

**ARPA**  
**Agenzia Regionale per la Prevenzione e l'Ambiente**  
**dell'Emilia - Romagna**

\* \* \*

**Atti amministrativi**

Determinazione dirigenziale	n. DET-2015-858	del 17/12/2015
Oggetto	Sezione Provinciale di Parma – Sottoscrizione di un accordo di collaborazione e ricerca con l'Università degli Studi di Parma, Dipartimento di Bioscienze, Laboratorio di Geno-tossicologia Umana, Microbica e Vegetale al fine di realizzare studi, valutazioni, analisi e ricerche.	
Proposta	n. PDTD-2015-849	del 14/12/2015
Struttura adottante	Sezione di Parma	
Dirigente adottante	de' Munari Eriberto	
Struttura proponente	Sezione di Parma	
Dirigente proponente	Dottor de' Munari Eriberto	
Responsabile del procedimento	Cassoni Francesca	

Questo giorno 17 (diciassette) dicembre 2015 presso la sede di Viale Bottego, 9 in Parma, il Direttore della Sezione di Parma, Dottor de' Munari Eriberto, ai sensi del Regolamento Arpa sul Decentramento amministrativo, approvato con D.D.G. n. 65 del 27/09/2010 e dell'art. 4, comma 2 del D.Lgs. 30 marzo 2001, n. 165 determina quanto segue.

**Oggetto: Sezione Provinciale di Parma – Sottoscrizione di un accordo di collaborazione e ricerca con l'Università degli Studi di Parma, Dipartimento di Bioscienze, Laboratorio di Geno-tossicologia Umana, Microbica e Vegetale al fine di realizzare studi, valutazioni, analisi e ricerche.**

**RICHIAMATI:**

- la L.R. 19/4/1995, n. 44 che istituisce l'Arpa (Agenzia Regionale per la Prevenzione e l'Ambiente dell'Emilia-Romagna), ente strumentale della Regione Emilia-Romagna preposto all'esercizio delle funzioni tecniche per la prevenzione collettiva e per i controlli ambientali, nonché all'erogazione di prestazioni analitiche di rilievo sia ambientale che sanitario;
- in particolare l'art. 5, comma 1, lett. a), della medesima Legge Regionale prevede tra le funzioni, attività e compiti di Arpa la realizzazione, anche in collaborazione con altri organismi ed istituti operanti nel settore, di iniziative di ricerca applicata sui fenomeni dell'inquinamento e della meteorologia, sulle condizioni generali dell'ambiente e del rischio per l'ambiente e per i cittadini, sulle forme di tutela degli ecosistemi;
- l'art. 5, comma 2, della medesima Legge Regionale prevede che per l'adempimento delle proprie funzioni, attività e compiti, Arpa possa definire accordi o convenzioni con Aziende ed Enti pubblici, operanti nei settori suolo, acque, aria, ambiente, in particolare per quanto concerne la raccolta dei dati e la gestione di sistemi informativi e di rilevamento;
- l'art. 15 della L. 7 agosto 1990, n. 241, ai sensi del quale le pubbliche amministrazioni possono concludere tra loro accordi per disciplinare lo svolgimento in collaborazione di attività di interesse comune;

**VISTE:**

- la DDG n. 94 del 23/12/2014 - Direzione Amministrativa. Area Bilancio e Controllo Economico. Approvazione del Bilancio pluriennale di previsione per il triennio 2015-2017, del Piano Investimenti 2015-2017, del Bilancio economico preventivo per l'esercizio 2015, del Budget generale e della programmazione di cassa 2015;
- la DDG n. 95 del 23/12/2014 - Direzione Amministrativa. Area Bilancio e Controllo Economico. Approvazione delle linee guida e assegnazione dei budget di esercizio e investimenti per l'anno 2015 ai centri di responsabilità;

#### PREMESSO:

- che la Sezione Provinciale Arpa di Parma, Laboratorio Tematico "Mutagenesi Ambientale", nell'ambito delle sue attività ha collaborato costantemente con il Laboratorio di Geno-Tossicologia Umana, Microbica e Vegetale sino dal 1990;
- che il suddetto Laboratorio dell'Università di Parma rappresenta un polo di eccellenza nazionale e regionale nello specifico settore;
- che attraverso questa importante sinergia è stato possibile sviluppare in Arpa Emilia-Romagna le competenze professionali e le metodiche analitiche che hanno portato le professionalità presenti nella Sezione di Parma a livello di consolidata eccellenza regionale in campo ambientale;
- che Arpa Emilia-Romagna e Università di Parma hanno realizzato numerosi progetti di ricerca comuni;
- che attualmente il Laboratorio Tematico di Mutagenesi Ambientale gestisce le attività analitiche relative alla Rete Regionale di Mutagenesi Ambientale sul Particolato Atmosferico, ed effettua specifiche attività di ricerca;
- che Arpa Emilia-Romagna intende sviluppare ulteriormente le attività attualmente in essere sulla matrice in oggetto anche alla luce delle collaborazioni, degli studi e delle valutazioni sino ad oggi effettuate anche in collaborazione con l'Università di Parma;
- che le attività in oggetto rientrano nella collaborazione attivata con la Convenzione Quadro, ormai decennale, stipulata da Arpa Emilia-Romagna e Università degli Studi di Parma;
- che, l'Università di Parma possiede all'interno del Laboratorio di Geno-Tossicologia Umana, Microbica e Vegetale del Dipartimento di Bioscienze tutte le attrezzature fondamentali e le competenze necessarie alla realizzazione dell'attività oggetto del presente Accordo;

#### DATO ATTO:

- che nel corso della suddetta collaborazione è emersa la possibilità di stipulare un accordo tra i due enti l'Università degli Studi di Parma, Dipartimento di Bioscienze, Laboratorio di Geno-Tossicologia Umana, Microbica e Vegetale e Arpa Sezione di Parma al fine di realizzare studi, valutazioni, analisi e ricerche; (Allegato sub A);

- che il suddetto accordo avrà la durata di 24 mesi ovvero da 1 gennaio 2016 al 31 dicembre 2017;

- che Arpa Sezione di Parma per le attività in essere corrisponderà all'Università degli Studi di Parma, Dipartimento di Bioscienze, Laboratorio di Geno-Tossicologia Umana, Microbica e Vegetale un contributo pari ad Euro 32.000,00 (16.000,00 Euro annui), escluso dall'applicazione IVA ai sensi dell'art. 4 del D.P.R. 633/72 e successive modifiche e integrazioni, in quanto trattasi di attività istituzionale.

Tale somma verrà erogata con le seguenti modalità:

- prima quota pari al 20% dell'importo complessivo entro 30 giorni dalla firma del presente Accordo;
- seconda quota pari al 30% dell'importo complessivo previa verifica delle attività sostenute e della condivisione di tutti i risultati ottenuti nel corso del primo anno di validità del presente Accordo;
- terza parte pari al saldo del 50% dell'importo complessivo, al termine del secondo anno di validità del presente Accordo ed entro 30 gg dalla condivisione di tutti i risultati e delle attività sostenute nonché alla restituzione di tutti i beni eventualmente concessi in comodato d'uso gratuito.

SU PROPOSTA:

- del Direttore di Sezione, dott. Eriberto de' Munari, il quale ha espresso il proprio parere favorevole in ordine alla regolarità amministrativa della presente determinazione;

DATO ATTO altresì:

- del parere di regolarità contabile reso, ai sensi dell'art. 8, comma 2, del Regolamento per il Decentramento Amministrativo, dal Responsabile dello Staff Amministrazione-Comunicazione, Ester Cella ;
- che Responsabile del Procedimento è Francesca Cassoni,

DETERMINA

1. di approvare lo schema di accordo di collaborazione e ricerca con l'Università degli Studi di Parma, Dipartimento di Bioscienze, Laboratorio di Geno-tossicologia Umana, Microbica e Vegetale al fine di realizzare studi, valutazioni, analisi e ricerche, che si allega al presente atto quale parte integrante e sostanziale - allegato sub A);

2. di nominare Referente scientifico la dr.ssa Annamaria Buschini;
3. di dare atto che il citato accordo di collaborazione avrà la durata di 24 mesi: dal 1 gennaio 2016 al 31 dicembre 2017;
4. di riconoscere all'Università degli Studi di Parma il contributo di Euro 32.000,00 così suddiviso:  
prima quota pari al 20% dell'importo complessivo entro 30 giorni dalla firma del presente Accordo;
  - seconda quota pari al 30% dell'importo complessivo previa verifica delle attività sostenute e della condivisione di tutti i risultati ottenuti nel corso del primo anno di validità del presente Accordo;
  - terza parte pari al saldo del 50% dell'importo complessivo, al termine del secondo anno di validità del presente Accordo ed entro 30 gg dalla condivisione di tutti i risultati e delle attività sostenute nonché alla restituzione di tutti i beni eventualmente concessi in comodato d'uso gratuito.
5. di dare atto che il costo di Euro 32.000,00 relativo al presente provvedimento, avente natura di “Costi per contributi a enti pubblici” è a carico dell'esercizio 2016 per la quota di Euro 16.000,00 e dell'esercizio 2017 per la quota di Euro 16.000,00 e sono compresi nel conto economico preventivo pluriennale, con riferimento al centro di responsabilità PRDS.

