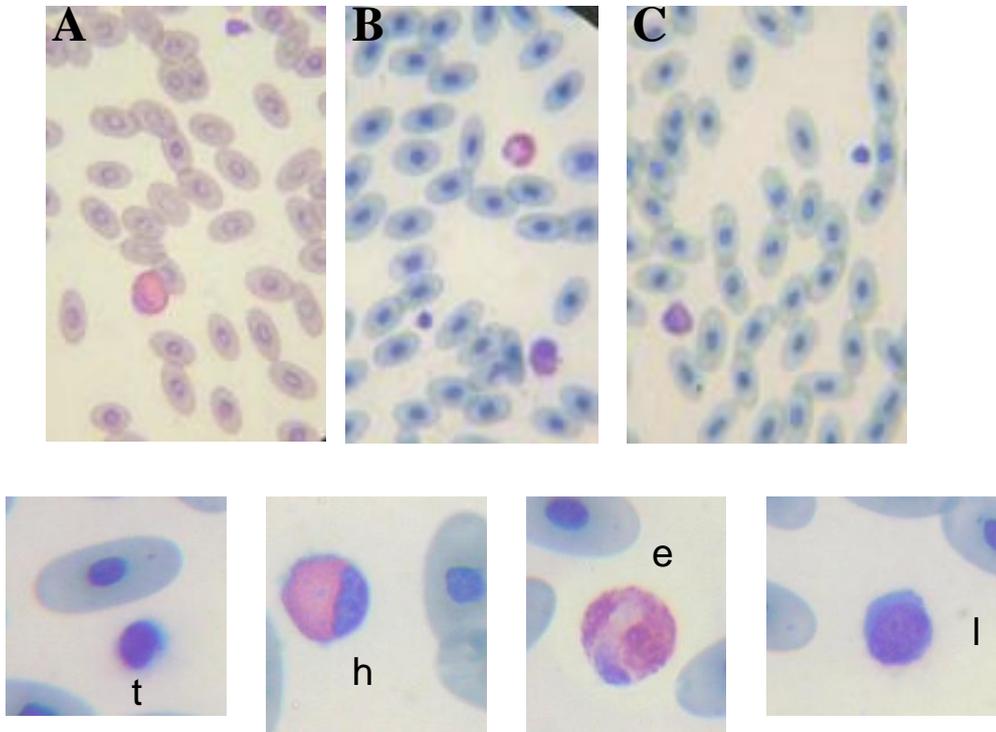
a)



b)

Figura 6.2.4. a) Trombociti (freccia grande) e linfociti (freccia piccola), da striscio ematico di *T. hermanni* colorato con Wright (400 X). b) Trombociti in *T. Hermann*, tendenza ad aggregarsi, granulocita eosinofilo (1000 X).

Figure 6.2.5. Striscio ematico di *Testudo colorato* usando differenti protocoli. (A) Diff-Quick, (B) May Grünwald-Giemsa, (C) Wright. **h:** eterofili, **t:** trombociti, **e:** eosinofili, **l:** linfociti. X 400 ingrandimenti.



6.3. BIOCHIMICA CLINICA

I parametri biochimici sono stati analizzati in 34 tartarughe sane e sono stati calcolati gli intervalli di riferimento. Sono state eseguite statistiche descrittive attraverso il calcolo degli intervalli di riferimento dei parametri analizzati, riportati in tabella 6.3.1. Il Test di normalità D'Agostino-Pearson ha messo in evidenza che 6 variabili delle 18 analizzate (ALP, proteine totali, albumina, Cl, Na, K) presentano distribuzione normale.

Enzimi, urea e acido urico hanno mostrato la più alta variabilità inter-individuale, mentre gli elettroliti, proteine totali e albumina presentavano una minore variabilità.

Le variabili sesso e stagione sono state identificate come fattori rilevanti che incidono sui parametri emato-biochimici in *T. hermanni* (Tabella 6.3.2). Le femmine presentano valori significativamente più bassi per l'acido urico, urea, AST, ALT e maggiori per il Cl, mentre differenze significative dovute alla stagione sono state rilevate per i seguenti parametri: glucosio, urea, acido urico, AST, Cl e P con livelli maggiori nei campioni ottenuti nel periodo di inizio estate ad eccezione di urea e Cl. Sono state evidenziate interazioni significative tra sesso e stagione per i seguenti parametri: glucosio, acido urico, AST, ALP, P, K e Cl.

È stata trovata una correlazione negativa significativa ($p < 0,01$) per l'attività dell'ALP con l'età e il peso (Figura 6.3.1), mentre la concentrazione di glucosio era inversamente correlata con l'età ($p < 0,01$) (Figura 6.3.2).

I parametri biochimici misurati in tre campioni patologici (dati non riportati) risultano compresi nell'intervallo di riferimento calcolato, con l'eccezione per Cl, che era inferiore (83 mmol L^{-1}) nel caso 1 (tumore cervicale) e superiore (113 mmol L^{-1}) nel caso 2 (anoressia).

Figura 6.3.1. Correlazione negativa tra ALP, età (a) e peso corporeo(b) ($P < 0,05$)

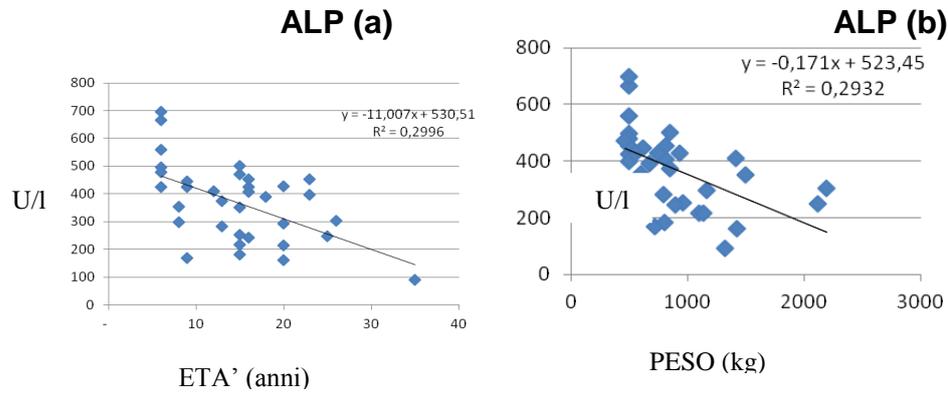


Grafico 6.3.2. Correlazione tra Glicemia ed età ($P < 0,05$)

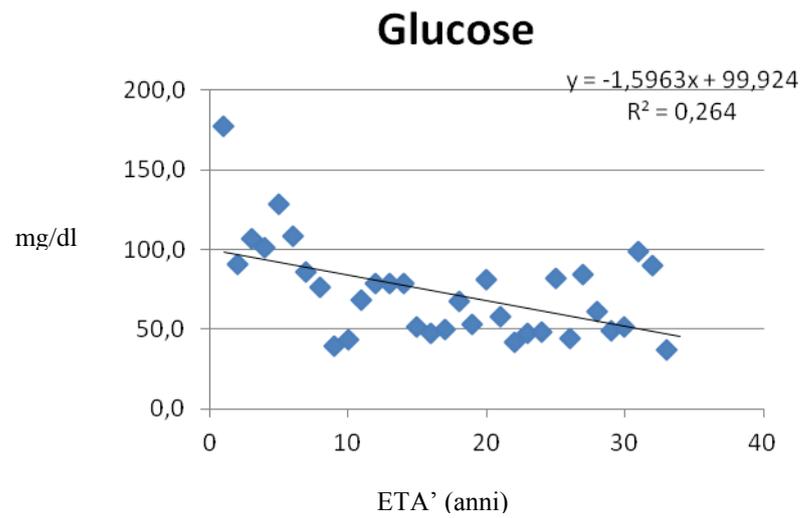


Tabella 6.3.1. Gli intervalli di riferimento nel plasma di *T. hermanni* ($n = 34$), sono stati calcolati come $media \pm 2\sigma$ per i parametri a distribuzione normale e come minimo-massimo per parametri non normalmente distribuiti.

	Intervalli di riferimento	Media \pm SE	Mediana	95% CI
Glucosio ^b (mg dL ⁻¹)	37-177	73 \pm 5	68	51-81
Urea ^b (mg dL ⁻¹)	1.78-16.67	5.59 \pm 0.67	3.75	3.01-6.36
Creatinina ^b (mg dL ⁻¹)	0.08-0.35	0.17 \pm 0.01	0.16	0.14-0.17
Acido urico ^b (mg dL ⁻¹)	0.69-7.86	2.72 \pm 0.27	2.62	2.12-3.26
Proteine totali ^a (g dL ⁻¹)	1.9-5.5	4.0 \pm 0.2	4.3	3.6-4.4
Albumina ^a (g dL ⁻¹)	0.6-2.5	1.6 \pm 0.1	1.8	1.4-1.8
Rapporto A/G ^b	0.26-0.92	0.64 \pm 0.02	0.66	0.61-0.69
AST ^b (U L ⁻¹)	18-628	134 \pm 28	74	49-94
ALT ^b (U L ⁻¹)	1-16	4 \pm 0.6	1	1-4
ALP ^a (U L ⁻¹)	91-645	368 \pm 24	392	320-417
CK ^b (U L ⁻¹)	19-1346	284 \pm 57	168	136-227
LDH ^b (U L ⁻¹)	166-1556	476 \pm 43	395	317-458
Ca ^b (mg dL ⁻¹)	10.7-28.1	14.7 \pm 0.7	12.9	12.1-14.3
P ^b (mg dL ⁻¹)	1.8-8.7	3.4 \pm 0.2	3.1	2.9-3.5
Na ^a (mmol L ⁻¹)	114-146	130 \pm 1	130	127-133
K ^a (mmol L ⁻¹)	3.4-8.2	5.8 \pm 0.2	5.6	5.4-6.2
Cl ^a (mmol L ⁻¹)	91-112	101 \pm 1	101	100-103

^a Parametri normalmente distribuiti ($P < 0.05$, D'Agostino-Pearson test)

^b Parametri a distribuzione non normale ($P > 0.05$, D'Agostino-Pearson test)

Tabella 6.3.2. Effetto del sesso e della stagione sui parametri biochimici in *Testudo hermanni* spp. Sono riportati i range minimo e massimo. Maschi, n=14; femmine, n=20; estate, n=14; autunno, n=20.

Analita		Range (min-max)	Media \pm SE	Mediana
Glucosio ^{c§} (mg dL ⁻¹)	Maschi (n=14)	47-108	77 \pm 5	80
	Femmine (n=19)	37-177	70 \pm 8	53
	Autunno (n=19)	37-99	58 \pm 4	50
	Estate ^{***} (n=14)	53-177	92 \pm 10	84
Urea ^d (mg dL ⁻¹)	Maschi (n=13)	2.78-14.20	6.47 \pm 0.99	6.81
	Femmine ^{**} (n=20)	1.78-16.67	5.02 \pm 0.90	3.24
	Autunno (n=19)	2.94-16.67	7.07 \pm 1.04	5.67
	Estate ^{***} (n=14)	1.78-6.95	3.58 \pm 1.08	2.96
Creatinina ^{a,d} (mg dL ⁻¹)	Maschi (n=14)	0.13-0.29	0.17 \pm 0.01	0.16
	Femmine (n=20)	0.08-0.35	0.18 \pm 0.02	0.15
	Autunno (n=20)	0.08-0.35	0.18 \pm 0.02	0.16
	Estate (n=14)	0.08-0.23	0.16 \pm 0.02	0.16
Acido Urico ^{c§§} (mg dL ⁻¹)	Maschi (n=13)	1.77-7.86	3.55 \pm 0.43	3.19
	Femmine ^{**} (n=19)	0.69-4.92	2.17 \pm 0.30	1.75
	Autunno (n=19)	0.69-4.43	1.92 \pm 0.25	1.70
	Estate ^{***} (n=14)	1.77-7.86	3.80 \pm 0.36	3.60
Proteine totali ^{a,d} (g dL ⁻¹)	Maschi (n=14)	2.0-5.5	4.3 \pm 0.2	4.4
	Femmine (n=20)	1.9-5.5	3.8 \pm 0.2	4.2
	Autunn (n=20)	1.9-5.5	3.7(\pm 0.3)	4.1
	Estate (n=14)	3.6-5.5	4.5(\pm 0.3)	4.4
Albumina ^a (g dL ⁻¹)	Maschi (n=13)	1.3-2.2	1.8(\pm 0.1)	1.8
	Femmine (n=20)	0.5-2.0	1.5(\pm 0.1)	1.8
	Autunno (n=19)	0.5-2.2	1.4(\pm 0.1)	1.6
	Estate [*] (n=14)	1.3-2.2	1.8(\pm 0.1)	1.8
Rapporto A/G ^e	Males (n=13)	0.51-0.90	0.67(\pm 0.03)	0.66
	Femmine (n=20)	0.26-0.92	0.63(\pm 0.04)	0.64
	Autunno (n=19)	0.26-0.81	0.62(\pm 0.03)	0.66
	Estate (n=14)	0.51-0.92	0.68(\pm 0.04)	0.67
AST ^{d§} (U L ⁻¹)	Maschi (n=14)	48-628	190(\pm 50)	107
	Femmine ^{**} (n=19)	18-628	88(\pm 30)	58
	Autunno (n=19)	18-295	79(\pm 15)	58
	Estate [*] (n=14)	48-628	203(\pm 35)	84
ALT ^b (U L ⁻¹)	Maschi (n=14)	1-16	5(\pm 1.1)	4
	Femmine [*] (n=19)	1-10	2(\pm 0.5)	1
	Autunno (n=19)	1-7	3(\pm 0.5)	1
	Estate (n=14)	1-16	5(\pm 1.0)	3

Analita		Range (min-max)	Media ± SE	Mediana
ALP (U L ⁻¹)	Maschi (n=14)	160-558	351(±33)	375
	Femmine (n=20)	90-695	380(±34)	397
	Autunno (n=20)	90-499	350(±26)	401
	Estate (n=14)	160-695	395(±40)	363
CK^f (U L ⁻¹)	Maschi (n=13)	38-969	305(±72)	188
	Femmine (n=20)	19-1346	270(±84)	146
	Autunno (n=20)	19-1346	339(±95)	167
	Estate (n=14)	81-630	213(±97)	168
LDH^d (U L ⁻¹)	Maschi (n=13)	195-1556	509(±97)	453
	Femmine (n=20)	166-590	360(±30)	354
	Autunno (n=20)	166-1556	426(±69)	395
	Estate (n=14)	195-754	409(±36)	380
Ca^{a,g} (mg dL ⁻¹)	Maschi (n=14)	11.3-19.2	12.9(±0.5)	12.2
	Femmine *(n=20)	10.7-28.2	15.9(±1.1)	14.2
	Autunno (n=20)	10.7-21.7	14.0(±0.8)	12.3
	Estate (n=14)	11.3-28.2	15.6(±1.3)	13.2
P^{d,§§} (mg dL ⁻¹)	Maschi (n=14)	2.4-4.6	3.4(±0.2)	3.2
	Femmine (n=20)	1.8-8.7	3.5(±0.4)	3.2
	Autunno (n=20)	1.8-4.3	2.8(±0.2)	2.9
	Estate *** (n=14)	2.4-8.7	4.3(±0.5)	3.8
Na^a (mmol L ⁻¹)	Maschi (n=14)	119-138	125(±1)	124
	Femmine (n=20)	120-150	134(±2)	135
	Autunno (n=20)	119-139	130(±1)	131
	Estate (n=14)	120-150	130(±2)	127
K[§] (mmol L ⁻¹)	Maschi (n=14)	4.9-8.7	6.3(±0.4)	6.0
	Femmine (n=20)	3.5-7.4	5.5(±0.2)	5.5
	Autunno (n=20)	3.5-8.7	5.8(±0.3)	5.8
	Estate (n=14)	4.9-8.5	5.8(±0.3)	5.4
Cl[§] (mmol L ⁻¹)	Maschi (n=14)	94-104	99(±1)	99
	Femmine * (n=20)	94-113	103(±1)	104
	Autunno (n=20)	94-113	104(±1)	104
	Estate * (n=14)	94-109	99(±2)	98

Effetto del sesso e dello stato fisiologico dei parametri, valutati attraverso ANOVA a due vie. *Significativo P<0.05 ** Significativo P≤0.01 ***Significativo P≤0.001

^a Analita con P-value al test di Leven per l'uguaglianza della varianza inferiore a 0,05, quindi ipotesi per ANOVA a due vie non soddisfatte.

^b Analita che presenta distribuzione non-normale dopo trasformazione di potenza, è stato eseguito test non parametrico di Mann-Whitney.

^c Trasformazione Box-Cox. Distribuzione non-normale dopo trasformazione, valutata con test D'Agostino-Pearson.

^d Trasformazione di Potenza Lambda=-0.5. Distribuzione non-normale dopo trasformazione, valutata con test D'Agostino-Pearson.

^e Trasformazione di Potenza Lambda=2. Distribuzione non-normale dopo trasformazione, valutata con test D'Agostino-Pearson.

^f Trasformazione di Potenza Lambda=1. Distribuzione non-normale dopo trasformazione, valutata con test D'Agostino-Pearson.

^g Trasformazione di Potenza Lambda=-3. Distribuzione non-normale dopo trasformazione, valutata con test D'Agostino-Pearson.

*Interazioni significative sono state identificate tra sesso e stagione nei seguenti parametric: Glucose, uric acid, AST, P, K and Cl. *Significance $P < 0.05$ **Significance $P \leq 0.01$

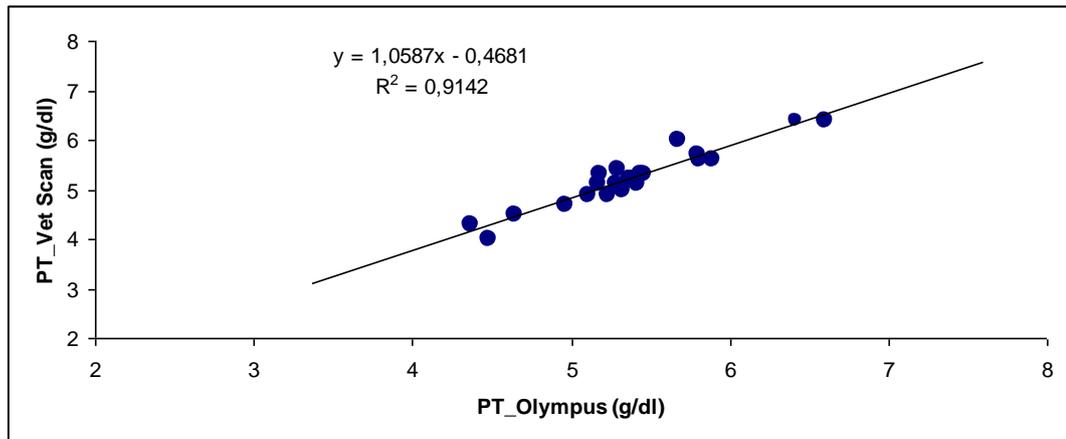
6.4. Confronto tra analizzatori automatizzati Olympus AU400 e VetScan

I risultati valori delle analisi biochimiche in *Testudo hermanni boettgeri* (n=23) eseguite determinati con due differenti analizzatori (Olympus vs VetScan) sono riportati in Tabella 6.4.1. E' stata riscontrata una correlazione significativa per tutti i parametri testati ad esclusione dell'albumina. Le correlazioni tra i valori degli analiti determinati con i due analizzatori son riportate nelle Figure 6.4.1-6.4.6.

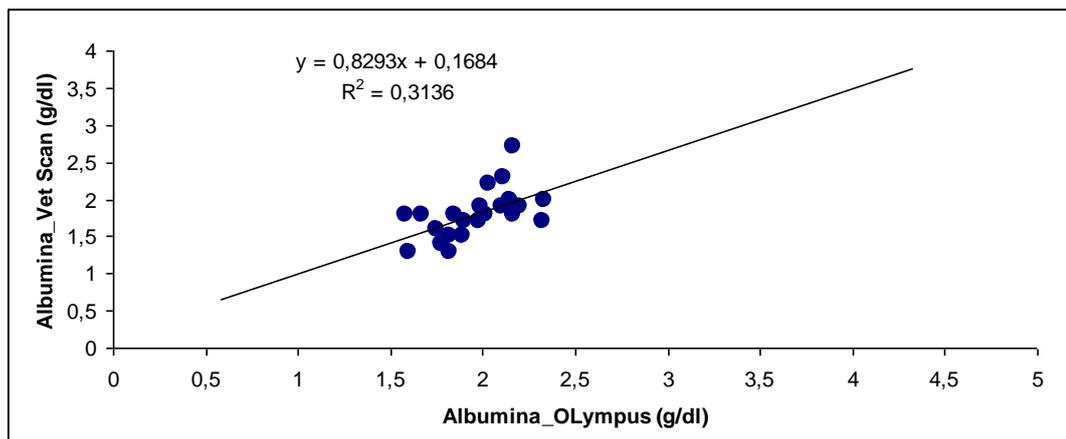
Tabella 6.4.1. Parametri biochimici determinati nel plasma di esemplari di *Testudo hermanni boettgeri* utilizzando due differenti analizzatori automatizzati

Analita	Olympus	VetScan
	Media ± DS	Media ± DS
Glucosio (mg/dl)	57,3 (±17,9)	70,0 (±19,3)
Acido Urico (mg/dl)	4,1 (± 1,0)	4,2 (± 0,9)
AST (U/l)	69,4 (±28,4)	54,8 (±24,9)
CK (U/l)	45, 0 (±68,9)	95,7 (±95,1)
Ca (mg/dl)	13,7 (±3,1)	14,4 (±2,0)
P (mg/dl)	3,1 (±0,8)	3,3 (±0,8)
Na (mmol/l)	131,9 (±4,6)	129,7 (± 7,6)
K (mmol/l)	6,2 (± 0,7)	5,9 (±0,7)
Proteine totali (g/dl)	5,4 (± 0,5)	5,2 (±0,6)
Albumina (g/dl)	1,9 (±0,2)	1,8 (±0,39)
Rapporto ALB/GLO (gr/dl)	0,6 (±0,1)	0,53 (±0,1)

Figura 6.4.1. Confronto tra metodiche (Olympus/VetScan) per la determinazione delle proteine totali (A) e albumina (B)



A



B

Figura 6.4.2. Confronto tra metodiche (Olympus/VetScan) nella determinazione di Acido urico (A), Glicemia (B)

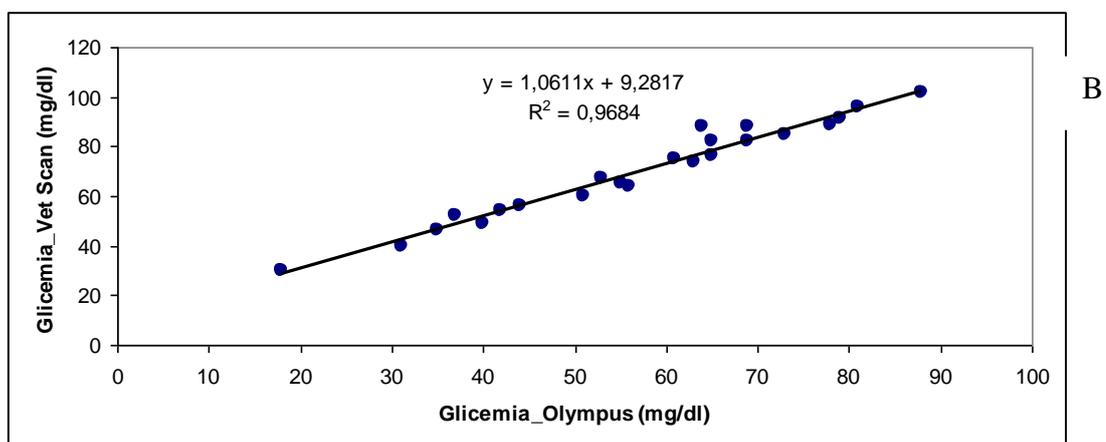
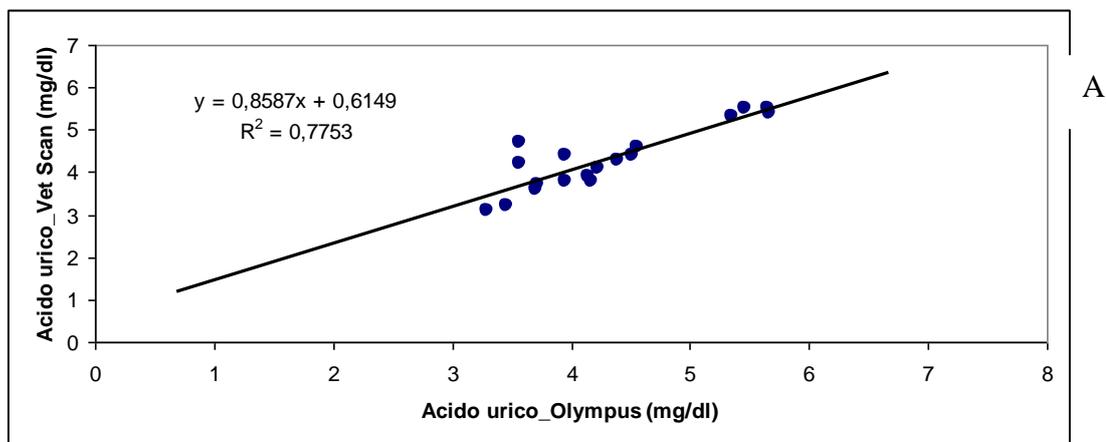
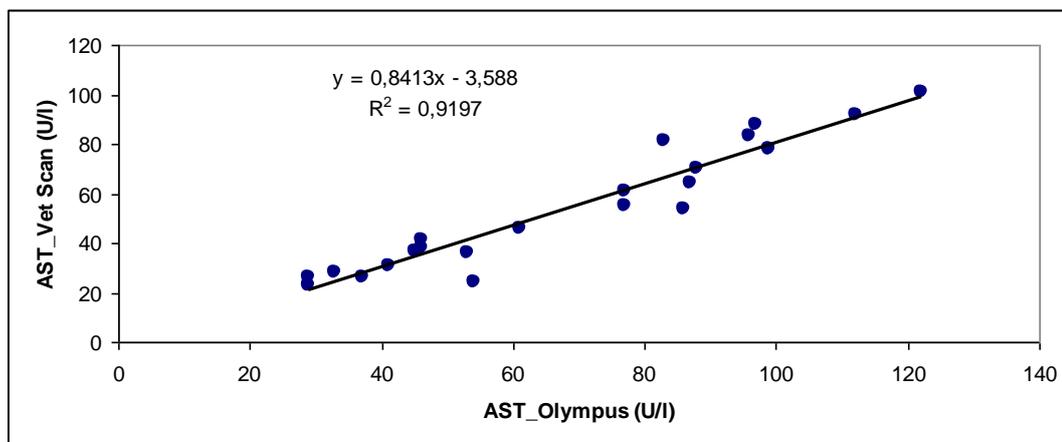
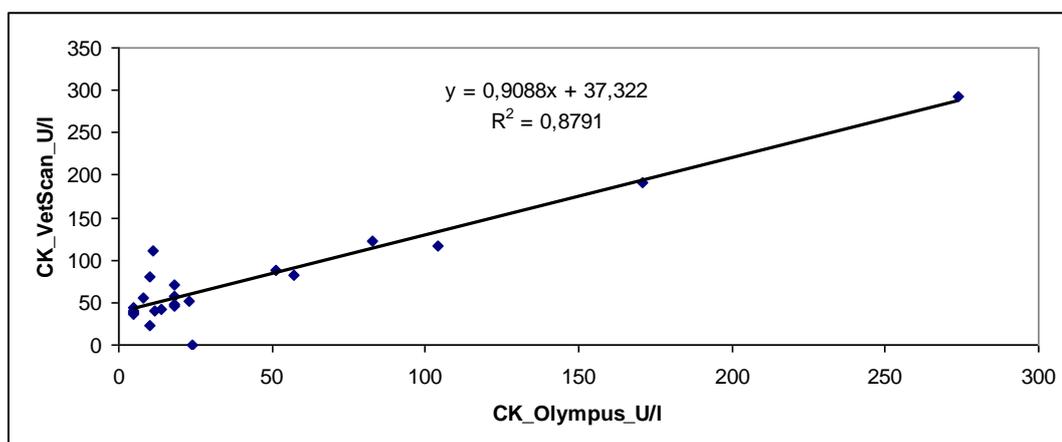


Figura 6.4.3. Confronto tra metodiche (Olympus/VetScan) nella determinazione di AST (A) e CK (B).

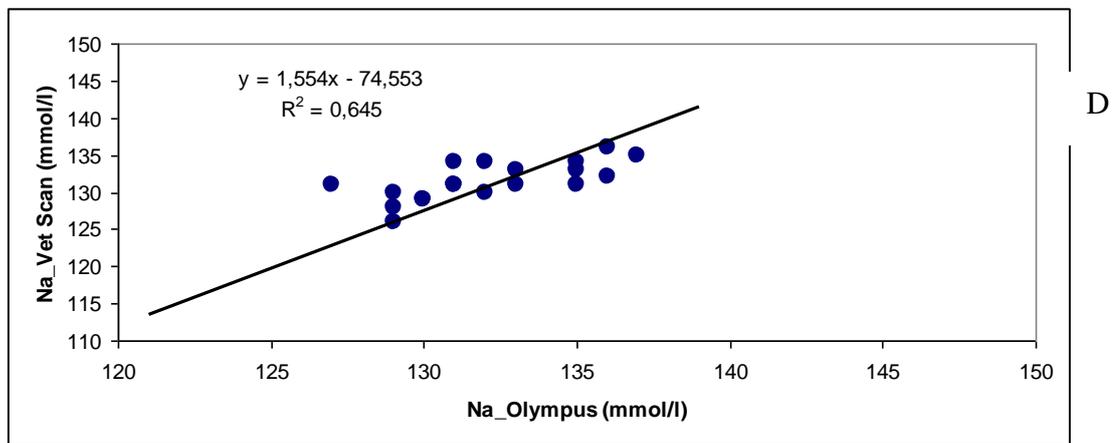
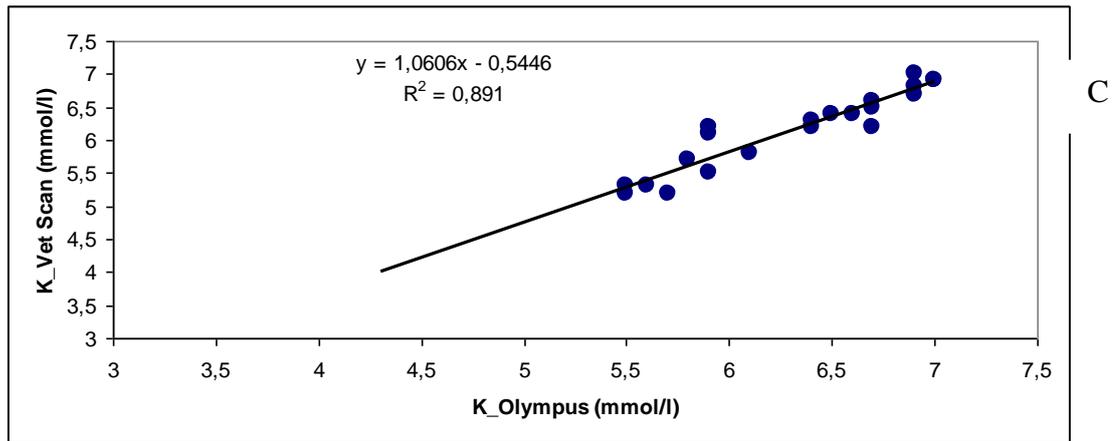


A



B

Figura 6.4.6. Confronto tra metodiche Olympus/VetScan nella determinazione degli elettroliti K (C), Na (D).



6.5. ELETTROFORESI PROTEINE PLASMATICHE

L'elettroforesi delle proteine plasmatiche è stata eseguita su 24 campioni di plasma di tartarughe sane. E' stata trovata una correlazione positiva significativa ($p < 0.01$) tra la quantificazione di albumina mediante tecniche colorimetriche ed elettroforetiche automatizzate (Figura 6.5.1). La differenza tra le due tecniche è visualizzata graficamente come concordanza di Bland-Altman nel grafico (Figura 6.5.2). La differenza media \pm SD (95% CI) è stata di $0,03 \pm 0,26$. I limiti di concordanza (95% CI) erano $-0,49$ ($-0,67$ a $-0,31$) e $0,55$ ($0,37$ - $0,73$). Non sono state trovate distorsioni proporzionali o sistemiche: l'inclinazione della linea di regressione della differenza rispetto alla media non era significativa ($r = -0,05$, $p = 0,60$) e la linea di uguaglianza è stata inclusa nel CI 95% delle differenze medie.

