

Il cluster tossicologico di PESCI: risultati e prospettive per lo sviluppo di strategie per la sicurezza alimentare

Dr. Alberto Mantovani

Direttore del reparto di Tossicologia Alimentare
e Veterinaria

Dip. Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza
Alimentare – ISS

alberto.mantovani@iss.it

Il pesce allevato e pescato, ancorché in diversa misura e con significative differenze fisiologiche, ecologiche ed etologiche fra le specie (*carpa, anguilla e trota...*)

Riceve segnali complessi e continui dall'ambiente attraverso il medio acquatico

Ed è in grado di accumularli e trammetterli al consumatore

Dal punto di vista della sicurezza del consumatore:

Dati scientifici per aggiornare (se necessario) i limiti massimi tollerabili già definiti (ad es. diossine) e definirne di nuovi per contaminanti prioritari (ad es., ritardanti di fiamma bromurati) tenendo conto dei consumatori più vulnerabili (es. bambini)

E definire le sostanze prioritarie per la gestione del rischio (esposizione x limiti tollerabili**)**

Dal punto di vista della qualità ambientale:

Utilizzare le conoscenze veterinarie (ad es. istopatologia) e le nuove acquisizioni della tossicologia molecolare (ad es., tossicogenomica) per definire possibili indicatori (*proof-of-principle*) dei riflessi della qualità ambientale sul pesce (organismo/alimento)

Priorità a sostanze

**(*effetti*) in grado di indurre effetti a lungo termine
(insidiosi)**

(*esposizione*) diffuse e che bioaccumulano

**(*vulnerabilità*) soprattutto in fasi particolarmente
suscettibili (ad es., riproduzione/sviluppo) che
vanno quindi specificamente protette:**

Interferenti endocrini, <http://www.iss.it/inte>

**Senza dimenticare però sostanze imperfettamente
note, in grado di dare effetti anche acuti e di
creare "allarmi"**

biotossine

Progetti PESCI: Cluster Tossicologico

UO11 (ISS): Biomarker in vivo di Interferenti endocrini (IE) a esposizioni realistiche (*in collaborazione con UK e Norvegia*)

Sulla stessa area campione (Liguria)

UO12 (IRF Mario Negri): Caratterizzazione dell'esposizione a IE persistenti

UO13 (Un.Genova): Marker di effetto in specie ittiche

UO14 (ARPA Em.Romagna) Marker molecolari in vitro di dose efficace per IE persistenti

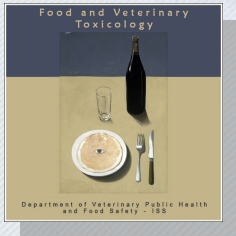
UO IZS Piem-Liguria: Caratterizzazione di biotossine (*Ostreopsis ovata*)

UO 11 - ISS: Sicurezza del pesce allevato

Caratterizzazione attraverso un modello murino di effetti istopatologici e molecolari di una dieta a base di pesce contenente contaminanti “riconosciuti” (PCB, diossine) o emergenti (ritardanti di fiamma bromurati) considerati prioritari per l'allevamento del pesce.

Valutare

- Possibili interazioni fra differenti matrici ittiche nei mangimi
- Effetti valutati sullo stesso modello animale e stessi bersagli di “novel feeds”



Collaborazione con KCL (UK) e NIFES (Norvegia)

Suggerimenti

- inserire i ritardanti di fiamma bromurati ***nei programmi di monitoraggio di mangimi ed alimenti di origine animale*** – come contaminanti emergenti
- Tutelare i consumatori vulnerabili (come i bambini)

Alla luce dei risultati ottenuti, non si può escludere un effetto sulla salute ad altri livelli di consumo di alimenti ittici in soggetti vulnerabili:

Sviluppare filiere mangimistiche a minore rischio di contaminazione



Ricerca Finalizzata 2006

Progetto: Qualità e sicurezza degli alimenti di origine animale con particolare riferimento a quelli di origine acquatica e degli ambienti di lavoro

UO n. 12 Esposizione a Interferenti endocrini persistenti

Responsabile

Dr.ssa Elena Fattore

Unità di Valutazione di Rischio Inquinanti Ambientali

Dipartimento Ambiente e Salute

Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri

Via Giuseppe La Masa 19

20156 Milano

Attività dell'UO 12 (Istituto Mario Negri)

Campionamento effettuato dall'UO 13 (Dott.ssa Alberta Mandich)

- **Prima campagna**

23 campioni di branzino (Dicentrarchus Labrax)



**13 campioni
Allevamento Ittico Lavagna
(9 maschi e 4 femmine)**



Pool LAVAGNA



**10 campioni
Allevamento Ittico Portovenere
(9 maschi e 1 femmina)**



Pool PORTO VENERE



**Analisi di policlorobifenili (PCB),
diossine e furani clorurati (PCDD-F),
acido perfluorooottanoico e
perfluorooottanosulfonato (PFOA-
PFOS)**

10 grammi di fresco

10 grammi di fresco

I 2 pool sono stati estratti e mandati all' UO 14 (Arpa Emilia Romagna Sezione di Bologna) per test in vitro e studi a livello molecolare.

Attività dell'UO 12 (Istituto Mario Negri)

Analisi dei singoli campioni

Analisi di policlorobifenili (PCB), diossine e furani clorurati (PCDD-F), acido perfluorottanoico e perfluorottanosulfonato (PFOA-PFOS)

- **Prima campagna (2008): 23 campioni (13 Lavagna, 10 Porto Venere)**

Analisi di policlorobifenili (PCB), acido perfluorottanoico e perfluorottanosulfonato (PFOA-PFOS)

- **Seconda campagna (2009): 16 campioni (8 Lavagna, 8 Porto Venere)**
- **Terza campagna (2010): 8 campioni (4 Lavagna, 4 Porto Venere)**

METODOLOGIA

PCB E PCDD-F

Liofilizzazione dei campioni



Aggiunta di standard interni marcati
17 congeneri 2,3,7,8-cloro sostituiti
12 congeneri PCB diossino simili
6 PCB non diossino-simili

