

# La Medicina del Lavoro

RIVISTA BIMESTRALE DI MEDICINA DEL LAVORO E IGIENE INDUSTRIALE  
ITALIAN JOURNAL OF OCCUPATIONAL HEALTH AND INDUSTRIAL HYGIENE

*Già diretta da* **Luigi Devoto** (1901-1935)  
**Luigi Preti** (1936-1941)  
**Enrico C. Vigliani** (1942-1991)

**DIRETTORE** Vito Foà  
**REDATTORI** Lorenzo Alessio, Pier Alberto Bertazzi,  
Antonio Colombi, Alessandra Forni, Italo Ghezzi,  
Carlo Zocchetti

**CONSIGLIO DI REDAZIONE** Pietro Apostoli, Massimo Bovenzi, Pierluigi Cocco,  
Giovanni Costa, Cristina E. Mapp, Antonio Mutti,  
Pietro Sartorelli, Leonardo Soleo, Francesco S. Violante

**IMPAGINAZIONE** Paolo Benvenuti

**REVISIONE LINGUISTICA** Kathleen White

**SEGRETERIA** Lilly Visintin

**INTERNET** <http://www.lamedicinadellavoro.it>

**E-MAIL** [redazione@lamedicinadellavoro.it](mailto:redazione@lamedicinadellavoro.it)

---

**REDAZIONE** La Medicina del Lavoro  
Clinica del Lavoro «L. Devoto»  
Via San Barnaba, 8 - 20122 Milano (Italy)  
Tel. 02/50320125 - Fax 02/50320126

**CASA EDITRICE** Mattioli 1885 spa - Casa Editrice  
Via Coduro, 1/b - 43036 Fidenza (PR)  
Tel. 0524/84547 - Fax 0524/84751  
e-mail: [edit@mattioli1885.com](mailto:edit@mattioli1885.com)  
[www.mattioli1885.com](http://www.mattioli1885.com) (CCP N. II.286.432)

---

Pubblicazione bimestrale  
Direttore Responsabile Prof. Vito Foà  
Autorizzazione del Presidente  
del Tribunale di Milano 10/5/1948 - Reg. al N. 47

---

La Medicina del Lavoro è recensita su:

*Index Medicus/MEDLINE; Embase/Excerpta Medica; Abstracts on Hygiene; Industrial Hygiene Digest;  
Sécurité et Santé au Travail Bit-CIS; Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC)*

# ABBONAMENTI 2003

## Abbonamenti e ordini

on line  [www.mattioli1885.com](http://www.mattioli1885.com)  
via fax  0524/84547 - Ufficio abbonamenti  
cedola  compilate ed inviate all'Editore la  
cedola allegata

## Prezzi Abbonamenti / Subscription rates

	Privati/Individual			Istituzioni/Institution	
	Italy	Europe	Out of Europe Air Mail	Italy and Europe	Out of Europe Air Mail
Abbonamento annuo/Annual subscription	59,00 €	71,00 €	83,00 €	86,00 €	97,00 €
Arretrati/Back Numbers:					
Numero singolo/Single Issue	14,00 €	17,00 €	20,00 €	21,00 €	23,00 €
Annata completa/Complete Year	68,00 €	86,00 €	100,00 €	103,00 €	116,00 €
Numeri speciali/Special Issues	26,00 €	33,00 €	38,00 €	39,00 €	44,00 €

I nuovi abbonamenti, anche se contratti durante l'anno, decorrono sempre dal 1° gennaio al 31 dicembre, con diritto per il nuovo abbonato di ricevere i fascicoli arretrati. I fascicoli non pervenuti debbono essere richiesti entro un mese dal ricevimento del fascicolo immediatamente successivo.

**DESIDERO SOTTOSCRIVERE L'ABBONAMENTO ALLA RIVISTA LA MEDICINA DEL LAVORO PER L'ANNO 2003**

INVIATE LE COPIE AL SEGUENTE NOMINATIVO:

COGNOME .....

NOME .....

VIA ..... N .....

CITTÀ .....

CAP ..... PROVINCIA .....

E-MAIL .....

TEL. ....

**DESIDERO RICEVERE FATTURA:**

P. IVA .....

HO PAGATO L'IMPORTO DI EURO .....  
TRAMITE:

CCP N. 11286432  
intestato a: Mattioli 1885 S.p.A. - Via Coduro, 1/b  
43036 Fidenza (PR)

**BONIFICO BANCARIO** (allego fotocopia) intestato a:  
Mattioli 1885 spa Via Coduro 1/B, 43036 Fidenza (PR),  
presso Cassa di Risparmio di Parma e Piacenza, Ag. 3 di  
Fidenza; cod. ABI 6230, CAB 65732, c/c 94186751

**VISA**       **MASTERCARD**

N° CARTA

SCADENZA

FIRMA .....