Nelle condizioni sperimentali precedentemente riportate, 4 frazioni erano sempre presenti in tutti i campioni: albumina, α globuline (spesso risolta in due picchi), β globuline (a volte diviso in due picchi) e γ globuline (Figura 6.5.3 a, b). Una piccola percentuale di γ globuline era evidente in tutti i campioni (Tabella 6.5.1). Tutte le proteine presentano distribuzione normale con l'eccezione dell' α -globulina nei campioni prelevati in autunno.

Gli intervalli di riferimento sulle frazioni proteiche dopo elettroforesi su gel di agarosio (AGE) sono riportati in Tabella 6.5.1.

Differenze significative sono state trovate tra l'estate e l'autunno: la maggior parte dei campioni hanno presentato livelli più alti di albumina ($p < 0.01$) e β globuline ($p < 0.05$) durante l'estate (Figura 6.5.3 a), mentre in autunno tutti i campioni hanno presentato un profilo specifico caratterizzato da una maggiore quantità di α globuline ($p < 0.05$) (Figura 6.5.3 b). I profili elettroforetici dei tre campioni patologici sono riportati in Figura 6.5.4. Elevate quantità delle frazioni α e β erano evidenti in esemplari patologici con anoressia e frattura dell'omero, mentre basse frazione di albumina e alte frazioni di α globuline sono state osservate nel campione con il tumore cervicale (Figura 6.5.5).

Figura 6.5.1. Correlazione tra la quantificazione dell'albumina con il verde di bromocresolo (metodo colorimetrico) e con l'elettroforesi (metodo densitometrico)

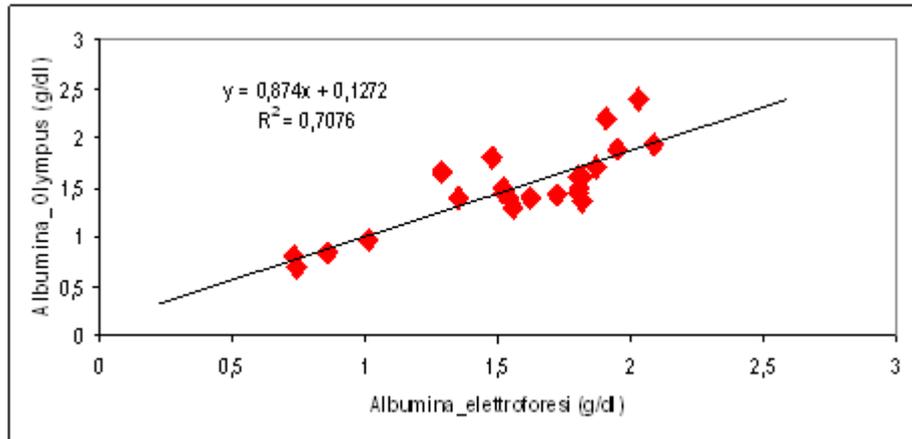


Figura 6.5.2. Bland-Altman plot per valutare la differenza nella quantificazione dell'albumina, ottenuti con metodi colorimetrici e densitometrici

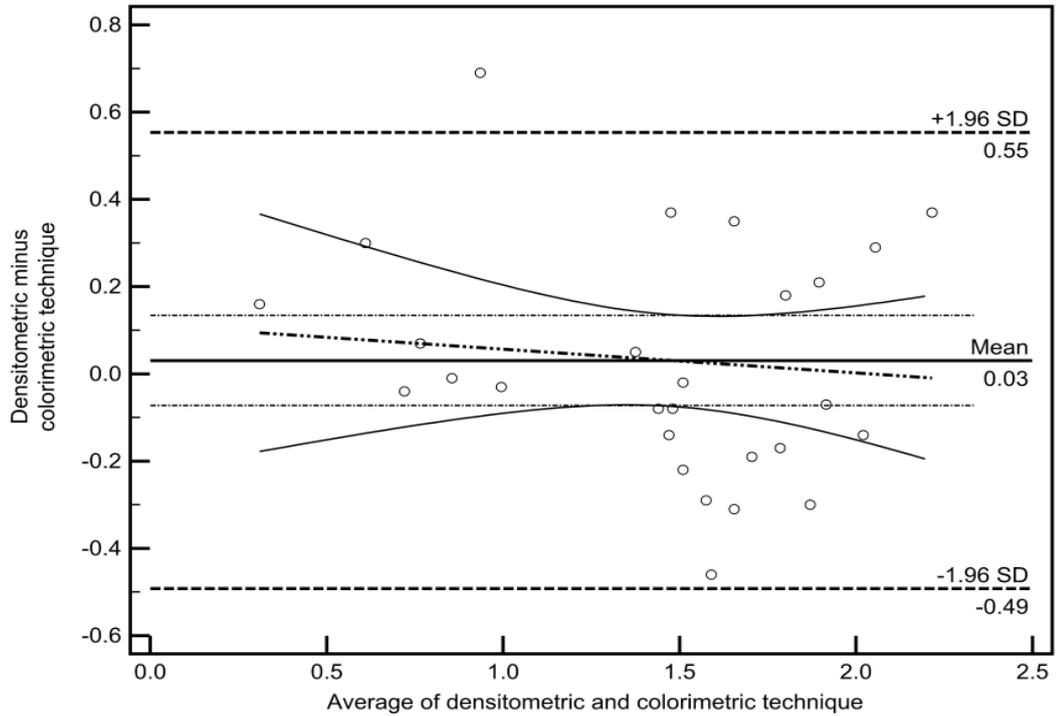


Tabella 6.5.1. Range minimo-massimo per le proteine plasmatiche in *T. hermanni* (n=24).

	Estate (n=6)		Autunno (n=18)	
	Range (min-max)	Media* ± SE	Range (min-max)	Media* ± SE
Albumina (g dL ⁻¹)	1.4-2.4	1.92 ± 0.16 ^a	0.69-1.94	1.36 ± 0.11 ^a
α-Globulina (g dL ⁻¹)	0.9-1.35	1.05 ± 0.07 ^b	0.7-1.62	1.29 ± 0.11 ^b
β-Globulina (g dL ⁻¹)	0.95-1.5	1.14 ± 0.10 ^c	0.38-1.53	0.91 ± 0.10 ^c
γ-Globulina (g dL ⁻¹)	0.2-0.3	0.26 ± 0.02	0.04-0.55	0.26 ± 0.04
Rapporto A/G	0.54-0.86	0.75 ± 0.06	0.45-0.74	0.59 ± 0.09

*Dati che presentano distribuzione normale ($p < 0.05$, Test D'Agostino-Pearson), ad eccezione dell'α-globulina in

autunno. È riportata la media aritmetica per i valori normali e come mediana per i valori a distribuzione non normale.

Sono riportati in apice ai dati della stessa riga i diversi valori di significatività: ^a differenze significative $p < 0.01$; ^b

differenze significative $p < 0.05$.

Figura 6.5.3. Profili elettroforetici e gel di campioni rappresentativi di plasma di *Testudo*. (A) Estate, (B) Autunno.

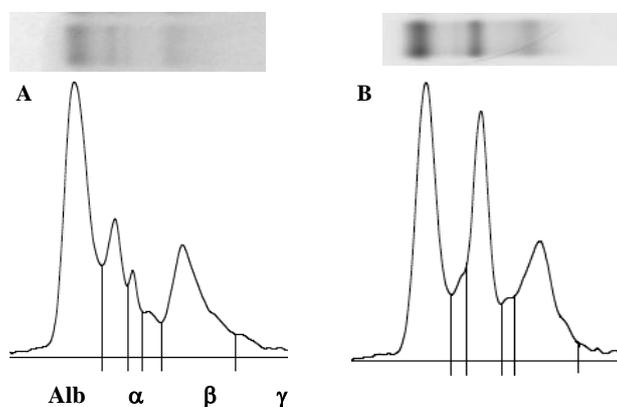


Figure 6.5.4. Profili elettroforetici in 3 esemplari con stati patologici in corso. (A), femmina con il tumore cervicale, presenta ipoalbuminemia, iperalfaglobulinemia e proteine totali 4,9 g dL-1; (B), femmina che presenta anoressia e astenia con ha iperalfa / betaglobulinemia, proteine totali 4,0 g dL-1; (C) maschio con frattura omero ha un profilo con iperbeta / gammaglobulinemia, 5,1 g dL-1.

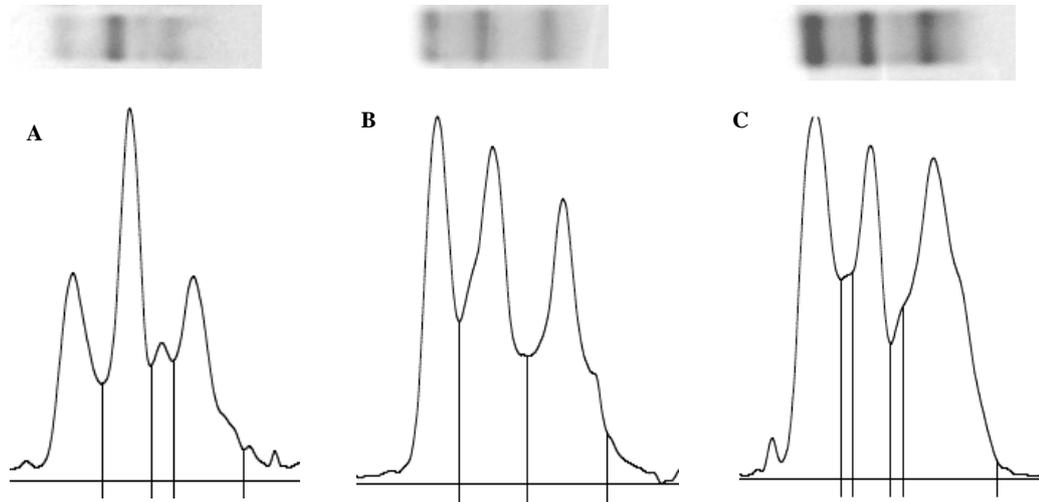
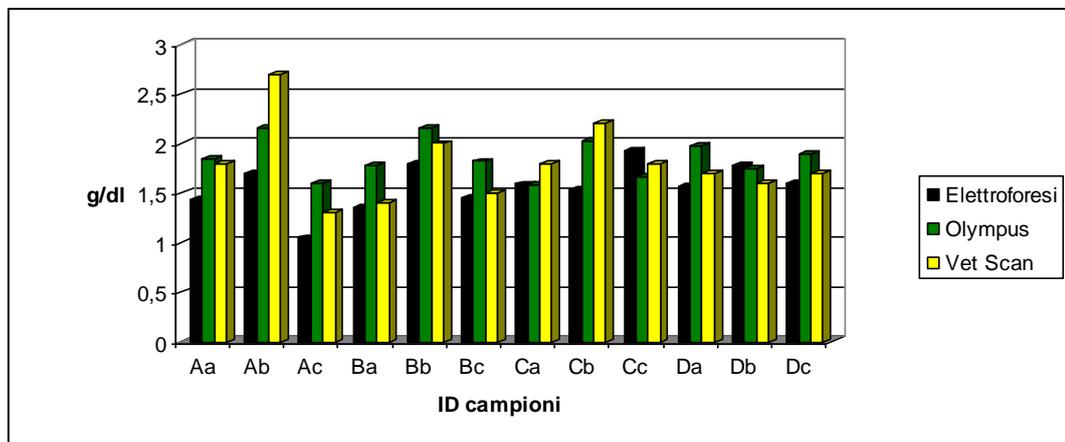


Figura 6.5.5. Metodiche a confronto elettroforesi, Olympus e Vet Scan nella determinazione dell'albumina



6.6. MACRO E MICROELEMENTI NEL PLASMA DI T. HERMANNI

Le concentrazioni degli elementi analizzati nel plasma di *Testudo hermanni spp* (n=35) sono riportate in Tabella 6.6.2 Le concentrazioni dei vari elementi sono espresse in mg/l per Na, K, Ca, Mg e µg/l per tutti gli altri. Il limite di quantificazione (LOQ) per ciascun elemento era: 2 µg/l (Pb, Cd), 5 µg/l (Fe, Zn, Cu, Se, Sr, Ni, Ba, Cr, As, Hg,) e 1 mg/l (Na, K, Ca, Mg).

Gli elementi che hanno mostrato una distribuzione normale ($P > 0,05$) sono stati : Cu, Zn, Fe, Mg, Se, K e Na. Per quanto riguarda i micro elementi non essenziali come Cd, Hg, Pb e As le concentrazioni plasmatiche risultano inferiori al limite di quantificazione. Non si sono riscontrate differenze significative legate al sesso, al sito di campionamento e prelievo, mentre sono state trovate differenze dovute al periodo di campionamento. Mg, maggiore nel prelievo giugulare (Figura 6.6.2) un aumento di Ca e Zn in quello primaverile rispetto al campionamento autunnale (Figura 6.6.1). Attraverso il calcolo del coefficiente di correlazione di Pearson (riportati in Tabella 6.6.1), lo zinco è risultato quello che presenta un maggior numero di correlazioni; in particolare in Figura 6.6.7 è rappresentata la correlazione con le proteine totali ($p < 0,005$). Si pone in evidenza anche la forte correlazione tra stronzio, bario e calcio ($p < 0,001$). Inversamente correlati risultano Mg e glucosio ($p < 0,002$). I valori di Na, K e Ca tra la tecnica ICP-MS e la tecnica potenziometrica Olympus, risultano correlati tra loro per Na e K, come riportato nelle Figure 6.6.4 e 6.6.6. Le differenze nella quantificazione dei due elementi, sono state visualizzate graficamente come concordanza di Bland-Altman (Figure 6.6.3 e 6.6.5).

Tabella 6.6.1: Coefficiente di correlazione di Pearson (*r*) e *p*-value (*p*) tra i diversi metalli analizzati

	R	P		R	P
Zn/Alb	0,462	0,005	Sr/Ca	0,754	< 0,001
Zn/ acido urico	0,466	0,005	Sr/Ba	0,703	< 0,001
Zn/Ca	0,422	0,011	Pb/P	0,445	0,007
Zn/GLU	0,561	< 0,001	Ni/As	0,457	0,005
Zn/Hb	0,825	0,006	Ni/GLU	0,619	< 0,001
Zn/Ni	0,534	< 0,001	Mn/Cr	0,795	< 0,001
Zn/PT	0,47	0,004	Mn/Fe	0,607	< 0,001
Zn/Se	0,459	0,005	Mg/Ca	0,465	0,004
Ba/Ca	0,773	< 0,001	Mg/GLU	-0,504	0,002

Tabella 6.6.2. Concentrazione di elementi essenziali (macro e micro elementi) e non essenziali nel plasma di *Testudo hermanni* sp. I dati sono espressi in mg/l per Na, K, Ca e Mg, mentre tutti gli altri sono espressi in µg/l. Il LOQ è: Cd e Pb 2 µg/l, macro elementi essenziali 1 mg/l, per tutti gli altri elementi 5 µg/l.

Analita		N	Media (±SD)	Min-Max
Na (mg/l)^a	Maschio	14	2026.9 ± 389	1543.1 – 2885
	Femmina	21	2007 ± 500	646 – 2740
	Estate	15	2144 ± 426	1414 – 2885
	Autunno	20	1918 ± 458	646 – 2705
K (mg/l)^a	Maschio	14	196.8 ± 38	114,3 – 278.2
	Femmina	21	182 ± 34	137 – 257
	Estate	15	194.6 ± 31	146 – 257
	Autunno	20	182.9 ± 40	114 – 278
Ca (mg/l)^b	Maschio	14	70.7 ± 25.5	50.04 – 132.6
	Femmina	21	65.5 ± 19	39.4 – 110
	Estate	15	76.1 ± 25	48 – 132
	Autunno	20	61.3 ± 16.6	39 – 110
Mg (mg/l)^a	Maschio	14	51.2 ± 13	30.7 – 73.5
	Femmina	21	46.6 ± 11.5	28.8 – 69
	Estate	15	44.2 ± 12.9	28.8 – 73
	Autunno	20	50.51 ± 11.3	30.7 – 72.3
Fe (µg/l)^{a*}	Maschio	11	1952 ± 930	876 – 3745
	Femmina	16	1801 ± 650	862 – 3086
	Estate	11	1633 ± 572	862 – 2434
	Autunno	16	2021 ± 852	876 – 3745
Zn (µg/l)^a	Maschio	14	2256 ± 660	1200 – 3271
	Femmina	21	2104 ± 757	1099 – 4171
	Estate	15	2686 ± 620	1747 – 4171
	Autunno	20	1773 ± 503	1099 – 2934
Cu (µg/l)^a	Maschio	14	1233 ± 263	730 – 1752
	Femmina	21	1141 ± 214	704 – 1630
	Estate	15	1174 ± 217	704 – 1630
	Autunno	20	1181 ± 256	730 – 1752
Mn (µg/l)^b	Maschio	14	23 ± 38	30 – 158
	Femmina	21	18 ± 18	< LOQ – 78
	Primavera	15	27 ± 37	< LOQ – 15
	Autunno	20	15 ± 16	< LOQ – 7

Analita		N	Media (\pm SD)	Min-Max
Se ($\mu\text{g/l}$)^a	Maschio	14	26 \pm 4	15 – 33
	Femmina	21	26 \pm 12	< LOQ – 49
	Estate	15	27 \pm 12	< LOQ – 49
	Autunno	20	25 \pm 7	14 – 41
Ni ($\mu\text{g/l}$)^b	Maschio	14	37 \pm 17	18 – 80
	Femmina	21	59 \pm 97	11 – 470
	Estate	15	71 \pm 114	11 – 480
	Autunno	20	35 \pm 14	16 – 73
Sr ($\mu\text{g/l}$)^b	Maschio	14	357 \pm 302	150 – 1336
	Femmina	21	342 \pm 117	152 – 563
	Estate	15	406 \pm 278	189 – 336
	Autunno	20	305 \pm 123	150 – 563
Ba ($\mu\text{g/l}$)^b	Maschio	14	102 \pm 120	18 – 398
	Femmina	21	69 \pm 75	16 – 344
	Estate	15	83 \pm 120	18 – 392
	Autunno	20	81 \pm 75	16 – 344
Cr ($\mu\text{g/l}$)^b	Maschio	14	14 \pm 12	5 -50
	Femmina	21	15 \pm 9	< LOQ – 40
	Estate	15	16 \pm 13	5 – 50
	Autunno	20	13 \pm 8	< LOQ – 31
Pb ($\mu\text{g/l}$)^b	Maschio	14	< LOQ	< LOQ – 17
	Femmina	21	< LOQ \pm 7	< LOQ – 34
	Estate	15	< LOQ \pm 8	< LOQ – 34
	Autunno	20	< LOQ	< LOQ – 17
Hg ($\mu\text{g/l}$)^b	Maschio	14	< LOQ	< LOQ
	Femmina	21	< LOQ	< LOQ
	Estate	15	< LOQ	< LOQ
	Autunno	20	< LOQ	< LOQ
As ($\mu\text{g/l}$)^b	Maschio	14	< LOQ	< LOQ – 7
	Femmina	21	< LOQ	< LOQ – 8
	Estate	15	< LOQ	< LOQ – 8
	Autunno	20	< LOQ	< LOQ – 8
Cd ($\mu\text{g/l}$)^b	Maschio	14	< LOQ	< LOQ
	Femmina	21	< LOQ	< LOQ
	Estate	15	< LOQ	< LOQ
	Autunno	20	< LOQ	< LOQ

^a Parametri normalmente distribuiti ($P < 0.05$, test D'Agostino-Pearson)

^b Parametri a distribuzione non normale ($P > 0.05$, Test D'Agostino-Pearson)

*eliminati outlier

Figura 6.6.1. Confronto tra i valori di Ca(mg/kg) e Zn (mg/kg) nelle due differenti stagioni di prelievo

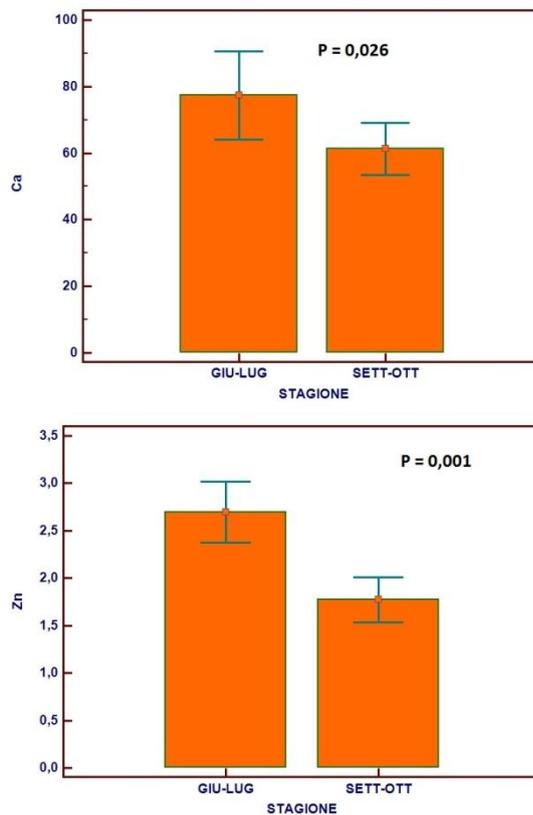


Figura 6.6.2. Confronto tra valori di Mg(mg/kg) nelle due differenti sedi di prelievo

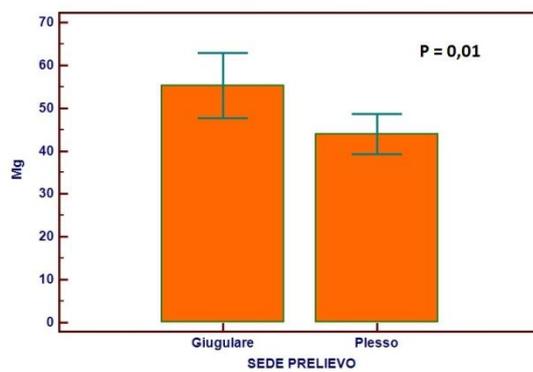


Figura 6.6.3. Bland-Altman plot per valutare le differenze nella quantificazione del K con la metodica automatizzata Olympus e con ICP-MS

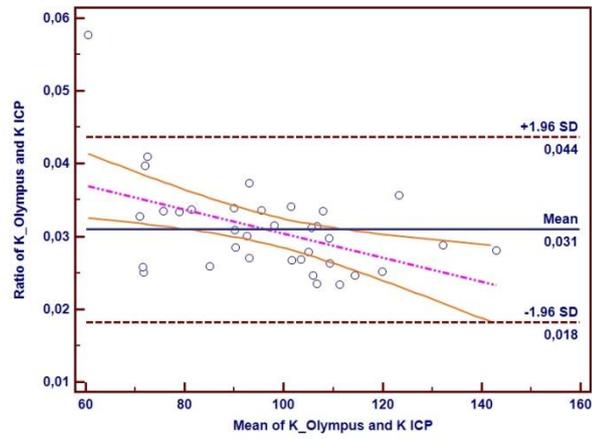


Figura 6.6.4. Confronto tra metodiche (Olympus/ICP-MS) nella determinazione del K

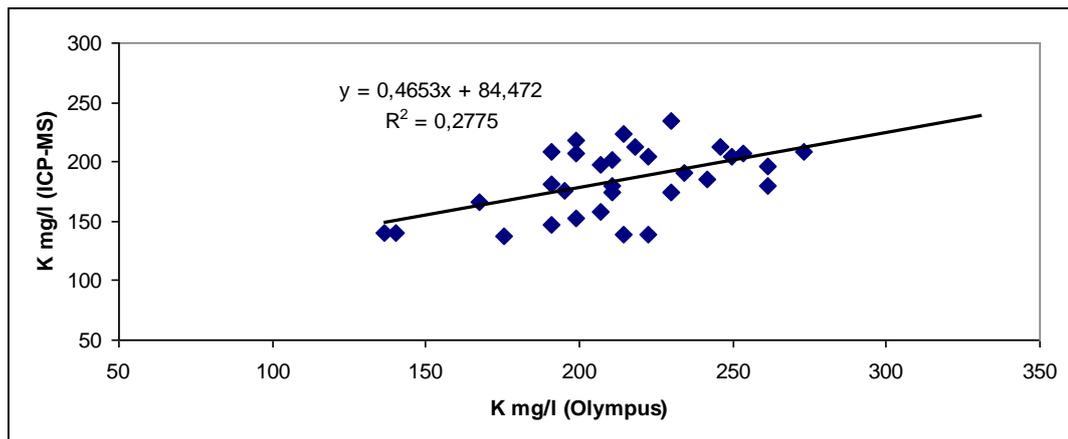


Figura 6.6.5. Bland-Altman plot per valutare le differenze nella quantificazione del Na con la metodica automatizzata Olympus e con ICP-MS

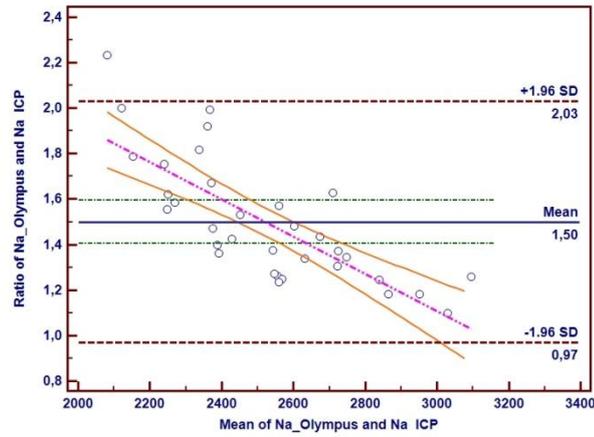


Figura6.6.6. Confronto tra metodiche (Olympus/ICP-MS) nella determinazione del Na.

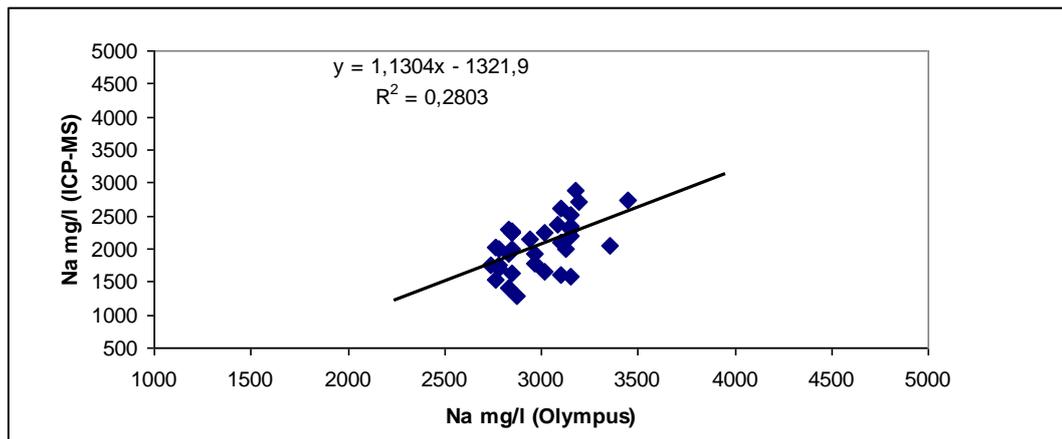


Figura 6.6.7. Correlazione tra Zn (mg/kg), proteine totali (g/dl) e glicemia (mg/dl)

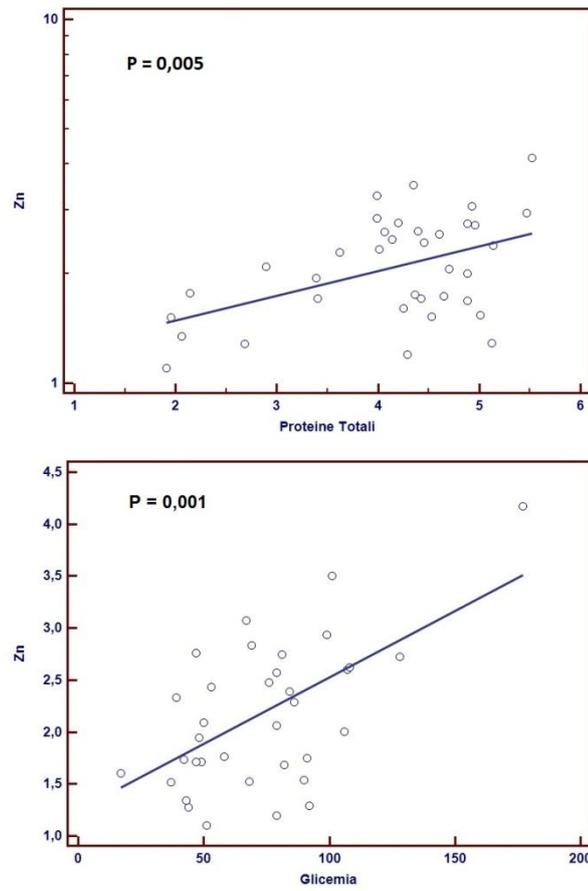
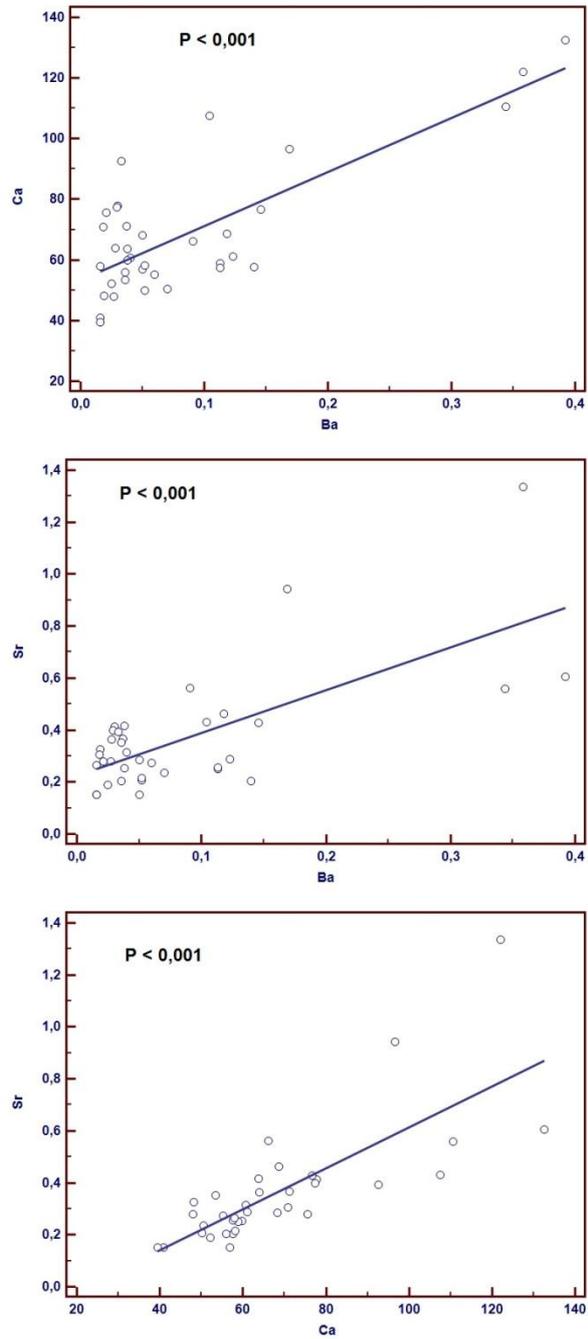


Figura 6.6.8. Correlazioni tra Ca, Ba e Sr (mg/kg) nel plasma di Testudo



7. DISCUSSIONI

La biochimica clinica dei rettili, come per altri vertebrati inferiori, non ha ottenuto al momento lo stesso livello di attenzione rivolto ad altri mammiferi. Con il presente studio viene proposta una rassegna dei più importanti parametri ematologici e biochimici al fine di facilitare l'interpretazione dei dati di laboratorio. A questo scopo, sono stati calcolati gli intervalli di riferimento e sono state valutate le influenze dei fattori ambientali e fisiologici.