Estrazione ASE



Extrelut
Ossido di Allumina



Analisi strumentale HRGC-HRMS
Trace CG 2000 Mat 95 XP

PFOA-PFOS

Determinazione di 1 grammo di
campione fresco e aggiunta di metanolo



Aggiunta di standard interni
marcati di PFOA e PFOS

Estrazione con ultrasuoni



Centrifuga e recupero del
surnatante

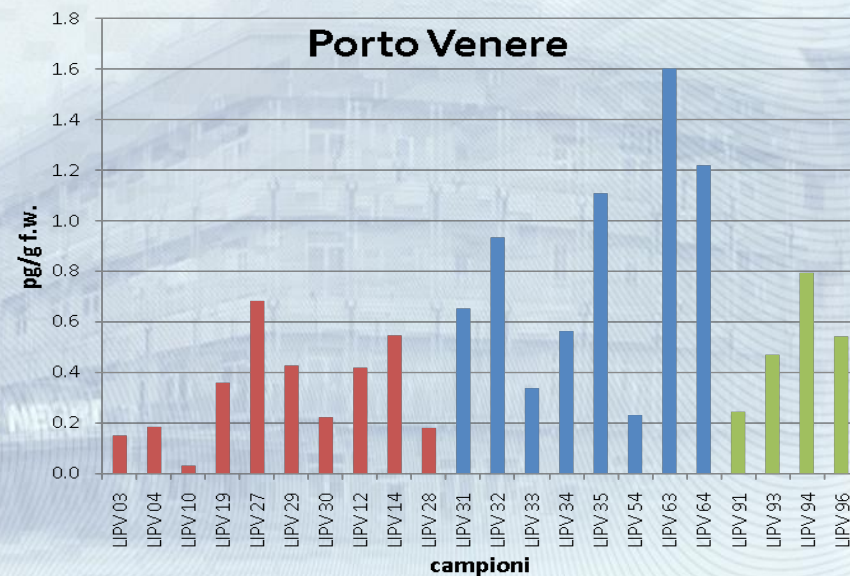
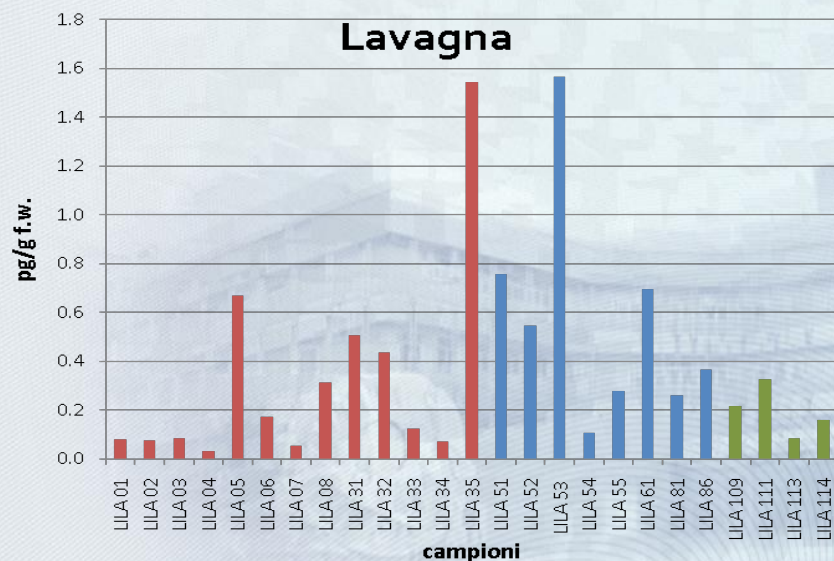


Analisi strumentale LC-MS/MS con
sorgente ESI

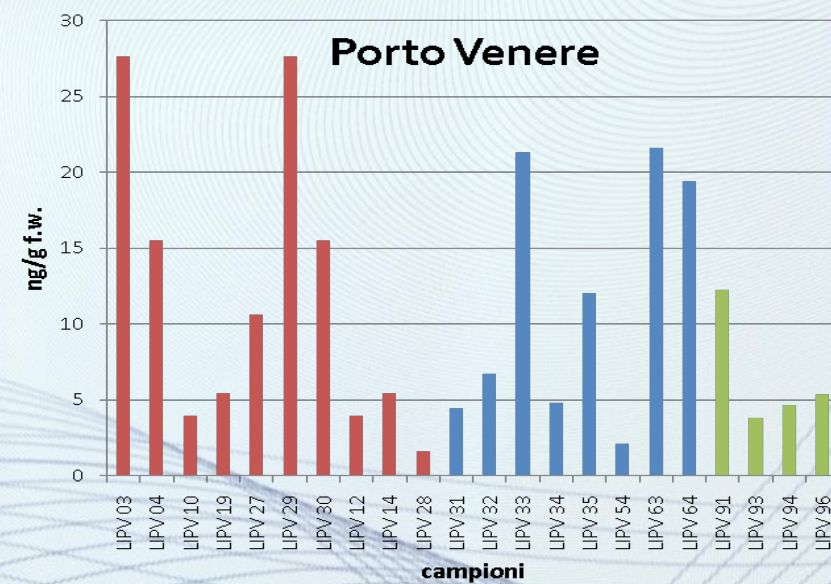
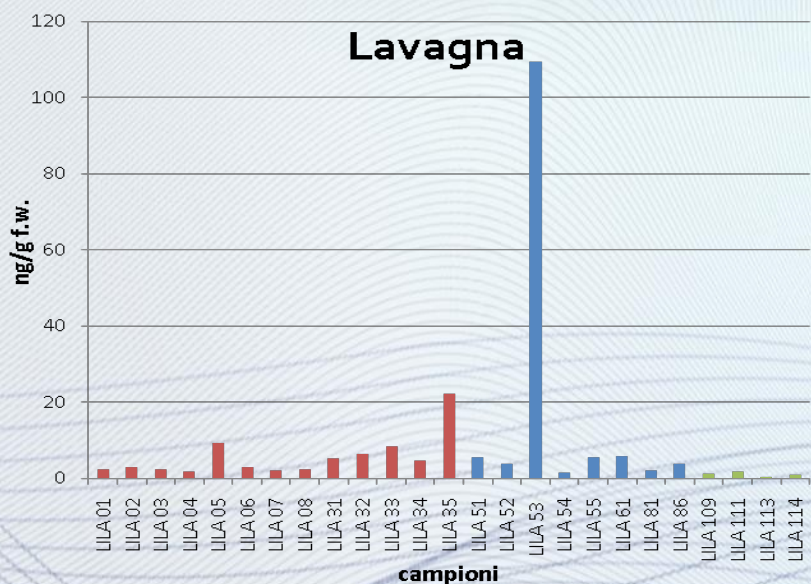
RISULTATI

Σ TEQ-PCB pg/g fresco

- Prima campagna
- Seconda campagna
- Terza campagna



Σ 6-PCB indicatori ng/g fresco

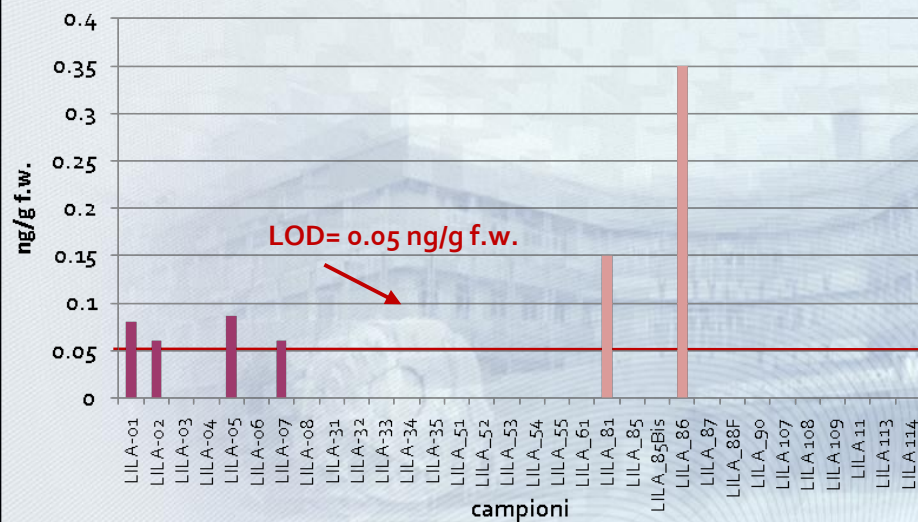


RISULTATI

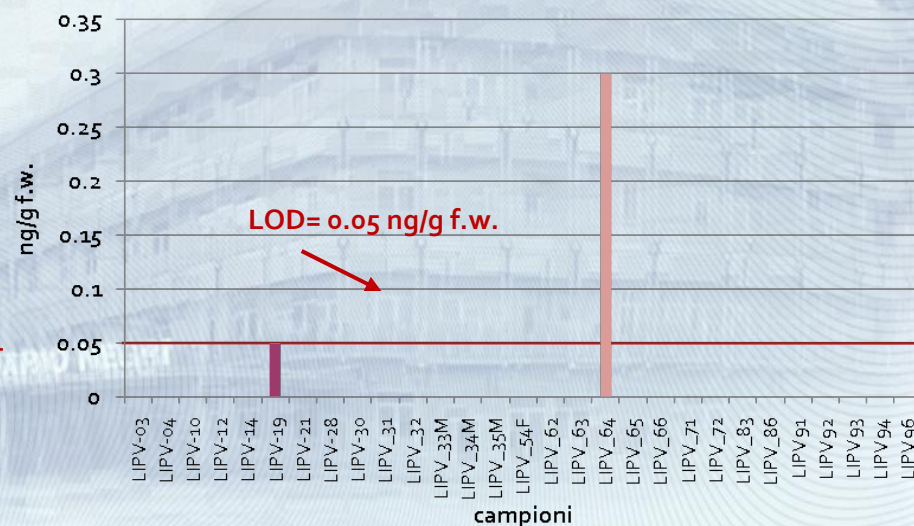
PFOS (circa 10% >LOD)