Il Direttore della Sezione  
(F.to Dottor Eriberto de' Munari)

## ACCORDO DI COLLABORAZIONE E RICERCA

ARPA Emilia-Romagna, Sezione Provinciale di Parma (in seguito chiamato anche "ARPA"), con sede in Parma – Viale Bottego n. 9 (PEC: [aoopr@cert.arpa.emr.it](mailto:aoopr@cert.arpa.emr.it); Codice Fiscale e Partita IVA: 04290860370), rappresentata dal Direttore Dottor Eriberto de' Munari ai sensi del Regolamento per il Decentramento amministrativo approvato con Deliberazione del Direttore Generale di ARPA n. 65 del 27/09/2010;

### E

Università degli Studi di Parma, Dipartimento di Bioscienze, Laboratorio di Geno-tossicologia Umana, Microbica e Vegetale (Responsabile: Dott.ssa Annamaria Buschini), in seguito chiamato anche "Dipartimento"), con sede legale in Parma – Via Università n. 12 (PEC: [dip.bioscienzepec.unipr.it](mailto:dip.bioscienzepec.unipr.it)), Codice Fiscale e Partita IVA: 00308780345, rappresentata dal Rettore Professor Loris Borghi

### PREMESSO

- a) che la Sezione Provinciale di Parma, Arpa Emilia-Romagna, Laboratorio Tematico "Mutagenesi Ambientale", nell'ambito delle sue attività ha collaborato costantemente sia dal punto di vista tecnico che scientifico con il Laboratorio di Geno-Tossicologia Umana, Microbica e Vegetale sino dal 1990;
- b) che l'Università di Parma e nello specifico il Laboratorio di Geno-Tossicologia Umana, Microbica e Vegetale rappresenta un polo di eccellenza nazionale e regionale nello specifico settore;
- c) che attraverso questa importante sinergia è stato possibile sviluppare in Arpa Emilia-Romagna le competenze professionali e le metodiche analitiche che hanno portato le professionalità presenti nella Sezione di Parma a livello di consolidata eccellenza regionale in campo ambientale;
- d) che Arpa Emilia-Romagna e Università di Parma hanno realizzato numerosi progetti di ricerca comuni (di cui si allega sub A) un elenco dei principali - tra cui ad esempio attività nell'ambito del monitoraggio ambientale, la valutazione della ricaduta di sostanze genotossiche derivanti dall'impianto di incenerimento rifiuti sito in località Cornocchio a Parma, ora dismesso, e la campagna Ante-Operam del Nuovo Termovalorizzatore di Parma Sito in località Uguzzolo;

### VALUTATO

- a) che attualmente il Laboratorio Tematico di Mutagenesi Ambientale gestisce le attività analitiche relative alla Rete Regionale di Mutagenesi Ambientale sul Particolato Atmosferico, ed effettua specifiche attività di ricerca;
- b) che Arpa Emilia-Romagna intende sviluppare ulteriormente le attività attualmente in essere sulla matrice in oggetto anche alla luce delle collaborazioni, degli studi e delle valutazioni sino ad oggi effettuate anche in collaborazione con l'Università di Parma;
- c) che le attività in oggetto rientrano nella collaborazione attivata con la Convenzione Quadro, ormai decennale, stipulata da Arpa Emilia-Romagna e Università degli Studi di Parma che ha permesso di raggiungere un elevato know-how comune (in allegato sub B) il testo della convenzione Arpa-Università vigente;
- d) che, anche in relazione a quanto premesso, l'Università di Parma possiede all'interno del Laboratorio di Geno-Tossicologia Umana, Microbica e Vegetale del Dipartimento di Bioscienze

tutte le attrezzature fondamentali e le competenze necessarie alla realizzazione dell'attività oggetto del presente Accordo;

- e) che all'interno del Laboratorio di Geno-Tossicologia Umana, Microbica e Vegetale dell'Università di Parma è presente personale formato ed esperto nelle attività oggetto del presente Accordo, che verrà specificatamente impiegato per l'espletamento dell'attività analitica e di ricerca in oggetto;
- f) che, nel caso se ne ravveda la necessità al fine di non ritardare eventuali richieste analitiche o di studi specifici, Arpa Emilia-Romagna è disposta a mettere a disposizione del Dipartimento, per la durata del presente Accordo, attrezzature già in suo possesso attraverso la sottoscrizione di apposito Accordo di comodato d'uso gratuito;

## **CONVENGONO E STIPULANO QUANTO SEGUE:**

### **Art. 1**

Sono parte integrante del presente Accordo tutte le premesse, le valutazioni, le considerazioni e gli allegati ivi contenuti

### **Art. 2**

#### **OGGETTO DELL'ACCORDO**

Arpa Emilia-Romagna Sezione di Parma e Università degli Studi di Parma, Dipartimento di Bioscienze - Laboratorio di Geno-Tossicologia Umana, Microbica e Vegetale-, stipulano il presente Accordo di Collaborazione al fine di realizzare studi, valutazioni, analisi e ricerche in modo comune secondo le metodiche e le modalità concordate all'interno del Protocollo Operativo allegato sub C) al presente Accordo.

Tutte le attività oggetto del presente Accordo di Ricerca dovranno essere realizzate con le modalità, le tempistiche e gli impegni analitici previsti dal Protocollo Operativo allegato al presente Accordo. Eventuali sviluppi e/o modifiche di quanto sancito all'interno del suddetto Protocollo derivanti dalle attività sviluppate potranno essere recepiti all'interno del medesimo previo accordo tra le parti.

Relativamente alle modalità e alle procedure del Protocollo Operativo allegato, le parti si riservano di concordare con separato atto l'effettuazione di analisi a pagamento con oneri a carico di soggetti terzi.

### **Art. 3**

#### **DURATA DELL'ACCORDO**

Il presente Accordo entrerà in vigore dal 01 gennaio 2016 e terminerà il 31 dicembre 2017, salvo quanto previsto successivamente nel presente articolo.

Eventuali recessi da parte di entrambi i contraenti dovranno essere comunicati a mezzo Posta Elettronica Certificata con preavviso minimo di 30 giorni. Al termine del primo anno di validità del presente Accordo le parti effettueranno una verifica delle attività svolte e confermeranno il termine di validità del presente Accordo al 31 dicembre 2017.

In caso di conclusione anticipata dell'Accordo:

- Arpa contribuisce alla copertura dei costi sostenuti per attività svolte nel periodo di effettiva vigenza della convenzione;
- l'Università degli Studi di Parma si impegna sia a fornire tutti i risultati delle attività svolte sia alla restituzione di tutti i beni eventualmente concessi in comodato d'uso gratuito entro e non oltre i 60 gg dalla chiusura dell'Accordo.

#### **Art. 4**

##### **LUOGO DI ESECUZIONE E RESPONSABILE**

Il Dipartimento dichiara che l'esecuzione delle analisi indicate sarà effettuata presso i propri locali, utilizzando proprie strutture, attrezzature e personale, salvo quanto eventualmente previsto attraverso la sottoscrizione di apposito Accordo di comodato d'uso gratuito relativo alla messa a disposizione da parte di Arpa Emilia-Romagna al Dipartimento di attrezzature in suo possesso.

Responsabile dell'attività scientifica sarà la Dott.ssa Annamaria Buschini.

Eventuali modifiche al presente Accordo dovranno essere preventivamente concordate per iscritto tra le parti.

#### **Art. 5**

##### **MODALITA' DI EROGAZIONE DEL CONTRIBUTO**

Arpa Emilia-Romagna a copertura dei costi per la realizzazione degli studi e delle analisi derivanti dal presente Accordo riconosce ad Università di Parma un contributo complessivo pari a Euro 32000,00. (16000,00 Euro annui) , escluso dall'applicazione IVA ai sensi dell'art. 4 del D.P.R. 633/72 e successive modifiche e integrazioni, in quanto trattasi di attività istituzionale.

Tale somma verrà erogata con le seguenti modalità:

- 1<sup>a</sup> quota pari al 20% dell'importo complessivo entro 30 giorni dalla firma del presente Accordo;
- 2<sup>a</sup> quota pari al 30% dell'importo complessivo previa verifica delle attività sostenute e della condivisione di tutti i risultati ottenuti nel corso del primo anno di validità del presente Accordo;
- 3<sup>a</sup> parte pari al saldo del 50% dell'importo complessivo, al termine del secondo anno di validità del presente Accordo ed entro 30 gg dalla condivisione di tutti i risultati e delle attività sostenute nonché alla restituzione di tutti i beni eventualmente concessi in comodato d'uso gratuito.

#### **Art. 6**

##### **REGIME DI SEGRETEZZA**

Il Dipartimento, nella persona del Responsabile e dei suoi collaboratori, è tenuto ad osservare il segreto, nei confronti di qualsiasi persona non coinvolta nell'attività di ricerca oggetto del presente Accordo, in relazione ad atti, fatti, informazioni, cognizioni, documenti e quant'altro dei quali fossero venuti a conoscenza in occasione della ricerca dai medesimi eseguita.

#### **Art. 7**

##### **UTILIZZO E PUBBLICAZIONE DEI RISULTATI**

ARPA si impegna ad utilizzare i risultati esclusivamente per gli scopi istituzionali consueti.

ARPA e Dipartimento concorderanno congiuntamente le eventuali modalità di diffusione di risultati derivanti dalla realizzazione delle attività oggetto del presente Accordo.

#### **Art. 8**

##### **RESPONSABILITA'**

Il Dipartimento sarà esclusivamente responsabile, sia verso ARPA sia verso qualunque altro soggetto terzo, per atti e/o fatti derivanti dall'attività da esso direttamente svolta o a mezzo di propri dipendenti e/o collaboratori consulenti e/o borsisti.

Il Dipartimento dichiara di ottemperare a tutti gli obblighi verso i propri dipendenti e/o collaboratori in base alle disposizioni legislative e regolamenti vigenti in materia di lavoro, assicurazioni sociali e infortuni, assumendo a loro carico tutti gli oneri relativi.

Il tutto per le attività e per la durata della ricerca previste dal presente Accordo.



**Art. 9**  
**PRIVACY**

Con riferimento al disposto del Decreto Legislativo 196/2003 circa la Tutela dei dati personali, le parti si danno reciprocamente atto di essere a conoscenza del fatto che i propri dati personali, utili a fini di legge ed al fine di adempiere agli obblighi contenuti nel presente Accordo, verranno dall'altra parte conservati ed utilizzati. Pertanto con la firma del presente Accordo, le parti intendono anche esprimere esplicitamente il proprio consenso ai trattamenti sopradescritti e nei limiti delle finalità sopraccitate.

**Art. 10**  
**SOTTOSCRIZIONE**

Il presente Accordo, redatto in unico originale, è sottoscritto dalle parti con firma digitale ai sensi dell'art. 15, comma 2 bis, della L. 241/90.

**Art. 11**  
**REGISTRAZIONE**

Il presente Accordo è da registrarsi in caso d'uso a cura e spese della parte richiedente la registrazione.