7.1. EMATOLOGIA

In molti rettili, fattori intrinseci ed estrinseci come specie, età, sesso, alimentazione, stato fisiologico, ibernazione, habitat, stagione, temperatura, complicano la valutazione dei dati ematologici. Inoltre, avendo i rettili eritrociti nucleati, che potrebbero interferire con l'analisi automatizzata, si rende necessaria una corretta conoscenza delle tecniche di conteggio e della morfologia cellulare per una corretta valutazione ed interpretazione del leucogramma nei rettili.

Diversi protocolli per la valutazione dello striscio ematico nei rettili consigliano le colorazioni di Romanowsky (Wright, Wright-Giemsa, May Grünwald-Giemsa), (Alemanni *et al.*, 1999, Stacy *et al.*, 2011). La colorazione migliore è considerata quella di Wright, ma anche le colorazioni Wright-Giemsa (Stacy *et al.*, 2011) e May Grünwald-Giemsa sono raccomandate. Al contrario, la colorazione rapida Diff-Quick può causare artefatti come la degranulazione, rendendo più difficile valutare i linfociti; con questa colorazione si potrebbero inoltre sottostimare gli eritrociti immaturi. I nostri dati confermano l'affidabilità della colorazione May Grünwald-Giemsa anche per *Testudo*.

L'emodiluizione causata da linfa è diversa a seconda del sito di campionamento e può influire su diversi parametri ematologici. Nardini *et al.* (2013) consigliano di effettuare il prelievo ematico dalla vena giugulare per ridurre la presenza in loco sugli strisci colorati. Mc Arthur *et al.* (2002) hanno dimostrato che la diluizione ematica dovuta a linfa può verificarsi anche in campioni di sangue prelevati da giugulare. Nel nostro studio, non abbiamo trovato differenze significative tra la concentrazione di emoglobina e l'ematocrito tra i due siti di prelievo, in accordo con uno studio condotto sui camaleonti (Cuadrado *et al.*, 2003).

I valori di emoglobina nei maschi erano significativamente più alti che nelle femmine, come riportato nel *Gopherus agassizii* (Oyewale *et al.*, 1998.), supponiamo che ciò sia dovuto all'azione del testosterone, in analogia con quanto accade nei mammiferi.

7.2. BIOCHIMICA CLINICA

Gli intervalli di riferimento da noi definiti per i più importanti parametri biochimici nel plasma erano simili a quelli riportati in studi precedenti condotti su *Testudo ssp* (Kölle *et al.* 2001; Lopez-Olvera *et al.*, 2006) e *Geochelone* (Zaias *et al.*, 2006).

Metaboliti - I metaboliti, con l'eccezione di creatinina, sono stati significativamente influenzati dal sesso e dalla stagione: urea e acido urico erano inferiori nelle femmine in accordo con Zaias *et al.* (2006). Glucosio e acido urico sono risultati essere più alti in estate, mentre l'urea è risultata inferiore, a differenza di *Geochelone* in cui non sono state invece osservate variazioni stagionali (Zaias *et al.*, 2006.). Le tartarughe, come altri rettili e uccelli, eliminano gli scarti del metabolismo azotato come acido urico, tuttavia la presenza di urea nel plasma è indicativa del fatto che parte del catabolismo proteico è stato indirizzato anche al ciclo dell'urea. A seconda dei parametri ambientali (temperatura, disponibilità di acqua e dieta), le tartarughe sono quindi in grado di modulare la produzione di acido urico e urea; in questo scenario così complesso, le differenze osservate in *Testudo* sono legate a molteplici adattamenti metabolici.

Proteine ed enzimi - La concentrazione di proteine totali ottenute in questo studio risulta essere simile ai dati riportati per la tartaruga del deserto, *Geochelone radiata* (Zaias *et al.*, 2006). La normale concentrazione di proteine plasmatiche nei rettili risulta essere compresa tra 3 e 5,5 g / dL, e generalmente inferiore a quella riscontrata nei mammiferi (Campbell, 2004). I cheloni sono caratterizzati da una minore quantità di albumina e da una presenza maggiore di globuline, con un conseguente rapporto A / G più basso (Zaias *et al.*, 2006, Gimenez *et al.*, 2010).

Per quanto riguarda gli enzimi, tra i fattori che possono influenzare significativamente le transaminasi plasmatiche si considerano patologie epatiche o malattie muscolari. Mentre l'attività dell'AST può essere elevata in un ampio spettro di patologie cliniche, l'incremento plasmatico dell'ALT viene considerato come un indicatore più specifico di epatopatie. Nei campioni analizzati in questo studio la bassa attività di ALT (1-16 U / L), rispetto all'AST (18-628 U / L), indica l'assenza di danni epatici ed è in accordo con i dati riportati in esemplari di tartarughe sane da altri autori (Lopez- Olvera *et al*, 2006;. Zaias *et al*, 2006).

Nei mammiferi, ALP svolge un ruolo importante nella mineralizzazione dell'osso (Price *et al.*, 2009). la sua presenza è documentata nelle ossa e nel tratto riproduttivo anche nei rettili (Wilkinson, 2004). Così danni a questi organi possono aumentare l'attività enzimatica in siero e plasma. Nel presente studio è stata osservata una correlazione negativa tra l'età, la massa corporea e l'ALP ($P < 0.01$), in accordo con i dati riportati in esemplari di *Chelonia mydas* (Bolten e Bjorndal, 1992), suggerendo che gli animali giovani presentino in circolo livelli enzimatici più elevati a causa di una maggiore attività osteoblastica.

La CK è considerata un enzima muscolo-specifico e il suo aumento nel plasma è utile per valutare danni muscolari, spesso si presenta in associazione ad un aumento di LDH e AST; animali molto attivi, soprattutto maschi, possono presentare elevate attività di questi enzimi. In questo studio a causa della elevata variabilità tra gli individui, abbiamo riscontrato differenze significative tra maschi e femmine soltanto per l'AST, forse per una maggiore attività e per un comportamento aggressivo che si manifesta nei maschi ad inizio estate e legato all'accoppiamento, come riportato da altri autori in altre specie di tartarughe (Vaughan, 1984; O'Connor *et al.* , 1994; Dickinson *et al*, 2002).

Elettroliti - Minori variazioni sono state osservate per Ca, P, Na, K e Cl i cui valori sono nel range di quelli riportati per altre specie di cheloni (Carpenter, 2005). Le concentrazioni di elettroliti sono notevolmente costanti a causa del rigido controllo omeostatico relativo al loro ruolo biochimico basale. Le tartarughe mediterranee (*T. hermanni* e *T. graeca*) sono specie monoestro con una singola deposizione di uova ogni anno, solitamente nel mese di agosto, mentre la vitellogenesi è continua da settembre a maggio. I livelli più elevati di Ca nelle femmine di *Testudo* possono essere correlati al ciclo riproduttivo come Ca che si

mobilità durante la vitellogenesi e coinvolto nella formazione dell'uovo, come osservato in *Testudo horsfieldi* (Lagarde *et al* 2003), *Gopherus agassizii* (Christopher *et al* 1999; Dickinson *et al* 2002) e *Testudo spp* (Eatwell, 2010).

Confronto tra metodiche - Per verificare il grado di correlazione tra l'analizzatore automatico per biochimica clinica OlympusAU400 e il VetScan abbiamo preso in considerazione 11 parametri emato-biochimici. Tutti i parametri hanno presentato valori significativamente correlati tra i due sistemi analitici, ad esclusione dell'albumina.

Per quanto riguarda gli elettroliti, nonostante VetScan usi test colorimetrici basati su reazioni enzimatiche, e Olympus usi tecniche potenziometriche i valori medi risultano concordi tra loro, mentre per gli enzimi ed il glucosio sono state riscontrate differenze. Risultati analoghi sono stati riportati in un interessante lavoro di Wolf *et al.*, (2008) in cui sono stati messi a confronto 5 analizzatori per la valutazione di parametri emato-biochimici nelle tartarughe. Gli autori riportano ad esempio che, per alcuni elettroliti come Ca e K, si ottengono valori statisticamente in accordo nonostante tecniche analitiche diverse; d'altra parte per proteine totali e acido urico sono stati ottenuti valori comparabili con tutti e cinque gli analizzatori, che usavano gli stessi metodi di misura, basati rispettivamente sul metodo del biuretto e sul metodo uricasi/per ossidasi. Infine per l'albumina, nonostante tutti gli strumenti usassero il verde di bromo cresolo, sono state riscontrate differenze significative come d'altronde è risultato anche per nostri campioni.

7.3. ELETTROFORESI PROTEINE PLASMATICHE

L'elettroforesi delle proteine presenti nel siero/plasma è una tecnica impiegata in medicina veterinaria per indagare disproteinemie e identificare e monitorare specifiche patologie.

Nelle tartarughe, studi di base che indagano il profilo elettroforetico delle proteine plasmatiche sono molto limitati (Lykakis, 1971. Zaias *et al*, 2006). Quando si lavora sull'elettroforesi delle proteine plasmatiche in animali non convenzionali, come ad esempio Chelonidi si presentano due principali difficoltà. La prima deriva dalla assenza di criteri definiti utili per l'identificazione delle differenti

frazioni: la separazione delle proteine, benché automatizzata, comporta il fattore umano quando si identificano le varie frazioni proteiche. Nonostante l'albumina possa essere identificata in modo inequivocabile, in alcuni campioni abbiamo avuto difficoltà nel separare le diverse frazioni. Pertanto, abbiamo preferito prendere in considerazione solo le frazioni α e β e γ globulinica, accettando il suggerimento riportato da Gimenez *et al* (2010) in *Trachemys*, anche se nella maggior parte dei casi le sotto-frazioni $\alpha 1$ e $\alpha 2$ e $\beta 1$ e $\beta 2$ erano chiaramente evidenti. La seconda difficoltà è legata alle differenze intraspecifiche legate ai fattori ambientali, come ad esempio habitat, stagione e dieta.

Attraverso l'impiego del "Bland-Altman plot" la differenza tra la quantificazione di albumina con metodi colorimetrici ed elettroforetici indica una concordanza. La pre-albumina non è stata identificata, a differenza di molte tartarughe marine (Osborn, 2010). Nei mammiferi la prealbumina è stata individuata come transtiretina, un elemento dell'ormone tiroideo tiroxina, mentre in *Trachemys scripta* la transtiretina era distinta dalla prealbumina (Hunt e Licht P, 1998).

Le informazioni riguardanti le proteine presenti nelle diverse frazioni di globuline sono frammentarie nei Chelonidi, ma si può ipotizzare che esse siano generalmente le stesse presenti nei mammiferi, alla luce del ruolo essenziale che svolgono nel metabolismo dei vertebrati.

La quantità significativamente più alta di α -globuline (soprattutto la presunta frazione α -2) presente nel plasma di *Testudo* campionato ad inizio autunno potrebbe essere correlato con l'abbondanza di due componenti proteiche specifiche di α zona: $\alpha 2$ macroglobulina (α -2M) e α lipoproteine (HDL e VLDL). L' α -2M è un importante inibitore della proteasi circolante coinvolta nella regolazione di una serie di passaggi della cascata di coagulazione e dell'attivazione complemento. Un aumento dei livelli delle $\alpha 2$ M prima dell'ibernazione potrebbe attenuare/prevenire la formazione di coaguli in seguito al rallentamento dell'attività cardiaca e ad un aumento della viscosità ematica, come suggerito per i mammiferi ibernanti (Srere *et al.*, 1995). Le proteine che migrano nella zona α includono anche le lipoproteine, anche se in minore quantità rispetto alle $\alpha 2$ M, nei mammiferi sono presenti $\alpha 1$ HDL coinvolte nel trasporto di colesterolo dai tessuti periferici al fegato e $\alpha 2$ VLDL responsabili del trasporto di trigliceridi agli organi periferici. Pertanto, in *Testudo*, l'aumento della frazione

$\alpha 2$ in autunno potrebbe indicare una mobilitazione dei lipidi, come riportato per i mammiferi ibernanti (Otis *et al.*, 2011).

7.4. MACRO E MICROELEMENTI ESSENZIALI E NON ESSENZIALI

I macroelementi Na, K, Ca, Mg, sono presenti in concentrazioni alcuni ordini di grandezza superiori rispetto agli altri elementi analizzati. In particolare, la concentrazione media di Na (2015 mg/L) è in accordo con quanto riscontrato da Flint *et al.*, (2010) in tartarughe acquatiche. Fe, Zn e Cu risultano essere i più abbondanti tra i microelementi essenziali, in accordo con le loro importanti funzioni biochimiche; gli altri microelementi essenziali, come Se, Mn e Cr, con funzioni biochimiche più limitate sono presenti in concentrazioni inferiori. La mancanza di dati bibliografici a proposito dei valori basali nel plasma e del metabolismo dei vari elementi rende difficile il confronto. I dati riportati in letteratura (Andreani *et al.*, 2008; Martinez-Lopez *et al.*, 2010; Flint *et al.*, 2010, Ley-Quinonez *et al.* 2011) riguardano molto spesso cheloni acquatici, le cui condizioni biologiche ed ecologiche sono molto differenti da quelle delle testuggini terrestri così come l'esposizione a fonti di inquinamento. In ogni caso, almeno per quanto riguarda gli elementi tossici, possiamo ipotizzare che gli esemplari oggetto di questo studio vivano in ambienti non contaminati da Cd, Hg, Pb e As.

Le differenze stagionali potrebbero essere correlate all'emoconcentrazione che precede il letargo. Concentrazioni di Zn più elevate in maggio rispetto ad ottobre sono state riportate anche in esemplari di *T. hermanni* alimentate con diete a diverso contenuto di metalli (Brunetti, 2008).

Per quanto riguarda le concentrazioni medie di Na, K e Ca sono risultate essere lievemente maggiori nella determinazione mediante ICP-MS rispetto a alla tecnica potenziometrica Olympus impiegata nelle analisi biochimiche sia in campo umano che veterinario. Le due metodiche risultano dunque correlate tra loro nella determinazione dei macro elementi essenziali (Na e K).

Stronzio e Bario sono elementi non essenziali ampiamente distribuiti che non biomagnificano lungo la catena trofica e mimano il calcio nei sistemi biologici

(Nielsen 2004; EPA 1998; Malina, 2004; Puerej, 2004). La correlazione Sr/Ba (> 50%) è stata evidenziata anche in micro mammiferi (Sánchez-Chardi *et al.*, 2008).

I rettili sono i vertebrati meno studiati in ambito tossicologico, hanno molte caratteristiche che rendono auspicabile una loro scelta per gli studi tossicologici (Heppell, 1998; Hopkins, 2000; Loumbourdis, 1997, Marinez-lopez *et al.*, 2010, Riggio *et al.*, 2002). Nonostante i pochi studi tossicologici in rettili come le tartarughe (Hopkins, 2000, Bickham *et al.*, 1988;. MeyersSchöne *et al.*, 1993; Lamb *et al.*, 1995), quest'ultimi sono in grado di fornire preziose informazioni sugli effetti e le dinamiche della contaminazione ambientale.

Soltanto una piccola percentuale di studi tossicologici ha riguardato i rettili, nonostante essi possano essere esposti ad una vasta gamma di contaminanti compresi i composti organici, i radionuclidi e i metalli pesanti. La probabilità di bioaccumulo può essere favorita dalla lunga vita di alcuni di questi composti (Hall, 1980). Molti pesticidi organici altamente lipofili sono spesso introdotti nei rettili per trasferimento trofico (Hall, 1980). I rettili, possono inoltre essere svantaggiati nel metabolizzare e detossificare i contaminanti rispetto agli organismi omeotermi a causa dei loro periodi di depressa attività metabolica, legata all'ibernazione (Hall, 1980). Alcuni composti organici agiscono come interferenti endocrini bloccando o mimando gli androgeni o gli estrogeni prodotti naturalmente o alterando la sintesi o la degradazione di questi ormoni (Crain e Guilette, 1998; Guilette, 2000). I rettili possono altresì essere impiegati per valutare la concentrazione di radionuclidi nell'ambiente.

Cadmio, piombo, selenio, cromo e manganese sono stati rilevati in gusci d'uovo di tartaruga; piombo, mercurio e selenio sono stati trovati in alte concentrazioni nelle uova di *Trachemys scripta* (Burger e Gibbons, 1998). La presenza di metalli pesanti in entrambi guscio e uova suggerisce che le femmine sono in grado di trasferire metalli nelle uova diminuendo la concentrazione di quest'ultimi nel resto del corpo (Meyers-Schöne e Walton, 1994; Moeller, 2004). Tra gli effetti dei metalli nei rettili si descrivono: alterazioni ematologiche, effetti comportamentali, depressione dell'attività enzimatica e alterazioni genetiche.

Sono stati condotti studi su *Testudo graeca* esposte a Pb che hanno mostrato una significativa correlazione negativa tra la concentrazione di Pb nel sangue e l'attività dell'enzima δ - ALAD (delta-aminolevulinico deidrogenasi), un enzima necessario per sintesi dell'eme (Martínez-López *et al.*, 2010). Cd, Pb, Zn e

possono agire anche come agenti genotossici, ma l'esatto meccanismo con cui si provocano lesioni cromosomiche è sconosciuto (Tachi *et al.*, 1985; Hartwig, 1994). Il Cd in grado di competere con il Ca e lo Zn per i siti di legame sul DNA (Hartwig, 1994; Satoh *et al.*, 2002). Alcuni studi dimostrano che Cd e Pb possono causare lesioni cromosomiche che alterano lo stato redox all'interno delle cellule e il rilascio dei radicali liberi, che possono danneggiare la struttura del DNA (Hartwig *et al.*, 2002;.. Lin *et al.*, 2005).

8. CONCLUSIONI

Questo studio conferma l'affidabilità della colorazione May Grünwald-Giemsa, che risulta inoltre facile da eseguire e non richiede tempi particolarmente lunghi. L'ematocrito e la concentrazione di emoglobina possono essere determinati attraverso metodiche automatizzate anche in *Testudo*. Abbiamo delineato gli intervalli di riferimento per i principali parametri chimico-clinici del plasma; questi dati potranno essere di aiuto ai veterinari e ai ricercatori che si occupano della salute e della conservazione dei rettili. Sono state messe in evidenza differenze significative legate al sesso e alla stagione, da considerare nel momento in cui si valuta lo stato di salute di un paziente.

Mediante l'elettroforesi delle proteine plasmatiche su agarosio, abbiamo definito dei profili tipici per *T. hermanni*, mettendo in evidenza la complessità e le differenze tra i ferogrammi. Per quanto riguarda quindi i vertebrati inferiori sarebbe utile una maggiore interazione tra i laboratori che lavorano con queste specie non convenzionali per minimizzare le differenze e impostare criteri e protocolli di analisi standardizzati, come già suggerito da Gimenez *et al.*, 2010.

Il confronto tra i due analizzatori automatici ha messo in evidenza che per molti parametri esaminati non erano presenti differenze significative e che quindi potevano essere usati entrambi per le analisi biochimico-cliniche sul plasma di *T. hermanni*.

Pochi studi sono stati fatti utilizzando le tartarughe come bioindicatori ambientali (Meyers-Schöne e Walton, 1994, Lamb *et al.*, 1995); questi animali in realtà sono ideali per il monitoraggio di una zona, poiché sono longevi, ad abitudini sedentarie e si muovono regolarmente tra terra e acqua. Le tartarughe sono inoltre animali più stanziali rispetto a molti uccelli e mammiferi, riducendo in tal modo l'incertezza riguardante le fonti di contaminazione. Mentre i mammiferi sono più utili per studiare gli effetti dannosi nell'arco di più generazioni, specie più longeve come le tartarughe sono in grado di fornirci dati su più anni di esposizione a contaminanti ambientali (Gibbons, 1990; Hopkins, 2000).

9. BIBLIOGRAFIA

- Alleman AR, Jacobson ER, Raskin RE. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from the desert tortoise (*Gopherus agassizii*). Am J Vet Res. 1992; 53(9): 1645-51.
- Alleman AR, Jacobson ER, Raskin RE. Morphologic, cytochemical staining, and ultrastructural characteristics of blood cells from eastern diamondback rattlesnakes (*Crotalus adamanteus*). Am J Vet Res. 1999; 60(4): 507-14.
- Anderson ET, Minter LJ, Clarke EO, Mroch RM, Beasley JF, Harms CA. The Effects of Feeding on Hematological and Plasma Biochemical Profiles in Green (*Chelonia mydas*) and Kemp's Ridley (*Lepidochelys kempi*) Sea Turtles. Vet Med Int. 2011; 21.
- Andreani G., Santoro M., Cottignoli S., Fabbri M., Carpenè E., Isani G. Metal distribution and metallothionein in loggerhead (*Carretta carretta*) and green (*Chelonia mydas*) sea turtles. Science of the Total Environment, 2008; 390(1):287-94
- Anstall H.B., Huntsman R.G. Influence on temperature upon blood coagulation in a cold- and warm-blooded animal. Nature, 1960; 186:726.
- Avanzi M. 2010. Tartarughe terrestri. Ed. De Vecchi.
- Avanzi M., Crosta L., Peccati C., Selleri P. 2008. Diagnosi e terapia delle malattie degli animali esotici. Coniglio, furetto, pappagalli e tartarughe. Ed. Elsevier.
- Bickham, J.W., Hanks, B.G., Smolen, M.J., Lamb, T., Gibbons, J.W. 1988. Flow cytometric analysis of the effects of low-level radiation exposure on natural populations of slider turtles (*Pseudemys scripta*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology 17, 837--841.

- Bolten AB, Jacobson ER, Bjorndal KA. Effects of anticoagulant and autoanalyzer on blood biochemical values of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). Am J Vet Res. 1992; 53(12): 2224-7.
- Brunetti S. 2008. Livelli plasmatici di Zn in esemplari di *Testudo hermanni* alimentati con diete a diversa concentrazione di Zn. Tesi di Laurea in Medicina Veterinaria, Università di Bologna.
- Campbell T.W., Ellis C.K., 2007. Avian and exotic animal hematology and cytology, 3a ed, Blackwell Publishing.
- Campbell Tw. Clinical Pathology of reptiles. In: Mader DR, Editor. Reptile medicine and Surgery. 2nd edition. St. Louis (USA); 2006 p 453-470
- Carpenter J.W., 2005: Exotic animal formulary, 3a ed, Ed Elsevier.
- Casal AB, Camacho M, López-Jurado LF, Juste C, Orós J.: Comparative study of hematologic and plasma biochemical variables in Eastern Atlantic juvenile and adult nesting loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). Vet Clin Pathol. 2009; 38(2):213-8.
- Christopher MM, Berry KH, Wallis IR, Nagy KA, Henen BT, Peterson CC. Reference intervals and physiologic alterations in hematologic and biochemical values of free-ranging desert tortoises in the Mojave Desert. J Wildl Dis. 1999 Apr;35(2):212-38.
- Convenzione sul commercio internazionale delle specie animali e vegetali selvatiche minacciate di estinzione. Sottoscritta a Washington il 3 Marzo 1973, emendata a Bonn, il 22 Giugno 1979.
- Crain DA, Bolten AB, Bjorndal KA, Guillette LJ Jr, Gross TS.: Size-dependent, sex-dependent, and seasonal changes in insulin-like growth factor I in the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). Gen Comp Endocrinol. 1995 May;98(2):219-26.

- Crain, D.A., Guilette, L.A. Reptiles as models of contaminant-induced endocrine disruption. *Animal Reproduction Science*, 1998; 53, 77--86.
- Cuadrado M, Molina-Prescott I, Flores L. Comparison between tail and jugular venipuncture techniques for blood sample collection in common chameleons (*Chamaeleo chamaeleon*). *Vet J*. 2003; 166(1):93-7.
- Dauner Enrique, Vaini F. A.: Il manuale delle tartarughe e delle testuggini terrestri e acquatiche. De Vecchi Ed. 2002
- De Voogt P., Van Hattum B., Feenstra J.F. e Copius Peereboom J.W. "Exposure and health effects of cadmium". *Toxicol. Environ. Chem. Rev.*, 1980; 3:89-109.
- Deem S.L., Norton T.M., Mitchell M., Segars A., Alleman A.R., Cray C., Poppenga R.H., Dodd M., Karesh W.B. Comparison of blood values in foraging, nesting, and stranded loggerhead turtles (*Caretta caretta*) along the coast of Georgia, USA. *Journal of Wildlife Diseases*. 2009; 45(1): 41-56.
- Dickinson V.M., Jarchow J. L., Trueblood M. H. Hematology and plasma biochemistry reference range values for free-ranging desert tortoises in Arizona. *Journal of Wildlife Diseases*, 2002; 38(1): 143–153
- E. Carpenè, G. Andreani, G. Isani. Metallothionein functions and structural characteristics. *J. Trace Elem. Med. Biol* 2007; 21: 35–39
- Eatwell K. Comparison of total calcium, ionised calcium and albumin concentrations in the plasma of captive tortoises (*Testudo species*). *Veterinary Record*, 2009; 165: 466-468.
- Eisenhawer E, Courtney CH, Raskin RE, Jacobson E. Relationship between separation time of plasma from heparinized whole blood on plasma biochemical analytes of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *J Zoo Wildl Med*. 2008; 39(2):208-15.

- Ernst C.H., Lovich, J.E., Barbour, R.W. 1994. Turtles of the United States and Canada. Smithsonian Institution Press, Washington D.C., USA.
- Ferguson M.W.J., Joanen, T. Temperature of egg incubation determines sex in Alligator mississippiensis. Nature 1982. (296), 850--853.
- Flint M., Moton J. M., Limpus J. C., Patterson-Kane C. J., Murray P. J., Millis P.C. Development and application of biochemical and haematological reference intervals to identify unhealthy green sea turtles (*Chelonia mydas*). The Veterinary Journal 2010; 185: 299-304.
- Frosly A., Norheim C., Rambaek J.P. e Steinnes E. Levels of trace elements in liver from Norwegian moose, reindeer and red deer in relation to atmospheric deposition". Acta Vet. Scand., 1984; 25:333-345.
- Frye FL. 1991. Hematology as applied to clinical medicine. In: Frye FL. Biochemical and Surgical Aspect of Captive Reptile Husbandry; 2 Ed. Vol. 1 Melburne; Krieger Publishing Co. pp. 209-277.
- Gibbons, J.W. 1990a. The slider turtle. In: Gibbons, J.W. (Ed.), Life History and Ecology of the Slider Turtle. Smithsonian Institution Press, Washington D.C., USA, pp. 3-18.
- Gibbons, J.W., Smelitsch, R.D., Greene, J.L., Schubauer, J.P. Variation in age and size at maturity of the slider turtles (*Pseudemys scripta*). The American Naturalist 1981; 117, 841--845.
- Giménez M., Saco Y., Pato R., Busquets A., Martorell J.M., Bassols A.: Plasma protein electrophoresis of *Trachemys scripta* and *Iguana iguana*. Vet Clin Pathol, 2010; 39(2):227–235.
- Goyer, R.A. and Clarkson, T.W. 2001. Toxic effects of metals. In Klaassen C.D. (ed) Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, pp. 811-867. New York, NY: McGraw-Hill.

- Guilette, L.J. Contaminant-associated endocrine disruption in reptiles. In: Sparling, D.W., Linder, G., Bishop, C.A. (Eds.), *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. SETAC Press, Pensacola, USA, 2000; 595--614.
- Hall, R.J. 1980. Effects of environmental contaminants on reptiles: A review. Special scientific report - Wildlife No. 228. U.S. Department of the Interior Fish and Wildlife Service, Washington D.C., USA.
- Harr KE, Alleman AR, Dennis PM, Maxwell LK, Lock BA, Bennett RA, Jacobson ER. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells and hematologic and plasma biochemical reference ranges in green iguanas. *J Am Vet Med Assoc*. 2001; 218 (6): 915-21.
- Hartwig, A. Role of DNA repair inhibition in lead- and cadmium- induced genotoxicity: a review. *Environ. Health Persp.* 1994; 102 (Suppl 3), 45--50.
- Hartwig, A., Asmuss, M., Ehleben, I., Herzer, U., Kostelac, D., Pelzer, A., Schwerdtle, T. Bürkle, A. Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell cycle control: molecular mechanisms. *Environ. Health Persp.* 2002; 110 (Suppl 5), 797--799.
- Heppell, S.S. Applications of life-history theory and population model analysis to turtle conservation. *Copeia* 1998, 367--375.
- Hopkins, W.A. Reptile toxicology: challenges and opportunities on the last frontier of vertebrate ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 2000; 19, 2391-2393.
- Hyvarinen H. e Nygren T. "Accumulation of copper in the liver of moose in Finland". *J. Wild. Man.* 1993; 57: 3, Pp. 469-474.
- Innis CJ, Ravich JB, Tlusty MF, Hoge MS, Wunn DS, Boerner-Neville LB, Merigo C, Weber ES. Hematologic and plasma biochemical findings

in cold-stunned Kemp's ridley turtles: 176 cases (2001-2005). *J Am Vet Med Assoc.* 2009; 235(4):426-32.

- Jacobson ER. Blood collection techniques in reptiles. In: Fowler ME, editor. *Zoo and wild animal medicine, current therapy 3*. Philadelphia: WB Saunders Co; 1993: p. 144-152
- Knotkova Z., Knotek Z., Hajkova P.: Plasma biochemistry of chelonians of the Geochelone group. European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians (EAZWV) Third scientific meeting, May 31th - June 4th, 2000, PARIS, France.
- Knotkova Z., Knotek Z., Hajkova P. Plasma biochemistry of chelonians of the Geochelone group. European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians (EAZWV) Third scientific meeting, May 31th - June 4th, 2000, PARIS, France.
- L. Bonfiglio e F. Riccobono, "Il deposito a *Hippopotamus sp.* del Pleistocene superiore presso la grotta di S. Teodoro in Acquadolci (Messina, Sicilia), un progetto di museo paleontologico in situ", *Bollettino della Società Paleontologica Italiana*, 29(1), 1990; pp. 109-115
- Lamb, T., Bickham, J.W., Gibbons, J.W., Smolen, M.J., McDowell, S.. Genetic damage in a population of slider turtles (*Trachemys scripta*) inhabiting a radioactive reservoir. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1991; 20, 138--142.
- Lamb, T., Bickham, J.W., Lyne, T.B., Gibbons, J.W. The slider turtle as an environmental sentinel: multiple tissue assays using flow cytometric analysis. *Ecotoxicol.* 1995; 4, 5-13.
- LEGGE 4 novembre 2010, n. 201. "Ratifica ed esecuzione della Convenzione europea per la protezione degli animali da compagnia, fatta a Strasburgo il 13 novembre 1987, nonché norme di adeguamento dell'ordinamento interno. (10G0220) (GU n. 283 del 3-12-2010).

- LEGGE 7 febbraio 1992, n. 150. Disciplina dei reati relativi all'applicazione in Italia della convenzione sul commercio internazionale delle specie animali e vegetali in via di estinzione.
- Ley-Quinonez C., Zavala-Norzagaray A., Espinosa-Carreón T. L., Peckham H., Marquez-Herrera C., Campos-Villegas L., Anguirre A. Baseline Heavy metals and metalloid values in blood of Loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from Baja California Sur, Mexico. *Mar. Poll. Bull.* 2011; 62: 2580.
- Lin, A.J., Zhu, Y.G., Tong, Y.P. and Geng, C.N. Evaluation of genotoxicity of combined pollution by cadmium and atrazine. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2005; 74, 589-596.
- Linee guida per la corretta gestione e il benessere degli animali non convenzionali. Manuale pratico dal veterinario al proprietario. SIVAE. Ed. EV, 2012.
- Løbersli E., Gjengedal E. e Steinnes E. Impact of soil acidification on the mobility of metals in the soil-plant system. In: *Heavy metals in the environment*?. Vernet Jp (Ed.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1991; Pp. 37-53.
- Lòpez-Olvera JR, Montane J, Marco I, Martínez-Silvestre A, Soler J, Lavìn S: Effect of venipuncture site on hematologic and serum biochemical parameters in marginated tortoise (*Testudo marginata*). *J. Wildlife Dis.* 2003, 39(4):830–836.
- Loumbourdis NS. Heavy metal concentration in a lizard, *Agana stellio*, compared in urban, high altitude and agricultural, low altitude areas of North Greece. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1997, 58: 945-952
- Loyd M., Morris P. Chelonian venipuncture technique. *Bulletin of the Association of Reptile and Amphibian Veterinarian*, 1999 ; 9(1): 26-28

- Lykakis JJ. Serological and immunochemical comparison of turtle blood proteins: serum proteins and hemoglobins. *Comp Biochem Physiol, Part B: Biochem Mol Biol.* 1971; 39:83 – 88.
- M., Bortolotto A. “Dossier- Parenti Serpenti” da CETACEA informa, anno VIII n .15, pag. 4-10
- Mader D. R. *Reptile Medicine and Surgery*, 2a ed., Ed. Saunders, 2002.
- Martínez-López E, Sousa AR, María-Mojica P, Gómez-Ramírez P, Guilhermino L, García-Fernández AJ. Blood delta-ALAD, lead and cadmium concentrations in spur-thighed tortoises (*Testudo graeca*) from Southeastern Spain and Northern Africa. *Ecotoxicol.* 2010; 19:670-7
- Mathes K.A., Holz A., Fehr M. Blood references values of terrestrial tortoises (*Testudo spp*). *Tierärztliche Praxis. Ausgabe Kleintiere, Heimtiere*, 2006; 34(4):268-274.
- Mayer J., Innis C. Characterizing the Hematologic and Plasma Chemistry Profiles of Captive Chinese Water Dragons, *Physignathus oncinus*. *J. Herpetol. Med.Surg.* 2005; 15(3):16-23.
- McArthur S., Wilkinson R., Meyer J., 2004: *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*, Blackwell Publishing Ltd.
- Merian E. *Metals and their compounds in the environment*. VCH, Weinheim, Germany, 1991, 1438 pp.
- Meyers-Schöne, L., Walton, B.T. Turtles as monitors of chemical contaminants in the environment. In: Ware, G.W. (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol 135. Springer-Verlag, New York, NY, USA, 1994; pp. 93--153.