- Prima campagna
- Seconda campagna
- Terza campagna

Lavagna

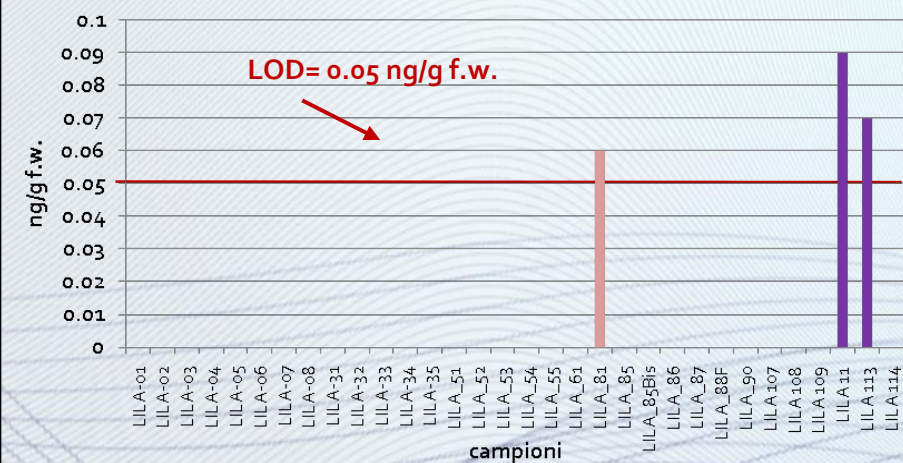


Porto Venere

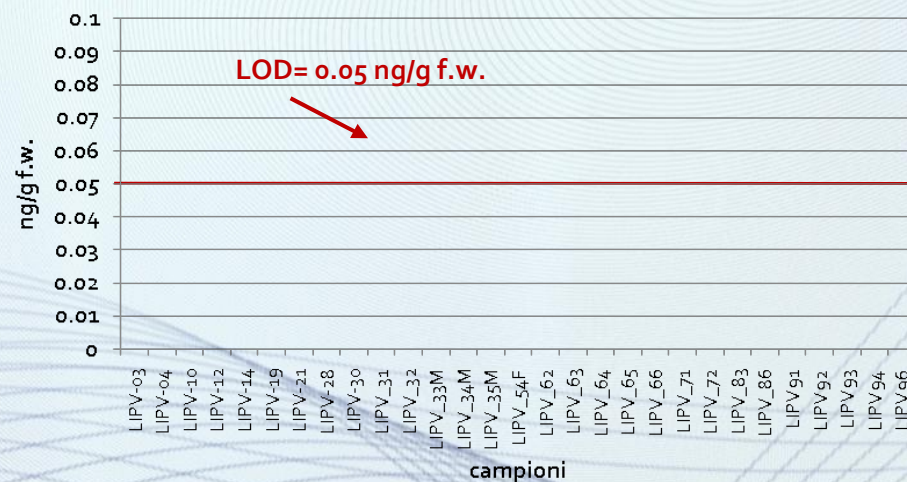


PFOA (circa 5% >LOD)

Lavagna



Porto Venere



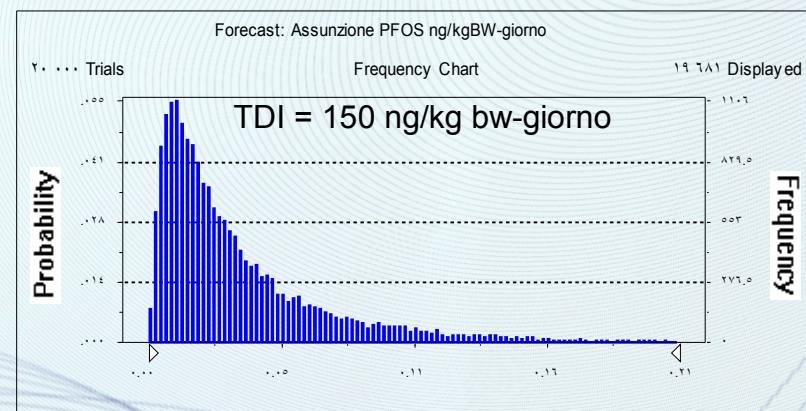
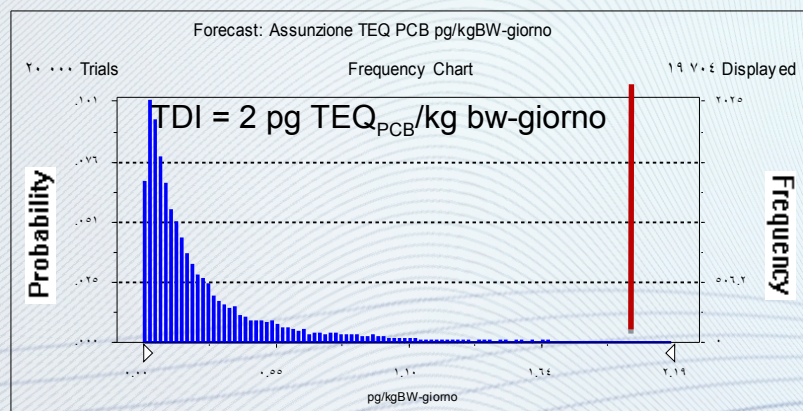
Valutazione dell'esposizione utilizzando un approccio probabilistico

Dati di consumo per la popolazione italiana
INRAN-SCAI 2005-6

Dati di concentrazione PCB e PFOS nei
pesci provenienti dai due allevamenti



Analisi Montecarlo



PCB: contributo rilevante alla TDI

PFOS e PFOA: contributo non rilevante alla TDI

- **Qualche considerazione**

L'andamento dei PCB diossina-simili (DL) e quello dei non-diossina simili (NDL: v. PCB indicatori) va incontro a variazioni stagionali **e non è sovrapponibile**

(NB: si potrebbero evidenziare raggruppamenti all'interno dei PCB da valutare in maniera cumulativa non dissimile dal TEQ per i PCB DL: v. Tait et al., Reprod Toxicol, 2011)

- La contaminazione da PF **si conferma essere “a chiazze”** (analogamente ai dati sull'uomo: v. ad es. il progetto PREVIENI, <http://www.iss.it/prvn>, La Rocca et al., 2011, in press)

Progetto di ricerca Ricerca Finalizzata IZS LT 2006

“Qualità e sicurezza degli alimenti di origine animale con particolare riferimento a quelli di origine acquatica e degli ambienti relativi alla loro filiera di produzione”