**Mattioli 1885** CASA EDITRICE  
VIA CODURO 1/B  
43036 FIDENZA (PR)

Mattioli 1885 CASA EDITRICE - SPA - VIA CODURO 1/B 43036 FIDENZA (PR) TEL +39 0524/84547 FAX + 39 0524/84751

E-MAIL [subscribe@mattioli1885.com](mailto:subscribe@mattioli1885.com)

[www.mattioli1885.com](http://www.mattioli1885.com)

# Modelli *in vitro* per la valutazione della neurotossicità del metilmercurio. Stato attuale delle conoscenze

MARIA VITTORIA VETTORI, ROSSELLA ALINOVI, SILVANA BELLETTI\*, M. GOLDONI, I. FRANCHINI, A. MUTTI

Sezione di Medicina del Lavoro e Laboratorio di Tossicologia Industriale, Dipartimento di Clinica Medica, Nefrologia e Scienze della Prevenzione;

\* Istituto di Istologia, Università di Parma, Italia

## KEY WORDS

Methylmercury; *in vitro* models; neurotoxicity

## SUMMARY

«**In vitro models for assessment of the neurotoxicity of methylmercury - current state of knowledge**». **Background:** *In adults, MeHg poisoning is characterized by damage to discrete anatomical areas of the brain (visual cortex, loss of neurons from the granule layer of the cerebellum). However, the immature central nervous system (CNS), which is extremely sensitive to MeHg neurotoxicity, shows a diffuse and widespread damage disorganization of cerebral cortex cytoarchitecture, disappearance of granule cells with narrowing of the molecular layer. While adverse effects have been unequivocally demonstrated in poisoning incidents in humans (visual abnormalities, sensory impairment of the extremities, cerebellar ataxia, hearing loss, muscle weakness, tremor and mental deterioration), the implications of lower level exposures, such as those occurring in fish-eating populations, are still controversial. The high affinity of MeHg for thiol groups makes proteins and peptides bearing cysteines the predominant targets for structural and functional modification by MeHg in all subcellular compartments. Methods: *The identification of MeHg cellular and sub-cellular targets in the CNS is complicated by the fact that it is difficult to observe the outcomes directly in vivo. In neurobiology, in vitro cell culture techniques have been successfully developed and employed to address specific questions of cell biology and nervous system functioning and provide a means to systematically study the complexity of cellular functions of the CNS elements. Moreover, they provide a convenient experimental tool for testing possible functions or postulates in vivo that otherwise might not be conducted. Results:* *Several mechanisms have been proposed as being implicated in the neurotoxic effects of MeHg. Examples of MeHg molecular effects which may be relevant to risk assessment are presented, including cell death mode, effects on microtubules, calcium signalling, oxidative stress, effects on neurotransmitter systems. Conclusions:* *Molecular and cellular approaches permit exploration of early biological responses to chemical or physical agents and definition of the role of these early effects in altered cellular structure and function.**

## RIASSUNTO

*Gli effetti neurotossici legati ad alte esposizioni di Metilmercurio (MeHg) sono noti sia negli animali da laboratorio che nell'uomo. Mentre sull'uomo adulto, l'avvelenamento da MeHg è caratterizzato da danni anatomici loca-*

Pervenuto il 17.1.2002 - Accettato il 26.3.2002

Corrispondenza: Maria Vittoria Vettori, Sezione di Medicina del Lavoro e Laboratorio di Tossicologia Industriale, Dipartimento di Clinica Medica, Nefrologia e Scienze della Prevenzione, Università di Parma, Via Gramsci 14, 43100 Parma, Italia

Lettura Invitata al Convegno "Valutazione degli effetti conseguenti a basse dosi di mercurio inorganico da esposizioni ambientali ed occupazionali: studio dei meccanismi di tossicità specifica *in vitro* e nell'uomo", 27-28 Settembre 2001, Gargnano, Brescia

*lizzati in diverse aree cerebrali (corteccia visiva, strato granulare del cervelletto), il sistema nervoso centrale (SNC) immaturo, estremamente sensibile alla neurotossicità del MeHg, mostra un danno diffuso le cui manifestazioni sono rappresentate da una disorganizzazione della citoarchitettura della corteccia, scomparsa di cellule granulari, accompagnate da astrocitosi reattiva. Sebbene sia noto che esposizioni ad alte dosi di MeHg possano dare manifestazioni cliniche quali cecità, sordità e serio ritardo mentale, le implicazioni delle basse dosi sono attualmente oggetto di numerosi dibattiti. L'individuazione dei bersagli cellulari del MeHg è inoltre complicata dal fatto che l'isolamento del SNC limita in modo considerevole la possibilità di obiettivare le alterazioni a livello di organo in vivo, specie tenendo conto che, per basse esposizioni, tali alterazioni hanno generalmente un lungo periodo di latenza. L'adozione di modelli in vitro si presta, pertanto, allo studio delle alterazioni biochimiche, funzionali e strutturali di singole popolazioni cellulari del SNC e contribuisce al miglioramento delle conoscenze degli effetti molecolari del MeHg. L'elevata affinità del MeHg per i gruppi tiolici rende le proteine e i peptidi che contengono cisteina particolarmente sensibili all'attacco del tossico in tutti i compartimenti subcellulari. Numerosi meccanismi sono stati presi in considerazione per spiegare la neurotossicità del MeHg. Tra questi gli effetti sui microtubuli, sui sistemi di neurotrasmissione e l'induzione dello stress ossidativo. In particolare, la morte della cellula per necrosi o apoptosi risulta essere dipendente dall'intensità dell'insulto tossico.*