Per ARPA Emilia-Romagna

Università degli Studi di Parma

Dott. Eriberto de' Munari

Prof. Loris Borghi

(documento firmato digitalmente secondo le normative vigenti)

(documento firmato digitalmente secondo le normative vigenti)

## **Pubblicazioni:**

1. C.Rossi, P.Poli, A.Buschini, R.Del Carratore, A.Galli, M.Impallomeni, V.Pessina, F.Cassoni (1989) "Indagine di Mutagenesi ambientale". *Parma Ambiente*, 5/6: 8-10.
2. C.Rossi, P.Poli, A.Buschini, F.Cassoni, V.Pessina, M.Impallomeni, R.Del Carratore, A.Galli, G.Bronzetti (1989) "Preliminary reports of genetic activity of samples collected from urban air and waste incinerator". *AGI*, 35: 313-314.
3. C.Rossi, P.Poli, A.Buschini, R.Del Carratore, A.Galli, M.Impallomeni, V.Pessina, F.Cassoni (1990) "Mutagenesi Ambientale Indagine nell'area urbana di Parma". *Parma Ambiente*, 3 :6-9.
4. C.Rossi, P.Poli, A.Buschini, F.Cassoni, V.Pessina, A.Galli, R.Velosi, R.Del Carratore (1990) "Risk assessment of incineration facilities emissions on the surrounding areas". *AGI*, 36: 71-72.
5. C.Rossi, P.Poli, A.Buschini, F.Cassoni (1990) "Genotoxic hazard valuation on the surrounding areas of an incineration plant". *S.I.T.E.*, 12: 319-322.
6. C.Rossi, P.Poli, A.Buschini, N.Campanini, M.V.Vettori, F.Cassoni (1991) "The extranuclear information: a new tool for ecotoxicity assessment". *AGI*, 37: 99-100.
7. C.Rossi, P.Poli, A.Buschini, F.Cassoni, A.Galli, R.Velosi, R.Del Carratore (1991) "Genetic activity of samples collected from a waste incinerator and its neighboring areas". *Toxicological and Environmental Chemistry*, 30: 51-61.
8. C.Rossi, P.Poli, A.Buschini, N.Campanini, M.V.Vettori, F.Cassoni (1992) "Persistence of genotoxicity in the area surrounding an incineration plant. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 36: 75-87.
9. P.Poli, A.Buschini, N.Campanini, M.V.Vettori, F.Cassoni, S.Cattani, C.Rossi (1992) "Urban air pollution: use of different mutagenicity assays to evaluate environmental genetic hazard". *Mutation Research*: 298: 113-123.
10. C.Rossi, P.Poli, A.Buschini, F.Cassoni (1993) "Different short-term tests for the detection of potentially genotoxic exposures in a glass industry". *Atti AGI*, 39: 39-40.
11. C.Rossi, P.Poli, A.Buschini, F.Cassoni, S.Cattani, E.DeMunari (1995) "Comparative investigations among meteorological conditions, air chemical/physical pollutants and airborne particulate mutagenicity: a long-term study (1990-1994) from a northern italian town". *Chemosphere*, 30: 1829-1845.
12. C.Rossi, P.Poli, A.Buschini, F.Cassoni, F.Magnani, S.Lucertini, S.Tolomei, C.Gerbelli (1995) "Occupational genotoxicity assessment by mutagenicity assays". *Toxicology Letters*, 77: 289-298.
13. F.Cassoni, A.Buschini, P. Poli, C.Rossi (1998) Termodistribuzione di RSU e inquinamento genotossico, strategie di monitoraggio. *ARPA*. 1(4): 24-25.
14. F.Cassoni, A.Buschini, P.Poli, C.Rossi (1999) "The regional network of Emilia-Romagna (Italy) for biomonitoring the airborne particulate genotoxicity load". *Air Quality in Europe Challenges for the 2000s*, International Conference Venezia 19-21 maggio 1999 Short Paper Book: 54
15. P.Poli, A.Buschini, F.M.Restivo, A.Ficarelli, F.Cassoni; I.Ferrero, C.Rossi (1999) Comet assay application in environmental monitoring: DNA damage in human leukocytes and plant cells in comparison with bacterial and yeast tests. *Mutagenesis*, 14:547-555.
16. F.Cassoni, A.Buschini (1999) "Biomonitoraggio della mutagenicità associata al particolato atmosferico: la rete regionale dell'Emilia-Romagna". *VII Congresso Annuale della Società Italiana di Mutagenesi Ambientale (SIMA)*, Cortona, 6-8 ottobre 1999: 56.
17. A.Buschini, E. Anceschi, F.Cassoni, S.Cattani, E.de'Munari, P.Poli, C.Rossi (2000) "Qualità dell'aria: valutazione della genotossicità associata al particolato atmosferico nella città di Parma (1991-1998)". *Inquinamento*, 12:42-45.
18. F.Cassoni, A.Buschini, S.Baiocchi, A.Ghinelli, P.Poli, C.Rossi (2000) "Genotoxicity of atmospheric particulate matter: a long-term study on different sizes". *Abstracts del 30<sup>th</sup> Annual Meeting of EEMS – Budapest, 22-26 agosto 2000*: 88.
19. F.Cassoni, A.Buschini, G.Pinto, P.poli, C.Rossi (2000) "Monitoraggio della genotossicità del particolato aerodisperso in area urbana". *I quaderni di Arpa: air qualità '98* Atti del 5° Convegno nazionale, Ravenna 25/28 Ottobre 1998: 328-335.
20. F.Cassoni, A.Buschini (2000) "Test di mutagenesi e monitoraggio ambientale" Rivista /Editore: *Volume de "I quaderni di Arpa"*
21. F.Cassoni, A.Buschini, S.Baiocchi, G.Pinto, S.Aimi, E.Renna, O.Sala, A.Chiodi, M.Ridolfi, R.Calori (2000) "Mutagenicità del particolato atmosferico urbano: studio delle diverse frazioni granulometriche sul lungo periodo". *I quaderni di Arpa: arie di città Atti del Convegno del 28/30 Novembre 2000 Bologna*: 60-605.
22. Buschini A, Cassoni F, Anceschi E, Pasini L, Poli P, Rossi C. (2001) "Urban airborne particulate: genotoxicity evaluation of different size fractions by mutagenesis tests on microorganisms and comet assay". *Chemosphere*; 44: 1723-1736.

23. Cassoni F, Buschini A, Bernardi D, Capellini L, Natali P, Chiodi A, Pagnani M, Bacchi M, Amadei V, Poli P, and Rossi C. (2002) "Mutagenicity of urban airborne particulate matter: monitorino strategies (the regional network of Emilia-Romagna)". *Eur J Oncol*; 7: 43-49.
24. F.Cassoni, C.Bocchi, A. Martino, G.Pinto, F.Fontana, A.Buschini. (2004) "The Salmonella mutagenicity of urban airborne particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) from eight sites of the Emilia-Romagna regional monitorino network (Italy)" *Sci Total Environ* ; 324: 79-90.
- 25.

### **Studi congiunti Arpa – Università:**

#### **INDAGINE DI MUTAGENESI AMBIENTALE SUL PARTICOLATO ATMOSFERICO DELL'AREA URBANA DI PARMA - ANNO 1995**

*Questa ricerca è stata effettuata con la collaborazione di:*

- A.R.P.A. di Parma, Dott.ssa Francesca Cassoni e Dott. Stefano Cattani;
  - BIOTECNOLOGIKA srl, Dott.ssa Annamaria Buschini;
  - Istituto di Genetica, Università di Parma, Prof. Carlo Rossi, Dott.ssa Paola Poli;
- e con il finanziamento del Comune di Parma, Assessorato all'Ambiente.*

#### **MONITORAGGIO DELLA GENOTOSSICITA' DI CAMPIONI DI SUOLO E DI PARTICOLATO ATMOSFERICO NELL'INTORNO DEL FORNO INCENERITORE AMNU DI PARMA - ANNO 1996**

**(Relazione congiunta Istituto di Genetica - Università di Parma e ARPA - Sezione Provinciale di Parma)**

#### **RELAZIONE CONGIUNTA ARPA EMILIA-ROMAGNA, SEZIONE. PROV.LE DI PARMA E UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA, DIPARTIMENTO GENETICA EVOLUZIONE ANTROPOLOGIA.**

**Esito del monitoraggio della genotossicità dei campioni di acqua prelevati nei mesi di giugno e di ottobre 2004 agli acquedotti di San Donato e di Priorato**

#### **RELAZIONE CONGIUNTA ARPA EMILIA-ROMAGNA, SEZIONE. PROV.LE DI PARMA E UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA, DIPARTIMENTO GENETICA, BIOLOGIA DEI MICRORGANISMI, ANTROPOLOGIA, EVOLUZIONE:**

**Esito del monitoraggio della mutagenicità, tramite test di reversione genica sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* e Test della Cometa (Comet Test) su leucociti umani, di 5 campioni di suolo e di 5 campioni di particolato atmosferico (PM<sub>2.5</sub>), prelevati nell'area circostante il futuro impianto di incenerimento di rifiuti di Parma nell'ambito del progetto PAI (Polo Ambientale Integrato della provincia di Parma)**

## PROTOCOLLO DI INTESA TRA ARPA EMILIA-ROMAGNA E UNIVERSITA' DI PARMA

L'anno 2012 addì 15 del mese di GENNAIO in Parma, presso il Rettorato dell'Università di Parma, fra Arpa -Agenzia Regionale per la prevenzione e l'ambiente, (di seguito denominata Arpa), con sede in Bologna, Via Po n. 5, P.IVA e CF 04290860370, rappresentata dal Direttore Generale e legale rappresentante Stefano Tibaldi e Università di Parma, con sede in Via Università, n. 12, rappresentata dal Rettore Prof. Gino Ferretti;

### Premesso:

- che l'Università di Parma ritiene importante, al fine del miglior perseguimento dei propri fini istituzionali, lo sviluppo di un più stretto accordo tra le attività che le sono proprie e quelle che rientrano nelle competenze di Arpa, così come disciplinate dalla legge, nel pieno rispetto delle libertà ed autonomie della ricerca;
- che Arpa ritiene importante che i rapporti esistenti con numerose strutture dell'università e con singoli docenti vengano consolidati ed ulteriormente sviluppati nell'ambito di un quadro unitario ed istituzionale rispondente ad una collaborazione volta ad ottimizzare le interazioni fra le attività di ricerca e di didattica svolta dall'Università di Parma con la funzione propria di Arpa in tema di ricerca applicata sui fenomeni dell'inquinamento, realizzazione di specifiche campagne di controllo dei fattori ambientali, supporto per l'elaborazione di piani di intervento per la prevenzione e il controllo ambientale, richiesti dalla Regione Emilia-Romagna, dagli Enti locali e da altre istituzioni pubbliche;

per quanto sopra premesso:

Arpa e Università di Parma, così come sopra rappresentate, convengono di stipulare il presente Protocollo di Intesa allo scopo di istituzionalizzare e promuovere ulteriormente la

collaborazione tra i due Enti, anche in considerazione dei proficui rapporti già in essere tra Arpa e singole strutture scientifiche dell'Università di Parma.