**UO 13 Università degli Studi di Genova
Dipartimento di Biologia**

Responsabile Scientifico: Alberta Mandich



**I tessuti di pesce come Biomarker di
qualità ambientale**

- ♦ 317 esemplari di spigola a fine ingrasso
- ♦ Estate/inverno 2008-2010
- ♦ Quattro allevamenti
 - ♦ sito 1: AQUA Srl di Lavagna
 - ♦ sito 2: Spezzina Itticoltura Srl di Portovenere
 - ♦ sito 3: Centro Ittico Bonello, Azienda Veneto Agricoltura, Porto Tolle
 - ♦ sito 4: Medfish Gaeta

- ♦ Tre tessuti target + plasma

- ♦ Gonadi
- ♦ Fegato
- ♦ Branchie



Analisi morfologiche
Attività enzimatiche (CAT, GST)
nel fegato
Misura VTG nel plasma

- ♦ T. muscolare



PCB e diossine

Pb, Hg, Cd, Cr

Parametri morfologici

Presenza/assenza di:

Gonadi

- ♦ alterazione della struttura
- ♦ aumento stroma connettivale a scapito cellule germinali
- ♦ infiltrazioni di granulociti
- ♦ presenza di agglomerati di Melanomacrofagi (MMC)
- ♦ zone emorragiche
- ♦ atresia dei gameti
- ♦ Presenza di PVG nella gonade maschile

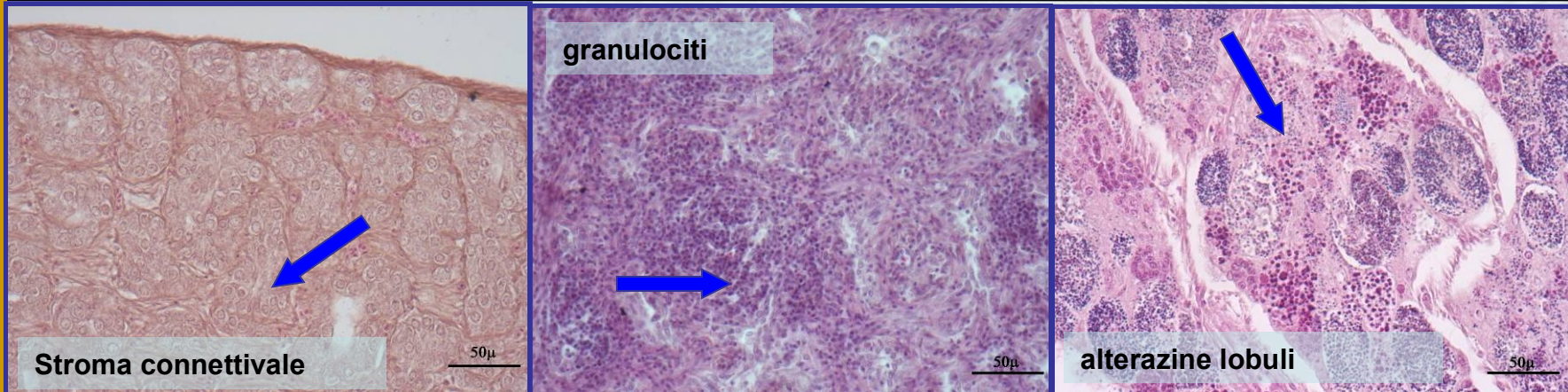
Fegato

- ♦ organizzazione in cordoni di epatociti
- ♦ lesioni del parenchima epatico
- ♦ infiltrazioni di granulociti
- ♦ presenza di agglomerati di Melanomacrofagi (MMC)
- ♦ accumulo di lipidi negli epatociti
- ♦ integrità dei canalicoli biliari

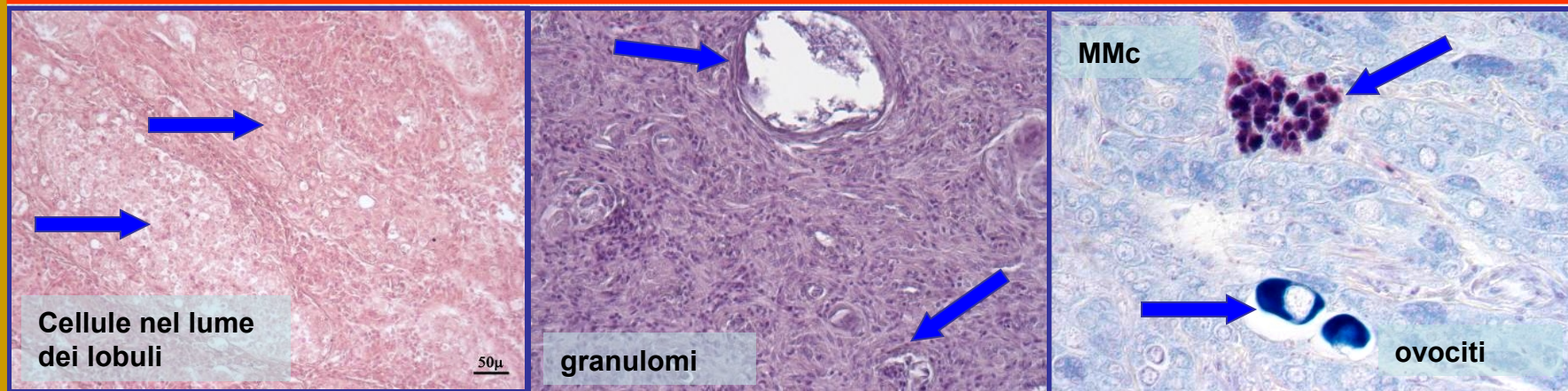
Branchie

- ♦ iperplasia dell'epitelio interlamellare
- ♦ iperplasia/ipertrofia delle lamelle respiratorie
- ♦ estese zone emorragiche
- ♦ cellule mucipare (Alcian/PAS)
- ♦ cellule a cloruri (Na/K ATPasi)