- Müller K, Brunnberg L. Determination of plasma albumin concentration in healthy and diseased turtles: a comparison of protein electrophoresis and the bromocresol green dye-binding method. *Vet. Clin. Pathol.* 2010; 39:79–82.
- Munk L., Faure G., Pride D.E., Bigham J.M. “Sorption of trace metals to an aluminium precipitate in a stream receiving acid rock-drainage; Snake River, Summit County, Colorado”. *Appl. Geochem.* 2002; 17, 421-430.
- Muro J, Cuenca R, Pastor J, Vinas L, Lavin SJ. Effects of lithium heparin and tripotassium EDTA on hematologic values of Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*). *Zoo Wildl. Med.* 1998; 29 (1) :40-44.
- Musquera S, Massegú J, Planas J.: Blood proteins in turtles (*Testudo hermanni*, *Emys orbicularis* and *Caretta caretta*). *Comp. Biochem. Physiol. A Comp Physiol.*, 1976; 55(3):225-30.
- Mylniczenko ND, Curtis EW, Wilborn RE, Young FA. Differences in hematocrit of blood samples obtained from two venipuncture sites in sharks. *Am. J. Vet. Res.* 2006; 67(11):1861-4.
- Nardini G, Leopardi S, Bielli M.: Clinical hematology in reptilian species. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 2013 Jan;16(1):1-30. (In press)
- Oyewale J.O., Ebute C.P., Ogunsanmi A.O., Olayemi F.O., Durotoye L.A.: Weights and blood profiles of the west African hingebacked tortoise, *Kinixys erosa* and the desert tortoise, *Gopherus agassizii*. *Zentralbl Veterinarmed A.* 1998; 45(10): 599-605
- Palmiter R.D. The elusive function of metallothioneins *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* 1998; 95(15): 8428–8430.
- Pendl H. “Corso di ematologia di uccelli e rettili”, Corso Scivac, Cremona, 2004; p.3

- Peterson P.J. e Alloway B.J. (1979). “Cadmium in soils and vegetation. In: The chemistry, biochemistry and biology of cadmium”, Webb M. (Ed.), Vol.2. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford, Pp. 45-92.
- Pokorný B, Al Sayegh-Petkovsek S, Ribarič-Lasnik C, Vrtacnik J, Doganoc DZ, Adamić M. Fungi ingestion as an important factor influencing heavy metal intake in roe deer: evidence from faeces. *Sci. Total Environ.* 2004; 324: 223-34.
- Prohaska J.R. and Gybina A.A. Intracellular copper transport in mammals. *J. Nutr.* 2004; 134:1003-1004.
- Rangel-Mendoza J, Weber M, Zenteno-Ruiz CE, López-Luna MA, Barba-Macías E. Hematology and serum biochemistry comparison in wild and captive Central American river turtles (*Dermatemys mawii*) in Tabasco, Mexico. *Res. Vet. Sci.* 2009; 87(2):313-8.
- Redrobe S., MacDonald J. Sample collection and clinical pathology of reptiles. *Veterinary Clinics of North America: Exotic animal practice.* 1999, 3 (2): 709-730.
- REGOLAMENTO (CE) N. 338/97 del 9 dicembre 1996. Relativo alla protezione di specie della flora e fauna selvatiche mediante il controllo del loro commercio.
- Riggio M., Scudiero R., Borrelli L., De Stasio R., Filosa S. Analisi del contenuto di “metalli traccia” e dei meccanismi molecolari che ne controllano l’omeostasi in Anfibi e Rettili del Parco del Matese. I vertebrati ectotermi del parco Regionale del Matese. 2002; 139 -147.
- Saint girons MC. 1970. Morphology of the circulating blood cell. In: Gans C, Parsons TC, editors. *Biology of the reptilian*, vol. 3. New York: Academic Press. p.73-91.

- Satoh, M., Koyama, H., Kaji, T., Kito, H., Tohyama, C. 2002. Perspectives on cadmium toxicity research. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 196, 23-32.
- Smits AW, Kozubowski MM. Partitioning of body fluids and cardiovascular responses to circulatory hypovolemia in the turtle *Pseudemys scripta elegans*. *J. Exp. Biol.* 1985; 116: 237-250.
- Stacy N., Alleman A. R., Saylor K. A.: *Diagnostic Hematology of Reptiles*. *Clin. Lab. Med.* 2011; 31(1):87-108.
- Stockham S.L., Scott M.A., 2008: *Fundamental of Veterinary Clinical Pathology*, 2a ed, Blackwell Publishing Ltd.
- Strik Ni, Alleman Ar, Harr KE. Circulating inflammatory cells. In: Jacobson ER, Editor. *Infection disease and pathology of reptiles color atlas and text*. Boca Raton (USA): CRC 2007. p 167-218.
- Sykes JM 4th, Klaphake E. Reptile hematology. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 2008; 11(3):481-500.
- Tachi, K., Nishimae, S., Saito, K. Cytogenetic effects of lead acetate on rat bone marrow cells. *Arch. Environ. Health* 1985; 40, 144-147.
- Tapiero H and Tew KW. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothionein. *Biomed. Pharmacother.* 2003; 57: 399-411.
- Vallee BL, Falchuck KH. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol. Rev.* 1993; 73: 79-118.
- Venugopal B. e Luckey T.D. 1978. "Chemical toxicity of metals and metalloids". *METAL TOXICITY IN MAMMALS 2* Plenum Press, New York and London.

- WHO (1992). “IPCS Environmental Health Criteria 135; Cadmium, environmental aspects”. Geneva, WORLD HEALTH ORGANIZATION-
- Wilkinson R. In McArthur S, Wilkinson R, Meyer J, editors. Medicine and surgery of tortoise and turtles. Clinical pathology. Oxford: Blackwell publishing Ltd; 2004. p. 141-86.
- Wolf KN, Harms C.A., Beasley J.F.: Evaluation of five clinical chemistry analyzers for use in health assessment in sea turtles. J. Am. Vet. Med. Assoc. 2008; 233(3):470-5.
- Wolkers H., Wensing T., Groot Bruinderink G.W.T.A. (1994). “Heavy metal contaminations in organs of red deer (*Cervus elaphus*) and wild boar (*Sus scrofa*) and the effect on some trace elements”. THE SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT, 144:191-199.
- Zaias J., Norton T., Fickel A., Spratt J., Altman N.H., Cray C.: Biochemical and hematologic value for 18 clinically healthy radiated tortoises (*Geochelone radiata*) on St Catherines Island, Georgia. Vet. Clin. Pathol. 2006; 35 (3): 321- 325.

Sitografia

- [www. Itis.Gov](http://www.Itis.Gov) (Integrated Taxonomic *Information* System)
- www.aae.it
- www.IUPAC.It

CAPITOLO 2

CONTAMINANTI IN ESEMPLARI URBANI DI CHIROTTERI DEL GENERE *TADARIDA TENIOTIS*

INTRODUZIONE

I pipistrelli sono eccellenti indicatori di cambiamenti della qualità dell'habitat e del clima indotti dall'uomo. Risultano utili bioindicatori per i seguenti motivi: vivono a lungo, consumano tra il 40% e il 100% della propria massa corporea in ciascuna notte di caccia (Hickey e Fenton, 1996), alcune specie si alimentano di insetti come *Trichoptera*, che hanno stadi larvali in terreni dove possono accumularsi contaminanti derivanti da attività industriali (Brigham e Fenton, 1991). I pipistrelli spesso coabitano con l'uomo in habitat urbani e agricoli (es: *Tadarida teniotis*), (Brigham e Fenton, 1986) esponendosi ai potenziali contaminanti (Clark, 1981), legati all'urbanizzazione.

Molti pipistrelli svolgono funzioni vitali per l'ecosistema e il declino della popolazione dei pipistrelli spesso riflette un deterioramento dell'habitat che ha impatto negativo su un ampio gruppo di specie. Le popolazioni di pipistrelli mostrano risposte agli *stressors* ambientali che vanno da alterazioni della qualità dell'habitat a cambiamenti climatici. Nel maggio del 2008 il governo del Regno Unito ha adottato i pipistrelli come indicatori di biodiversità. Quando si indagano gli effetti di contaminanti ambientali è essenziale prendere in considerazione sia la dose che la biodisponibilità dell'inquinante. I livelli di contaminanti nei tessuti bersaglio e nell'ambiente dovrebbero essere determinati in qualsiasi studio tossicologico per poter fornire un collegamento tra l'inquinamento ambientale e gli effetti nell'organismo.

I livelli dei contaminanti, nei tessuti della fauna selvatica, sono comunemente nelle indagini eco tossicologiche, perché spesso forniscono una rappresentazione accurata dei contaminanti biodisponibili.

Le popolazioni di pipistrelli in molte parti del mondo stanno diminuendo. Sebbene molti fattori possono essere responsabili, è dimostrato che l'uso degli insetticidi organoclorurati è una delle cause. Quindi diversi studi hanno relazionano il declino delle popolazioni a quest'ultimi (Geluso *et al.*, 1976; Frank *et al.*, 1980; Hernandez *et al.*, 1993; Clark *et al.*, 1981).

Nell'ambiente, solo una porzione di contaminanti è disponibile per l'assorbimento, essendo quest'ultimo legato alle proprietà fisico-chimiche degli stessi. I metalli, per esempio, possono esistere in diversi stati di ossidazione che

possono avere effetti molto diversi. La maggior parte dei metalli, ad eccezione del piombo, sono trasportati dall'acqua. Tuttavia i cambiamenti di fattori fisici dell'acqua e dei sedimenti chimici, tra cui pH e l'attività microbica, possono alterare la disponibilità e quindi l'assorbimento dei metalli (Beijer e Jernelöv, 1979).

Molti contaminanti possono subire modificazioni durante il processo di deposizione che ne influenzano la biodisponibilità. Il mercurio, per esempio, può essere metilato durante la sua incorporazione nel sedimento trasformandosi in metilmercurio, che è più biodisponibile rispetto alla forma inorganica (Meyers-Schöne e Walton, 1994). La tossicità e la biodisponibilità dei metalli cationici bivalenti, tra cui Cd, Zn e Pb, possono essere ridotte per azione dei legami con i solfuri volatili nei sedimenti anossici (Ankley, 1996).

Un altro gruppo di contaminanti, i POPs (Persistent Organic Pollutants) rappresentano un gruppo di composti o classi di composti, per i quali sono stati stabilite a livello internazionale (Convenzione di Stoccolma, 2001), azioni mirate a ridurre e ad eliminare il loro rilascio nell'ambiente (Decisione 2006/507/CE). Le agenzie governative preposte alla protezione della salute pubblica e dell'ambiente hanno avviato da anni programmi di studio e monitoraggio dei livelli della contaminazione del rischio associato alla loro diffusione nel pianeta (Swedish Environmental Protection Agency, 1998). Tra i 12 POP messi al bando ci sono: insetticidi come l'HCB, aldrin, dieldrin, endrin, eptacloro, clordano, DDT, mirex e toxafene, prodotti industriali (PCB) e prodotti secondari non desiderati (PCDD/F) (www.pops.int). A questi vanno aggiunti l'acido perfluoro-ottan-sulfonico (PFOS) e l'acido perfluoro-ottanoico (PFOA), composti chimici fluorurati con proprietà tensioattive che appartengono alla famiglia delle sostanze perfluoroalchiliche (PFAS). Analogamente ai pesticidi organoclorurati e ai PCB anche i metalli pesanti sono conosciuti per essere tossici e persistenti (Fowler, 1992; Domingo, 1994) e sono introdotti nell'ambiente attraverso processi naturali e antropogenici principalmente legati alla combustione di combustibili fossili, additivi industriali e usati da vari mezzi di trasporto che li rilasciano sotto forma di emissioni.

Il nostro interesse è stato rivolto ad una colonia urbana di pipistrelli del genere *Tadarida teniotis*, localizzata nel quartiere Africano di Roma. Questi chiroteri, in particolare gli esemplari più giovani, dal 2005 sono sotto stretto controllo da

parte dei volontari della Lipu a causa di un aumento di decessi, un aumento dei giovani caduti al suolo prima dell'involto e alla presenza di deformità e fragilità ossee, con conseguente impossibilità dei giovani sopravvissuti di essere rimessi in libertà. Gli obiettivi del nostro studio sono stati quindi quelli di valutare la concentrazione di diversi contaminanti, tra cui macro e micro elementi, diossine (PCDD/F), policlorobifenili (PCB DL e NDL) e sostanze perfluoroalchiliche (PFOS e PFOA) nella carcassa e in alcuni tessuti ai fini di valutare:

- il possibile livello di contaminazione in relazione all'habitat;
- la prevalenza e/o il rapporto delle classi di contaminanti;
- l'eventuale collegamento con le manifestazioni cliniche.

CENNI DI BIOLOGIA DI *TADARIDA TENIOTIS*

In Italia sono attualmente presenti 34 specie di chiroteri appartenenti a 4 famiglie: quattro Rinolofidi, un Miniotteride, un Molossidae e i restanti 28 tutti Vespertilionidi.

La famiglia Molossidae, è la quarta più grande famiglia di pipistrelli si compone di circa 100 specie suddivise in 16 generi (Simmons, 2005).

Il Molosso di Cestoni (*Tadarida teniotis*, RAFINESQUE, 1814) è un pipistrello della famiglia dei Molossidi. Secondo la nuova “Lista Rossa” IUNC (Lista Rossa nazionale dei mammiferi), appartiene alla categoria delle specie a “rischio minimo”. Il Molosso di Cestoni rientra nell’allegato IV della Direttiva “Habitat” (92/43/EEC), come specie di importanza comunitaria.

È presente su tutto il territorio nazionale italiano. È inoltre presente in Europa meridionale, Svizzera, nord Africa e Balcani, medio Oriente fino a Buthan, Nepal e India (Figura 1.1).

È una specie piuttosto elusiva, di grandi dimensioni che si trova sia in aree costiere sia montane e si distingue da tutti gli altri chiroteri italiani per avere una coda lunga non compresa all’interno della membrana alare. Questa caratteristica non è ben evidente nell’animale in volo (Figura 1.3), bensì nell’animale fermo. Ha grandi occhi e orecchie unite alla base (Lanza, 1954; Vernier, 1997).

Si rifugia in grotte o nelle fessure di pareti rocciose (Figura 1.2); a volte è possibile trovarlo anche nei centri abitati, in vecchie torri, campanili, grattacieli, palazzi moderni o nelle “intercapedini tra due palazzi” (Roma, dal 2005). Le dimensioni dell’avambraccio variano da 57 a 65 mm ed il peso tra 25 e 50 grammi. Le nascite avvengono tra fine giugno e inizio luglio. Le femmine partoriscono un unico giovane, indipendente dopo 6-7 settimane. Le attività di caccia avvengono prevalentemente in volo, ad altezze elevate. A volte caccia al di sopra di grandi fari, come quelli degli stadi. Caccia anche sul mare. Si possono osservare in caccia anche d’inverno. La dieta è costituita da insetti quali ditteri e lepidotteri notturni, soprattutto falene. Può arrivare a cacciarne parecchie centinaia in una notte.

I pipistrelli sono i primi veri mammiferi volanti, e ciò grazie a una speciale modificazione dell’arto anteriore le cui ossa metacarpali, si allungano come i

raggi di un ombrello. Il margine anteriore è sorretto dall'omero, dal radio e dal secondo e terzo dito della mano. Un'ala allungata e stretta, come quella di una rondine è un adattamento per un volo veloce ed efficace, quest'ultima si riscontra in pipistrelli che utilizzano gli spazi aperti e liberi per il volo e la caccia (es: nottole e molosso di Cestoni). Il Molosso di Cestoni è uno dei pochi pipistrelli che durante la caccia non emette ultrasuoni ma suoni udibili che possono essere percepiti dall'orecchio umano (frequenze di 9 – 13 KHz), (Russo, 2013).

La vita media è stimata in circa 20 anni. Una delle stranezze dei chiroterteri è loro lunga vita. Solitamente specie di piccole dimensioni vivono meno rispetto a quelle di dimensioni maggiori. Un aspetto che potrebbe influenzare la longevità, è la durata del letargo: i pipistrelli che vanno in letargo vivono in media 6 anni di più rispetto a quelli che non lo fanno (es: specie che vivono ai tropici). Il letargo gli permetterebbe di superare periodi in cui scarseggiano le prede e li sottrarrebbe dal rischio di cadere vittima di predatori. Il letargo è comunque un periodo fisiologico complesso in cui molti esemplari muoiono. La maturità sessuale viene raggiunta a circa un anno di età. L'accoppiamento e la fecondazione non sono contemporanei, possono verificarsi a distanza di mesi. Solo al termine del letargo, la femmina ovula e gli spermatozoi possono fecondare la cellula uovo. La gestazione dura circa due mesi. Il tasso riproduttivo è piuttosto basso. I parti avvengono in colonie riproduttive, note come "nursery", che si formano in primavera. Alla nascita i piccoli sono privi di pelo e inetti. Il neonato pesa fino al 40% del peso corporeo della madre, è come se una donna di 50 Kg partorisce un neonato di 20 Kg. Inoltre, caso unico tra i mammiferi placentati, nei pipistrelli l'allattamento porta il piccolo al raggiungimento di una taglia pari almeno al 70% del peso dell'adulto e al 90% e oltre delle dimensioni delle ali (Russo, 2013). Dalle colonie "nursery" possono spostarsi dopo lo svezzamento e compiere migrazioni, in rifugi ritenuti più idonei per svolgere il letargo. È un specie piuttosto stanziale che può però compiere anche 50 km di distanza dal proprio rifugio.

Figura 1.1: Distribuzione geografica di Tadarida teniotis



<http://commons.wikimedia.org>

Figura 1.2: Tadarida teniotis in una fessura



Figura 1.3: Tadarida teniotis durante un volo



1. CONSERVAZIONE E LEGISLAZIONE

La fauna selvatica autoctona è soggetta a particolari tutele volte sia a preservare la sua peculiarità che il suo ambiente, ai sensi della Legge 11 febbraio 1992, n. 157, “Norme per la protezione della fauna selvatica omeoterma e per il prelievo venatorio”. Molte di queste norme si occupano dei chiroteri:

- Convenzione di Berna (1979) ratificata con la Legge 503/1981, l’Allegato II elenca le specie animali strettamente protette: tra i Chiroteri italiani solo il *Pipistrellus pipistrellus* viene escluso da questa rigorosa protezione.

- Convenzione di Bonn (1979), ratificata con Legge 42/1993 che ha come obiettivo la conservazione delle specie migratrici. Sono compresi alcuni chiroteri quali *Tadarida teniotis* e alcune popolazioni europee delle specie migratrici del genere *Rhinolophidae* e *Vespertilionidae*. Per effetto della Convenzione, si è arrivati alla stesura dell’Accordo sulla conservazione delle popolazioni di chiroteri europei (Londra, 1991), l’Italia ha ufficialmente sottoscritto tale Accordo aderendo così alla Convenzione “EUROBATS” con la Legge 104/2005.

- Direttiva 92/43/CEE, Consiglio del 21 maggio 1992 (Direttiva Habitat), relativa alla conservazione degli habitat (attuata col D.P.R. n. 357/1997, modificato e integrato dal D.P.R. 120/2003).

- Convenzione di Rio de Janeiro (1992) relativa alla conservazione della diversità biologica, approvata in Europa con la Decisione del Consiglio 93/626/CEE e resa esecutiva in Italia dalla Legge 124/1994.

È importante notare come le normative non tutelino soltanto gli individui, vietandone la detenzione, la cattura o l’uccisione, ma proteggendo i loro habitat e i loro rifugi.

2. MATERIALI E METODI

2.1. AREA DI STUDIO E CAMPIONI BIOLOGICI

Sono stati impiegati chiroterteri del genere *Tadarida teniotis* prelevati in colonie localizzate in ambienti urbani. Gli animali erano tutti lattanti. L'alimentazione era costituita da latte materno. Gli esemplari sono stati recuperati dalla Lipu di Roma e deceduti poco dopo il loro recupero.

La colonia oggetto di questo studio è localizzata in una fessura tra due palazzi (figura 3.1.2), nel periodo primavera-estate (in coincidenza con le nascite) è costantemente monitorata dai volontari della Lipu. Questi ultimi hanno segnalato crescenti difficoltà nel rimettere in libertà gli esemplari ricoverati a causa di deformità e fragilità ossea, che impediscono loro di volare in concomitanza con un aumento degli animali caduti a terra prima dell'involo. Si sa poco a proposito dell'attività migratoria degli esemplari oggetto di questo studio. La colonia esaminata è una colonia "nursery", non è certo se quest'ultima venga occupata dagli stessi anche durante il periodo invernale (letargo).

Il campionamento è stato effettuato negli anni 2010 (n=222 animali), 2011 (n=189 animali) e 2012 (n=213 animali) da via Migiurtina (quartiere Africano, Roma, colonia A), come riportato nella figura 3.1.1. In sede autoptica, per ogni esemplare è stata compilata una scheda informativa indicante il luogo di provenienza, il sesso, l'età, peso, la presunta causa di morte, rilievi anatomopatologici (3.1.4). Sono stati scelti in maniera casuale 60 esemplari ricevuti nell'anno 2011 (30 maschi e 30 femmine) e suddivisi in 6 pool di 10 animali ciascuno (Figura 3.1.3). Su ogni pool sono stati esaminati i seguenti contaminanti: Diossine (PCDD/F), Policlorobifenili (DL-PCB e NDL-PCB), sostanze perfluoroalchiliche (PFOS e PFOA), elementi essenziali e non essenziali (Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Sn, Sr, Th, Tl, V, Zn). Per quanto riguarda l'analisi della distribuzione degli elementi essenziali e non essenziali, abbiamo impiegato ulteriori 30 esemplari, scelti casualmente nei tre anni di campionamento (10 per ogni anno) e analizzati singolarmente. Da ogni animale sono stati prelevati fegato, rene ed ossa dell'intero arto anteriore. Gli organi sono stati congelati a -20°C fino al momento delle analisi. In aggiunta a questi 30 animali, sono stati analizzati 3 esemplari ricevuti nel 2010 e provenienti

da altre colonie del Lazio: da Velletri (colonia C), da Latina (colonia D) e dalla stessa Roma (via Passera, colonia B). Anche questi ultimi sono stati analizzati singolarmente per elementi essenziali e non essenziali nei vari organi bersaglio (fegato, rene e ossa dell'intero arto anteriore).

Figura 3.1.1: Localizzazione delle due colonie urbane di Roma



Figura 3.1.2. Fessura in cui è allocata la colonia A



Figura 3.1.3: *Esemplare di Tadarida teniotis (A) impiegato nella formazione del pool (B), liofilizzato e accuratamente omogenato (C)*

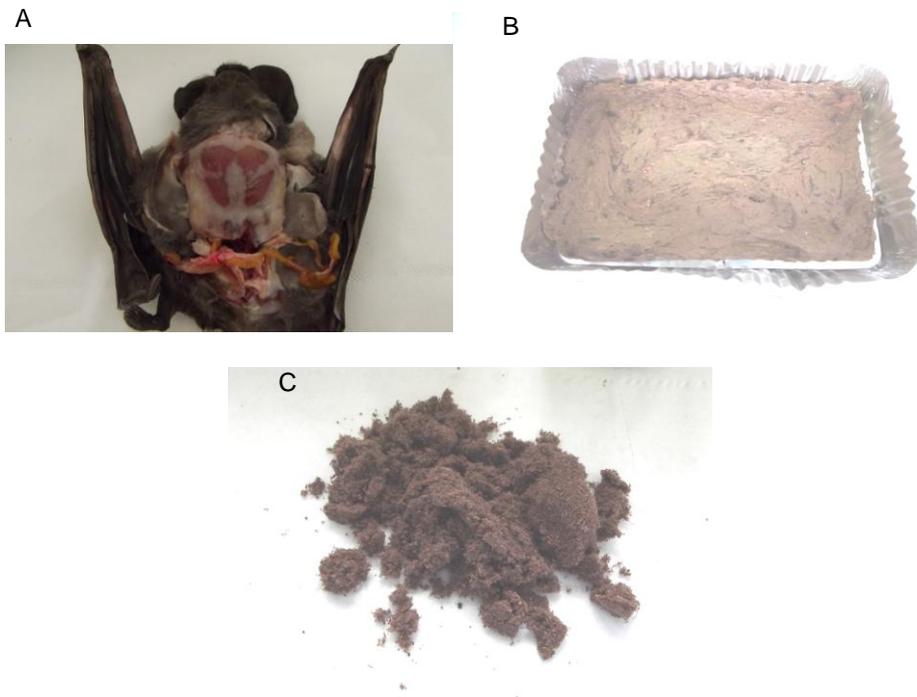
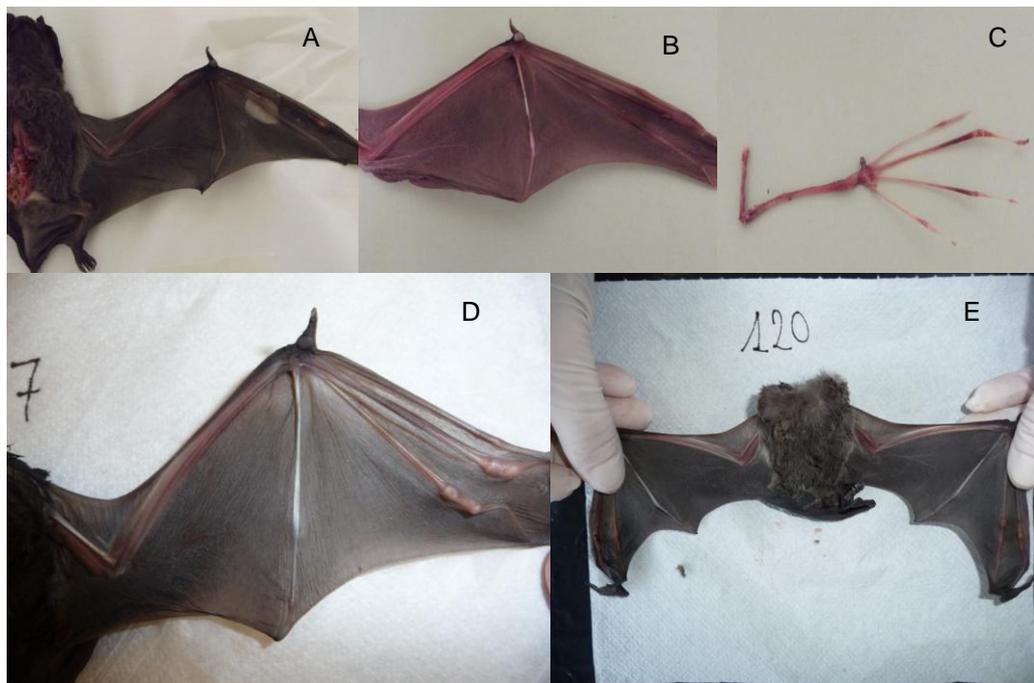


Figura 3.1.4 Ala di *Tadarida teniotis* provenienti dalla colonia A. (A). frattura radio-ulna; (B): frattura dei metacarpali; (C): arto anteriore preparato per analisi dei metalli (D), (E): noduli evidenti a livello di articolazioni



2.2. DETERMINAZIONE DEGLI ELEMENTI ESSENZIALI E NON ESSENZIALI

Il metodo prevedeva una determinazione quali-quantitativa di alcuni metalli (Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Sn, Sr, Th, Tl, V, Zn) mediante spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP/MS). I campioni sono stati sottoposti a mineralizzazione per via umida con acido nitrico concentrato, i mineralizzati sono stati poi portati ad opportuno volume con soluzione acida ed analizzati mediante ICP-MS.

L'analisi dei campioni di fegato, rene, osso e carcassa, è stata condotta su quantitativi di tessuto fresco accuratamente omogenato (pool costituito da 10 esemplari) o dell'intero organo del singolo esemplare. Il campione è stato posto in tubi ("Digitubes") addizionati di HNO₃ concentrato. In seguito sono stati sottoposti a processo digestivo con applicazione di calore umido mediante Digestore aperto tipo Digi-Prep (SCP-Science) tarato a temperatura di 75 °C. Questo procedimento prevede una mineralizzazione della matrice organica a 75°C per 12 ore.

Al termine del processo digestivo i campioni sono stati portati ad opportuno volume per aggiunta di acqua deionizzata. Le soluzioni ottenute sono state diluite con una soluzione acquosa di acido nitrico al 2% con 0,5% di acido cloridrico.

Per ogni serie di analisi è stato mineralizzato un bianco trattato come i campioni e un materiale di riferimento certificato o a titolo noto. L'esito di tale lettura doveva essere pari al valore nominale \pm l'incertezza di misura definita per il metodo stesso.

Per la determinazione analitica è stata utilizzata la tecnica della spettrometria di massa con sorgente al plasma (ICP-MS). È stato impiegato uno spettrometro di massa con sorgente al plasma (ICP-MS) modello 7700 a, Agilent HP interfacciato ad un autocampionatore, modello ASX-500, CETAC. Attraverso l'impiego di questa tecnica è possibile determinare la composizione elementare inorganica delle matrici biologiche presente in matrici differenti. Il campione subisce processi di nebulizzazione, decomposizione termica delle molecole in ioni, estrazione degli ioni nello spettrometro di massa, selezione degli ioni a seconda del rapporto massa/carica ed infine rivelazione degli ioni con elettromoltiplicatore.

La concentrazione dei vari elementi è stata determinata per interpolazione con la curva di calibrazione. La calibrazione dello strumento è stata effettuata mediante la lettura di standard esterni. Il calcolo quantitativo della concentrazione C (espressa in mg/kg) si ottiene dalla seguente formula:

$$C(\text{mg/kg}) = \frac{[\text{metallo (ng/ml)}] \times V1 \times V2}{\text{Peso} \times 1000}$$

Dove:

V1= fattore relativo alla diluizione operata

V2= eventuale successiva diluizione

La quantificazione è stata effettuata sull'isotopo più abbondante. La specificità caratteristica della spettrometria di massa e la possibilità di effettuare automaticamente l'analisi in presenza ed in assenza di gas ausiliario (elio) ha permesso la completa eliminazione di eventuali interferenti derivanti dalle matrici e dalla ionizzazione del plasma. I risultati sono stati espressi in mg/kg peso fresco, come richiesto dalla Legislazione Europea per gli alimenti (Regolamento UE 1881/2006 e Regolamento CE n. 333/2007).

Il limite di rilevabilità, calcolato sperimentalmente all'interno della validazione è stato fissato a 0,005 mg/kg. Il limite di quantificazione è pari a 0,005 mg/kg per ciascun elemento sottoposto ad analisi.