#### Art. 1

Le parti si impegnano ad attivare strumenti permanenti di consultazione e di programmazione della collaborazione, finalizzate a coordinare le attività svolte nei settori di comune interesse, secondo le diverse competenze, con l'obiettivo di favorire e promuovere un continuo confronto finalizzato ad arricchire, reciprocamente, le proprie linee di azione.

#### Art. 2

Per le finalità indicate nel presente Protocollo di Intesa, Arpa e Università di Parma predisporranno un Piano pluriennale delle iniziative e dei progetti, che le parti si impegnano a sviluppare con il conferimento delle risorse necessarie e disponibili, nei seguenti ambiti:

- a) ampliamento della collaborazione nel campo delle analisi e della progettazione ambientale, delle ricerche, dello studio degli inquinanti ambientali;
- b) scambio di esperienze per il raggiungimento di obiettivi di qualità totale nella produzione di servizi;
- c) collaborazione nell'ambito della promozione e gestione di ricerca ed innovazione attraverso progetti scientifici;
- d) elaborazione di proposte di stage, di corsi formativi e di aggiornamento rivolti al personale interno dei due Enti e/o a pubblici esterni, con collaborazione nella didattica e nella ricerca e accoglimento da parte di Arpa di studenti in tirocinio curriculare, in tesi di laurea o neo laureati in tirocinio post lauream.

A tal fine il Rettore dell'Università di Parma e il Direttore della Sezione Provinciale Arpa di Parma designeranno, ciascuno per la propria competenza, un responsabile quale

riferimento delle iniziative e dei progetti indicati nel Piano.

### Art. 3

Per la definizione dei contenuti e delle modalità della collaborazione con l'Università di Parma di cui al presente Protocollo di Intesa Arpa si avvarrà delle strutture della Agenzia. I Direttori dei Nodi di Arpa potranno essere di volta in volta delegati dal Direttore Generale alla sottoscrizione delle convenzioni di cui al successivo art. 4.

### Art. 4

Le parti si impegnano, attraverso la stipulazione di singole specifiche convenzioni, a dare attuazione a quanto disposto dall'art. 2, lettere a), b), c). Tali convenzioni dovranno individuare di volta in volta le risorse finanziarie, il personale, le strutture e le attrezzature da destinare a supporto di ogni singolo progetto. Per quanto riguarda gli stage, i corsi formativi e di aggiornamento del personale, i rapporti di collaborazione nell'ambito della didattica e nella ricerca, di cui all'art. 2, lett. d), le parti concordano che le suddette attività potranno essere definite attraverso uno scambio di lettere di intenti tra i Responsabili delle relative funzioni, compatibilmente con le esigenze e la disponibilità delle singole strutture.

### Art. 5

Il presente Protocollo di Intesa ha validità di tre anni a decorrere dalla data di sottoscrizione ed è rinnovabile tacitamente salvo disdetta di una delle parti.

Per l'Università di Parma

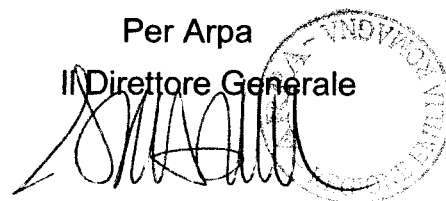
Il Rettore

11.5 GEN. 2013



Per Arpa

Il Direttore Generale



# PROTOCOLLO OPERATIVO

Il presente protocollo operativo stabilisce le modalità di trattamento e test dei campioni oggetto della collaborazione scientifica siglata. Come previsto all'interno dell'accordo eventuali variazioni dei carichi di lavoro, delle modalità operative o della tipologia di test, anche derivante da specifici studi a seguito dell'accordo in oggetto, sono possibili solo previo accordo tra la parti. Si riporta di seguito, l'elenco di tutti i test che rientrano nelle competenze del Laboratorio Tematico Mutagenesi Ambientale:

- Test di reversione batterica (test di Ames) sui due ceppi, TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* in presenza e in assenza di attivazione metabolica esogena;
- Test di reversione batterica (test di Ames) sui cinque ceppi, TA98, TA100, TA1535, TA1537 e TA102 di *Salmonella typhimurium* in presenza e in assenza di attivazione metabolica esogena;
- Test della Cometa sulla linea cellulare umana A549;
- Test della Cometa sulla linea cellulare umana A549 con valutazione del danno ossidativo;
- Test della Cometa su leucociti, *in vitro*, da donatori;
- Test della Cometa su leucociti, *in vitro*, da donatori con valutazione del danno ossidativo;
- Test della Cometa su soggetti esposti;
- Test della Cometa su soggetti esposti con valutazione del danno ossidativo;
- Test del Micronucleo sulla linea cellulare umana A549
- Test del Micronucleo su strisci di materiale biologico da soggetti esposti;
- Pretrattamento delle seguenti matrici da sottoporre ai test:
  - a) Pretrattamento dei filtri utilizzati per il campionamento del particolato atmosferico (PM)
  - b) Pretrattamento di campioni di terreno
  - c) Pretrattamento di campioni di acqua.

Sono individuate come attività specifiche per la realizzazione degli studi e delle valutazioni oggetto dell'accordo le seguenti attività:

- a) attività di pretrattamento dei campioni di Particolato Atmosferico da sottoporre ai test così come specificata al punto 2;
- b) esecuzione dei saggi e test di reversione batterica sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* con e senza attività metabolica, di seguito indicato con “test di Ames”, test della Cometa sulla linea cellulare umana A549, come previsto al punto 3.

Le parti concordano, a seguito dell'analisi dei carichi di lavoro derivanti, che le attività dell'accordo in oggetto dovranno essere all'interno del numero stimato di campioni di cui al punto 1 del presente Protocollo Operativo, salvo ulteriore accordo tra le parti.

Ogni ulteriore modifica del presente Protocollo Operativo potrà essere effettuata solo ed esclusivamente previo accordo tra le parti.

# 1. Numero campioni

Nella tabella seguente è indicato il numero di campioni da estrarre ed analizzare per studi ed attività di valutazione comuni relativamente al biennio 2016 – 2017.

CAMPIONI	NUMERO DI CAMPIONI
Campioni di Particolato atmosferico – filtri - (PM)	50

PRETRATTAMENTO CAMPIONI	NUMERO DI CAMPIONI
Numero di estrazioni chimica con soxhlet in acetone x pesticidi	50
TEST	NUMERO DI CAMPIONI
Numero di test di Ames su TA98 e TA100 in presenza e in assenza di attivazione metabolica esogena	50
Numero di test della Cometa sulla linea cellulare umana A549	30

## 2. Modalità di estrazione dei campioni

### Estrazione chimica del particolato atmosferico da sottoporre a test di mutagenesi

#### Apparecchiature e attrezzature

- Sistema di estrazione Büchi B-811, 230 V/50-60 Hz, completo di 4 refrigeranti, 4 colonne di estrazione, bicchieri per solventi e portaditali (25x100 mm).
- Evaporatore rotante (Rotavapor).
- Vials in vetro graduato da 5 ml, con fondo a “V” e con tappo a vite.
- Azoto.
- Ditali per estrazione in cellulosa (43 x 123 mm).

#### Estrazione chimica dei filtri

- Utilizzare, per il trattamento dei campioni da sottoporre a test di mutagenesi, vetreria “dedicata”.
- Mettere tutti i filtri in un ditale per estrazione in cellulosa. Utilizzare, per ogni estrazione ditali nuovi e non riciclati.
- Mettere il ditale nel corpo centrale dell'estrattore Soxhlet.



- Estrarre con 150 ml di Acetone RS (o altro solvente indicato) per pesticidi per almeno 100 cicli e al buio.
- La temperatura del sistema di estrazione dipende dal solvente utilizzato e va impostata seguendo le istruzioni riportate sul manuale dello strumento.
- Alla fine dell'estrazione trasferire il solvente con l'estratto in un pallone da evaporatore rotante (rotavapor).
- Quindi far evaporare il solvente fino a ridurlo a pochi ml, trasferire in vial di vetro, risciacquare il pallone con alcuni ml del solvente utilizzato per l'estrazione e unirli all'estratto quindi portare a secco sotto flusso di azoto o sotto cappa.
- Conservare l'estratto a +4 °C al buio fino al momento dell'invio al laboratorio che eseguirà i test di mutagenesi.
- Il campione deve essere trasportato al buio e refrigerato.

**Si consiglia, in ogni passaggio, di evitare il più possibile l'esposizione del campione alla luce e al calore.**

## **PREPARAZIONE DEI CAMPIONI DI TERRENO DA SOTTOPORRE AD ESTRAZIONE CHIMICA PER TEST DI MUTAGENESI**

### **Apparecchiature e attrezzature**

- Utilizzare, per il trattamento dei campioni da sottoporre a test di mutagenesi, vetreria o altro materiale "dedicato".
- Ciotole in porcellana con diametro di almeno 25-30 cm o vasche in alluminio piuttosto ampie (tipo quelle da forno), o in acciaio o in vetro
- Guanti monouso
- Setaccio a maglie di 2 mm come previsto dalla linea guida dell'APAT: RTI CTN\_SSC 2/2002
- Vasi di vetro da 1Kg circa
- Armadio termostato
- Frigorifero

### **Trattamento campioni di suolo**

- Trasferire il campione di terreno dal contenitore utilizzato per il campionamento o la conservazione del campione in un'ampia ciotola di porcellana o in una vaschetta di alluminio o acciaio.
- Sminuzzare il terreno a mano ripulendolo da sassi, eventuali insetti, residui vegetali ecc...
- Disporre il campione, in strato sottile (il più possibile) nella ciotola di porcellana o nella vaschetta.
- Mettere ad asciugare il campione in armadio termostato al buio e a temperatura ambiente (+30°C

come massimo)

- Controllare e rigirare il terreno una volta al giorno .
- Rimuovere il campione solo quando è asciutto
- Setacciare il campione
- Trasferire il terreno così trattato in vasi di vetro ben puliti e conservare al buio e a 4°C fino al momento dell'estrazione.