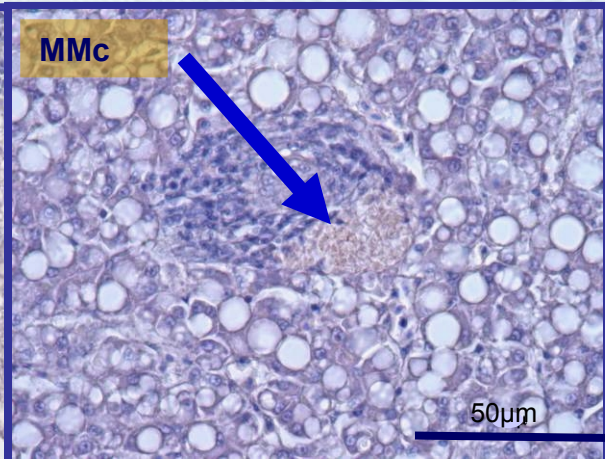
Risultati – morfologia gonadi



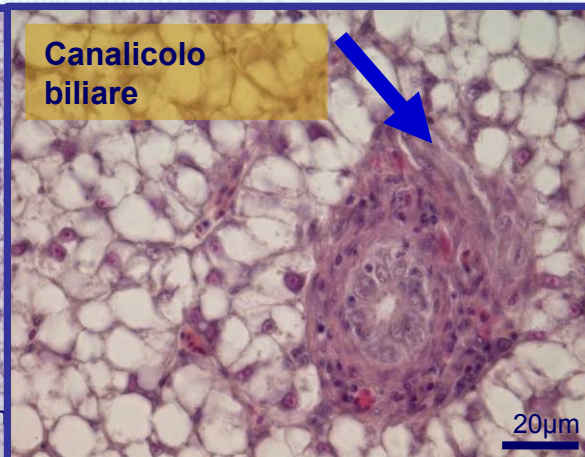
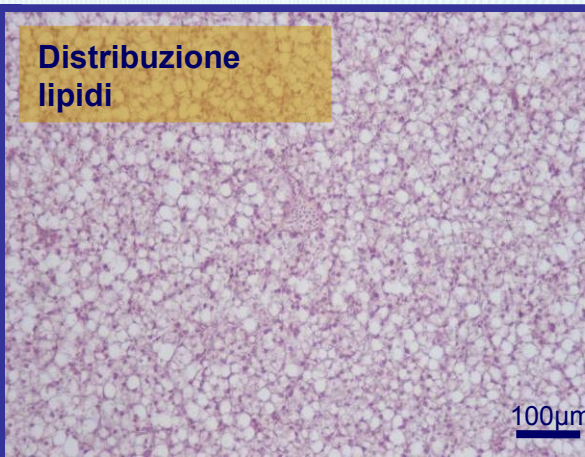
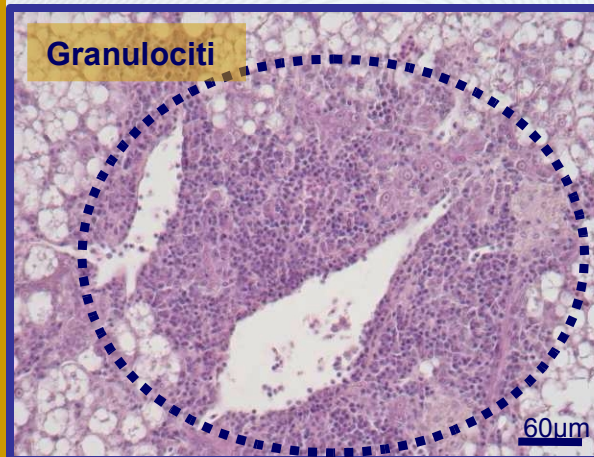
SITO	N	periodo	anno	granulociti			atresia gameti		aumento stroma		alterazione lobuli		granulomi		vasi dilatati		BB			PVG		cell. germ. nel lume	
				A	R	D	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	Pc	Gr	A	P	A	P
1	19	estate	2008	42.1	57.9	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	0.0	31.6	68.4	100.0	0.0
	20	estate	2008	60.0	30.0	10.0	100.0	0.0	95.0	5.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0
	29	inverno	2009	100.0	0.0	0.0	37.9	62.1	96.6	3.4	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	96.6	3.4
	22	estate	2009	45.5	27.3	27.3	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	13.6	81.8	4.5	100.0	0.0	86.4	13.6
	8	inverno	2010	87.5	0.0	12.5	100.0	0.0	12.5	87.5	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	12.5	87.5	0.0	100.0	0.0	87.5	12.5
2	28	estate	2008	0.0	3.6	96.4	53.6	46.4	3.6	96.4	42.9	57.1	39.3	60.7	60.7	39.3	10.7	67.9	21.4	100.0	0.0	96.4	3.6
	29	inverno	2009	48.3	51.7	0.0	51.7	48.3	44.8	55.2	86.2	13.8	75.9	24.1	96.6	3.4	75.9	24.1	0.0	100.0	0.0	51.7	48.3
	27	estate	2009	0.0	29.6	70.4	29.6	70.4	7.4	92.6	48.1	51.9	48.1	51.9	92.6	7.4	0.0	37.0	48.1	100.0	0.0	100.0	0.0
	7	inverno	2010	100.0	0.0	0.0	42.9	57.1	57.1	42.9	57.1	42.9	100.0	0.0	85.7	14.3	42.9	28.6	28.6	100.0	0.0	57.1	42.9
3	20	estate	2008	10.0	65.0	25.0	90.0	10.0	90.0	10.0	90.0	10.0	100.0	0.0	100.0	0.0	75.0	25.0	0.0	100.0	0.0	95.0	5.0
	20	inverno	2009	95.0	5.0	0.0	95.0	5.0	85.0	15.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	95.0	5.0	0.0	100.0	0.0	95.0	5.0
	22	estate	2009	95.5	4.5	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0
4	13	estate	2009	7.7	46.2	46.2	38.5	61.5	7.7	92.3	23.1	76.9	100.0	0.0	92.3	7.7	30.8	38.5	30.8	100.0	0.0	92.3	7.7



Risultati – morfologia fegato

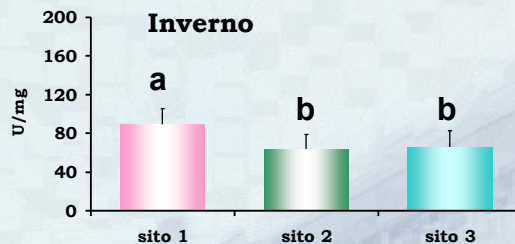
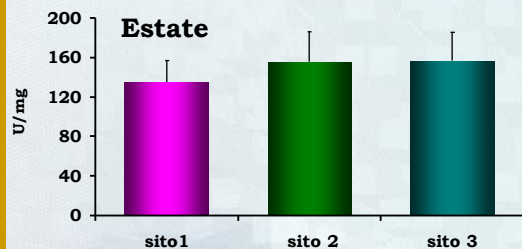


periodo	sito	campioni (n)	alterazione cordoni (%)		alterazione parenchima (%)		presenza di MMc (%)			granulociti (%)			distribuzione omogenea lipidi (%)		Canalicoli biliari alterati (%)	
			no	si	no	si	no	piccoli	estesi	no	diffusi	a zone	no	si	no	si
estate	1	30	76.7	24.0	86.7	20.0	60.0	40.0	0.0	100.0	0.0	0.0	32.0	68.0	92.0	8.0
	2	30	50.0	50.0	50.0	50.0	23.3	76.7	0.0	93.3	0.0	6.7	0.0	100.0	73.3	26.7
	3	30	66.7	33.3	63.3	36.7	10.0	90.0	0.0	90.0	0.0	10.0	0.0	100.0	70.0	30.0
	4	19	0.0	100.0	36.8	63.2	5.3	89.4	5.3	78.9	15.8	5.3	5.3	94.7	36.8	63.2
inverno	1	10	90.0	10.0	70.0	30.0	60.0	40.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	0.0
	2	10	60.0	40.0	60.0	40.0	30.0	70.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	100.0	80.0	20.0
	3	30	53.3	46.7	60.0	40.0	13.3	86.7	0.0	80.0	0.0	20.0	0.0	100.0	83.3	16.7

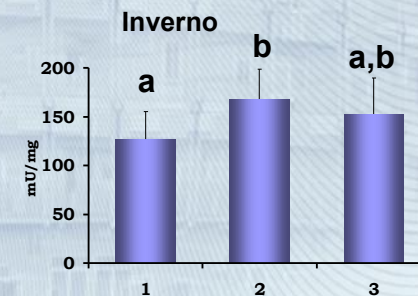
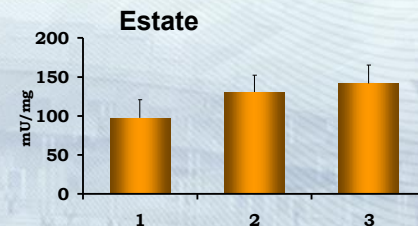