2.3. DETERMINAZIONE DELLE DIOSSINE E DEI PCB

I tessuti sono stati preparati ed analizzati secondo il metodo EPA 1613/B (1994) per la determinazione dei 17 congeneri 2,3,7,8 sostituiti di PCDD e di PCDF mediante diluizione isotopica con l'aggiunta di 15 standard interni e 2 standard di recupero. Gli stessi campioni sono stati analizzati per la determinazione dei 12 congeneri di PCB-DL e i sei congeneri di PCB-NDL (PCB indicatori: 28, 52, 101, 153, 138, 180) secondo il metodo EPA 1668/B (2008) che prevede l'impiego di 12 standard interni, 3 standard di purificazione e 3 standard di recupero marcati al $^{13}\text{C}_{12}$.

I recuperi degli standard interni rispettano le caratteristiche richieste degli specifici metodi di analisi. Entrambe le procedure sono state conformi alle indicazioni del Regolamento CE n. 252/2012. Sono state inoltre analizzate per

ogni serie di campioni, un bianco per evidenziare eventuali contaminazioni dei processi di estrazione e purificazione al fine di garantire una validità del dato analitico. Attraverso l'impiego delle metodiche ufficiali EPA è stato possibile eliminare le eventuali interferenze di pesticidi o altri contaminanti.

Ogni pool (costituito da 10 esemplari) opportunamente omogeneizzato, è stato liofilizzato e sottoposto alla metodica analitica per la ricerca ed il dosaggio di PCDD/F, DL-PCB e NDL-PCB.

Il campione liofilizzato è stato addizionato con terra di diatomee come fase disperdente e con le miscele di standard interni marcati per le diossine e i PCB contenenti rispettivamente i 2 congeneri di PCB marcati e i 2 congeneri di PCDD/F 2,3,7,8 sostituiti marcati al C¹³. Il preparato così ottenuto è stato sottoposto ad estrazione della frazione lipidica mediante estrattore ASE. La purificazione e la separazione in classi di composti è stata ottenuta mediante il passaggio attraverso tre tipi di purificazioni in colonne di silicio/ allumina e carbone attivo. Power- Il metodo di purificazione è basato su cromatografia ad adsorbimento solido-liquido.

La determinazione analitica è avvenuta mediante iniezione gascromatografica (gascromatografo HP 6890 Plus, HRGC) interfacciato ad uno spettrometro di massa ad alta risoluzione (Autospec Micromass, HRMS). La risoluzione dello spettrometro di massa è > 10.000 al 5% dell'altezza dei picchi della soluzione di riferimento (PFK) presenti nelle funzioni di acquisizione. La determinazione quali-quantitativa è stata effettuata mediante diluizione isotopica come previsto dai metodi EPA 1613/94 ed EPA 1668/08. I risultati sono stati espressi in pg/g di grasso, pg/g peso fresco (TQ) e WHO-TEQ utilizzando OMS-TEF (2005), per diossine e PCB-DL, e ng/g di grasso per i PCB-NDL come richiesto dalla Legislazione Europea (Regolamento UE 1259/2011) negli alimenti.

2.4. DETERMINAZIONE DELLE SOSTANZE PERFLUORAALCHILICHE (PFOa/PFOs)

È stata effettuata una determinazioni quali-quantitativa di alcune sostanze perfluoroalchiliche [acido perfluoroesanoico (PFHxA), acido perfluoroeptanoico (PFHpA), acido perfluorooottanoico (PFOa), acido perfluorodecanoico (PFNoA),

acido perfluorobutansolfonico (PFBS), acido perfluoroesansolfonico (PFHxS) e acido perfluorooctansolfonico (PFOs)] mediante cromatografia liquida con rivelatore di massa a triplo quadruplo (LC-MS/MS) in alimenti di origine animale e vegetale. Il metodo di analisi è applicabile per concentrazioni superiori a 1 µg/Kg per PFOA e PFOS in conformità alla Raccomandazione della Commissione Europea 17/03/2010 e a concentrazioni superiori a 10 µg/Kg tutte le altre.

La ricerca di sostanze perfluoroalchiliche ha previsto una fase di omogeneizzazione del campione, una fase di estrazione in soluzione acquosa acida, una fase di purificazione mediante coloninne SPE e successivamente analisi in LC-MS/MS.

L'identificazione e la quantificazione di ciascuna sostanza perfluoroalchilica analizzata è stata effettuata valutando il tempo di ritenzione, i frammenti ionici prodotti e il rapporto ionico.

Ciascun acido perfluoroalchilico eventualmente presente è stato quantificato sulla base del recupero del relativo standard interno, a sua volta valutato sulla base dello standard di iniezione.

2.5. ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica dei risultati è stata effettuata usando il sistema statistico MedCalc® versione 12.5 (Ostenda, Belgio). Per quei dati i cui valori analitici fossero risultati inferiori al LOQ, per i soli fini statistici, veniva sostituito un valore pari alla metà del LOQ stesso, al fine di poter eseguire l'analisi statistica su tutti i dati disponibili. Si è provveduto ad eseguire una prima analisi descrittiva dei dati attraverso la valutazione di media, deviazione standard, minimo e massimo. La normalità delle variabili è stata valutata con il Test D'Agostino-Pearson. Per valori di P maggiori di 0,005 è stato ritenuto che i dati avessero una distribuzione normale.

3. RISULTATI

3.1. DATI BIOMETRICI

Sono state inclusi in questo studio 93 esemplari di *Tadarida teniotis*, tra questi, 60 (campionati nel 2011) sono stati impiegati per le analisi degli elementi chimici nella carcassa in toto. Dei rimanenti 33 esemplari, analizzati singolarmente, prendendo in considerazione tre tessuti (fegato, rene e ossa), 30 provengono dalla colonia A (quartiere Africano, via Mingiurtina), e sono stati campionati negli anni 2010, 2011, 2012 (Tabella 3.1.1), mentre gli ultimi tre provengono da colonie diverse: via Passera (Roma), Velletri e Latina e sono stati campionati nel 2010.

Il peso e la data di campionamento sono riportati in tabella 3.1.2 e 3.1.3. Tutti gli esemplari avevano un'età stimata tra le 4 e le 8 settimane, trattandosi tutti di soggetti giovani non svezzati. La massa corporea, degli esemplari costituenti i pool e i singoli animali sono riportati in Tabella 3.1.2. La massa corporea degli esemplari presenta distribuzione normale (Grafico 3.1.1, A e B).

Tabella 3.1.1: Riepilogo degli gli esemplari utilizzati per le analisi dei macro e micro elementi, distinti per sesso, tipologia di preparazione e anno di campionamento

esemplari analizzati		COLONIA_A
		Q.re Africano
2010	MASCHI	4
	FEMMINE	6
	Totale	10
2011	MASCHI	5 singoli + 30 in pool
	FEMMINE	5 singoli + 30 in pool
	Totale	70
2012	MASCHI	5
	FEMMINE	5
	Totale	10

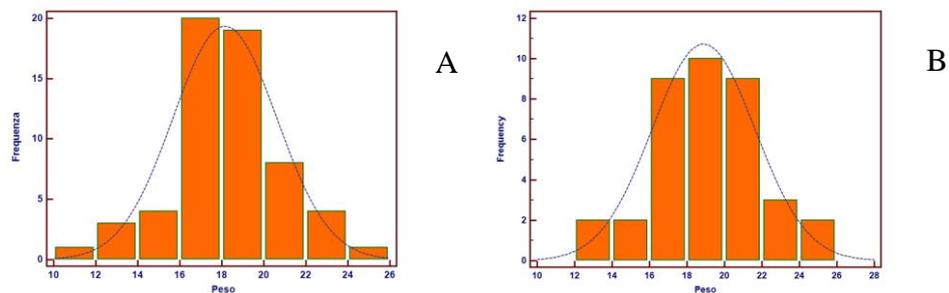
Tabella 3.1.2: Elenco dei pesi degli esemplari di chiroterro impiegati nella formazione dei pool (COLONIA A – 2011)

n. pool	Media peso (10 esemplari)	Min	Max	SD	SESSO	Data decesso
1	18,75	14,7	22,9	2,3	M	2011
2	18,249	15,8	24,09	2,4	M	2011
3	19,48	17,5	23	2,1	M	2011
4	18,42	15,8	22,8	2,1	F	2011
5	17,69	13,6	20,3	1,9	F	2011
6	16,245	11,7	20,2	3,1	F	2011

Tabella 3.1.3: Elenco dei pesi dei singoli esemplari di *Tadarida teniotis* analizzati per la determinazione di macro e micro elementi

Pesi singoli esemplari (gr)		COLONIA_A Q.re Africano peso medio \pm SD
2010	Maschi	19,5 \pm 1,29 (n=4)
	Femmine	19,1 \pm 2,5 (n=6)
	totale	17,7 \pm 2,21 (n=10)
2011	Maschi	18,6 \pm 2,1 (n=5)
	Femmine	15,9 \pm 2,2 (n=5)
	totale	17,2 \pm 2,6 (n=10)
2012	Maschi	19,6 \pm 2,01 (n=5)
	Femmine	20,8 \pm 2,8 (n=5)
	totale	20,2 \pm 2,4 (n=10)

Grafico 3.1.1: Distribuzione del peso nei pipistrelli (n=60) impiegati nella formazione del pool (A); e dei pipistrellii (n=30) impiegati singolarmente (B).



3.2. ELEMENTI ESSENZIALI E NON ESSENZIALI IN *TADARIDA TENIOTIS*

Le concentrazioni dei vari elementi determinate sulle carcasse di 60 esemplari riuniti in 6 pool sono riportate in tabella 4.2.1. Le concentrazioni dei vari elementi determinate nei tessuti bersaglio (fegato, rene ed osso) dei singoli esemplari della colonia A (anno di campionamento 2010, 2011, 2012) sono riportati rispettivamente nelle tabelle 4.2.3, 4.2.4, 4.2.5. Si riportano i valori medi della colonia A nei tessuti bersaglio, durante il triennio (Tabella 4.2.6). Tra gli elementi essenziali, il Mg è quello che presenta le concentrazioni più elevate sia nella carcassa che in tutti gli altri tessuti esaminati, in particolare nell'osso (1122 mg/kg). Per quanto riguarda gli altri elementi essenziali, le concentrazioni risultano tessuto specifiche ad esempio nel fegato essi presentano il seguente ordine decrescente, $Zn > Cu > Mn > Se > Mo$.

Per quanto riguarda gli elementi non essenziali, alcuni come Cd e Th presentano in tutti i tessuti esaminati valori quasi sempre inferiori al LOQ, altri come As, Cr, Hg, Sb, Sn valori di poco superiori ($< 0,1$ mg/kg). Per gli altri abbiamo riscontrato valori molto elevati di Al, Sr; Pb.

Per i tessuti il piombo è risultato l'elemento non essenziale presente in concentrazioni più elevate (65 mg/kg fegato, 5,6 mg/kg rene), mentre l'osso sembra l'organo bersaglio più ricco di elementi non essenziali tra questi alluminio (6,3 mg/kg), stronzio (68 mg/kg) e piombo (168 mg/kg), nel triennio. Il grafico 4.2.1 riporta la distribuzione di Pb nei tre tessuti osservati (fegato, rene e ossa). Non si osservano variazioni legate all'anno di campionamento. Al presenta concentrazioni più elevate in rene e ossa rispetto al fegato. Le concentrazioni dei metalli negli esemplari provenienti da altre colonie, sono riportati in tabella 4.2.2.

Tabella 3.2.1: Concentrazione di elementi essenziali e non essenziali nei pool di *Tadarida teniotis*

Analiti	POOL 1	POOL 2	POOL 3	POOL 1	POOL 2	POOL 3	media ± SD	min - max
	(10 maschi)	(10 maschi)	(10 maschi)	(10 femmine)	(10 femmine)	(10 femmine)		
	mg/Kg (w/w)						mg/Kg (w/w) ± SD	mg/Kg (w/w)
As	0,06	0,07	0,05	0,04	0,05	0,07	0,05 ± 0,01	0,043 - 0,072
Al	63,41	68,24	61,13	59,47	75,73	83,20	68,52 ± 9,3	59,47 - 83,20
Cd	0,01	0,01	< LOQ	< LOQ	0,01	0,01	0,005 ± 0,001	< 0,005 - 0,006
Co	0,03	0,03	0,02	0,02	0,03	0,04	0,02 ± 0,01	0,022 - 0,037
Cr	0,42	0,48	0,26	0,23	0,31	0,47	0,36 ± 0,1	0,234 - 0,476
Cu	4,31	4,59	3,65	3,36	4,02	5,36	4,21 ± 0,7	3,36 - 5,36
Hg	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,03	0,024 ± 0,004	0,017 - 0,029
Mg	370,17	357,49	358,44	359,33	363,34	375,26	364,00 ± 7,2	357,48 - 375,25
Mn	1,59	1,70	1,44	1,25	1,56	1,99	1,58 ± 0,3	1,24 - 1,99
Mo	0,16	0,16	0,11	0,09	0,11	0,20	0,13 ± 0,04	0,091 - 0,196
Ni	0,29	0,34	0,23	0,25	0,29	0,36	0,29 ± 0,1	0,231 - 0,362
Pb	42,44	38,10	31,86	32,92	34,38	49,96	38,276 ± 6,91	31,86 - 49,95
Sb	0,08	0,11	< LOQ	0,03	0,03	0,14	0,065 ± 0,05	< 0,005 - 0,138
Se	0,36	0,36	0,28	0,31	0,32	0,38	0,33 ± 0,04	0,275 - 0,383
Sn	0,25	0,20	0,16	0,13	0,14	0,32	0,199 ± 0,07	0,125 - 0,318
Sr	12,08	9,69	10,69	10,77	10,73	11,74	10,95 ± 0,85	9,69 - 12,08
Th	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04	0,06	0,044 ± 0,01	0,035 - 0,056
Tl	0,09	0,11	0,11	0,13	0,14	0,13	0,118 ± 0,02	0,090 - 0,137
V	2,22	2,07	1,44	1,50	2,12	2,55	1,98 ± 0,4	1,44 - 2,55
Zn	36,76	33,82	29,51	27,75	28,46	35,25	31,92 ± 3,8	27,75 - 36,76

Tabella 3.2.2: Concentrazione di elementi essenziali e non essenziali nei tre esemplari di *Tadarida teniotis* provenienti da colonie diverse

Elementi	Colonia B – VIA PASSERA (RM)			colonia C – LATINA			colonia D – VELLETRI		
	FEGATO (n=1)	RENE (n=1)	OSSA (n=1)	FEGATO (n=1)	RENE (n=1)	OSSA (n=1)	FEGATO (n=1)	RENE (n=1)	OSSA (n=1)
	mg/kg w/w			mg/kg w/w			mg/kg w/w		
Al	0,91	< LOQ	6,34	0,74	< LOQ	8,20	< LOQ	< LOQ	0,27
As	0,03	0,02	0,07	0,02	0,01	0,07	< LOQ	< LOQ	0,01
Cd	0,02	0,02	< LOQ	0,02	0,01	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Co	0,02	0,01	0,22	0,02	0,01	0,18	< LOQ	0,01	0,07
Cr	0,01	0,02	0,59	0,02	0,08	0,46	< LOQ	0,01	0,26
Cu	7,82	5,10	0,94	9,47	5,57	0,85	5,25	5,23	0,92
Hg	0,17	0,15	0,01	0,22	0,14	0,02	0,03	0,03	0,01
Mg	293,65	262,85	2273,17	365,17	314,60	2081,68	178,79	163,84	982,02
Mn	5,64	1,32	0,78	4,52	1,39	0,74	0,93	0,47	0,47
Mo	0,46	0,32	< LOQ	0,65	0,32	< LOQ	0,14	0,13	< LOQ
Ni	0,04	0,09	1,65	0,05	0,11	1,25	0,03	0,05	0,49
Pb	2,44	0,34	100,83	1,08	0,25	5,68	0,09	0,02	0,27
Sb	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Se	1,15	1,05	0,41	0,94	0,70	0,23	0,50	0,52	0,20
Sn	< LOQ	< LOQ	0,06	< LOQ	< LOQ	0,06	< LOQ	< LOQ	0,03
Sr	0,43	0,25	155,82	0,49	0,39	102,35	0,25	0,22	39,61
Th	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,01	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Tl	0,26	0,26	0,28	0,03	0,01	0,03	0,05	< LOQ	0,02
V	0,03	0,04	0,01	0,04	0,08	0,01	0,01	0,04	0,00
	52,23	28,40	67,09	49,51	26,05	59,34	21,74	21,48	32,45

Tabella 3.2.3: Concentrazione di elementi essenziali e non essenziali nei singoli esemplari della colonia A, campionati nel 2010

ca	colonia A - QUARTIERE AFRICANO (2010)											
	FEGATO (N=10) M/F - 4/6				RENE (N=10) M/F - 5/5				OSSA (N=10) M/F - 5/5			
	Media	SD	Minimo	Max	Media	SD	Minimo	Max	Media	SD	Minimo	Max
	Mg/kg w/w				mg/kg w/w				mg/kg w/w			
Al	0,49	1,29	< LOQ	4,13	0,03	0,10	< LOQ	0,32	6,764 *	3,58	1,97	13,04
As	0,01	0,01	< LOQ	0,04	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,0212 *	0,00	0,02	0,03
Cd	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,01	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Co	0,0099 *	0,01	< LOQ	0,02	0,0072 *	< LOQ	< LOQ	0,01	0,0998 *	0,01	0,08	0,12
Cr	0,016 *	0,01	< LOQ	0,04	0,02 *	0,01	< LOQ	0,04	0,64	0,27	0,37	1,36
Cu	20,687 *	11,30	7,43	35,29	5,52	1,35	3,63	7,84	1,32	1,13	0,75	4,48
Hg	0,0224 *	0,01	0,01	0,04	0,014 *	0,00	0,01	0,02	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,01
Mg	250,7*	39,7	206,8	334,8	211,3 *	19,1	180,6	234,3	1206,3 *	120,0	1045,2	1464,6
Mn	2,211 *	0,63	0,92	3,21	0,676 *	0,14	0,43	0,87	0,47 *	0,11	0,25	0,60
Mo	0,164 *	0,05	0,09	0,27	0,182 *	0,04	0,12	0,25	0,01	0,03	< LOQ	0,10
Ni	0,05	0,04	0,03	0,17	0,10	0,07	0,05	0,29	0,84	0,21	0,65	1,39
Pb	62,017 *	31,22	21,15	126,86	4,038 *	1,15	2,72	6,17	144,461 *	54,74	79,25	219,55
Sb	0,00	0,01	< LOQ	0,02	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Se	0,52	0,12	0,39	0,83	0,68	0,15	0,46	0,84	0,258 *	0,03	0,22	0,32
Sn	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,0844 *	0,05	0,05	0,19
Sr	0,278 *	0,11	0,15	0,49	0,174 *	0,07	0,11	0,31	70,883 *	15,97	47,62	108,91
Th	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,01
Tl	0,23	0,20	0,09	0,77	0,13	0,10	0,05	0,34	0,0837 *	0,04	0,04	0,16
V	0,0368 *	0,03	< LOQ	0,11	0,03	0,03	< LOQ	0,10	0,0066 *	< LOQ	< LOQ	0,01
Zn	44,59 *	16,40	28,22	72,22	31,197 *	8,52	22,19	50,93	47,018 *	10,15	34,89	64,28

^a Parametri normalmente distribuiti ($P < 0.05$, test D'Agostino-Pearson)

Tabella 3.2.4: Concentrazione di elementi essenziali e non essenziali nei singoli esemplari della colonia A, campionati nel 2011

	colonia A - QUARTIERE AFRICANO (2011)											
	FEGATO (N=10)				RENE (N=10)				OSSA (N=10)			
	M/F - 5/5				M/F - 5/5				M/F - 5/5			
	Media	SD	Minimo	Max	Media	SD	Minimo	Max	Media	SD	Minimo	Max
	Mg/kg w/w			mg/kg w/w			mg/kg w/w					
Al	0,06	0,09	< LOQ	0,28	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	6,57	4,73	2,81	18,29
As	0,015 *	0,01	0,01	0,02	0,011 *	< LOQ	0,01	0,02	0,025 *	0,01	0,02	0,04
Cd	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,01	< LOQ	0,00	< LOQ	0,01	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Co	0,01	0,00	0,01	0,02	0,009 *	< LOQ	0,01	0,01	0,114 *	0,02	0,09	0,14
Cr	0,13 *	0,07	0,05	0,27	0,504 *	0,20	0,24	0,82	0,496 *	0,10	0,37	0,64
Cu	19,06*	12,86	4,39	43,70	5,751 *	2,24	3,62	9,66	1,04	0,25	0,80	1,65
Hg	0,02	0,01	0,01	0,04	0,01	0,00	0,01	0,02	0,01	< LOQ	< LOQ	0,01
Mg	256,23	28,75	217,08	286,80	212,02	34,46	172,20	291,92	1199,8 *	138,19	984,95	1435,41
Mn	1,97 *	0,44	1,30	2,73	0,771 *	0,19	0,57	1,17	0,48	0,15	0,36	0,86
Mo	0,183 *	0,05	0,12	0,27	0,176 *	0,06	0,11	0,29	0,01	0,02	< LOQ	0,07
Ni	0,090 *	0,02	0,06	0,13	0,2 *	0,06	0,11	0,30	0,865 *	0,13	0,69	1,07
Pb	58,61 *	22,80	22,14	96,30	5,687 *	3,21	2,63	12,21	192,6 *	60,49	88,71	282,37
Sb	0,037 *	0,03	0,00	0,09	0,01	0,01	0,00	0,02	0,00	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Se	0,569 *	0,08	0,47	0,73	0,709 *	0,10	0,56	0,88	0,298 *	0,04	0,24	0,35
Sn	0,86	0,65	0,29	2,46	0,93	0,69	0,32	2,22	0,06	0,08	0,02	0,27
Sr	0,53	0,55	0,20	2,06	0,28 *	0,05	0,21	0,35	70,50 *	17,12	50,04	102,36
Th	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,00	0,01	0,00	< LOQ	0,02
Tl	0,343 *	0,15	0,11	0,65	0,202 *	0,08	0,06	0,33	0,203 *	0,08	0,05	0,33
V	0,143 *	0,08	0,05	0,26	0,484 *	0,20	0,19	0,83	0,01	0,00	< LOQ	0,02
Zn	39,03 *	9,11	27,27	54,44	27,96 *	4,83	22,39	37,12	50,48 *	7,29	42,82	65,57

^a Parametri normalmnte distribuiti ($P < 0.05$, test D'Agostino-Pearson)

Tabella 3.2.5: Concentrazione di elementi essenziali e non essenziali nei singoli esemplari della colonia A, campionati nel 2012

	Colonia A - QUARTIERE AFRICANO (2012)											
	FEGATO (N=10) M/F - 5/5				RENE (N=10) M/F - 5/5				OSSA (N=10) M/F - 5/5			
	Media	SD	Minimo	Max	Media	SD	Minimo	Max	Media	SD	Minimo	Max
	mg/kg w/w											
Al	0,258	0,322	< LOQ	1,021	1,620	5,113	< LOQ	16,172	5,716 *	3,042	2,065	12,217
As	0,007 *	< LOQ	< LOQ	0,014	0,0064 *	0,005	< LOQ	0,017	0,0159 *	0,005	0,008	0,024
Cd	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,005	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Co	0,010 *	< LOQ	0,008	0,014	0,0101 *	< LOQ	0,007	0,014	0,0978 *	0,012	0,080	0,116
Cr	0,065 *	0,061	< LOQ	0,199	0,349 *	0,085	0,169	0,464	0,523 *	0,069	0,395	0,622
Cu	25,29 *	9,486	9,952	37,761	7,52 *	2,200	5,063	11,185	0,89 *	0,169	0,678	1,265
Hg	0,007 *	< LOQ	< LOQ	0,012	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,007	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Mg	256,12 *	40,51	198,98	318,22	199,39 *	19,26	157,49	224,21	961,455 *	120,21	737,46	1165,00
Mn	1,753 *	0,501	1,204	2,670	0,691 *	0,170	0,455	0,954	0,514 *	0,117	0,378	0,702
Mo	0,141	0,049	0,093	0,259	0,188	0,133	0,117	0,558	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Ni	0,058 *	0,013	0,046	0,083	0,135 *	0,024	0,089	0,169	0,753 *	0,092	0,620	0,882
Pb	76,57 *	24,79	33,73	120,85	7,301 *	3,18	3,55	11,73	168,167 *	32,89	109,88	225,80
Sb	0,013*	0,011	< LOQ	0,035	0,010	0,022	< LOQ	0,071	0,003	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Se	0,558 *	0,123	0,427	0,804	0,75 *	0,192	0,511	1,146	0,321 *	0,074	0,238	0,475
Sn	0,303	0,548	0,092	1,859	0,774	1,133	0,208	3,790	0,014	0,010	< LOQ	0,036
Sr	0,649	0,731	0,256	2,689	0,292 *	0,090	0,177	0,473	63,545	18,38 *	38,194	96,873
Th	0,003	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,005	0,007	0,003	0,026	< LOQ	0,002	0,003	0,007
Tl	0,0796 *	0,022	0,052	0,126	0,0529 *	0,018	0,026	0,077	0,034	0,015	0,015	0,052
V	0,079	0,079	< LOQ	0,265	0,386 *	0,120	0,188	0,624	0,0057*	< LOQ	< LOQ	0,012
Zn	47,06*	16,24	25,94	74,33	32,035 *	6,30	25,17	45,86	49,988 *	7,34	41,30	62,88

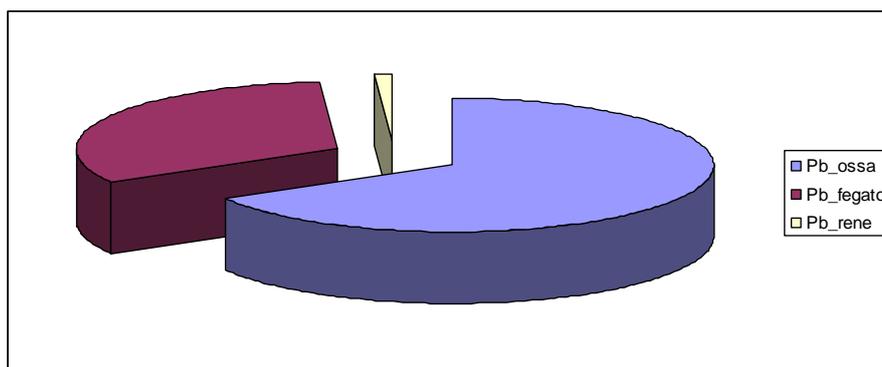
^a Parametri normalmnte distribuiti ($P < 0.05$, test D'Agostino-Pearson)

Tabella 3.2.6: Concentrazione di elementi essenziali e non essenziali nei singoli esemplari della colonia A, campionati nel triennio 2010-2011-2012

	colonia A - QUARTIERE AFRICANO											
	Mean	FEGATO (N=30)			Mean	RENE (N=30)			Mean	OSSA (N=30)		
		SD	Minimum	Maximum		SD	Minimum	Maximum		SD	Minimum	Maximum
	mg/kg w/w											
Al	0,269	0,765	< LOQ	4,132	0,553	2,951	< LOQ	16,172	6,350	3,74	1,970	18,286
As	0,012	0,008	< LOQ	0,041	0,007	0,005	< LOQ	0,019	0,021 *	0,01	0,008	0,039
Cd	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,010	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,005	< LOQ	ND	< LOQ	< LOQ
Co	0,010	< LOQ	< LOQ	0,020	0,009	< LOQ	0,005	0,014	0,104	0,02	0,080	0,141
Cr	0,074	0,074	< LOQ	0,269	0,291	0,239	LOQ	0,819	0,553	0,18	0,371	1,359
Cu	21,681	11,229	4,389	43,702	6,264	2,109	3,616	11,185	1,082	0,67	0,678	4,476
Hg	0,017 *	0,010	0,004	0,040	0,011	0,006	< LOQ	0,022	< LOQ	ND	< LOQ	0,008
Mg	254,37 *	35,52	198,98	334,87	207,58	25,14	157,49	291,92	1122,55*	168,28	737,46	1464,63
Mn	1,98 *	0,545	0,923	3,213	0,713	0,170	0,427	1,173	0,488	0,12	0,252	0,857
Mo	0,162 *	0,053	0,090	0,270	0,182	0,085	0,110	0,558	0,008	0,02	< LOQ	0,095
Ni	0,066	0,032	0,030	0,170	0,146	0,066	0,054	0,302	0,820	0,16	0,620	1,385
Pb	65,734	26,780	21,150	126,860	5,675 *	2,931	2,630	12,206	168,43 *	52,93	79,254	282,373
Sb	0,018	0,022	< LOQ	0,088	0,007	0,013	< LOQ	0,071	< LOQ	ND	< LOQ	< LOQ
Se	0,549 *	0,107	0,390	0,830	0,714 *	0,150	0,462	1,146	0,293	0,06	0,215	0,475
Sn	0,387	0,596	< LOQ	2,460	0,570	0,848	< LOQ	3,790	0,052	0,06	< LOQ	0,268
Sr	0,485	0,538	0,150	2,689	0,249	0,088	0,105	0,473	68,311 *	16,93	38,194	108,908
Th	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0,004	< LOQ	< LOQ	0,026	< LOQ	ND	< LOQ	0,019
Tl	0,216	0,177	0,052	0,770	0,128	0,094	0,026	0,339	0,107	0,09	0,015	0,330
V	0,086	0,078	< LOQ	0,265	0,301	0,236	< LOQ	0,830	0,006	ND	< LOQ	0,018
Zn	43,563 *	14,237	25,941	74,325	30,398	6,728	22,188	50,926	49,164 *	8,22	34,890	65,574

^a Parametri normalmente distribuiti ($P < 0.05$, test D'Agostino-Pearson)

Grafico 3.2.1: Distribuzione del Pb in fegato, rene, ossa degli esemplari campionati nel triennio 2010-2011-2012 (Colonia A)



3.3. DIOSSINE E PCB

Nelle tabelle 4.3.2 a 4.3.7, sono riassunti i risultati di PCB DL, PCB NDL, PCDD/F con il dettaglio delle concentrazioni di ciascun congenere riscontrato nei campioni; i valori sono espressi come tossicità (TEQ) e come somma dei singoli congeneri. I risultati sono espressi sia come concentrazione riferita alla frazione grassa che sul prodotto tal quale in quanto non sono definite né dal punto di vista normativo né scientifico, le modalità di espressione dei risultati.

I risultati ottenuti dall'indagine evidenziano che la contaminazione da PCDD/F espressa come media tra i 6 gruppi analizzati è elevata, con un livello massimo di 358 pg/g di grasso corrispondenti a 32 pg/g di grasso espressi come TEQ. Chiaramente lo stesso gruppo di pipistrelli presenta la maggiore contaminazione di PCDD/F espressa sull'animale tal quale (63 pg/g di grasso corrispondenti a 5 pg/g di grasso espressi come TEQ). La differenza di contaminazione da PCDD/F tra i 6 gruppi appare sostanzialmente ampia con una concentrazione minima di 171 e una massima di 358 pg/g di grasso.

I valori espressi come somma di PCDD/F + PCB-DL sono riportati nelle singole tabelle e riassunti in tabella 4.3.1: in questo caso tra i pool 1-3 maschi e pool 1-2 femmine, i livelli di contaminazione sono tra loro elevati ma omogenei (grafico 4.3.1). Il pool 3 femmine si differenzia decisamente dagli altri presentando una concentrazione più elevata (827331 pg/g di grasso corrispondenti a 120586 pg/g di grasso espressi come TEQ). La differenza tra i pool è sostanzialmente dovuta alla differenza in concentrazione di PCB DL (233 pg/g espressi come TEQ sulla frazione grassa).