**Si consiglia, in ogni passaggio, di evitare il più possibile l'esposizione del campione alla luce e al calore.**

## **ESTRAZIONE CHIMICA DI CAMPIONI DI SUOLO DA SOTTOPORRE A TEST DI MUTAGENESI**

### **Apparecchiature e attrezzature**

- Utilizzare, per il trattamento dei campioni da sottoporre a test di mutagenesi, vetreria o altro materiale "dedicato".
- Ditali per estrazione in cellulosa (43 x 123 mm). Utilizzare, per ogni estrazione ditali nuovi e non riciclati.
- Vials in vetro graduato da 5 ml, con fondo a "V" e con tappo a vite.
- Capsula in porcellana idonea alla determinazione del peso secco in stufa a +105°C.
- Azoto.
- Sistema di estrazione Büchi B-811, 230 V/50-60 Hz, completo di 4 refrigeranti, 4 colonne di estrazione, bicchieri per solventi e portaditali (25x100 mm).
- Stufa a +105°C per la determinazione del peso secco.
- Evaporatore rotante (Rotavapor).

### **Reagenti**

- Acetone RS per pesticidi.
- Esano
- Dimetilsolfossido, DMSO RPE-ACS.

### **Estrazione chimica dei suoli**

- Pesare 100 grammi di terreno, precedentemente preparato e suddividerlo in due ditali.
- Insieme alla pesata dei 100 g da estrarre, pesare, in capsula di porcellana, una aliquota (es.: 10 g) dello

stesso campione per la determinazione del peso secco, che viene effettuata dopo sosta in stufa a 105°C per 24 ore (DM 11 maggio 1992)

- Mettere il ditale contenente i 50 g di terreno nel corpo centrale dell'estrattore Soxhlet. Estrarre con 150 ml di una miscela 1/1 di Acetone/Esano (Linea Guida APAT: RTI CTN\_SSC 2/2002), o altro/i solvente/i.
- La temperatura del sistema di estrazione dipende dal solvente utilizzato e va impostata seguendo le istruzioni riportate sul manuale dello strumento. Se si usa una miscela di più solventi impostare la temperatura indicata per il solvente con il più alto punto di ebollizione. Effettuare almeno 100 cicli di estrazione.
- Alla fine dell'estrazione trasferire il solvente con l'estratto in un pallone da evaporatore rotante (rotavapor).
- Quindi far evaporare il solvente fino a ridurlo a pochi ml, trasferire in vial di vetro, risciacquare il pallone con alcuni ml del solvente utilizzato (o della miscela di solventi) per l'estrazione e unirli all'estratto quindi portare a secco sotto flusso di azoto o sotto cappa.
- Conservare l'estratto a +4 °C al buio fino al momento dell'esecuzione dei test di mutagenesi.
- Il campione deve essere trasportato al buio e refrigerato.
- Prima dell'esecuzione dei test di mutagenesi, risospendere l'estratto in Dimetilsolfossido ad una concentrazione di 10g, in peso secco, per ml.

**Si consiglia, in ogni passaggio, di evitare il più possibile l'esposizione del campione alla luce e al calore.**

#### **Lavaggio della vetreria utilizzata per l'estrazione**

- Lavare in modo da eliminare qualsiasi residuo o incrostazione (si consiglia di lavare a mano).
- Eseguire 2 o 3 risciacqui in acqua distillata.
- Asciugare in stufa e quindi sottoporre a lavaggio con acido nitrico diluito in acqua distillata. Risciacquare abbondantemente e per l'ultimo risciacquo utilizzare acqua distillata.
- Asciugare in stufa.

## **ESTRAZIONE DI CAMPIONI DI ACQUA DA SOTTOPORRE A TEST DI MUTAGENESI**

Il volume che viene concentrato è fondamentale per la ripresa dell'estratto secco.

Per l'estrazione del campione (concentrazione) si usano delle colonne (cartucce) di silice C18 - 10 g - 70 ml con prefiltro, preventivamente attivate con solventi a differente polarità.

### **Attivazione della/e colonna/e:**

- 40 ml Etile Acetato RS per pesticidi (goccia a goccia per gravità);
- 40 ml Acetone RS per pesticidi (goccia a goccia con pompa);
- 40 ml Alcool Metilico RS per pesticidi (goccia a goccia con pompa);
- 40 ml Acqua distillata (goccia a goccia con pompa)

### **Estrazione campione**

Una volta attivata/e, evitando di farla/e asciugare, fare fluire il campione attraverso la/le cartuccia/e, con un flusso costante di 40 ml/min.

Importantissimo è non far asciugare mai le colonne durante l'estrazione (concentrazione del campione).

Alla fine dell'estrazione, nelle colonne viene fatto passare, lentamente, un flusso d'aria; per eliminare l'eventuale acqua residua.

### **Eluizione delle colonne**

I solventi sono gli stessi e nelle stesse quantità di quelli usati per l'attivazione, eccetto l'acqua:

- 1) 40 ml Etile Acetato RS per pesticidi (goccia a goccia con pompa) – eluato n. 1;
- 2) 40 ml Acetone RS per pesticidi (goccia a goccia con pompa) – eluato n. 2;
- 3) 40 ml Alcool Metilico RS per pesticidi (goccia a goccia con pompa) – eluato n.3.

L'eluato n. 1 viene raccolto in un contenitore di vetro e posto in congelatore a -20°C; questo permette all'acqua residua, non eliminata precedentemente, di congelare e quindi di separarsi dall'etile acetato. Questa operazione richiede almeno 3 giorni.

Gli eluati n. 2 e n. 3 vengono conservati in frigorifero, nello stesso contenitore, in attesa del n. 1 privo di acqua congelata.

### **Evaporazione solventi**

Una volta uniti i 3 eluati in un unico contenitore di vetro l'estratto viene ridotto a piccolo volume tramite evaporatore rotante (rotavapor).

Quindi si trasferisce in una provetta in vetro con tappo a vite e con fondo a V e portato a secco. con flusso di azoto o sotto cappa.

Una volta secco, conservare la provetta in frigorifero a +4/+6°C.

Trasferire il campione al laboratorio per l'esecuzione del test, al buio e refrigerato.

### 3. Modalità di esecuzione dei test e dei saggi previsti

#### Test di Ames sui due ceppi, TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* in presenza e in assenza di attivazione metabolica esogena

##### Allestimento delle piastre di riferimento

- Scongellare una coltura stabile di TA98 ed una di TA100 (conservate a  $-80 \pm 2^\circ\text{C}$ ); versare il contenuto in 2 beutine contenenti circa 10 - 15 ml di Brodo Nutritivo + Ampicillina (25 mg/ml) ed incubare per 8-16 ore a  $+37 \pm 1^\circ\text{C}$  in bagnetto termostato dotato di sistema di agitazione (circa 170 colpi al minuto), oppure strisciare direttamente in piastre come descritto di seguito.
- Dopo 8-16 ore di incubazione, dalle brodocolture strisciare con ansa su piastre di Terreno Minimo + 0,1 ml di Biotina (0,5 mM) + 0,1 ml di Istidina (0,1 M) + 0,1 ml di Ampicillina (8 mg/ml), in modo da ottenere colonie ben isolate. Incubare in termostato a  $+37 \pm 1^\circ\text{C}$  per 44/48 ore.
- Le piastre di riferimento (Master Plates) devono essere conservate a  $+4 \pm 2^\circ\text{C}$  in sacchetti contenenti cristalli di gel di silice, al fine di ridurre l'umidità, e possono essere utilizzate per un mese circa.

##### Allestimento delle colture stabili per lunga conservazione (permanents)

- Dalle piastre di riferimento allestire, per ogni ceppo, una brodocoltura in Brodo Nutritivo + Ampicillina (25 mg/ml).
- Dopo 8-16 ore di incubazione a  $+37 \pm 1^\circ\text{C}$  in agitazione, aggiungere alle colture Dimetilsolfossido nella quantità di 0,09 ml per 1,0 ml di brodocoltura.
- Suddividere le brodocolture in aliquote di ~1 ml in Vials.
- Conservare a  $-80 \pm 2^\circ\text{C}$ .

#### ESECUZIONE DEL TEST

##### Preparazione della brodocoltura, dei tubi e delle piastre per il test

- Per ognuno dei 2 ceppi trasferire, mediante ansa sterile, una colonia dalle piastre di riferimento in una beutina contenente circa 15 ml di Brodo Nutritivo ed incubare per 8-16 ore a  $+37 \pm 1^\circ\text{C}$  in bagnetto termostato dotato di sistema di agitazione (170 colpi al minuto). La concentrazione cellulare deve essere di circa  $10^9$  cellule/ml, è bene, quindi, allestire una curva di crescita al fine di stabilire il tempo ottimale di crescita.
- Per ogni punto del test: controlli negativi e controlli positivi, dosi del campione in esame, per i 2 ceppi e per le 2 condizioni (con e senza S9), preparare 3 tubi e 3 piastre corrispondenti di Terreno Minimo.
- Ad ogni tubo della parte di test da eseguire in assenza di attivazione metabolica aggiungere sterilmente 0,5 ml di Tampone Fosfato (0,1 M).

##### Allestimento delle concentrazioni

- Al termine dell'incubazione delle brodocolture sciogliere il Top Agar in bagnomaria bollente.
- Aggiungere al Top Agar la miscela di Istidina/Biotina (0,5 mM) nella quantità di 1 ml ogni 10 ml.
- Dispensare in tutti i tubi 2 ml di Top Agar con Istidina/Biotina. Porre i tubi in termoblock o bagnetto

termostato in modo da mantenere la temperatura fra +43 e +45°C affinché l'agar non solidifichi.

- Preparare S9 mix mantenendo la miscela in ghiaccio per tutto il tempo di esecuzione del test.
- Mettere nei tubi:
  18. le quantità scalari di campione scelte,
  19. il solvente (generalmente dimetilsolfossido) utilizzato per solubilizzare il campione come controllo negativo (in quantità uguale alla dose più alta di campione in esame)
  20. i controlli positivi utilizzati nel nostro laboratorio sono:
    21. 2-Nitrofluorene (2 µg/piastra) per il TA98 senza attivazione metabolica
    22. Sodioazide (1.5 µg/piastra) per il TA100 senza attivazione metabolica
    23. 2-Aminoantracene (1 µg/piastra) per entrambi i ceppi con attivazione metabolica;
- Ad ogni tubo aggiungere: 0,1 ml di coltura batterica.
- Nei test in presenza di attivazione metabolica aggiungere 0,5 ml di S9 mix.