Risultati - CAT, VTG, UO6

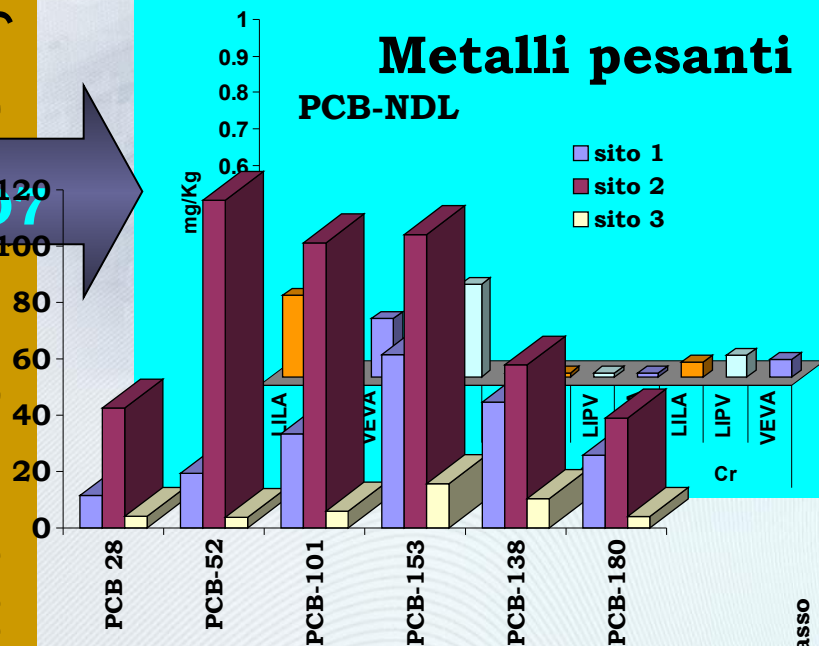
CAT



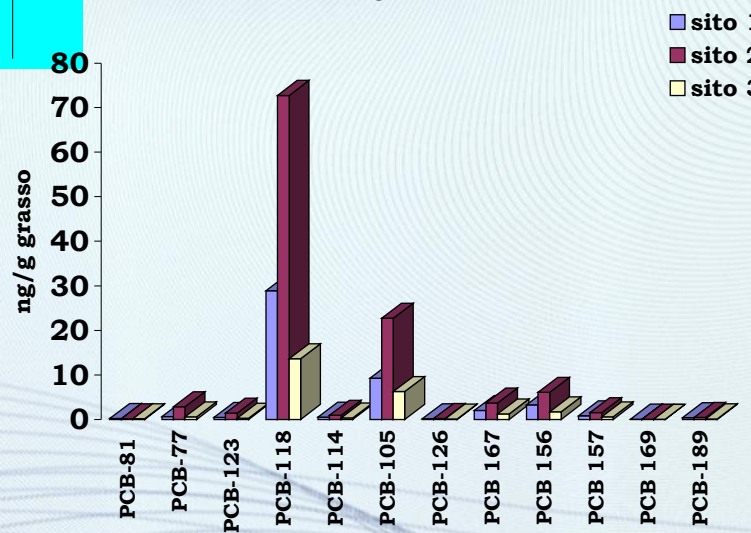
GST



Metalli pesanti PCB-NDL



PCB-DL



UO6 e 12

◆ Parametri morfologici

- ◆ Gonadi: la situazione migliore è stata osservata nel sito 3 (semi-intensivo in vasca)
- ◆ Fegati: la situazione migliore è stata osservata nel sito 1 (off-shore)

◆ Enzimi epatici

- ◆ sembrano confermare i dati morfologici (il sito 1 presenta CAT meno inibita, GST meno indotta rispetto agli altri siti)

Complessivamente, parametri morfologici, enzimatici ed analisi chimiche non hanno mai evidenziato situazioni di particolare criticità

- ♦ Suggerimento

- ♦ Periodiche analisi istologiche di tessuti bersaglio di contaminanti persistenti (fegato-gonadi)

- + stress ossidativo CAT-GST)

può essere un buon metodo per **caratterizzare la qualità ambientale e le sue variazioni nel tempo** di siti di acquacoltura/pesca

(N.B. Vitellogenina plasmatica o nel fegato: biomarker specifico di composti ad azione estrogena - > nel maschio- o antiestrogena - < nella femmina. v. ad es. Mandich et al., Gen. Comp. Endocrinol. 2007)

biomarcatori cellulari e molecolari di effetto; composti diossina-simili

Resp. Annamaria Colacci

**Centro Tematico Regionale di Cancerogenesi Ambientale e Valutazione del Rischio
Agenzia Regionale Prevenzione e Ambiente dell'Emilia Romagna**

Schema delle fasi sperimentali

Campioni analizzati:

LAVAGNA PORTO VENERE BIANCO PROCEDURALE

Estratti provenienti da pool di muscolo di branzino



Diluizione in DMSO



Test di vitalità dell'MTT su linea di carcinoma mammario T47D
(identificazione delle dosi da utilizzare negli esperimenti di microarray)



Esperimenti di microarray

Quantità di contaminanti presenti negli estratti espressi in TEQ

	LAVAGNA	PORTO VENERE
WHO-TEQ PCDD e PCDF	0.048	0.052
WHO-TEQ DL-PCB	0.0183	0.0471
WHO-TEQ totale pg/g	0.0663	0.0989

Dosi utilizzate nel test di vitalità

	% DMSO	pM	ppb
Porto venere	0.1%	0.19	0.64×10^{-4}
	0.25%	0.48	1.5×10^{-4}
	0.5%	0.95	3.0×10^{-4}

Lavagna	0.1%	0.13	0.4×10^{-4}
	0.25%	0.33	1×10^{-4}
	0.5%	0.65	2.1×10^{-4}

Risultati del test di vitalità

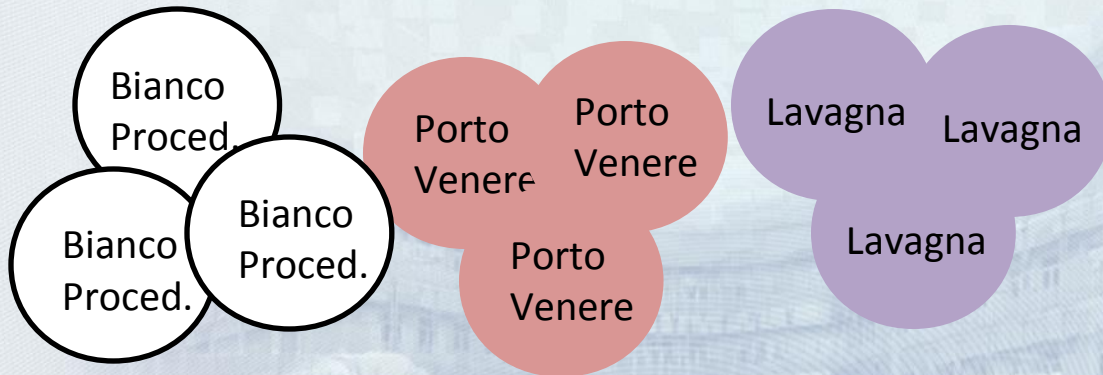
- Il Bianco Procedurale non mostra alcun effetto tossico evidente sulla linea cellulare esaminata
- Lavagna e Porto Venere presentano un effetto tossico statisticamente significativo (t-test di ogni dose rispetto al Bianco procedurale $p\text{-value} < 0.01$) sia dopo trattamento di 72h sia dopo trattamento di 6gg
- L'estratto più contaminato da PCB e diossine (Porto Venere) presenta un effetto tossico di minore entità rispetto a Lavagna
- Le dosi di PCB e diossine rilevate nel muscolo di branzino così come quelle impiegate in vitalità sono al di sotto del limite massimo residuo di 8 pgTEQ/g peso fresco



Per l'identificazione di potenziali biomarcatori di effetto si è stabilito di utilizzare la massima dose testata negli esperimenti di vitalità (0.5%) per un periodo di trattamento di 4h

Esperimenti di microarray

3 repliche biologiche di



4h

Estrazione dell'RNA



Controllo qualità/quantità dell'RNA totale



cRNA sintesi e marcatura con Cy3



ibridazione



Scanning



Analisi dei dati
Feature extraction 9.1
GeneSpring GX 10.0
Pathway Express

Risultati dell'analisi statistica e dell'interpretazione biologica dei dati di microarray

L'analisi statistica dei dati di microarray (1 wayANOVA, $p < 0.05$) ha identificato 2982 geni differenzialmente espressi tra Bianco Procedurale, Lavagna e Porto Venere



Attraverso un T-test, sono stati eseguiti i confronti diretti tra Lavagna e Bianco Procedurale e tra Porto Venere e Bianco Procedurale



Sono stati identificati 218 geni comuni
che analizzati mediante Pathway Express (approccio biologico) sembrano coinvolti principalmente in due processi

- p53 signaling pathway
- MAPK signaling pathway



La disamina dei singoli geni di queste due KEGG suggerisce un blocco del ciclo cellulare associato ad induzione di apoptosi.