Per i PCB NDL (6 congeneri indicatori) i livelli di contaminazione sono espressi solamente come concentrazione e non come TEQ. Anche in questo caso, così come per i PCB DL, la maggiore concentrazione (255 ng/g sul TQ) è stata riscontrata nel pool 3 femmine. Chiaramente la differenza di concentrazione di PCB (somma di PCB DL + PCB NDL) tra i 6 pool di pipistrelli risente del contributo di ciascuna classe e risulta ancora più marcata la differenza tra il pool 3 femmine e gli altri 5 pool considerati. La contaminazione media in PCB DL e NDL è di 1,36 µg/g di grasso

Tabella 3.3.1: Concentrazione di PCDD/F e PCB (DL e NDL) nei 6 pool

	% GRASSO	Somma PCDD/Fs		Somma Somma PCDD/Fs + DL PCBs		NDL PCBs		SOMMA DL PCBs+NDL PCBs
		Pg/g grasso	pg/g TQ	pg/g grasso	Pg/g TQ	ng/g di grasso	ng/gTQ	pg/g grasso
POOL 1_MASCHI	18,3	171,46	30,94	220026,9	39928,3	837,20	153,80	1057026,9
POOL 2_MASCHI	15,3	290,20	41,18	275748,1	39166,5	925,90	133,40	1201648,1
POOL 3_MASCHI	16,1	180,99	29,75	203212,1	33397,0	1048,90	174,20	1252112,1
POOL 1_FEMMINE	14,9	226,36	33,27	217266,4	32291,5	938,50	141,40	1155766,4
POOL 2_FEMMINE	17,5	358,17	63,01	231777,1	40775,6	918,40	162,40	1150177,1
POOL 3_FEMMINE	16,1	188,24	27,14	827331,2	120586,9	1537,20	225,90	2364531,2
MEDIA	16,4	235,90	37,55	329227,0	51024,3	1034,35	165,18	1363543,6

Grafico 3.3.1: Distribuzione della somma di PCDD/F e PCB nei 6 pool

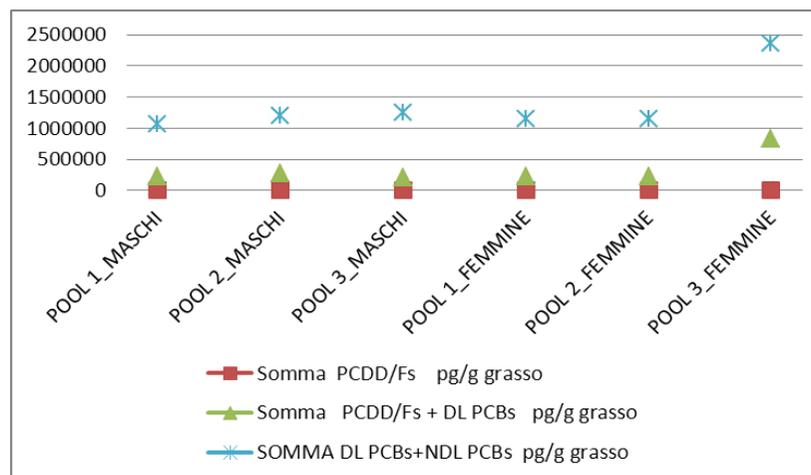


Tabella 3.3.2. Risultati dei vari congeneri di PCDD/F e PCB, del pool 1 (M)

		107186 (POOL 10 MASCHI)				
		Risultato espresso in pg/g grasso		Risultato espresso in pg/g TQ		
		pg/g grasso	TEQ pg/g	pg/g TQ	TEQ (pg/g TQ)	
		% GRASSO = 18,3				
PCDD/Fs	2,3,7,8-Tetraclorodibenzofurano	3,59	0,36	0,65	0,07	
	1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzofurano	4,84	0,15	0,88	0,03	
	2,3,4,7,8-Pentaclorodibenzofurano	30,83	9,25	5,60	1,68	
	1,2,3,4,7,8-Esaclorodibenzofurano	14,78	1,48	2,68	0,27	
	1,2,3,6,7,8-Esaclorodibenzofurano	14,39	1,44	2,61	0,26	
	2,3,4,6,7,8-Esaclorodibenzofurano	10,65	1,07	1,93	0,19	
	1,2,3,7,8,9-Esaclorodibenzofurano	<0,1	0,00	<0,2	0,00	
	1,2,3,4,6,7,8-Eptaclorodibenzofurano	4,52	0,05	0,82	0,01	
	1,2,3,4,7,8,9-Eptaclorodibenzofurano	<0,1	0,00	<0,2	0,00	
	1,2,3,4,6,7,8,9-Octaclorodibenzofurano	1,02	0,00	<0,4	0,00	
	2,3,7,8-Tetraclorodibenzodiossina	4,36	4,36	0,79	0,79	
	1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzodiossina	4,47	4,47	0,81	0,81	
	1,2,3,4,7,8-Esaclorodibenzodiossina	3,17	0,32	0,58	0,06	
	1,2,3,6,7,8-Esaclorodibenzodiossina	12,54	1,25	2,28	0,23	
	1,2,3,7,8,9-Esaclorodibenzodiossina	8,35	0,83	1,52	0,15	
	1,2,3,4,6,7,8-Eptaclorodibenzodiossina	9,60	0,10	1,74	0,02	
1,2,3,4,6,7,8,9-Octaclorodibenzodiossina	44,36	0,01	8,05	0,00		
Somma pg/g PCDD/Fs TEQ upper		171,46	25,13 ± 7,15	30,94	4,58 ± 1,39	
DL PCBs	PCB 81 (3,4,4',5 Tetraclorobifenile)	54,79	0,02	<10	0,00	
	PCB 77 (3,3',4,4' Tetraclorobifenile)	71,17	0,01	12,92	0,00	
	PCB 123 (2',3,4,4',5 Pentaclorobifenile)	1730,48	0,05	314,11	0,01	
	PCB 118 (2,3',4,4',5 Pentaclorobifenile)	102666,52	3,08	18635,55	0,56	
	PCB 114 (2,3,4,4',5 Pentaclorobifenile)	1965,36	0,06	356,74	0,01	
	PCB 105 (2,3,3',4,4' Pentaclorobifenile)	41899,32	1,26	7605,37	0,23	
	PCB 126 (3,3',4,4',5 Pentaclorobifenile)	260,12	26,01	47,22	4,72	
	PCB 167 (2,3',4,4',5,5' Esaclorobifenile)	17689,20	0,53	3210,86	0,10	
	PCB 156 (2,3,3',4,4',5 Esaclorobifenile)	39220,11	1,18	7119,05	0,21	
	PCB 157 (2,3,3',4,4',5' Esaclorobifenile)	12246,48	0,37	2222,93	0,07	
	PCB 169 (3,3',4,4',5,5' Esaclorobifenile)	<1	0,00	<1	0,00	
	PCB 189 (2,3,3',4,4',5,5' Eptaclorobifenile)	2223,32	0,07	403,57	0,01	
	Somma pg/g DL PCBs TEQ upper		220026,9	32,65 ± 13,01	39928,3	5,95 ± 1,37
	SOMMA PCDD/Fs+ DL PCBs		57,78 ± 22,52		7,78 ± 2,76	
NDL PCBs		ng/g di grasso	/	ng/gTQ	/	
	PCB 28	20,4		3,7		
	PCB 52	<1		<2		
	PCB 101	129,2		23,4		
	PCB 153	235,0		42,7		
	PCB 138	247,3		44,9		
	PCB 180	204,3		37,1		
NDL PCBs upper		837,2 ± 175,49	153,8 ± 53,87			
SOMMA DL PCBs+NDL PCBs espressa in pg/g grasso		1057026,9	193728,3			

Tabella 3.3.3. Risultati dei vari congeneri di PCDD/F e PCB, del pool 2 (M)

		107314 (POOL 10 MASCHI)			
		Risultato espresso in pg/g grasso		Risultato espresso in pg/g TQ	
		pg/g grasso	TEQ pg/g	pg/g TQ	TEQ (pg/g TQ)
		% GRASSO = 15,3			
PCDD/Fs	2,3,7,8-Tetraclorodibenzofurano	1,04	0,10	0,15	0,01
	1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzofurano	<0,04	0,00	<0,08	0,00
	2,3,4,7,8-Pentaclorodibenzofurano	39,08	11,72	5,55	1,67
	1,2,3,4,7,8-Esaclorodibenzofurano	18,36	1,84	2,61	0,26
	1,2,3,6,7,8-Esaclorodibenzofurano	17,04	1,70	2,42	0,24
	2,3,4,6,7,8-Esaclorodibenzofurano	14,37	1,44	2,04	0,20
	1,2,3,7,8,9-Esaclorodibenzofurano	0,35	0,03	<0,2	0,00
	1,2,3,4,6,7,8-Eptaclorodibenzofurano	7,29	0,07	1,04	0,01
	1,2,3,4,7,8,9-Eptaclorodibenzofurano	<0,1	0,00	<0,2	0,00
	1,2,3,4,6,7,8,9-Octaclorodibenzofurano	3,66	0,00	0,52	0,00
	2,3,7,8-Tetraclorodibenzodiossina	5,24	5,24	0,75	0,75
	1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzodiossina	11,60	11,60	1,65	1,65
	1,2,3,4,7,8-Esaclorodibenzodiossina	4,17	0,42	0,59	0,06
	1,2,3,6,7,8-Esaclorodibenzodiossina	19,99	2,00	2,84	0,28
	1,2,3,7,8,9-Esaclorodibenzodiossina	11,23	1,12	1,59	0,16
	1,2,3,4,6,7,8-Eptaclorodibenzodiossina	18,81	0,19	2,67	0,03
	1,2,3,4,6,7,8,9-Octaclorodibenzodiossina	117,97	0,04	16,76	0,01
	Somma pg/g PCDD/Fs TEQ upper		290,20	37,52 ± 10,50	41,18
DL PCBs	PCB 81 (3,4,4',5 Tetraclorobifenile)	59,10	0,02	<10	0,00
	PCB 77 (3,3',4,4' Tetraclorobifenile)	75,84	0,01	10,77	0,00
	PCB 123 (2',3,4,4',5 Pentaclorobifenile)	3139,43	0,09	446,01	0,01
	PCB 118 (2,3',4,4',5 Pentaclorobifenile)	123595,44	3,71	17558,94	0,53
	PCB 114 (2,3,4,4',5 Pentaclorobifenile)	3712,86	0,11	527,48	0,02
	PCB 105 (2,3,3',4,4' Pentaclorobifenile)	82394,60	2,47	11705,63	0,35
	PCB 126 (3,3',4,4',5 Pentaclorobifenile)	540,53	54,05	76,79	7,68
	PCB 167 (2,3',4,4',5,5' Esaclorobifenile)	15464,92	0,46	2197,07	0,07
	PCB 156 (2,3,3',4,4',5 Esaclorobifenile)	37552,04	1,13	5334,94	0,16
	PCB 157 (2,3,3',4,4',5' Esaclorobifenile)	6924,04	0,21	983,68	0,03
	PCB 169 (3,3',4,4',5,5' Esaclorobifenile)	<1	0,00	<1	0,00
	PCB 189 (2,3,3',4,4',5,5' Eptaclorobifenile)	2289,29	0,07	325,23	0,01
	Somma pg/g DL PCBs TEQ upper		275748,1	62,36 ± 22,29	39166,5
SOMMA PCDD/Fs+ DL PCBs		99,88 ± 38,78		14,24 ± 3,63	
NDL PCBs		ng/g di grasso		ng/gTQ	
	PCB 28	19,5		2,8	
	PCB 52	<1		<2	
	PCB 101	121,7		17,3	
	PCB 153	252,9		35,9	
	PCB 138	298,3		42,4	
PCB 180	232,5		33,0		
NDL PCBs upper		925,9 ± 195,9		133,4 ± 46,47	
SOMMA DL PCBs+NDL PCBs espressa in pg/g grasso		1201648,1		172566,5	

Tabella 3.3.4. Risultati dei vari congeneri di PCDD/F e PCB, del pool 3 (M)

		107317 (POOL 10 MASCHI)				
		Risultato espresso in pg/g grasso		Risultato espresso in pg/g TQ		
		pg/g grasso	TEQ pg/g	pg/g TQ	TEQ (pg/g TQ)	
		% GRASSO = 16,1				
PCDD/Fs	2,3,7,8-Tetraclorodibenzofurano	0,93	0,09	0,15	0,02	
	1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzofurano	3,38	0,10	0,55	0,02	
	2,3,4,7,8-Pentaclorodibenzofurano	38,97	11,69	6,41	1,92	
	1,2,3,4,7,8-Esaclorodibenzofurano	17,37	1,74	2,85	0,29	
	1,2,3,6,7,8-Esaclorodibenzofurano	17,15	1,72	2,82	0,28	
	2,3,4,6,7,8-Esaclorodibenzofurano	11,57	1,16	1,90	0,19	
	1,2,3,7,8,9-Esaclorodibenzofurano	<0,1	0,00	<0,2	0,00	
	1,2,3,4,6,7,8-Eptaclorodibenzofurano	4,75	0,05	0,78	0,01	
	1,2,3,4,7,8,9-Eptaclorodibenzofurano	<0,1	0,00	<0,2	0,00	
	1,2,3,4,6,7,8,9-Octaclorodibenzofurano	<0,2	0,00	<0,4	0,00	
	2,3,7,8-Tetraclorodibenzodiossina	5,78	5,78	0,95	0,95	
	1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzodiossina	11,51	11,51	1,89	1,89	
	1,2,3,4,7,8-Esaclorodibenzodiossina	3,35	0,33	0,55	0,06	
	1,2,3,6,7,8-Esaclorodibenzodiossina	15,37	1,54	2,53	0,25	
	1,2,3,7,8,9-Esaclorodibenzodiossina	4,62	0,46	0,76	0,08	
	1,2,3,4,6,7,8-Eptaclorodibenzodiossina	11,72	0,12	1,93	0,02	
	1,2,3,4,6,7,8,9-Octaclorodibenzodiossina	34,53	0,01	5,68	0,00	
Somma pg/g PCDD/Fs TEQ upper		180,99		29,75		
			36,30 ± 10,23		5,99 ± 1,81	
DL PCBs	PCB 81 (3,4,4',5 Tetraclorobifenile)	63,19	0,02	10,38	0,00	
	PCB 77 (3,3',4,4' Tetraclorobifenile)	72,04	0,01	11,84	0,00	
	PCB 123 (2',3,4,4',5 Pentaclorobifenile)	2475,52	0,07	406,84	0,01	
	PCB 118 (2,3',4,4',5 Pentaclorobifenile)	91533,18	2,75	15043,06	0,45	
	PCB 114 (2,3,4,4',5 Pentaclorobifenile)	3143,19	0,09	516,57	0,02	
	PCB 105 (2,3,3',4,4' Pentaclorobifenile)	62379,54	1,87	10251,79	0,31	
	PCB 126 (3,3',4,4',5 Pentaclorobifenile)	675,40	67,54	111,00	11,10	
	PCB 167 (2,3',4,4',5,5' Esaclorobifenile)	13636,79	0,41	2241,14	0,07	
	PCB 156 (2,3,3',4,4',5 Esaclorobifenile)	26250,66	0,79	4314,18	0,13	
	PCB 157 (2,3,3',4,4',5' Esaclorobifenile)	1048,85	0,03	172,37	0,01	
	PCB 169 (3,3',4,4',5,5' Esaclorobifenile)	<1	0,00	<1	0,00	
	PCB 189 (2,3,3',4,4',5,5' Eptaclorobifenile)	1933,78	0,06	317,81	0,01	
	Somma pg/g DL PCBs TEQ upper		203212,1		33397,0	
				73,67 ± 24,39		12,13 ± 2,61
SOMMA PCDD/Fs+ DL PCBs			109,97 ± 43,07		18,12 ± 4,43	
NDL PCBs		ng/g di grasso	/	ng/gTQ	/	
	PCB 28	18,9		3,1		
	PCB 52	<1		<2		
	PCB 101	74,6		12,3		
	PCB 153	240,5		39,5		
	PCB 138	224,8		36,9		
	PCB 180	489,1		80,4		
NDL PCBs upper		1048,9 ± 223,01		174,2 ± 59,54		
SOMMA DL PCBs+NDL PCBs espressa in pg/g grasso		1252112,1		207597,0		

Tabella 3.3.5. Risultati dei vari congeneri di PCDD/F e PCB, del pool 1 (F)

		107322 (POOL 10 FEMMINE)			
		Risultato espresso in pg/g grasso		Risultato espresso in pg/g TQ	
		pg/g grasso	TEQ pg/g	pg/g TQ	TEQ (pg/g TQ)
		% GRASSO = 14,9			
PCDD/Fs	2,3,7,8-Tetraclorodibenzofurano	0,96	0,10	0,14	0,01
	1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzofurano	2,30	0,07	0,34	0,01
	2,3,4,7,8-Pentaclorodibenzofurano	34,24	10,27	5,09	1,53
	1,2,3,4,7,8-Esaclorodibenzofurano	16,27	1,63	2,42	0,24
	1,2,3,6,7,8-Esaclorodibenzofurano	15,27	1,53	2,27	0,23
	2,3,4,6,7,8-Esaclorodibenzofurano	13,31	1,33	1,98	0,20
	1,2,3,7,8,9-Esaclorodibenzofurano	0,18	0,02	<0,2	0,00
	1,2,3,4,6,7,8-Eptaclorodibenzofurano	6,28	0,06	0,93	0,01
	1,2,3,4,7,8,9-Eptaclorodibenzofurano	<0,1	0,00	<0,2	0,00
	1,2,3,4,6,7,8,9-Octaclorodibenzofurano	2,45	0,00	<0,4	0,00
	2,3,7,8-Tetraclorodibenzodiossina	4,98	4,98	0,74	0,74
	1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzodiossina	12,44	12,44	1,85	1,85
	1,2,3,4,7,8-Esaclorodibenzodiossina	3,80	0,38	0,56	0,06
	1,2,3,6,7,8-Esaclorodibenzodiossina	20,31	2,03	3,02	0,30
	1,2,3,7,8,9-Esaclorodibenzodiossina	12,08	1,21	1,80	0,18
	1,2,3,4,6,7,8-Eptaclorodibenzodiossina	14,79	0,15	2,20	0,02
1,2,3,4,6,7,8,9-Octaclorodibenzodiossina	66,70	0,02	9,92	0,00	
Somma pg/g PCDD/Fs TEQ upper		226,36	36,22 ± 10,07	33,27	5,41 ± 1,69
DL PCBs	PCB 81 (3,4,4',5 Tetraclorobifenile)	58,88	0,02	<10	0,00
	PCB 77 (3,3',4,4' Tetraclorobifenile)	66,06	0,01	<10	0,00
	PCB 123 (2',3,4,4',5 Pentaclorobifenile)	2453,20	0,07	364,82	0,01
	PCB 118 (2,3',4,4',5 Pentaclorobifenile)	98853,03	2,97	14700,63	0,44
	PCB 114 (2,3,4,4',5 Pentaclorobifenile)	2796,56	0,08	415,88	0,01
	PCB 105 (2,3,3',4,4' Pentaclorobifenile)	63275,62	1,90	9409,84	0,28
	PCB 126 (3,3',4,4',5 Pentaclorobifenile)	612,87	61,29	91,14	9,11
	PCB 167 (2,3',4,4',5,5' Esaclorobifenile)	11826,55	0,35	1758,75	0,05
	PCB 156 (2,3,3',4,4',5 Esaclorobifenile)	26929,68	0,81	4004,77	0,12
	PCB 157 (2,3,3',4,4',5 Esaclorobifenile)	8149,50	0,24	1211,93	0,04
	PCB 169 (3,3',4,4',5,5' Esaclorobifenile)	219,09	6,57	32,58	0,98
	PCB 189 (2,3,3',4,4',5,5' Eptaclorobifenile)	2025,35	0,06	301,19	0,01
	Somma pg/g DL PCBs TEQ upper		217266,4	74,37 ± 24,84	32291,5
SOMMA PCDD/Fs+ DL PCBs		110,59 ± 43,72		16,47 ± 4,44	
NDL PCBs		ng/g di grasso	/	ng/gTQ	/
	PCB 28	19,2		2,9	
	PCB 52	<1		<2	
	PCB 101	79,2		11,8	
	PCB 153	192,6		28,6	
	PCB 138	194,3		28,9	
	PCB 180	452,1		67,2	
NDL PCBs upper		938,5 ± 200,77	141,4 ± 48,71		
SOMMA DL PCBs+NDL PCBs espressa in pg/g grasso		1155766,4	173691,5		

Tabella 3.3.6. Risultati dei vari congeneri di PCDD/F e PCB, del pool 2 (F)

		107325 (POOL 10 FEMMINE)			
		Risultato espresso in pg/g grasso		Risultato espresso in pg/g TQ	
		pg/g grasso	TEQ pg/g	pg/g TQ	TEQ (pg/g TQ)
		% GRASSO = 17,5			
PCDD/Fs	2,3,7,8-Tetraclorodibenzofurano	1,32	0,13	0,23	0,02
	1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzofurano	3,18	0,10	0,56	0,02
	2,3,4,7,8-Pentaclorodibenzofurano	35,40	10,62	6,23	1,87
	1,2,3,4,7,8-Esaclorodibenzofurano	16,56	1,66	2,91	0,29
	1,2,3,6,7,8-Esaclorodibenzofurano	15,54	1,55	2,73	0,27
	2,3,4,6,7,8-Esaclorodibenzofurano	12,43	1,24	2,19	0,22
	1,2,3,7,8,9-Esaclorodibenzofurano	<0,1	0,00	<0,2	0,00
	1,2,3,4,6,7,8-Eptaclorodibenzofurano	6,27	0,06	1,10	0,01
	1,2,3,4,7,8,9-Eptaclorodibenzofurano	2,80	0,03	0,49	0,00
	1,2,3,4,6,7,8,9-Octaclorodibenzofurano	5,29	0,00	0,93	0,00
	2,3,7,8-Tetraclorodibenzodiossina	5,09	5,09	0,89	0,89
	1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzodiossina	8,98	8,98	1,58	1,58
	1,2,3,4,7,8-Esaclorodibenzodiossina	3,94	0,39	0,69	0,07
	1,2,3,6,7,8-Esaclorodibenzodiossina	17,74	1,77	3,12	0,31
	1,2,3,7,8,9-Esaclorodibenzodiossina	8,76	0,88	1,54	0,15
	1,2,3,4,6,7,8-Eptaclorodibenzodiossina	22,46	0,22	3,95	0,04
	1,2,3,4,6,7,8,9-Octaclorodibenzodiossina	192,40	0,06	33,85	0,01
Somma pg/g PCDD/Fs TEQ upper		358,17	32,79 ± 9,22	63,01	5,79 ± 1,78
DL PCBs	PCB 81 (3,4,4',5 Tetraclorobifenile)	74,14	0,02	13,04	0,00
	PCB 77 (3,3',4,4' Tetraclorobifenile)	77,46	0,01	13,63	0,00
	PCB 123 (2',3,4,4',5 Pentaclorobifenile)	2745,78	0,08	483,05	0,01
	PCB 118 (2,3',4,4',5 Pentaclorobifenile)	89790,50	2,69	15796,48	0,47
	PCB 114 (2,3,4,4',5 Pentaclorobifenile)	3625,42	0,11	637,81	0,02
	PCB 105 (2,3,3',4,4' Pentaclorobifenile)	67478,57	2,02	11871,23	0,36
	PCB 126 (3,3',4,4',5 Pentaclorobifenile)	640,47	64,05	112,67	11,27
	PCB 167 (2,3',4,4',5,5' Esaclorobifenile)	15936,50	0,48	2803,64	0,08
	PCB 156 (2,3,3',4,4',5 Esaclorobifenile)	37827,70	1,13	6654,87	0,20
	PCB 157 (2,3,3',4,4',5' Esaclorobifenile)	9707,80	0,29	1707,85	0,05
	PCB 169 (3,3',4,4',5,5' Esaclorobifenile)	952,52	28,58	167,57	5,03
	PCB 189 (2,3,3',4,4',5,5' Eptaclorobifenile)	2920,26	0,09	513,75	0,02
	Somma pg/g DL PCBs TEQ upper		231777,1	99,55 ± 30,45	40775,6
SOMMA PCDD/Fs+ DL PCBs		132,35 ± 53,67		23,30 ± 7,41	
NDL PCBs		ng/g di grasso		ng/gTQ	
	PCB 28	18,2		3,2	
	PCB 52	<1		<2	
	PCB 101	77,6		13,7	
	PCB 153	154,9		27,3	
	PCB 138	173,6		30,5	
PCB 180	493,1		86,7		
NDL PCBs upper		918,4 ± 197,42		162,4 ± 56,53	
SOMMA DL PCBs+NDL PCBs espressa in pg/g grasso		1150177,1		203175,6	

Tabella 3.3.7. Risultati dei vari congeneri di PCDD/F e PCB, del pool 3 (F)

		107327 (POOL 10 FEMMINE)			
		Risultato espresso in pg/g grasso		Risultato espresso in pg/g TQ	
		pg/g grasso	TEQ pg/g	pg/g TQ	TEQ (pg/g TQ)
		% GRASSO = 16,1			
PCDD/Fs	2,3,7,8-Tetraclorodibenzofurano	1,11	0,11	0,16	0,02
	1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzofurano	2,36	0,07	0,34	0,01
	2,3,4,7,8-Pentaclorodibenzofurano	<0,04	0,00	<0,08	0,00
	1,2,3,4,7,8-Esaclorodibenzofurano	34,37	3,44	5,01	0,50
	1,2,3,6,7,8-Esaclorodibenzofurano	21,28	2,13	3,10	0,31
	2,3,4,6,7,8-Esaclorodibenzofurano	16,71	1,67	2,44	0,24
	1,2,3,7,8,9-Esaclorodibenzofurano	<0,1	0,00	<0,2	0,00
	1,2,3,4,6,7,8-Eptaclorodibenzofurano	7,65	0,08	1,11	0,01
	1,2,3,4,7,8,9-Eptaclorodibenzofurano	2,03	0,02	0,30	0,00
	1,2,3,4,6,7,8,9-Octaclorodibenzofurano	2,02	0,00	<0,4	0,00
	2,3,7,8-Tetraclorodibenzodiossina	4,78	4,78	0,70	0,70
	1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzodiossina	<0,04	0,00	<0,08	0,00
	1,2,3,4,7,8-Esaclorodibenzodiossina	4,11	0,41	0,60	0,06
	1,2,3,6,7,8-Esaclorodibenzodiossina	17,87	1,79	2,60	0,26
	1,2,3,7,8,9-Esaclorodibenzodiossina	7,28	0,73	1,06	0,11
	1,2,3,4,6,7,8-Eptaclorodibenzodiossina	14,56	0,15	2,12	0,02
1,2,3,4,6,7,8,9-Octaclorodibenzodiossina	52,12	0,02	7,60	0,00	
Somma pg/g PCDD/Fs TEQ upper		188,24	15,44 ± 4,18	27,14	2,37 ± 0,77
DL PCBs	PCB 81 (3,4,4',5 Tetraclorobifenile)	<10	0,00	<10	0,00
	PCB 77 (3,3',4,4' Tetraclorobifenile)	155,65	0,02	22,69	0,00
	PCB 123 (2',3,4,4',5 Pentaclorobifenile)	10532,94	0,32	1535,22	0,05
	PCB 118 (2,3',4,4',5 Pentaclorobifenile)	180950,10	5,43	26374,22	0,79
	PCB 114 (2,3,4,4',5 Pentaclorobifenile)	33679,65	1,01	4908,95	0,15
	PCB 105 (2,3,3',4,4' Pentaclorobifenile)	153556,61	4,61	22381,51	0,67
	PCB 126 (3,3',4,4',5 Pentaclorobifenile)	1383,82	138,38	201,70	20,17
	PCB 167 (2,3',4,4',5,5' Esaclorobifenile)	68232,07	2,05	9945,11	0,30
	PCB 156 (2,3,3',4,4',5 Esaclorobifenile)	275259,49	8,26	40120,20	1,20
	PCB 157 (2,3,3',4,4',5' Esaclorobifenile)	88010,35	2,64	12827,87	0,38
	PCB 169 (3,3',4,4',5,5' Esaclorobifenile)	2347,81	70,43	342,20	10,27
	PCB 189 (2,3,3',4,4',5,5' Eptaclorobifenile)	13222,77	0,40	1927,27	0,06
	Somma pg/g DL PCBs TEQ upper	827331,2	233,54 ± 57,37	120586,9	34,04 ± 11,25
SOMMA PCDD/Fs+ DL PCBs		248,98 ± 100,96		36,41 ± 12,02	
NDL PCBs		ng/g di grasso		ng/gTQ	
	PCB 28	13,8		2,0	
	PCB 52	<1		<2	
	PCB 101	158,2		23,1	
	PCB 153	277,6		40,5	
	PCB 138	395,7		57,7	
	PCB 180	691,0		100,7	
NDL PCBs upper		1537,2 ± 326,60		225,9 ± 77,01	
SOMMA DL PCBs+NDL PCBs espressa in pg/g grasso		2364531,2		346486,9	

Valutazione dei profili

Nei grafici 3.3.2 a 3.3.7 sono riportati i profili normalizzati di PCDD/F (impronte). I profili appaiono omogenei tra i diversi pool (pool 1-3 maschi e pool 1-2 femmine) a parte il pool 3 femmine. Dall'esame comparato dei profili dei 3 campioni si evidenziano 3 impronte sostanzialmente differenti che fanno ipotizzare fonti di contaminazione tra loro non correlate. Nei 5 pool si rileva una prevalenza di penta cloro sostituiti nell'ordine del 50% seguito dagli esa-sostituiti (25%) e quindi dai tetra sostituiti (18%). In questi pool c'è una prevalenza del penta furano (36%). Al contrario per il pool 3 femmine è decisamente netta la prevalenza degli esa sostituiti con un valore normalizzato di 66%; i penta sostituiti sono pressoché assenti e i tetra sostituiti sono circa il doppio (30%) rispetto agli altri pool. Il contributo per i tetra sostituiti è dato dalla TCDD. In tutti i campioni appartenenti ai 6 pool la concentrazione di octaclorodiossina (OCDD) e di octaclorofurano (OCDF) sono trascurabili rispetto agli altri congeneri. Nei 2 grafici 3.3.18 e 3.3.19 si riporta un confronto tra il pool 3 femmine e uno rappresentativo degli altri pool. Il rapporto PCDD / PCDF in realtà tra i 6 gruppi è più omogeneo e non spicca la differenza dell'impronta dei singoli congeneri infatti oscilla intorno ad un 50 – 55% di PCDD.

Analogamente alle diossine anche l'esame delle impronte dei PCB DL conferma la diversità dalla contaminazione del pool 3 femmine. Nel profilo del pool 3 femmine si rileva una netta prevalenza del PCB 156 (33%) seguito dal PCB 118 (21%) e dal PCB 105 (18%); al contrario negli altri 5 pool considerati prevale il PCB 118. Nel complesso nel pool 3 femmine prevalgono i PCB DL + PCB NDL rispetto agli altri gruppi di pipistrelli (vedi grafico 3.3.16 e 3.3.17), congeneri dei PCB a maggior grado di clorurazione. Il PCB 126 che contribuisce in maniera predominante alla tossicità totale e che è ritenuto un indicatore importante di contaminazione industriale (lavorazione di metalli), ha in tutti i casi un apporto inferiore allo 0,5%. Il pool 3 femmine si differenzia dagli altri gruppi anche per il rapporto PCDD/F e PCB DL che è 10 volte inferiore (vedi grafico 3.3.17). Come frequentemente si rileva anche in questo caso si registra un apporto determinante di PCB (DL e NDL) nei confronti delle diossine.

Grafico 3.3.2: profilo normalizzato dei congeneri di PCDD/F dei campioni di pipistrelli pool 1 maschi.

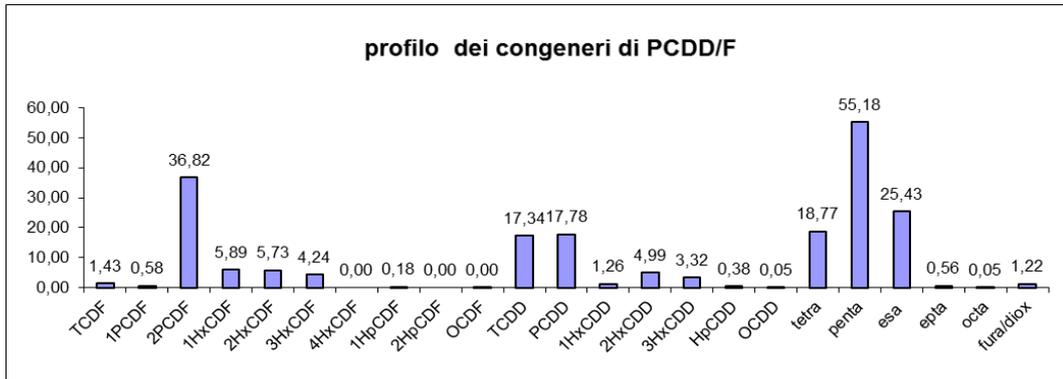


Grafico 3.3.3: profilo normalizzato dei congeneri di PCDD/F dei campioni di pipistrelli pool 2 maschi.