Vortexare e versare il contenuto di ogni tubo nella piastra di Terreno Minimo corrispondente. In ogni test eseguire le prove di sterilità del terreno, dell'S9 mix, all'inizio e alla fine del test e del campione in esame.

Lasciare solidificare il Top Agar, capovolgere le piastre e mettere in termostato per 44/48 ore a +37 ± 1°C.

Contare le colonie cresciute nelle piastre. I risultati si esprimono come rapporto fra la media dei revertenti contati all'ultima dose e la media dei revertenti del controllo.

### **Test di Ames sui cinque ceppi, TA98, TA100, TA1535, TA1537 e TA102 di *Salmonella typhimurium* in presenza e in assenza di attivazione metabolica esogena (su sostanze)**

Il test è condotto su 5 ceppi batterici TA98, TA100, TA1535, TA1537 e TA102 di *Salmonella typhimurium*, per minimizzare la complessità del test è opportuno non utilizzare tutti i ceppi in un singolo test, la procedura riportata di seguito si riferisce ad un solo ceppo.

#### Primo giorno:

- preparare 3 beute sterili da 50 ml in cui dispensare 15 ml di brodo nutritivo. Nelle prime 2 beute inoculare il ceppo batterico, la terza viene utilizzata come prova di sterilità del brodo di coltura
- incubare in termostato a +37°C con agitazione di 170 rpm per 12 - 16 h
- allestire 3 provette e 3 piastre di terreno minimo per ogni dose, per i controlli positivi e per il controllo negativo/veicolo, in entrambe le condizioni (con e senza S9); in ogni test allestire le prove di sterilità del terreno, dell'S9 mix e della sostanza in esame.
- aggiungere 500 µl di tampone fosfato 0,1M alle provette della parte di test da condurre senza attivazione metabolica, conservare i tubi in frigorifero a +4°C ± 3°C.

#### Secondo giorno:

- verificare che l'assorbanza delle brodoculture a 660 nm sia maggiore o uguale a 1,2
- sciogliere l'adeguata quantità di top agar a bagnomaria, calcolando 2 ml per provetta
- aggiungere al top agar sciolto il 10% di istidina/biotina
- dispensare 2 ml di soluzione top agar/istidina/biotina per ogni provetta, mantenere le provette in thermoblock a +43 ± 2°C (i batteri possono restare intorno ai +45°C per alcuni minuti senza perdere di vitalità)

- sciogliere la sostanza in esame alla concentrazione identificata nei test di solubilità e tossicità e allestire le adeguate diluizioni, per ottenere le 5 dosi da saggiare
- allestire i seguenti mutageni:
  - 2-Nitrofluorene (2 µg/piastra) TA98 senza attivazione metabolica
  - Sodioazide (1.5 µg/piastra) TA100 e TA1535 senza attivazione metabolica
  - 9-Aminoacridina (15 µg/piastra) TA1537 senza attivazione metabolica
  - Mitomicina C (0.5 µg/piastra) TA102 senza attivazione metabolica
  - 2-Aminoantracene per tutti i ceppi con attivazione metabolica, per il TA98, TA100; TA1535 e TA1537 utilizzare 1 µg/piastra, per il TA102 20 µg/piastra
- aggiungere in ogni provetta l'idonea quantità di controllo negativo/veicolo, di controlli positivi e di sostanza in esame
- preparare la miscela di attivazione metabolica S9 mix e conservarla in ghiaccio
- aggiungere ad ogni provetta 100 µl di brodocoltura
- nella parte di test con attivazione metabolica aggiungere, in ultimo, ad ogni provetta 500 µl di S9 mix (l'S9 mix può restare a temperatura ambiente solo per breve tempo)
- vortexare e versare il contenuto di ogni provetta nella piastra corrispondente di terreno minimo
- lasciare solidificare il top agar, capovolgere le piastre e mettere in termostato a  $+37 \pm 1^\circ\text{C}$  per 44/48 ore in caso di crescita scarsa lasciare in termostato fino a 68/72 ore di incubazione totale.

#### Quarto giorno:

Contare le colonie cresciute nelle piastre. Le colonie possono essere contate anche manualmente, ciò è necessario quando la sostanza in esame forma precipitati visibili ad occhio nudo nella piastra o quando ci sono altri impedimenti visivi che produrrebbero risultati non corretti.

Se si utilizza il contacolonia procedere come segue:

Accendere il computer e la telecamera, togliere il copri-obiettivo e avviare il programma Image-Pro Plus

- Calibrazione luce e contrasto: scegliere la telecamera selezionando, dalla barra degli strumenti, il comando macro numero 1, quindi cliccare sul pulsante 2 (Macro: Light-Cal). Compare la finestra "Calibrazione luce": posizionare una piastra senza colonie (ad esempio una sterilità), senza coperchio, sulla sagoma circolare del transilluminatore, cliccare su "Avvia" e compare "Dimensionare e posizionare AOI", funzione che imposta la posizione e la dimensione dell'area circolare di lavoro, entro la quale vengono contate le colonie. Per fare ciò inscrivere il quadrato all'interno della circonferenza costituita dal bordo della piastra. Selezionare OK. Quindi selezionare il tasto AVVIA: questa operazione permette di regolare l'intensità luminosa in entrata al diaframma dell'obiettivo ruotando la ghiera superiore della telecamera. Il valore deve avvicinarsi il più possibile a 250, ma non deve raggiungerlo, premere il tasto FERMA. Selezionare ESCI.
- Preparazione dei parametri di conta: cliccare sulla macro numero 3, TEST DI AMES, appare una casella in cui selezionare INSERISCI PARAMETRI, compilare i campi della maschera "Dati Esperimento":
  - Prodotto, Protocollo e Notebook. Attenzione! Il campo Protocollo è il nome del file di output.
  - Nei campi Diluizioni inserire le dosi saggiate nel test.
  - Nel riquadro Prodotti, dai menù a tendina inserire: il numero di piastre, di dosi e dei controlli, indicare il veicolo e inserire il nome degli standard (controlli positivi) e il numero di piastre per ogni standard. Infine selezionare i ceppi di Salmonella. Controllare che il numero di piastre

totale, calcolato dal programma, sia l'effettivo numero di piastre da leggere.

Selezionare PROSEGUI. Ricomparsa la casella TEST DI AMES, selezionare SET UP SISTEMA e posizionare una delle piastre dei controlli, senza coperchio, sul transilluminatore. Selezionare 89 mm cliccare CONFERMA. Il programma automaticamente richiede:

- il controllo della messa a fuoco: ruotare la ghiera inferiore fin quando l'immagine è nitida e premere CONFERMA;
- il posizionamento del campo di lettura dell'area interna alla piastra: spostare e dimensionare il cerchio bianco evitando il bordo interno della piastra e premere CONFERMA;
- il posizionamento corretto del quadrato circoscritto alla piastra: spostare e dimensionare il quadrato bianco toccando il bordo esterno della piastra e premere CONFERMA.

A questo punto il programma legge il numero di colonie presenti nella piastra, per finire questo passaggio cliccare su CONFERMA.

Ora selezionare OPZIONI e scegliere "Parametri Conta".

- Numero di colonie inferiore a 400

All'interno della finestra Parametri Conta selezionare come N° COLONIE l'intervallo 1-400 che corrisponde ad un'area minima di 0,1 mm, con Analisi densitometrica: 15%. Cliccare su OK, per tornare a Opzioni.

Selezione del FILTRO: nell'area Background scegliere SHADING e nell'area Detector HIGH:7, quindi ESCI.

Controllare che i parametri siano corretti cliccando su Analisi, in questo modo il dato non viene memorizzato e si può controllare se la lettura è corretta.

In caso di lettura non corretta: se la lettura risultasse non idonea e il numero delle colonie nella piastra fosse di molto inferiore a 400, è opportuno ripetere le operazioni di calibrazione della luce e la messa a fuoco. Quando, invece, il numero delle colonie si avvicina o supera il 400 è opportuno settare i parametri come descritto al seguente paragrafo.

- Numero di colonie superiore a 400

Selezionare nel menù a tendina N° COLONIE, l'intervallo 150-300 corrispondente ad un'area minima di 0,05 mm con analisi densitometrica: 15%.

Selezione del FILTRO: scegliere nell'area Background SHADING e nell'area Detector scegliere HIGH 7, quindi ESCI. Controllare i parametri cliccando su Analisi.

In caso di lettura non corretta è opportuno ripetere la calibrazione della luce e la messa a fuoco.

Cliccare su ESCI e quindi su AVVIA ANALISI

- Avvio della lettura delle colonie: porre la prima piastra (di solito un controllo negativo/veicolo), senza coperchio, sul trans illuminatore e cliccare ANALISI PIASTRA. Dopo la lettura della prima piastra si apre automaticamente il file di output in cui vengono salvati i dati sul disco rigido del computer. Nel bordo in alto della casella TEST DI AMES si può controllare che dose si sta contando (dose del campione, Controlli o Standard), nel riquadro "Prossima Misura" si può leggere qual è la piastra che deve essere letta (Ceppo e piastra x di y) e qual è l'area minima ed il numero di colonie da leggere impostato. Nel riquadro centrale compare la "Misura Precedente" in questo riquadro è presente il comando Auto mediante il quale si può rileggere una piastra. Nel comando Analisi Piastra si può intervenire per cambiare tutte le impostazioni di conta (Parametri conta, AOI e Filtro). Cliccando su Globali compare una casella chiamata Opzioni ove è possibile cambiare le



impostazione e controllare la lettura senza registrare il dato, per uscire dal menù Opzioni, e salvare le impostazioni scelte, scegliere Esci.

Al termine della lettura di tutte le piastre appare l'indicazione ANALISI TERMINATA, selezionare OK. Chiudere Output di Windows, selezionando ESCI e confermare la chiusura del programma Test di Ames. Chiudere il programma IPWin.

I risultati si esprimono come rapporto fra la media dei revertenti contati all'ultima dose e la media dei revertenti del controllo.

### **Test della Cometa sulla linea cellulare umana A549**

Le cellule vanno utilizzate dopo 2 settimane dallo scongelamento e comunque con una mortalità inferiore al 10% (meglio ancora se inferiore al 5%)

#### 1°giorno

Sigliare il fondo di una piastra da 24 pozzetti con la dose e la replica.