Conclusione

- Anche dosi molto inferiori al limite massimo residuo **espresso in TEQ** di contaminanti estratti da branzino presentano effetti tossici su cellule T47D
- Queste dosi determinano una modulazione trascrizionale significativa rispetto al Bianco Procedurale, consentendo quindi di identificare potenziali biomarcatori di effetto
- Da un punto di vista biologico i dati ottenuti in microarray evidenziano un blocco del ciclo e possibile morte cellulare in risposta ad un trattamento acuto di 4h. Tuttavia, alcuni geni presentano effetti opposti e il ruolo di questi marcatori deve essere approfondito.
- Il trattamento con l'estratto proveniente da Lavagna presenta un effetto tossico e "trascrizionale" maggiore rispetto all'estratto ottenuto da Porto Venere pur avendo una contaminazione di minor entità
- **Il riferimento alla sola presenza di diossina e dioxin-like espresso come TEQ potrebbe determinare una sottovalutazione della tossicità globale** e potrebbe costituire una possibile spiegazione delle differenze di tossicità tra Lavagna e Porto Venere

Sub- Progetto: Tossine prodotte da *Ostreopsis Ovata*

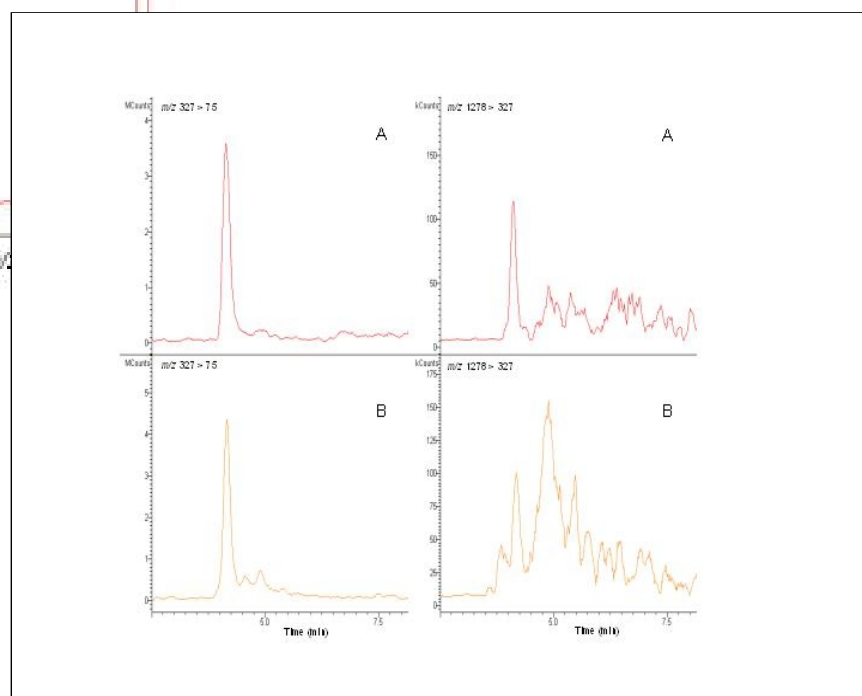
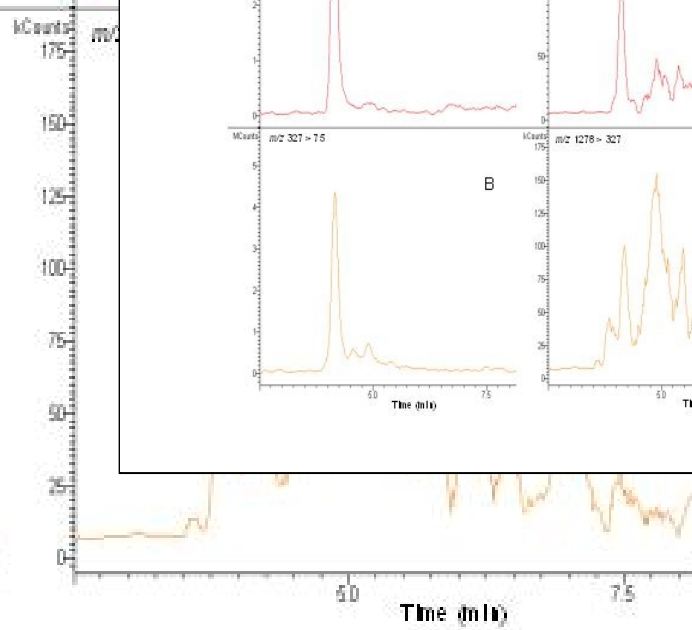
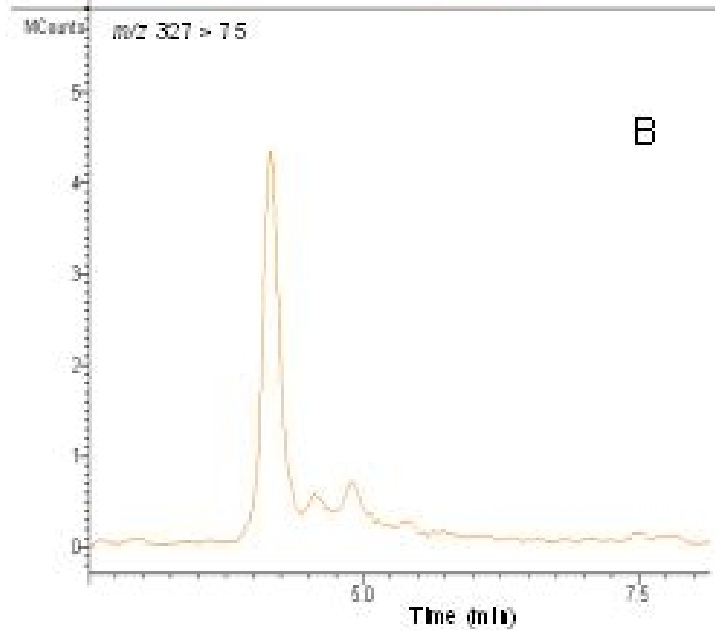
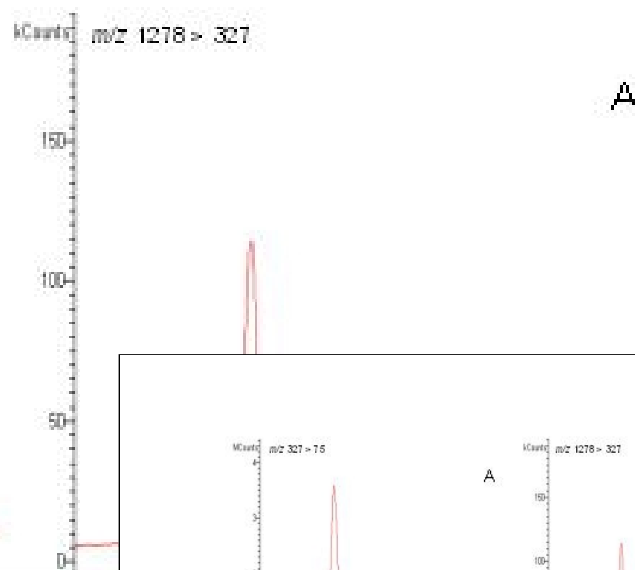
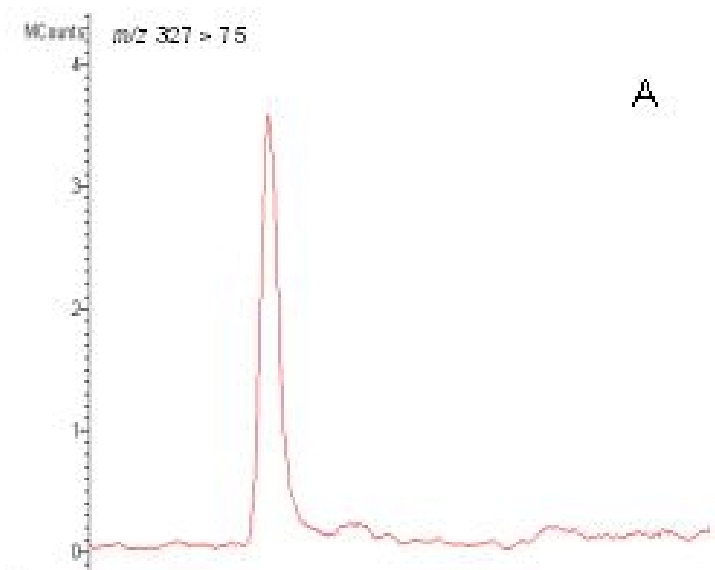
- Monitoraggio: caratterizzazioni siti, prelievi di mitili ed echinodermi estate 2008, 2009, 2010
- Prove biologiche: tutti i campioni sono stati sottoposti a mouse test secondo Protocollo 2 All- II Decreto 16/05/2002
- Identificazione tossina tramite LC/MS/MS
- Determinazione tossicità in vitro e danno DNA