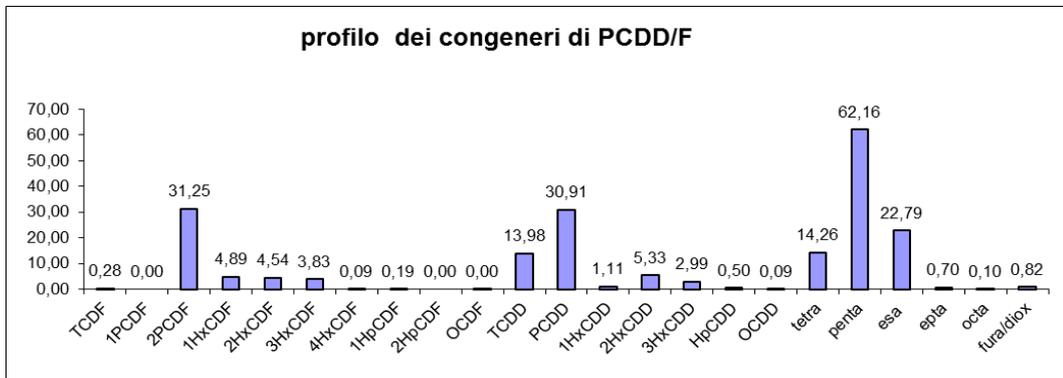


Grafico 3.3.4: profilo normalizzato dei congeneri di PCDD/F dei campioni di pipistrelli pool 3 maschi.

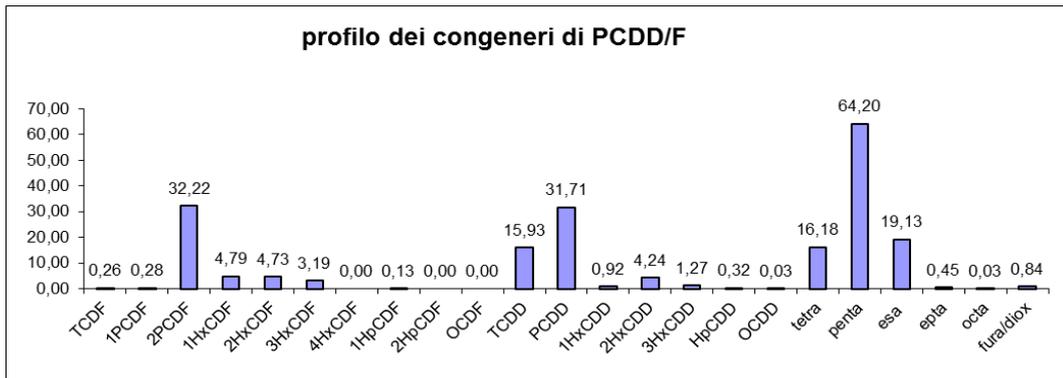


Grafico 3.3.5: profilo normalizzato dei congeneri di PCDD/F dei campioni di pipistrelli pool 1 femmine.

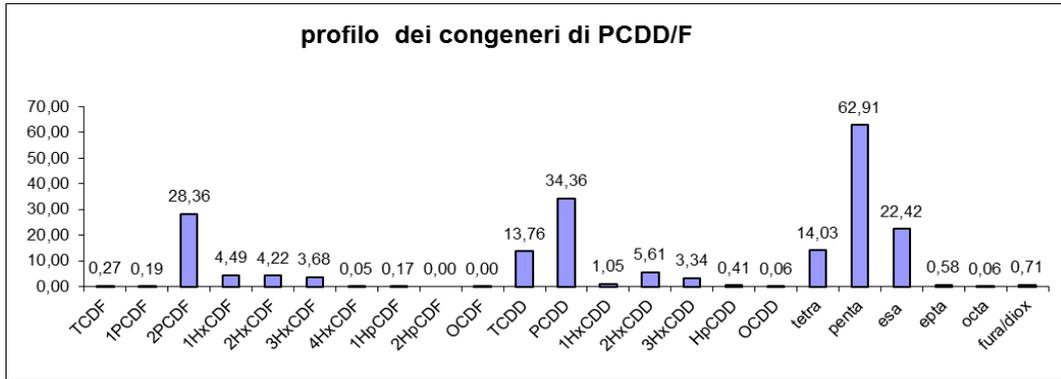


Grafico 3.3.6: profilo normalizzato dei congeneri di PCDD/F dei campioni di pipistrelli pool 2 femmine

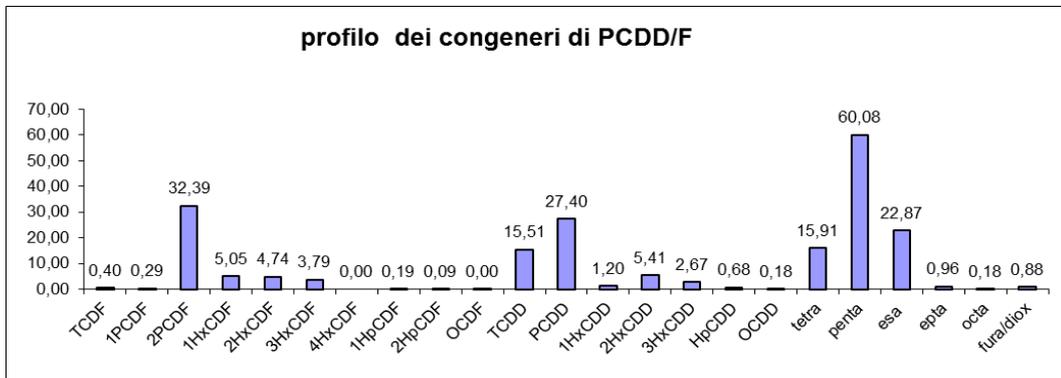


Grafico 3.3.7: profilo normalizzato dei congeneri di PCDD/F dei campioni di pipistrelli pool 3 femmine.

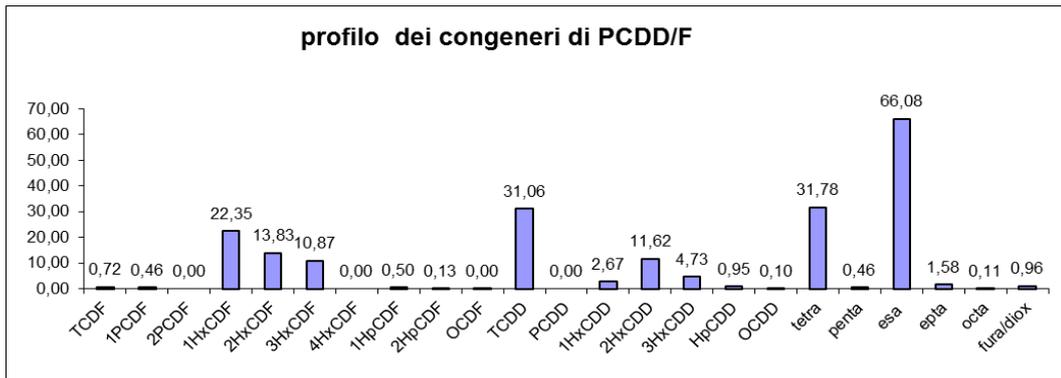


Grafico 3.3.8: profilo normalizzato dei congeneri di PCB DL dei campioni di pipistrelli pool 1 maschi.

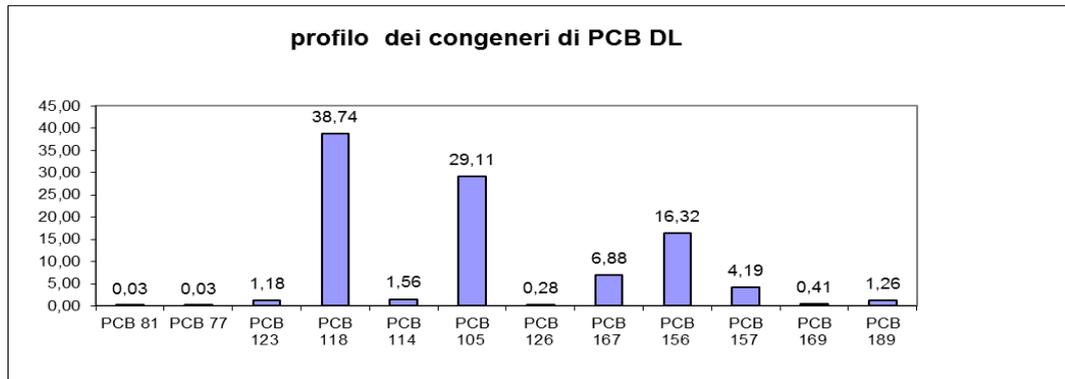


Grafico 3.3.9: profilo normalizzato dei congeneri di PCB DL dei campioni di pipistrelli pool 2 maschi.

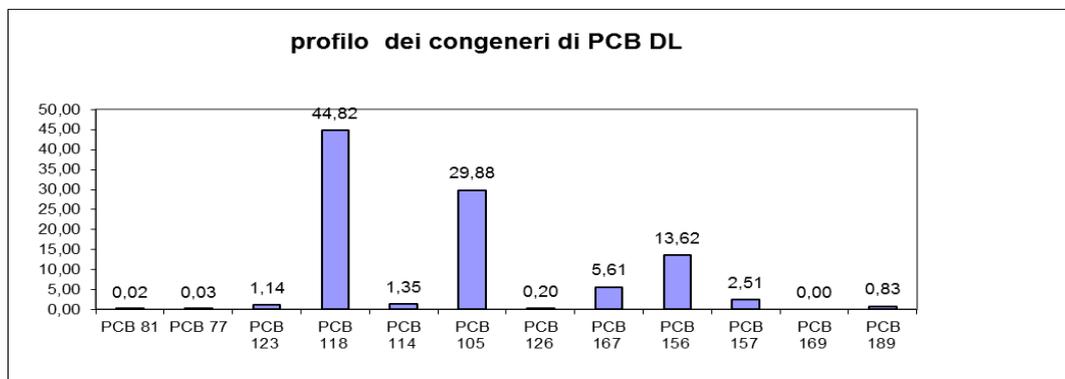


Grafico 3.3.10: profilo normalizzato dei congeneri di PCB DL dei campioni di pipistrelli pool 3 maschi.

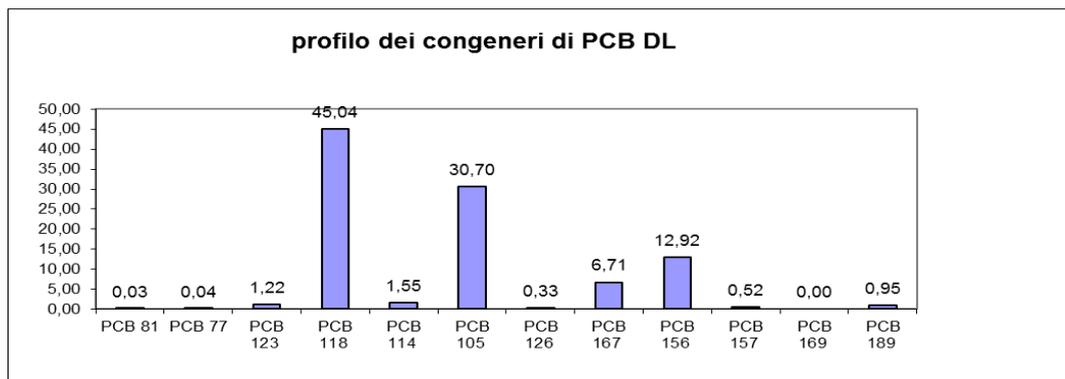


Grafico3.3.11: profilo normalizzato dei congeneri di PCB DL dei campioni di pipistrelli pool 1 femmine.

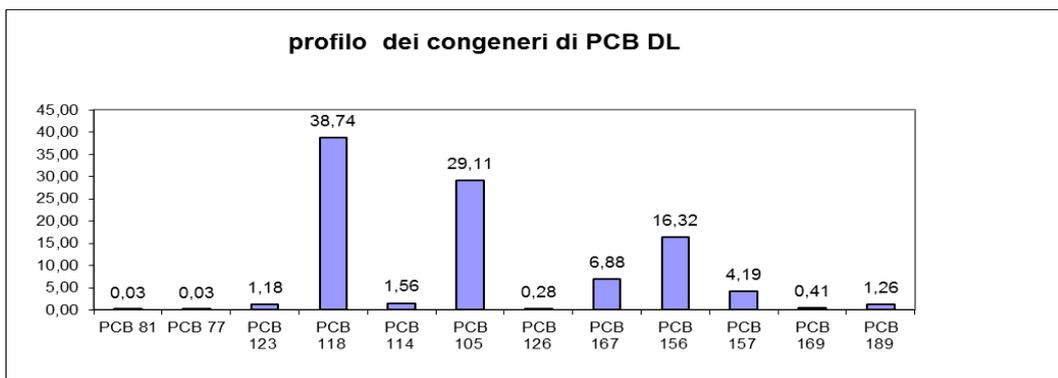


Grafico 3.3.12: profilo normalizzato dei congeneri di PCB DL dei campioni di pipistrelli pool 2 femmine.

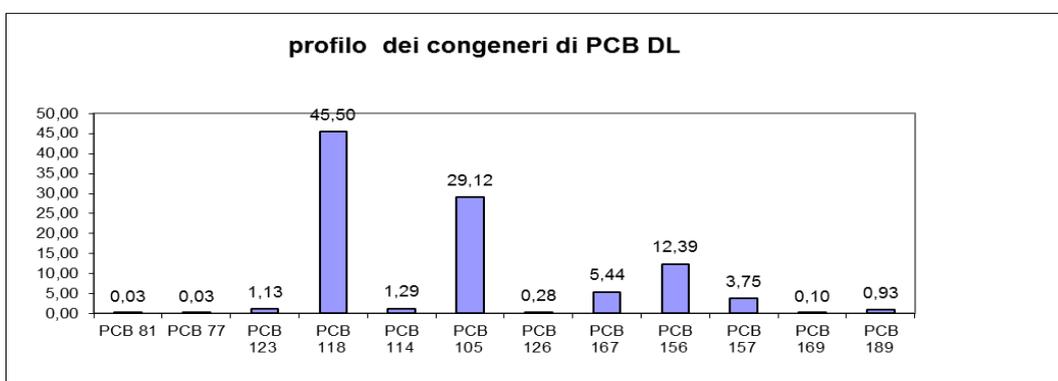


Grafico3.3.13: profilo normalizzato dei congeneri di PCB DL dei campioni di pipistrelli pool 3 femmine..

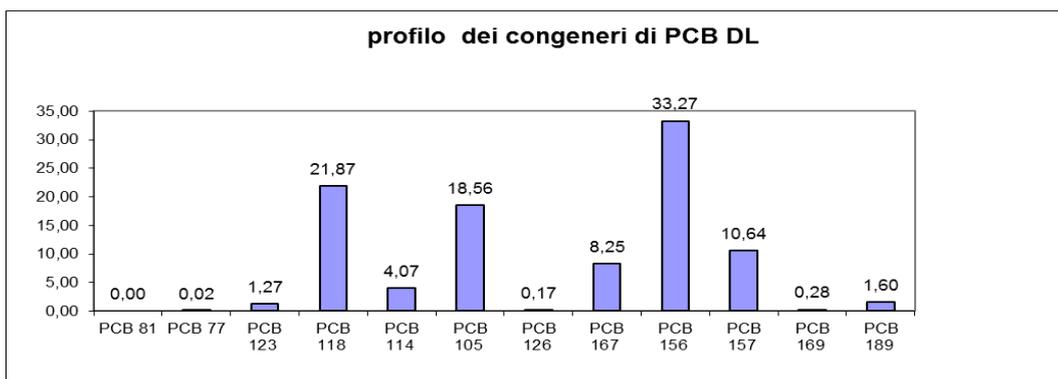


Grafico 3.3.14: rapporto percentuale della concentrazione di PCDD e PCDF nei pipistrelli dei pool 1-3 maschi e 1-2 femmine.

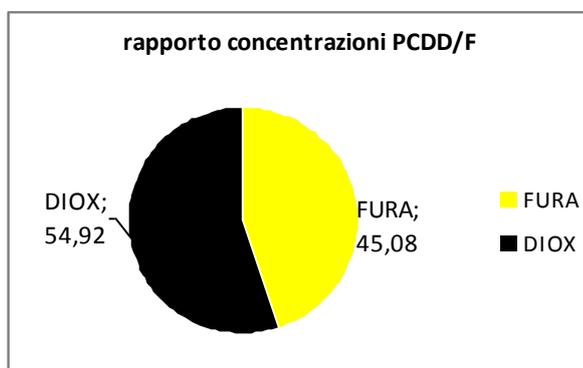


Grafico 3.3.15: rapporto percentuale della concentrazione di PCDD e PCDF nei pipistrelli pool 3 femmine.

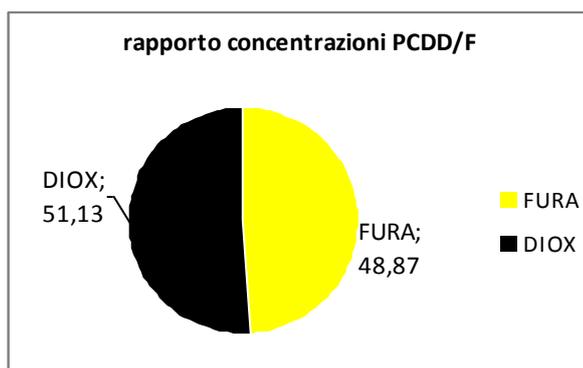


Grafico3.3.16: rapporto percentuale della concentrazione di PCDD/F e PCB DL e confronto tra la TEQ totale dei PCDD/F (calcolata come lower bound) rispetto a quella dei PCB DL nei pipistrelli dei pool 1-3 maschi e 1-2 femmine.

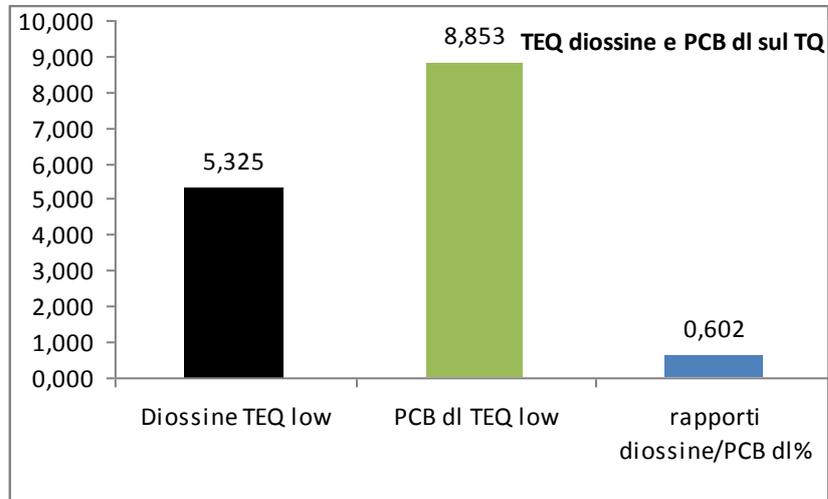


Grafico3.3.17: rapporto percentuale della concentrazione di PCDD/F e PCB DL e confronto tra la TEQ totale dei PCDD/F (calcolata come lower bound) rispetto a quella dei PCB DL nei pipistrelli del pool 3 femmine..

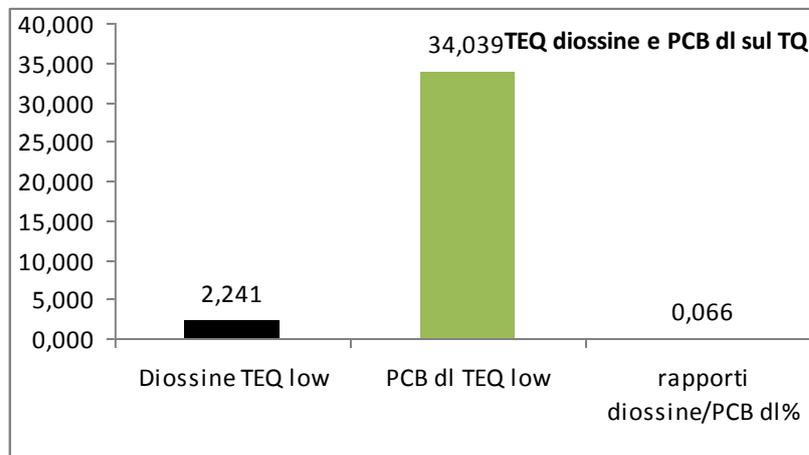


Grafico 3.3.18: rapporto percentuale dei congeneri tetra, penta, esa ed epta sostituiti dei PCDD/F nei pipistrelli dei pool 1-3 maschi e 1-2 femmine.

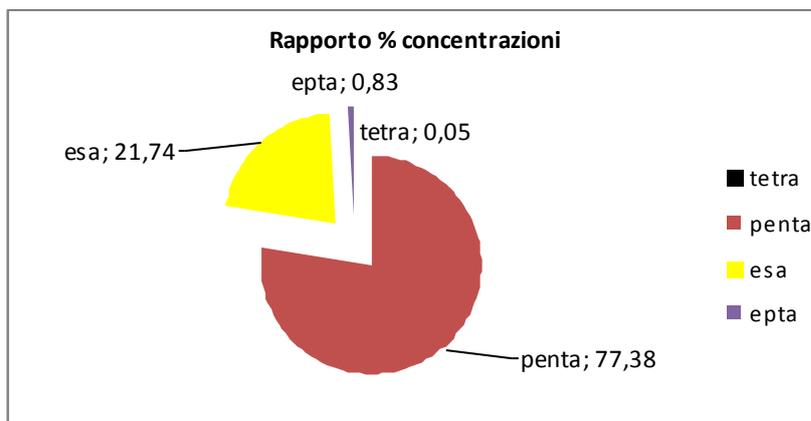
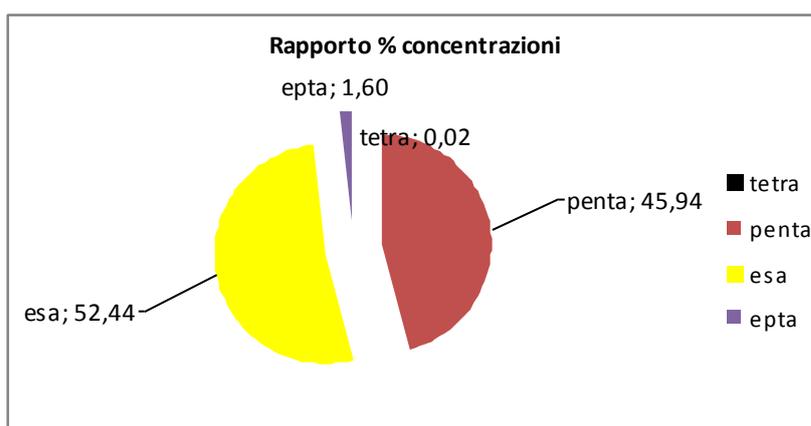


Grafico 3.3.19: rapporto percentuale dei congeneri tetra, penta, esa ed epta sostituiti dei PCDD/F nei pipistrelli del pool 3 femmine



3.4. PFAS

Sono state analizzate le sostanze perfluoralchiliche nei 6 campioni di pool. I risultati sono riportati in Tabella 3.4.1. Delle diverse molecole analizzate quella maggiormente rappresentata in tutti i campioni è stata C8PFOS (min 1,4 – max 25,5 µg/Kg). Tutte le altre sostanze perfluorate risultano inferiori al limite di quantificazioni.

Tabella 3.4.1: Riepilogo dei risultati di PFOs e PFOa nei 6 pool di Tadarita teniotis

PFOS/ PFOA	MASCHI			FEMMINE		
	pool 1	pool 2	pool 3	Pool 1	pool 2	Pool 3
	(µg/Kg)					
C ₄ PFBS	<1	<1	<1	<1	<1	<1
C ₆ PFH _χ A	<1	<1	<1	<1	<1	<1
C ₇ PFH _p A	<1	<1	1	<1	<1	<1
C ₆ PFH _χ S	<1	<1	4,9	<1	<1	<1
C ₈ PFOA	<1	1,1	<1	1,1	1,3	<1
C ₉ PFN _O A	<1	4,1	1	1,4	1,4	2,1
C ₈ PFOS	10	10	25,5	8,7	1,4	9,5
C ₁₀ PFDC _A	<1	<1	1,9	<1	1,4	<1
C ₁₁ PFU _N A	<1	<1	<1	<1	<1	<1
C ₁₂ PFDO _A	<1	<1	<1	<1	<1	<1
SOMMA						
PFOs/PFOa	10	15,2	34,3	11,2	5,5	11,6

4. DISCUSSIONI

4.1. MACRO E MICRO ELEMENTI

Molta letteratura riporta le concentrazioni e gli effetti dei contaminanti negli animali selvatici in seguito all'antropizzazione (Hughes *et al.*, 1997). Questi studi hanno documentato le variazioni geografiche e temporali nelle concentrazioni dei contaminanti e i loro effetti sulla salute (Bishop *et al.*, 1998, Alleva *et al.*, 2005) in un ampio range di specie. Molti dei dati esistenti riguardo le concentrazioni dei contaminanti nei pipistrelli riguardano soprattutto i composti organici (Thies *et al.*, 1996).

Metalli non essenziali come il Pb, Hg e il Cd e gli elementi essenziali come Zn e Cu sono comuni inquinanti largamente distribuiti nell'ecosistema. Informazioni riguardanti gli altri metalli e metalloidi come Fe, Mg, Mo, Sr, Ba e Bo sono meno disponibili, i loro livelli nei tessuti dei mammiferi possono dipendere dalla stagione, età, e/o sesso così come da condizioni ecologiche, fisiologiche o patologiche (Komarnicki, 2000; Lopes *et al.*, 2002). Inoltre i loro livelli e/o biodisponibilità possono aumentare a causa dell'inquinamento industriale, agricolo e domestico e di altre attività umane come la caccia. In aggiunta gli scarichi industriali possono contenere virtualmente tutti gli elementi e gli scarichi domestici possono essere un importante fonte di Zn, Cu, Fe, Mg, Cr e B (Lucho-Constantino *et al.*, 2005). I piccoli mammiferi sono validi bioindicatori di inquinamento ambientale (bioaccumulo di metalli e effetti fisiologici) perché hanno grande richiesta di alimento e il loro fabbisogno metabolico è alto (Komarnicki, 2000; Pankakoski *et al.*, 1993).

Sono disponibili in letteratura diversi report che riguardano i livelli e gli effetti di metalli come arsenico, cadmio, rame, mercurio, selenio, ma i pipistrelli non sono inclusi in nessuno di questi rapporti (Eisler 1988, 1997, Ma 1996), mentre altri due studi hanno riportato la presenza di piombo in *Myotis lucifugus* (Clark, 1979) e in *Myotis grisescens* (Martin, 1992).

Il bioaccumulo dei metalli nei pipistrelli risulta influenzato dal regime alimentare (erbivoro o insettivoro), abbiamo confrontato il nostro studio anche con studi condotti su mammiferi insettivori come ad esempio toporagni (Sánchez-Chardi, 2008).

Data la scarsità di dati bibliografici riguardanti la specie oggetto della nostra indagine, abbiamo ritenuto utile analizzare le concentrazioni di 20 elementi chimici sia essenziali che non essenziali nelle carcasse e in tre tessuti bersaglio di *Tadarida teniotis* per evidenziare eventuali fenomeni di carenza e di tossicità.

Degli elementi studiati, Mg, Zn, Cu, Mn, Mo, Se, V svolgono funzioni sicuramente essenziali. Tra questi, il **Magnesio** presenta concentrazioni 1-5 ordini di grandezza superiori rispetto agli altri, a causa dei suoi importanti ruoli biochimici; tra questi ruoli ricordiamo: 1-cofattore essenziale per la catalisi di oltre 300 enzimi, inclusi tutti gli enzimi che provvedono alla sintesi di ATP, 2-regolatore dei livelli di altri importanti ioni e metaboliti, 3- ultimo, ma non meno importante, componente delle ossa e dei denti.

Il corpo della maggior parte degli animali contiene circa 500 mg di Mg per Kg di tessuto fresco (Jahnen-Dechent e Ketteler, 2012) e i dati ottenuti su *Tadarida* mostrano concentrazioni simili con un valore medio pari a 364 mg/Kg, in accordo anche con quanto riportato per un'altra specie di pipistrello, *Eptesicus fuscus* (Hood et al., 2011). Per quanto riguarda le concentrazioni nei tessuti, l'osso presenta valori molto più elevati rispetto a fegato e rene, in accordo con quanto riportato anche in altri mammiferi e nell'uomo (Jahnen-Dechent e Ketteler, 2012). Lo **zinco** è un altro elemento essenziale per molti processi biochimici e il suo ruolo a livello cellulare può essere svolto principalmente in tre modi: 1- come il Mg, lo Zn è cofattore essenziale per molti enzimi, 2- come regolatore di alcune importanti processi, tra i quali la trasmissione nervosa e lo sviluppo del sistema immunitario, 3- come componente nel mantenimento della corretta struttura delle proteine (Vallee e Falchuck, 1993).

Nei mammiferi, lo zinco è presente in tutti i tessuti con alte concentrazioni in ossa, rene, fegato, cuore, pancreas (Opresko, 1992). Lo zinco è presente nelle carcasse con un valore medio pari a 31,9 mg/Kg e nei diversi organi in concentrazioni variabili tra 39 e 50 mg/kg di peso fresco in accordo con quanto riportato per molti vertebrati (Carpenè et al., 2006, Andreani et al., 2006), ma più basse rispetto a quelle riscontrate da Allison *et al*, 2006, nel fegato di Miniotteri in una cava del sud-est Australiano (134–172 mg/kg d/w).

Nei mammiferi le concentrazioni di **rame** sono controllate da sofisticati meccanismi omeostatici che prevedono l'azione coordinata di trasportatori plasmatici e di membrana, di proteine di deposito e di ligandi intracellulari. Questi

meccanismi omeostatici sono importanti per prevenire il manifestarsi di effetti tossici, dovuti alle proprietà redox del rame (Goyer, 1997, Lopez-Alonso et al., 2004); il rame può inoltre combinarsi con altri elementi come il mercurio e lo zinco per produrre effetti tossici additivi in alcune specie (Hilmy *et al.*, 1987). È difficile stabilire quale sia la soglia di tossicità del rame, essendo questo influenzato dalla presenza di altri elementi, come molibdeno, ferro e zinco, inoltre ci sono differenti sensibilità a seconda della specie in esame, ad esempio i ruminanti, sono sensibili ad una concentrazione di 8-10 ppm. Le concentrazioni di rame, determinate nei tessuti dei pipistrelli oggetto di questa tesi, rientrano nei livelli fisiologici riportati per molte specie animali e compresi tra 2-5 mg/Kg di peso fresco in alcuni uccelli (Carpenè et al., 2006) e oltre 100 mg/Kg di peso fresco nelle tartarughe della specie *Chelonia mydas* (Andreani et al., 2008); il fegato, essendo l'organo preposto ai principali meccanismi omeostatici, presenta concentrazioni più elevate rispetto al rene e all'osso.

L'inalazione e l'ingestione di **manganese** sono importanti vie di esposizione. Un eccesso di manganese è di solito eliminato dal corpo nel giro di pochi giorni (ATSDR 1990), quindi, concentrazioni relativamente alte di manganese nei tessuti di pipistrello potrebbero riflettere una recente esposizione locale. I livelli di questo metallo sono fisiologicamente regolati nei mammiferi e gli incrementi ambientali non sono generalmente collegati ad alti livelli nei tessuti (Beardsley *et al.*, 1978).

Il **molibdeno** è conosciuto per essere un antagonista del rame (Pankakoski *et al.*, 1993), poichè forma un complesso sulfuro-molibdeno che lega il rame.