Controllare la coltura nella fiasca al microscopio invertito, se è confluyente eseguire i seguenti passaggi:

- lavare due volte le cellule con 3 ml PBS sterile preriscaldato a +37°C
- staccare le cellule con 1.2 ml di tripsina preriscaldata e incubare a +37°C per 6 minuti
- aggiungere 3 ml di terreno completo preriscaldato e staccare tutte le cellule, centrifugare a 2700 RPM (1312 g) per 10 min
- eliminare il surnatante, aggiungere in 1 ml di terreno completo e risospendere le cellule
- VITALITA' (%) e CONTEGGIO CELLULARE (cell/ml)
  - mescolare 30 µl di sospensione cellulare con 30 µl di Trypan blue e montare su burker
  - contare le cellule presenti e la vitalità su 100 cellule (le cellule blu sono morte)

Risospendere le cellule in terreno completo in modo da ottenere  $2 \cdot 10^5$  cell /ml, seminare 1 ml per pozzetto (quindi  $2 \cdot 10^5$  cell/pozzetto) allestendo 2 repliche per dose, incubare a +37°C al 5% CO<sub>2</sub> per 24h.

#### 2°giorno

Dispensare le dosi di campione nei pozzetti della piastra, la quantità di controllo negativo è pari alla dose massima del campione, come controllo positivo si utilizza etilmetansulfonato (EMS: 25 µl di 0.1 M).

Aggiungere, ad ogni dose, la quantità di solvente necessaria per raggiungere la dose massima.

Incubare per 24 h in termostato CO<sub>2</sub> a +37°C.

#### 3°giorno

Al termine del trattamento lavare 2 volte i pozzetti con 1 ml di PBS sterile preriscaldato.

Staccare le cellule con 300 µl di tripsina per pozzetto, incubare la piastra per 6 minuti.

Aggiungere 0.7 ml di terreno completo e pipettare con vigore.

Prelevare 250 µl di sospensione cellulare da ciascun pozzetto e mettere in provette da 1,5 ml

Centrifugare le provette da 1,5 ml a 4500 rpm per 2 minuti

Eliminare il surnatante e aggiungere 90 µl di LMA, precedentemente sciolto

Distribuire sui vetrini e coprire immediatamente con un coprioggetto, mettere in frigorifero per 12 minuti

Trascorsi i 12 minuti di solidificazione togliere il coprioggetto e aggiungere altri 90 µl di LMA. Rimettere il coprioggetto e rimettere in frigorifero per 10/12minuti.

Togliere i coprioggetto e immergere i vetrini in lisi fredda. Tenere in frigorifero overnight.

### Vitalità cellulare e conteggio cellulare

Si effettua solo per il controllo negativo, il controllo positivo e la dose max dei campioni, in caso di tossicità si passa anche alle dosi più basse (vedi sopra).

### 4°giorno

Inserire la cella elettroforetica in una vaschetta contenente ghiaccio, versare il buffer freddo di elettroforesi (pH>13) nelle vaschette laterali della cella, mettere i vetrini nella cella e coprirli con il buffer

Fare una pre-corsa di 20 minuti

Applicare un campo elettrico di 25 V (0.78 V/cm) e 300 mA per 20 minuti. Controllare che i parametri non si discostino per tutta la durata della corsa (in caso contrario aggiungere o togliere qualche ml di buffer)

Al termine lavare i vetrini 3 volte con 2 ml di soluzione tampone di neutralizzazione (Tris HCl)

Asciugare il lato inferiore, immergere i vetrini per 5 min in alcol etilico 70% (o assoluto) conservato a -20°C.

Fare asciugare overnight e trasferire i vetrini in scatole porta vetrini.

### Lettura

Colorare ogni vetrino con 75 µl di etidio bromuro (10 µg/ml) leggere 100 cellule per replica ed esprimere il risultato in percentuale d'intensità di fluorescenza nella coda (%TI).

## **Test della Cometa sulla linea cellulare umana A549 con valutazione del danno ossidativo**

Procedere per i primi 3 giorni come per il test della Cometa standard su A549, fino al termine del trattamento col campione. Dopo l'incubazione e il distacco delle cellule con trispina, allestire due serie di provette uguali. Prelevare dallo stesso pozzetto per 2 volte 250 µl di sospensione cellulare ( $5 \cdot 10^4$  cell/vetrino) e mettere in 2 provette da 1,5 ml: una provetta per il danno basale e l'altra per il trattamento enzimatico.

Centrifugare le provette a 4500 rpm per 2 minuti e preparare i vetrini come descritto nel test standard.

### Vitalità cellulare e conteggio cellulare

Si effettua solo per il controllo negativo, il controllo positivo e la dose max dei campioni, si passa anche alle dosi più basse, in caso in tossicità (vedi sopra)

### Prima di mettere in lisi allestire il controllo dell'attività dell'enzima con l'acqua ossigenata

- trattare il vetrino con 100 µl di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2.5 mM, coprire con coprioggetto e incubare in frigo per 5'
- eliminare il coprioggetto e immergere il vetrino in lisi fredda per 1 h, nella giarina deve esserci solo il vetrino con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Mettere in lisi fredda tutti i vetrini. Tenere in frigorifero per almeno 1h.

**Trascorsa la lisi trasferire i vetrini in giarine contenenti il buffer di reazione (Hepes, conservato a +4°C).**

**Fare 3 lavaggi consecutivi in Hepes per un totale di 15 minuti.**

Disporre i vetrini su vassoi e distribuire

- 50 µl di Hepes sui vetrini del danno basale
- 50 µl di FPG 1/3000 sui vetrini del danno ossidativo e sul vetrino dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Coprire subito con coprioggetto.

Incubare per 30 minuti in termostato a +37°C con camera umida.

Al termine dell'incubazione inserire la cella elettroforetica in una vaschetta contenente ghiaccio, versare il buffer freddo di elettroforesi (pH>13) nelle vaschette laterali della cella, mettere i vetrini nella cella e coprirli

con il buffer.

Fare una pre-corsa di 30 minuti

Applicare un campo elettrico di 25 V (0.78 V/cm) e 300 mA per 20 minuti. Controllare che i parametri non si discostino per tutta la durata della corsa (in caso contrario aggiungere o togliere qualche ml di buffer)

Al termine dell'elettroforesi lavare i vetrini 3 volte con 2 ml di soluzione tampone di neutralizzazione (Tris HCl)

Asciugare il lato inferiore e trasferire i vetrini per 5 minuti in una giarina contenente alcol etilico 70% (o assoluto) conservato a -20°C.

Togliere dalla giarina e fare asciugare per tutta la notte sul banco. Trasferire i vetrini in scatole porta vetrini e conservarli fino al momento della lettura.

#### *Lettura*

Colorare ogni vetrino con 75 µl di etidio bromuro (10 µg/ml) leggere 100 cellule per replica ed esprimere il risultato in percentuale d'intensità di fluorescenza nella coda (%TI).

### **Test della Cometa su leucociti, in vitro, da donatori**

#### 1°giorno

Mantenere il sangue intero in provette con eparina a +4°C al buio (max 48 ore), se invece viene processato nell'arco di poche ore dal prelievo mantenerlo a temperatura ambiente.

Suddividerlo in aliquote da 500 µl, centrifugare a 3000 g (4100 rpm) a +37° C per 10'.

Eliminare il surnatante e risospingere il pellet (con vortex).

Aggiungere 3,5 ml di soluzione di isolamento (pH 7.4) mantenuta a +37°C, agitare e mettere le provette in bagnetto a +37°C per 5'.

Centrifugare a 3000 g (4100 rpm) per 10', eliminare il surnatante e risospingere, aggiungere 3,5 ml di PBS mantenuto a +37°C (sospensione cellulare di circa  $1 \cdot 10^6$  cell/ml)

Agitare con vortex; unire le provette in una unica beutina o falcon.

Preparare le microprovette, in doppio, con le idonee quantità di campione, di controllo negativo (corrispondente alla dose massima di campione) e con etilmetansulfonato (50 µl EMS, 0.1 M) come controllo positivo. Portare ogni dose alla quantità di solvente presente nella dose massima.

Aggiungere in ogni microprovetta da 1,5 in cui è già presente il campione la giusta quantità di sospensione cellulare per portare ad un volume totale di 1ml/ependorf .

Vortexare e incubare a +37°C per 1 ora (in agitazione a 144 rpm)

Dopo incubazione centrifugare 4500 rpm per 2', rimuovere il surnatante e risospingere in 1ml di PBS

Prelevare 200 µl da mettere in una nuova eppendorf per fare il vetrino.

#### VITALITA' CELLULARE

La vitalità si effettua per la dose più alta del campione in esame, per il controllo positivo e per quello negativo. Aggiungere a 500 µl di sospensione cellulare 10 µl di soluzione di lavoro di Hoechst / EtBr, incubare 5'- 10' a temperatura ambiente.

Montare 10 µl di cellule "colorate" su vetrino e coprire con coprioggetto piccolo, osservare 100 cellule con microscopio a fluorescenza (filtro DAPI: ex 340-380; ba: 435-485): le cellule vitali presentano un nucleo intatto blu (dovuto all'HOESCHST), le cellule apoptotiche nucleo con morfologia apoptotica (nuclei

frammentati) e colore blu/ bianco e le cellule necrotiche si presentano di colore rosso (in quanto fluorescono per EtBr)

Centrifugare i 200 µl trasferiti nella eppendorf a 4500 rpm per 2', togliere il surnatante

Aggiungere 90 µl di LMA/eppendorf, distribuire sui vetrini e coprire immediatamente con coprioggetto

Mettere in frigorifero per 10'/12'

Dopo la solidificazione togliere il coprioggetto e aggiungere altri 90 µl di LMA.

Rimettere il coprioggetto e rimettere in frigorifero per 10'/12'

Togliere i coprioggetti e immergere i vetrini in lisi fredda. Tenere in frigorifero per almeno 1h (meglio tutta la notte).

### 2°giorno

L'esecuzione dell'elettroforesi e la lettura dei vetrini è identica a quella del test standard eseguito su A549. *Lettura*

Colorare ogni vetrino con 75 µl di etidio bromuro (10 µg/ml) leggere 100 cellule per replica ed esprimere il risultato in percentuale d'intensità di fluorescenza nella coda (%TI).