Monitoraggio

- Siti di prelievo: Golfo di La Spezia, Golfo di Genova, litorale comune di Lerici
- Osservazioni in superficie, (a lato foto di superficie) osservazioni sul fondo, prelievo d'acqua, macroalghe, organismi marini
- Campioni prelevati e sottoposti a mouse test:
400 mitili e 40 echinodermi





Determinazioni LC/MS/MS in comparazione mouse test (eseguite per anno 2008)

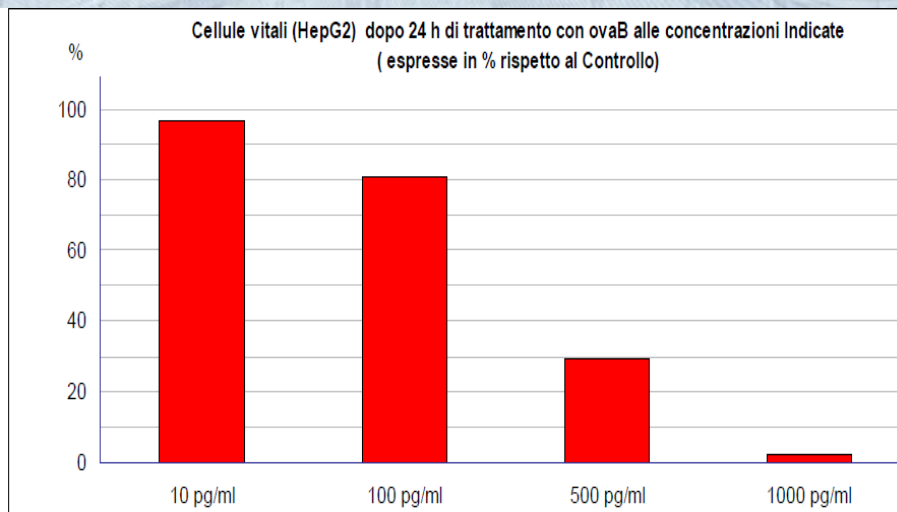
		LC-MS/ MS						MBA
		pPITX (µg/kg)		OVTX-a (µg/kg)		PITXs (µg/kg)		t.s. (hh.mm)
		estr.	omog.	estr.	omog.	estr.	omog.	estr.
A	mitili	<LOD	<LOD	<LOQ	39	<LOQ	39	03.00
B	mitili	<LOD		<LOQ		<LOQ		03.00
C	mitili	<LOD		<LOQ		<LOQ		02.30
D	mitili	<LOD		<LOQ		<LOQ		02.00
E	echinodermi	<LOD	<LOD	34	111	34	111	00.40
F	echinodermi	<LOD	<LOD	37	180	37	180	00.30
G	echinodermi	<LOD	<LOD	27	55	27	55	00.38

TEST IN VITRO E Determinazione Danno al DNA

- Si riporta l'andamento di tossicità sui camioni positivi nelle 24h., per la linea cellulare utilizzata HepG2 (epatoma umano) dimostratasi dai dati della ricerca la più sensibile alla presenza di ovatossina
- Per quanto attiene l'induzione di danno al DNA dose-risposta è evidente solo con trattamento di estratto campione positivo.

Il campione con maggiore positività ha indotto necrosi in più del 50% delle cellule e pertanto non è stato valutabile il dosaggio.

Nessun effetto è stato rilevato sui campioni negativi



Cluster Tossicologico: PRODOTTI: SICUREZZA DEL CONSUMATORE

- 1) Induzione di alterazioni endocrino-immunitarie in fasi della vita vulnerabili (femmina prepubere) a livelli compatibili con un range elevato di esposizione umana (salmone)

Dati utili per definire *limiti tollerabili di contaminanti non normati* (PCB NDL, ritardanti di fiamma bromurati) in comparazione con diossine

- 2) Studio su IE persistenti in un'area campione (Liguria)

2.a) Caratterizzazione dell'esposizione alimentare:

- esposizione relativamente bassa per PF
- esposizione potenzialmente importante ($> 50\%$ TDI) per PCDD/PCB DL

Cluster Tossicologico: PRODOTTI: BIOMARKER DI QUALITA'AMBIENTALE

- 2) Studio su un'area campione (Liguria)
- 2.b) Alterazioni epatiche e marcatori di stress ossidativo nel pesce come indici di qualità ambientale: correlazioni con sito e stagionalità, ma non lineare con *singoli* contaminanti: comunque non indicazioni di allerta
- 2.b) Geni associati all'apoptosi possono essere marker di effetto per composti diossina-simili: Tuttavia l'effetto additivo di miscele di contaminanti può essere più importante dei composti diossina-simili.

Cluster Tossicologico: PRODOTTI: SOSTANZE CON TOSSICITA' ACUTA

3) Caratterizzazione tossicologica di biotossine di *Ostreopsis ovata*, con relazioni dose-risposta per

Tossicità acuta in vivo, citotossicità in cellule di derivazione epatica e potenziale danno al DNA
Come supporto per una valutazione del rischio per ecosistemi e consumatori

Pensiamo ad una prevenzione traslazionale
Dal bancone del ricercatore all'analisi del rischio
That's all Folks...