Il **selenio** è un oligoelemento essenziale nelle diete degli animali, ma è tossico a concentrazioni di poco sopra i necessari fabbisogni alimentari. I mammiferi sono molto meno suscettibili alle intossicazioni da selenio rispetto gli uccelli (Eisler 1985b). Non esistono studi pubblicati che documentino le concentrazioni di selenio in tutto il corpo dei pipistrelli. Nella carcassa di toporagni (*Sorex ornatus*) raccolti da una zona contaminata da selenio in California sono state riportate elevate concentrazioni di selenio, con un valore medio di 47,9 µg/g di peso secco (Clark, 1987), molto superiore a quello riscontrato nei nostri esemplari (0,33 mg/kg peso fresco). Anche le concentrazioni da noi riscontrate misurate in fegato, rene ed osso sono risultate costantemente basse, probabilmente nei limiti fisiologici.

Per quanto riguarda gli elementi sicuramente tossici, Cd, Hg, As, Th, Al, Pb e Sr, abbiamo ottenuto dati rassicuranti per quanto riguarda l'eventuale contaminazione da As, Cd, Th e Hg, in quanto per questi elementi le concentrazioni si sono rivelate estremamente basse, a volte addirittura inferiori al LOQ, mentre per gli altri abbiamo determinato concentrazioni che raggiungono livelli preoccupanti.

L'**Arsenico** è considerato dalla USEPA come uno dei 129 inquinanti prioritari (Keith e Telliard 1979). L'arsenico può essere assorbito attraverso ingestione, inalazione o attraverso la permeazione della pelle o delle mucose (Gearheart e Waller 1994). La sensibilità è specie-specifica ed è influenzata dalla forma in cui è presente l'As, la dose e la via di somministrazione (Eisler, 1998). L'arsenico è un elemento comune in natura, presente nell'aria, nel terreno, nell'acqua e nei vari tessuti. La maggior parte dell'arsenico è escreto attraverso le urine durante i primi giorni dopo l'esposizione (Gearheart e Waller 1994). Concentrazioni di arsenico in natura sono di solito meno di 1µg/g di peso umido (Eisler 1988) o circa 4,5 µg/g di peso secco. Tra le cause più comuni di intossicazione da As c'è la contaminazione da erbicidi e pesticidi. L'arsenico era presente in concentrazioni basse (0,012 mg/kg nel fegato; 0,007 mg/kg nel rene, 0,021 mg/kg nelle ossa). Così come la concentrazione media di As nei 6 pool, confermerebbe i risultati riscontrati nei singoli animali della stessa (0,05 mg/Kg). L'arsenico è stato rilevato in concentrazioni maggiori nei due esemplari rispettivamente della colonia B e C e completamente assente in quella D. Questo suggerisce che queste due popolazioni si nutrono in habitat unici con diversi livelli di arsenico ambientale.

Il **cadmio** non ha alcuna funzione biologica nota (Eisler 1985). La sua tossicità può avvenire attraverso l'esposizione per via respiratoria o digerente (Cooke e Johnson 1996). L'assorbimento per via orale è scarso, solitamente meno del 5% del cadmio ingerito viene assorbito. Il cadmio non sembra essere soggetto a bioaccumulo di livelli potenzialmente pericolosi nei Molossi oggetto del nostro studio. Livelli superiori a 10 µg/g nel fegato possono essere considerati indicativi di contaminazione da Cd (Eisler, 1985). La concentrazione media di cadmio da noi riscontrata misurata nell'intera carcassa è risultata molto bassa (0,005 mg/kg), in accordo con quanto determinato nei diversi organi; questi dati permettono di escludere la contaminazione da cadmio.

Le concentrazioni di **mercurio** sono di particolare interesse poiché il mercurio può subire bioconcentrazione e bioamplificazione negli organismi, attraverso la

catena alimentare (Eisler, 1987). Il mercurio non ha alcuna funzione biologica nota e la sua presenza nelle cellule degli organismi viventi è indesiderabile e potenzialmente pericolosa. Le concentrazioni da noi misurate risultano essere trascurabili sia nell'intera carcassa (0,024 mg/Kg, w/w) che nei singoli organi analizzati (rene 0,011 mg/kg, fegato 0,017 mg/kg, ossa < loq, w/w). Le concentrazioni maggiori si sono avute sul singolo campione rinvenuto in via Passera (0,21 mg/kg w/w) e a Latina (0,17 mg/kg w/w). La concentrazione media di mercurio nel biota dei siti incontaminati è <1,0 mg/Kg di peso fresco (Eisler, 1987), pertanto, vi sono scarse probabilità che si riscontrino gli effetti negativi del mercurio considerando i due singoli esemplari. Il mercurio, tuttavia, una volta ingerito può avere effetti sinergici tossici o additivi in combinazione con altri elementi quali cadmio e rame, anch'essi presenti in concentrazioni trascurabili (Eisler 1987; Hoffman *et al.* 1990; Calabrese e Baldwin 1993).

Tra tutti gli elementi sicuramente tossici, nei campioni di pipistrello che abbiamo esaminato, il Pb presenta le concentrazioni più elevate, raggiungendo valori medi nelle ossa superiori anche a 168 mg/kg. Solo pochi studi hanno valutato la distribuzione di piombo nei pipistrelli (Clark 1979, Martin 1992). Le concentrazioni di Pb riscontrate nei pool ottenuti dall'intera carcassa (31,86 – 49,95 mg/kg w/w) sono simili alle concentrazioni di tutto il corpo del grande pipistrello marrone (*Myotis lucifugus*), (31,49-46,56: mg/kg di peso fresco) e piccolo pipistrello marrone (16,9 7 mg/kg di peso fresco), riscontrate per l'intera carcassa da Clark (1979) in esemplari raccolti in aree contaminate da piombo, nel Maryland. Le concentrazioni elevate, riscontrate nei vari organi degli esemplari della colonia A (rene: 5,67 mg/kg; fegato: 65,7 mg/kg; ossa: 168,43 mg/kg di peso fresco) e la distribuzione normale in rene e ossa, nei 3 anni di campionamento suggeriscono una costante presenza del contaminante nella colonia, infatti i valori da noi determinati nel rene sono di un ordine di grandezza superiore a quanto riportato da Walker *et al.*, (2007) per alcune specie di pipistrelli provenienti dalla Gran Bretagna.

Non è noto con certezza quali effetti sub letali o addirittura letali tali concentrazioni potrebbero avere sullo sviluppo e sul comportamento dei giovani esemplari. Le alte concentrazioni riscontrate possono inoltre suggerirci che gli esemplari della colonia, potrebbero alimentarsi in habitat contaminati, ad esempio, alti livelli di piombo sono stati osservati negli uccelli erbivori e in quelli che si

nutrono di invertebrati acquatici oltre ai mammiferi insettivori (Alleva *et al.*, 2005). Gli insetti esposti al Pb potrebbero fungere inoltre da tramite per i livelli trofici superiori, sebbene Price *et al.* (1974), hanno trovato che gli insetti non fungono da reservoir di grandi quantità di Pb nell'ecosistema.

Ad alte dosi il piombo induce una riduzione del numero di gravidanze nel topo e mortalità embrionale prima dell'impianto. Dopo l'impianto i feti di topo mostrano un ritardo nella crescita, mortalità post-impianto e un aumento delle malformazioni scheletriche (Tachon *et al.*, 1983). Altri effetti includono alterate funzioni degli apparati nervoso, gastrointestinale, muscolare e del sistema ematopoietico (Eisler, 1988). Concentrazioni di piombo pari a 361.29 µg/g d/w sono state riscontrate nel fegato di fenicotteri con avvelenamento acuto in atto, in seguito ad ingestione di pallini da caccia (Ancora, 2008). Perrins *et al.*, (2003) in UK, riportano valori di Pb nel sangue di cigno, che vanno da un minimo di 0,02 µg/mL in cigni prelevati da siti non inquinati, ad un massimo 30 µg/ml negli uccelli provenienti da aree inquinate. Concentrazioni massime di piombo pari a 140 mg/kg sono state osservate nella tibia di lavoratori esposti alla contaminazione da quest'ultimo (Ambrose *et al.*, 2000).

Un'ipotesi di contaminazione potrebbe essere rappresentata dalla ingestione o inalazione di polveri contenenti differenti rapporti dei vari elementi. Non ci sono casi documentati di effetti dei metalli sulla popolazione dei pipistrelli (Clark e Shore, 2001), sebbene l'intossicazione da Pb è stata osservata, come risultato di inalazione di Pb atmosferico o ingestione di particelle di Pb durante il grooming (Hariono *et al.*, 1993) con concentrazioni però molto più basse (13,1 mg/kg d/w) di quelle riscontrate nel nostro studio (media pool carcasse: 38,2 mg/kg). È inoltre interessante osservare come le concentrazioni di piombo nelle colonie B, C, D siano inferiori in rene e fegato, ed elevate nelle ossa soltanto dell'esemplare di via Passera (100 mg/kg). Ciò ci conferma l'importanza di valutare le ossa dei mammiferi, considerando inoltre che le ossa accumulano molti metalli specialmente gli elementi bivalenti che mimano il calcio (EPA 1998; Nielsen 2004). L'ipotesi che l'origine della contaminazione da piombo possa derivare dal grooming e quindi essere legata al sito di "nursery", sarebbe dovuto essere supportato da concentrazioni maggiori nell'intera carcassa, costituita prevalentemente da ossa e pelo. In ogni caso in tutti gli esemplari esaminati, le concentrazioni di Pb si sono rivelate nel rene vicine al valore soglia di 25 mg/kg

di peso secco (circa 6 mg/Kg di peso fresco) che viene riportato come indicativo di intossicazione acuta nei mammiferi selvatici (Ma, 1996).

Stronzio e Bario sono elementi non essenziali ampiamente distribuiti che non biomagnificano lungo la catena trofica e mimano il calcio nei sistemi biologici (Nielsen 2004; EPA 1998; Malina, 2004; Puerej, 2004). I sali solubili di bario possono essere tossici per i mammiferi (US EPA 1999). Lo stronzio è considerato tossico solo ad alti dosaggi (Nielsen, 2004), inducendo ipocalcemia negli animali esposti. Lo stronzio è un elemento che si trova naturalmente nelle rocce e nel suolo; gli isotopi che si ritrovano nell'ambiente sono stabili e sono in genere quattro: ^{84}Sr , ^{86}Sr , ^{87}Sr , ^{88}Sr , mentre l'isotopo radioattivo ^{90}Sr si forma nei reattori nucleari ed è caratterizzato da un tempo di vita medio molto lungo, pari a 29 anni. Nei nostri campioni sono state riscontrate concentrazioni medie di stronzio nella carcassa variabili tra 9,7 e 12 mg/kg, mentre l'osso è risultato il tessuto dove erano presenti le maggiori concentrazioni, con valori che arrivavano a 70 mg/kg negli esemplari della colonia A, è interessante inoltre osservare le alte concentrazioni di Sr anche negli esemplari campionati a Latina e via Passera (rispettivamente 155 e 102 mg/kg w/w).

L'alluminio è un elemento abbondantemente presente nell'ambiente e ha molte applicazioni industriali. L'esposizioni può avvenire dall'ambiente, dai cibi, dall'acqua, dalle particelle fini contenenti alluminio inalate e per l'uomo dal consumo di certi farmaci. È accertato che l'alluminio è un agente neurotossico. È stato proposto che la neurotossicità indotta dall'alluminio derivi da vari meccanismi, come la produzione di radicali liberi che inducono per ossidazione lipidica, alterazione del metabolismo glucidico, alterazione della trasduzione, attraverso la modificazione di proteine, alterazione del trasporto dell'impulso nervoso nei neuro filamenti (Gomez *et al.*, 2008). Nell'uomo l'alluminio accumulato nelle ossa può interferire con il rimodellamento osseo, portando a forme di osteodistrofia, osteoartrite oppure osteomalacia (Davis *et al.*, 2008). Le concentrazioni medie di Al da noi osservate nell'intera carcassa risultano pari a 68 mg/kg. Osservando la distribuzione di alluminio nei diversi tessuti (fegato 0,26 mg/kg, rene 0,55 mg/kg, ossa 6,3 mg/kg), se ne deduce che il contributo maggiore possa derivare dalle ossa, come osservato in uno studio sperimentale condotto su ratti (Slanina *et al.* 1984). Il medesimo studio riporta un valore medio di alluminio nelle dei ratti non trattati pari a 0,35 mg/kg. Inoltre Baydar *et al.*, 2004 riporta

concentrazioni di Al nelle ossa di ratti trattati con 200 mg/ml per via orale e per 8 settimane pari a 9 µg/g.

4.2. DIOSSINE E PCB

Le diossine e i PCB sono sostanze chimiche dotate di alcune proprietà tossiche che, contrariamente ad altri inquinanti, resistono alla degradazione e sono quindi particolarmente nocive per la salute umana e per l'ambiente. Si accumulano negli organismi viventi e si propagano per mezzo dell'aria, dell'acqua e delle specie migratrici, concentrandosi negli ecosistemi terrestri e acquatici.

Le policlorodibenzo-*p*-diossine (PCDD) ed i policlorodibenzofurani (PCDF) denominate genericamente "diossine" sono composti chimici, eteroaromatici triciclici il cui grado di clorurazione ha permesso di individuare diversi congeneri (75 per i PCDD e 135 per i PCDF). Di questi 210 congeneri, 17 sono considerati tossicologicamente rilevanti e sono quelli con cloro-sostituzione nelle posizioni 2, 3, 7 e 8, tra cui il più attivo è la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-diossina (T₄CDD).

PCDD e PCDF di per sé non rivestono alcuna utilità pratica, e non sono mai stati un prodotto industriale (<http://www.sanitaliaweb.it>) bensì sottoprodotti indesiderati di reazioni chimiche, termiche, fotochimiche ed enzimatiche. Sono tuttavia reperibili pressoché ovunque nell'ambiente

I PCB sono contaminanti ambientali ubiquitari, ampiamente introdotti nell'ambiente come prodotti dell'industria e dell'agricoltura. Costituiscono un gruppo di 209 congeneri (Ballschmiter e Zell, 1980) i quali differiscono tra loro per la posizione assunta dagli atomi di cloro (Ruzzenti, 2003). Di questi circa 130 congeneri sono presenti nei prodotti commerciali (UNEP, 1999). Dall'atmosfera i PCB, per deposizione della polvere e con le precipitazioni, possono raggiungere il terreno, le acque superficiali e le piante. La loro degradazione dipende dal grado di clorazione del bifenile.

Per la loro alta lipofilità e persistenza si accumulano nei tessuti grassi e biomagnificano nella catena alimentare (Newton, 1979). A concentrazioni relativamente basse i composti organoclorurati e i metalli pesanti sono coinvolti in danneggiamenti del sistema riproduttivo e nel declino della popolazione e alterazioni comportamentali come descritto anche per i pipistrelli (Stansley *et al.*, 2001). I pipistrelli insettivori hanno diverse caratteristiche che possono aumentare la loro esposizione agli organoclorurati rispetto a mammiferi o uccelli di

dimensioni maggiori, questo è legato al loro alto grado metabolico (grandi quantità di cibo assunto rispetto alla loro massa). Gli organoclorurati essendo contaminanti lipofilici si depositano nel grasso. Come per alcuni uccelli i pipistrelli aumentano il rischio di mobilitazione di organoclorurati immagazzinati quando i depositi di grasso sono consumati, quindi durante la migrazione, l'ibernazione o il risveglio.

Nei mammiferi le più alte concentrazioni di PCBs sono state osservate negli insettivori (Alleva *et al.*, 2005).

Il trasferimento per via verticale degli organoclorurati dalle femmine ai feti e ai giovani attraverso il latte è un fatto conosciuto per diverse specie di pipistrelli (Clark and Lamont, 1976; Clark 1981). Un meccanismo che potrebbe spiegare gli alti livelli di PCB riscontrati in esemplari giovani potrebbe essere legato alle alte proporzioni di grassi nel corpo delle femmine in lattazione e la trasmissione di lipidi attraverso il latte. Questo determinerebbe una via di assunzione più veloce dall'ambiente dei giovani, attraverso la madre (Guillen *et al.*, 1993). Inoltre, il tempo di dimezzamento di queste sostanze tossiche potrebbe essere più alto negli individui giovani a causa dell'imaturità dei loro meccanismi catabolici e di escrezione. Per esempio Ballatori e Clarkson 1982, riportano che in alcuni mammiferi il dotto biliare non diventa funzionale per diverso tempo dopo la nascita, essendo quindi inabile all'escrezione di tossici come il mercurio. I giovani sono maggiormente esposti alle contaminazioni da pesticidi organoclorurati per l'alta concentrazione di questi composti liposolubili nei grassi del latte e successivo immagazzinamento nei loro tessuti corporei. I giovani pipistrelli rimangono piuttosto protetti dagli effetti tossici di queste sostanze perché essi contengono grasso corporeo sufficiente per l'immagazzinamento dei pesticidi sino a quando non iniziano a volare. Il rilascio di questi pesticidi, quando il grasso è mobilizzato durante la migrazione, potenziale rischio, sia nei giovani che negli adulti (Geluso *et al.*, 1976; Thies *et al.*, 1996).

Da un primo esame valutativo effettuato sui singoli congeneri nei 6 campioni sembrano essere presenti origini di contaminazione comune, anche se il profilo del pool 3 femmine è sostanzialmente differente sia per le diossine che per i PCB. Per quest'ultimo gruppo potrebbe essere presente un fattore perturbante legato a qualche animale componente del pool, infatti a questo gruppo appartengono pipistrelli di peso inferiore ed è quello che nel complesso presenta il peso medio

inferiore. La prevalenza di congeneri di PCB e di PCDD/F a maggior grado di clorurazione farebbe ipotizzare una minore metabolizzazione e quindi per il pool 3 femmine una maggiore presenza di soggetti lattanti.

In considerazione della presenza di una medesima impronta di diossine e PCB nei 5 campioni di pool analizzati, ad eccezione del pool 3 femmine, e di una intercorrelazione tra i diversi gruppi di clorurazione si ritiene possibile la presenza di una fonte comune di contaminazione.

La conoscenza dei profili dei congeneri può fornire utili informazioni circa il contributo di una specifica fonte di combustione durante la misurazione delle sostanze tossiche presenti nell'aria; consente, inoltre, di paragonare le fonti di emissione sulla base dei differenti congeneri emessi e di approfondire le modalità di formazione di PCDD e PCDF a livello di ciascuna di esse (Rapporti ISTISAN 06/5).

4.3. PFAS

L'acido perfluoro-ottan-sulfonico (PFOS) e l'acido perfluoro-ottanoico (PFOA) sono composti chimici che a partire dagli anni 40, si trovano in diverse parti del Mondo. Il capostipite di tutti i fluoropolimeri e fluorotelomeri è noto come Teflon (PTEF). Le prime preoccupazioni dei possibili effetti tossici sembra risalgano agli anni '70. Dall'esito di numerosi monitoraggi, si può affermare che il PFOS possa essere biomagnificato ai livelli più alti della catena alimentare. Tra le sostanze perfluoroalchiliche, i PFOS erano i composti perfluorinati predominanti trovati nelle carcasse di chiroteri analizzati, così come riportato da (Kannan *et al.*, 2010). Le concentrazioni misurate di PFOS (valore massimo 25,5 µg/kg) erano inferiori a quelle riportate in chiroteri del genere *Myotis lucifugus* a New York (Kannan *et al.*, 2010).

5. CONCLUSIONI

Nonostante le popolazioni di molte specie europee di pipistrelli siano attualmente in calo, i lavori riguardanti le concentrazioni dei contaminanti potenzialmente tossici sono molto scarse e si limitano generalmente ad esaminare alcuni metalli, come Cd e Pb o alcuni contaminanti organici. Le sostanze tossiche possono essere una grave minaccia per gli organismi a vita lunga, ma questi animali spesso non ricevono sufficiente attenzione. A quanto ci risulta, il nostro lavoro rappresenta quindi il primo tentativo di analizzare su vasta scala le concentrazioni di questi inquinanti in una popolazione di pipistrelli residenti in un'area urbana. Tra i vari contaminanti esaminati in questo studio, il Pb e le diossine possono costituire un serio problema per *Tadarida teniotis*.

La contaminazione da PCDD/F e da PCB DL e PCB NDL nei pipistrelli analizzati è da ritenersi importante anche se in bibliografia non sono riportati dati sulle diossine propriamente dette e quelli sui PCB sono datati e non si tiene conto dei rispettivi fattori di tossicità. Il confronto dei livelli di contaminazione con altri mammiferi predatori evidenzia maggiormente l'alto livello di contaminazione nei nostri esemplari. I livelli di elevata contaminazione da diossine e PCB associati ad altrettanti elevati livelli di Pb e alla presenza di alterazioni patologiche nei pipistrelli lattanti farebbe ipotizzare una tossicità sinergica di questi composti tossici organici ed inorganici. I dati ottenuti sono sovrapponibili per 5 dei 6 gruppi esaminati e quindi correlabili ad un'unica fonte di contaminazione. Presumibilmente il gruppo che presenta un diverso profilo, associato però ad un maggior livello di contaminazione, è costituito da animali più giovani e quindi maggiormente influenzati dal trasferimento dei contaminanti mediante il latte materno. Investigare la possibile fonte di contaminazione con i dati a disposizione non è possibile, comunque questa va ricercata sia nell'ambiente di predazione che quello in cui vive la colonia.

Prima di trarre conclusioni definitive, ulteriori studi sono necessari per analizzare le concentrazioni di questi inquinanti in altre popolazioni di pipistrelli provenienti da aree meno antropizzate, in modo da produrre dati utilmente applicabili sia alla salvaguardia della fauna selvatica che alla protezione della salute umana.

6. BIBLIOGRAFIA

- Alleva E, Francia N, Pandolfi M, De Marinis AM, Chiarotti F, Santucci D. Organochlorine and heavy-metal contaminants in wild mammals and birds of Urbino-Pesaro Province, Italy: an analytic overview for potential bioindicators. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2006; 51(1):123-34.
- Ambrose T. M., Muhammad Al-Lozi, Scott M. G. Bone Lead concentration assessed by in vivo X-Ray Fluorescence. *Clinical Chemistry*, 2000; 46: 1171- 1178
- Ancora S, N Bianchi, C Leonzio and A Renzoni. Heavy metals in flamingos (*Phoenicopterus ruber*) from Italian wetlands: the problem of ingestion of lead shot. *Environ Res*, 2008; 107: 229-236.
- Andreani G., Santoro M., Cottignoli S., Fabbri M., Carpenè E., Isani G. Metal distribution and metallothionein in loggerhead (*Carretta carretta*) and green (*Chelonia mydas*) sea turtles. *Science of the Total Environment*, 2008; 390(1):287-94
- Ankley, G.T.. Evaluation of metal/acid-volatile sulfide relationships in the prediction of metal bioaccumulation by benthic macroinvertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 1996; 15, 2138--2146.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 1990. Toxicological Profile for Manganese (Draft). U.S. Public Health Service., U.S. Dept. Health and Human, Atlanta, GA 4 pp. Blus, L.J. 1996. DDT, DDD, and DDE in birds. Pages 49-71 in *Environmental*
- B. L. Vallee and K. H. Falchuk The biochemical basis of zinc physiology *Physiol Rev* January 1, 1993 73:(1) 79-118
- Ballatori N, Clarkson TW. Developmental changes in the biliary excretion of methylmercury and glutathione. *Science*. 1982; 216:61-3.

- Baydar T, Nagymajtényi L, Isimer A, Sahin G. Effect of folic acid supplementation on aluminum accumulation in rats. *Nutrition*. 2005 Mar;21(3):406-10.
- Beijer, K., Jernelöv, A. 1979. Sources, transport and transformation of metals in the environment. In: Friberg, L., Norfberg, G.F., Vouk, V.B. (Eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam,
- Brigham, R.M. and M.B. Fenton. Convergence in foraging strategies by two morphologically and phylogenetically distinct nocturnal aerial insectivores. *Journal of Zoology (London)* 1991; 223:475-489.
- Calabrese, E.J. and L.A. Baldwin. *Performing ecological risk assessments*. Lewis Publishers, Chelsea, Michigan. 1993; 257 pp.
- Clark DR Jr, Stafford CJ. Effects of DDE and PCB (Aroclor 1260) on experimentally poisoned female little brown bats (*Myotis lucifugus*): lethal brain concentrations. *J Toxicol Environ Health*. 1981; 7:925-34.
- Clark, D.R., Jr. Death of bats from DDE, DDT, or dieldrin: diagnosis via residues in carcass fat. *Bull Environ. Contam. Toxicol*. 1981; 26:367-374.
- Clark, D.R., Jr. Selenium accumulation in mammals exposed to contaminated California irrigation drainwater. *The Sci. Total Environ*. 1987; 66: 147-168.
- Clark, D.R., Jr. Lead concentrations: Bats vs. terrestrial small mammals collected near a major highway. *Environ. Sci. Technol*. 1979; 338-341.
- Cooke, J.A. and M.S. Johnson. Cadmium in small mammals. in *Environmental Contaminants in Wildlife: Interpreting Tissue Concentrations*. Beyer Pp. 1996; 377 - 388

- Davis K, Aslam, Pejovia-Miaia A., Chettle DR. In vivo measurement of bone aluminum in population living in southern Ontario. *Med Phys.* 2008; 35 (11) 5115 - 23
- Domingo JL. Metal-induced development toxicity in mammals. A review. *J. Toxicol. Environm. Health* 1994; 42:123-141
- Eisler, R. 1988a. Arsenic hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. U.S. Fish Wildl. Serv. Biol. Rep. 85(1.12), Washington, D.C. 92 pp.
- Eisler, R. 1988b. Lead hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. U.S. Fish Wildl. Serv. Biol. Rep. 85(1.4), Washington, D.C. 134 pp.
- Eisler, R. 1997. Copper hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. U.S. Fish Wildl. Serv., USGS/BRD–Biol. Sci. Rep. 1997 Washington, D.C. 99 pp.
- Fowler BA. Mecchanism of kidney cell injury from metal. *Environm. Health Perspect.* 1992; 100: 57-63
- Gearheart, R.A. and G.W. Waller. 1994. Hayward Metals Study: Literature survey. Environmental Resources Engineering Department, Humbolt State University, Arcata, CA, 136 pp.
- Geluso KN, Altenbach JS, Wilson DE. Bat mortality: pesticide poisoning and migratory stress. *Science.* 1976; 194:184-6.
- Hariono, B., J. Ng, and R.H. Sutton. Lead concentrations in tissues of fruit bats (*Pteropus sp.*) in urban and non-urban locations. *Wildlife Research* 1993; 20:315-320.

- Hernández LM, Ibáñez C, Fernández MA, Guillén A, González MJ, Pérez JL. Organochlorine insecticide and PCB residues in two bat species from four localities in Spain. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1993; 50(6):871-7.
- Hickey, M. B. C. and M. B. Fenton. Behavioural and thermoregulatory responses of female hoary bats, *Lasiurus cinereus* (Chiroptera: Vespertilionidae), to variations in prey availability. *Ecoscience* 1996; 3:414-422.
- Hilmy, A.M., N.A. El-Domiaty, A.Y. DaaBees, and A. Alsarha. Toxicity in *Tilapia zilla* and *Clarias lazera* (Pisces) induced by zinc seasonally. *Comparative Biochemistry and Physiology* 1987; 86C:263-365.
- Hoffman, D.J., B.A. Rattner, and R.J. Hall.. *Wildlife toxicology. Environmental Science and Technology*. 1990; 24:276-282.
- Hoffman, D.J., G.H. Heinz, L.J. LeCaptain, and C.M. Bunck.. Subchronic hepatotoxicity of selenomethionine ingestion in mallards. *J. Toxicology and Environ. Health* 1991; 32:449-464.
- Hood, W.R., Oftedal, O.T., Kunz, T.H. Is tissue maturation necessary for flight? Changes in body composition during postnatal development in the big brown bat. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* . 2011; (181) 423-435
- <http://commons.wikimedia.org>
- Hughes, J.B., Daily, G.C. and Ehrlich, P.R. Population diversity: its extent and extinction. *Science* 1997; 278, 689–92.
- Keith, L.H. and W.A. Telliard. Priority Pollutants: I a perspective view. *Environ. Sci. and Toxicol*. 1979; 13:416-423.

- Komarnicki GJ Tissue. Sex and age specific accumulation of heavy metals (Zn, Cu, Pb, Cd) by populations of the mole (*Talpa europaea L.*) in a central urban area. *Chemosphere*. 2000 ;41:1593-602.
- Lanza B., 1959. Chiroptera. In: Toschi A., lanza B., Fauna d'Italia, vol. IV, Mammalia, generalità, Insectivora, Chiroptera, Ed. Calderini, Bologna; 187-473.
- Lucho-Constantino CA, Alvarez-Suárez M, Beltrán-Hernández RI, Prieto-García F, Poggi-Varaldo HM.A Multivariate analysis of the accumulation and fractionation of major and trace elements in agricultural soils in Hidalgo State, Mexico irrigated with raw wastewater. *Environ Int*. 2005 ;31:313-23.
- Ma, W.C. Lead in mammals. In: Beyer, W., Heinz, G., Redmon-Norwood, A. (Eds.), *Environmental Contaminants in Wildlife. Interpreting Tissue Concentrations*. CRC Press Inc, London, 1996. pp. 281-296.
- Martin, D.B. Contaminant Studies on Endangered Bats in Northeastern Oklahoma. U.S. Fish and Wildlife Service, Oklahoma Ecological Services Field Office, Tulsa, Oklahoma 1992; 16 pp.
- Meyers-Schöne, L., Shugart, L.R., Beauchamp, J.J.. Comparison of two freshwater turtle species as monitors of radionuclide and chemical contamination: DNA damage and residue analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 1993; 12, 1487-1496.
- Newton I. (1979). *Population ecology of raptors*. Harrel Book. England, UK.
- Ohlendorf, H.M., A.W. Kilness, J.L. Simmons, R.K. Stroud, D.J. Hoffman, and J.F. Moore. Selenium toxicosis in wild birds. *J. Toxicol. Environ. Health* 1988; 24:67-92.

- Pankakoski E, Hyvärinen H, Jalkanen M, Koivisto I. Accumulation of heavy metals in the mole in Finland. *Environ Pollut.* 1993;80:9-16.
- Perrins CM, G Cousquer and J Waine. A survey of blood lead levels in mute swans *Cygnus olor*. *Avian Pathol*, 2003; 32: 205-212.
- Russo D. 2013. *La vita segreta dei pipistrelli. Mito e storia naturale.* Lit Edizioni s.r.l., Roma
- Sánchez-Chardi A, López-Fuster MJ. Metal and metalloid accumulation in shrews (Soricomorpha, Mammalia) from two protected Mediterranean coastal sites. *Environ Pollut.* 2009; 157:1243-8.
- Simmons, N. B.. Order Chiroptera. in *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference* (D. E. Wilson and D. M Reeder, eds.). 3rd ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland. 2005; Pp. 312–529
- Slanina P, Falkeborn Y, Frech W, Cedergren A. Aluminium concentrations in the brain and bone of rats fed citric acid, aluminium citrate or aluminium hydroxide. *Food Chem Toxicol.* 1984; 22:391-7.
- Stansley W, Roscoe DE, Hawthorne E, Meyer R. Food chain aspects of chlordane poisoning in birds and bats. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2001; 40:285-91.
- Thies ML, Thies K, McBee K. Organochlorine pesticide accumulation and genotoxicity in Mexican free-tailed bats from Oklahoma and New Mexico. 1996;30:178-87.
- Vernier E., 1997. *Manuale pratico dei Chiropteri Italiani.* (Seconda edizione, riveduta ed aggiornata). Società cooperativa tipografica, Padova, 159 pp.

- Walker LA, Simpson VR, Rockett L, Wienburg CL, Shore RF. Heavy metal contamination in bats in Britain *Environ Pollut.* 2007; 148:483-90
- Walker LA, Simpson VR, Rockett L, Wienburg CL, Shore RF. Heavy metal contamination in bats in Britain. *Environ Pollut.* 2007; 148:483-90.
- Wilhelm Jahnen-Dechent¹ and Markus Ketteler. Magnesium basics *Clin Kidney J* (2012) 5[Suppl 1]: i3–i14
- <http://www.sanitaliaweb.it>
- Ballschmiter K. and Zell M. 1980: Analysis of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) by Glass Capillary Gas Chromatography. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 302, 20-31
- UNEP (United Nations Environmental Program), 1999. Guidelines for the Identification of PCBs and Materials Containing PCBs. UNEP Chemicals
- Ruzzenenti M. La storia dei PCB (policlorobifenili). *Miracoli e disastri della tecnica del novecento.* Altrionovecento. N.6 febbraio 2003.