## **Test della Cometa su leucociti *in vitro* con valutazione del danno ossidativo**

Procedere come per il test della Cometa standard su leucociti, fino al termine del trattamento con il campione; dopo l'incubazione allestire due serie di provette uguali

Prelevare dalla stessa microprovetta per 2 volte 200 µl di sospensione cellulare e mettere in provette da 1,5 ml, una provetta per il danno basale e l'altra per il trattamento enzimatico.

Centrifugare le provette a 4500 rpm per 2 minuti e preparare i vetrini come sopra.

Prima di mettere in lisi allestire il controllo dell'attività dell'enzima con l'acqua ossigenata

- trattare il vetrino con 100 µl di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2.5 mM
- coprire con coprioggetto e incubare in frigo per 5'
- eliminare il coprioggetto e immergere il vetrino in lisi fredda, per 1 h da solo nella giarina

Mettere in lisi fredda tutti i vetrini. Tenere in frigorifero per almeno 1h.

**Trascorsa la lisi trasferire i vetrini in giarine contenenti il buffer di reazione (Hepes, conservato a +4°C).**

**Fare 3 lavaggi consecutivi in Hepes per un totale di 15 minuti.**

Disporre i vetrini su vassoi e distribuire

- 50 µl di Hepes sui vetrini del danno basale
- 50 µl di FPG 1/3000 sui vetrini del danno ossidativo e sul vetrino dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Coprire subito con coprioggetto.

Incubare per 30 minuti in termostato a +37°C con camera umida.

Al termine dell'incubazione eseguire l'elettroforesi la cui procedura è identica a quella del test con valutazione del danno ossidativo eseguito su A549.

*Lettura*

Colorare ogni vetrino con 75 µl di etidio bromuro (10 µg/ml) leggere 100 cellule per replica ed esprimere il risultato in percentuale d'intensità di fluorescenza nella coda (%TI).

**Test della Cometa su soggetto esposti**

Il sangue può essere conservato in frigorifero a +4°C per 24h, per ogni individuo allestire due vetrini.  
Per ogni corsa allestire anche il controllo positivo incubando per 1h a +37°C due microprovette con l'EMS 5mM, al termine dell'incubazione allestire i vetrini con il doppio strato di agar e mettere in lisi per almeno 1 ora.  
Trasferire 45 µl di sangue intero, per ogni individuo, in microprovetta in bagnetto a +40°C per qualche istante.  
Aggiungere 270 µl di LMA/ependorf sciolto in precedenza e mantenuto in bagnetto  
Distribuire 90 µl della miscela agar/sangue su vetrino pre-agarizzato  
Coprire con coprioggetto e lasciare solidificare a +4°C per 10'  
Dopo la solidificazione fare il doppio strato di agar con 90 µl di LMA  
Lasciare solidificare a +4 °C per altri 10'  
Eliminare il coprioggetto e immergere i vetrini in lisi fredda per 2h (per permettere la lisi dei vetrini con controllo positivo).  
Al termine della lisi procedere con la corsa elettroforetica seguendo quanto indicato nel test standard eseguito su A549.

### **Test della Cometa su soggetti esposti con valutazione del danno ossidativo**

Il sangue può essere conservato in frigorifero a +4°C per 24h. Per ogni individuo allestire 4 vetrini e, per ogni corsa, allestire il controllo dell'attività dell'enzima e il controllo della corsa (EMS 5mM).  
Trasferire 90 µl di sangue intero, per ogni individuo, in microprovetta in bagnetto a +40°C per qualche istante.  
Aggiungere 540 µl di LMA/ependorf  
Distribuire 90 µl della miscela agar/sangue su vetrino pre-agarizzato, coprire con coprioggetto e lasciare solidificare a +4°C per 10'  
Dopo la solidificazione fare il doppio strato di agar con 90 µl di LMA, lasciare solidificare a +4 °C per altri 10'  
Prima di mettere in lisi allestire il controllo dell'attività dell'enzima con l'acqua ossigenata

- trattare il vetrino con 100 µl di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2.5 mM, coprire con coprioggetto e incubare in frigo per 5'
- eliminare il coprioggetto e immergere il vetrino in lisi fredda, per 1 h da solo nella giarina

Mettere in lisi fredda tutti i vetrini per almeno 1h.  
Trascorsa la lisi trasferire effettuare 3 lavaggi in 15 minuti con il buffer di reazione (Hepes, conservato a +4°C), dopo i lavaggi disporre i vetrini su vassoi e distribuire:

- 50 µl di Hepes sui vetrini del danno basale
- 50 µl di FPG 1/3000 sui vetrini del danno ossidativo e sul vetrino dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Coprire subito con coprioggetto.  
Incubare per 30 minuti in termostato a +37°C con camera umida.  
Al termine dell'incubazione eseguire l'elettroforesi la cui procedura è identica a quella del test con valutazione del danno ossidativo eseguito su A549.

### **Test del Micronucleo sulla linea cellulare umana A549**

Le cellule vanno utilizzate dopo 2 settimane dallo scongelamento e comunque con una mortalità inferiore al 10% (meglio ancora se inferiore al 5%)

#### 1°giorno

Controllare la coltura al microscopio invertito, se è confluyente eseguire i seguenti passaggi:

- lavare due volte le cellule con 3 ml PBS sterile preriscaldato a +37°C
- staccare le cellule con 1.2 ml di tripsina preriscaldata e incubare a +37°C per 6 minuti
- aggiungere 3 ml di terreno completo preriscaldato e centrifugare 2700 RPM (1312 g) per 10 min.
  - Eliminare il surnatante, aggiungere in 1 ml di terreno completo per risospendere le cellule
  - Contare le cellule in camera burker

Seminare, in una piastra da 24 pozzetti,  $6 \cdot 10^4$  cell/pozzetto allestendo 2 ml per pozzetto ( $3 \cdot 10^4$  cell/ml).

Mettere in incubatore a +37°C al 5% di CO<sub>2</sub> fino a una confluenza di circa il 50-60%, se 24h non fossero sufficienti, lasciare in incubatore per ulteriori 24h.

#### 2°giorno

Controllare che le cellule nei pozzetti siano al 50/60 % di confluenza.

Eliminare la quantità di terreno corrispondente a quello di campione aggiunto, dispensare le dosi di campione e portare a volume con il solvente. Il controllo negativo è la dose massima di solvente in cui è risospeso il campione, come controllo positivo utilizzare Mitomicina C.

Incubare la piastra per ulteriori 24h

#### 3°giorno

Dopo le 24 h di trattamento lavare le cellule 2 volte con 1,5 ml di PBS per pozzetto.

Aggiungere 16 µl di Citocalasina B (0,5 mg/ml) per ogni pozzetto (4 µg per ml). Reincubare.

#### 4°giorno

Alla 72° ora di incubazione totale lavare 2 volte con 1,5 ml di PBS per pozzetto.

Staccare le cellule con 300 µl di tripsina per pozzetto ed incubare a +37°C per 6 minuti

Aggiungere 700 µl di terreno completo e trasferire la soluzione cellulare in provette.

Centrifugare a 2700 RPM per 10 min a +4°C, eliminare il surnatante.

Fissare le cellule con miscela di fissativo ghiacciato (metanolo:acido acetico 5:1) aggiungendo circa 1,5 ml di fissativo facendolo cadere goccia a goccia nel tubo. Centrifugare a 2700 RPM per 10 min a +4°C

Ripetere una seconda volta e risospendere le cellule in fissativo in modo da avere circa 250 µl per tubo

#### **Citocentrifuga**

Montare i vetrini sui citoblocchi (possibilmente utilizzando vetrini e citoblocchi raffreddati in frigorifero a +4°C) introdurre i citoblocchi nella centrifuga. Inserire 100 µl di sospensione cellulare all'interno del 2° e 3° foro posto sul citoblocco stesso, seminare una replica per vetrino (200 µl dello stesso tubo).

Centrifugare a 760 RPM per 10' a +5°C.

#### **Colorazione may-grünwald/giems**

Immergere i vetrini per 3' in May-Grünwald puro.

Immergere i vetrini per 1' in acqua bidistillata (cambiare l'acqua, se diventa molto blu).

Immergere i vetrini per 10' in Giemsa 10% in tampone fosfato Sorenase pH=6,8.

Immergere i vetrini per 2' in acqua bidistillata.

Controllare la colorazione: se il nucleo non è ben contrastato immergere i vetrini di nuovo per alcuni minuti in Giemsa 10%, se i preparati sono troppo scuri immergere i vetrini in acqua deionizzata per 1-2'.

### **Conteggio e valutazione dei dati**

È consigliato utilizzare l'ingrandimento 40% del microscopio ottico

Indice di divisione cellulare: contare le prime 500 cellule che si trovano, suddividendole in mono- bi- tri e tetra-nucleate (le eventuali plurinucleate si contano insieme alle tetra).

Binucleate: proseguirne il conteggio fino a 1000 binucleate per replica (2000 binucleate totali). Registrare quante binucleate contengono: Micronuclei, Buds (estroflessioni del nucleo con la parte vicino al nucleo più stretta), Ponti (i due nuclei sono uniti da una sottile striscia).

### **Test del Micronucleo su strisci di materiale biologico da soggetti esposti**

Il metodo è strettamente dipendente dall'organismo monitorato e dalla tipologia del materiale biologico.

- Pretrattamento delle seguenti matrici da sottoporre ai test:
  - a) Pretrattamento dei filtri utilizzati per il campionamento del particolato atmosferico (PM)
  - b) Pretrattamento di campioni di terreno
  - c) Pretrattamento di campioni di acqua.

N. Proposta: PDTD-2015-849 del 14/12/2015

**Centro di Responsabilità: Sezione di Parma**

**OGGETTO: Sezione Provinciale di Parma – Sottoscrizione di un accordo di collaborazione e ricerca con l'Università degli Studi di Parma, Dipartimento di Bioscienze, Laboratorio di Geno-tossicologia Umana, Microbica e Vegetale al fine di realizzare studi, valutazioni, analisi e ricerche.**

**PARERE CONTABILE**

La sottoscritta Cella Esterina, Responsabile Amministrativa della Sezione di Parma, esprime parere di regolarità contabile ai sensi del Regolamento Arpa sul Decentramento amministrativo.

Data 17/12/2015

La Responsabile Amministrativa

---