## PREMESSA

La valutazione del rischio in Tossicologia Industriale si basa sull'integrazione delle informazioni ottenute dalla sperimentazione su animali da laboratorio, dalle osservazioni sui lavoratori esposti e, più raramente, da studi sperimentali su gruppi di volontari o da indagini epidemiologiche su gruppi a rischio della popolazione generale. In mancanza di informazioni precise, l'estrapolazione fra specie e fra livelli di dose richiede l'applicazione di fattori correttivi (di sicurezza) arbitrari, definiti in base al grado di incertezza associata con l'operazione.

Nella maggior parte dei casi, la valutazione del rischio deve necessariamente basarsi su dati ottenuti su animali da laboratorio (test di tossicità acuta o sistemica, test di sensibilizzazione cutanea, valutazione dell'attività mutagena e teratogena, studi di esposizione per valutazione dei cancerogeni e studi sul metabolismo) per giungere alla definizione di valori limite che consentano l'impiego della sostanza in condizioni di massima sicurezza e senza effetti a lungo termine sulla salute umana, in particolari gruppi a rischio professionale od ambientale. Tuttavia, è attualmente oggetto di dibattito e di verifica a livello scientifico la possibilità di sviluppare tecniche alternative all'impiego di animali da laboratorio in considerazione:

- del crescente numero di sostanze chimiche presenti nell'ambiente e nell'ambito lavorativo in assenza di un'adeguata valutazione del rischio per l'uomo;
- dei costi sempre maggiori e dei tempi operativi elevati necessari per l'esecuzione di saggi di tossicità su animali;
- della crescente consapevolezza della difficoltà di estrapolare i dati sperimentali ottenuti sugli animali al fine di definire il rischio per l'uomo (18).

La necessità di acquisire informazioni in tempi ragionevoli implica l'adozione di test di più rapida esecuzione, meno costosi, ma ugualmente informativi, come quelli basati sull'uso di colture cellulari e tessutali. Recentemente è stata valutata l'utilità di questo approccio per l'identificazione del pericolo (*hazard identification*), fase iniziale del processo formale di valutazione del rischio (*risk assessment*).

Nei sistemi *in vitro* possono essere descritti non solo gli effetti funzionali o morfologici che si accompagnano ad un test tossicologico, ma anche gli aspetti fisiologici inerenti ai meccanismi d'azione della sostanza; infatti è opinione ormai comune che i convenzionali *end-points* tossici valutati sugli animali non rappresentino altro che la conseguenza di effetti iniziali sul metabolismo, sulla funzione e sull'integrità cellulare.

I sistemi *in vitro* offrono, rispetto alla tradizionale valutazione della tossicità in animali da laboratorio, i seguenti vantaggi:

- i composti da analizzare, solubilizzati nel terreno di coltura opportunamente scelto, sono a diretto contatto con i tessuti in assenza di processi di filtrazione e di ripartizione lipidica, determinando una esposizione al tossico continua e quantificabile;
- i parametri sperimentali possono essere standardizzati in modo rigoroso, riducendo la variabilità tra gli esperimenti;
- l'ambiente chimico-fisico risulta uniforme in quanto sono eliminati gli organi che possono modulare l'azione tossica primaria di una sostanza.

Inoltre, per studiare l'interazione fra cellule in coltura e metaboliti della biotrasformazione, possono essere addizionati al terreno sostanze quali la frazione epatica microsomale (S9 mix), che conferisce al sistema una competenza metabolica (7).

A fronte dei vantaggi citati, le principali obiezioni che vengono mosse nei confronti dell'utilizzo di sistemi *in vitro* per l'identificazione del rischio sono costituite dal fatto che le cellule, che non fanno più parte dei tessuti normali, possono subire alterazioni morfologiche e metaboliche con conseguenti modificazioni nella risposta ai composti tossici. Esistono inoltre limitazioni nell'adottare le tecniche *in vitro* per i saggi di tossicità: poiché in questo settore la definizione di linee guida e di protocolli sperimentali condivisi dalla comunità scientifica è molto lenta, potrebbero insorgere problemi nel caso in cui non venisse seguita una procedura standardizzata.

## MODELLI *IN VITRO* PER LO STUDIO DELLA NEUROTOSSICITÀ

Il sistema nervoso è costituito da popolazioni cellulari altamente specializzate, eterogenee ma integrate. La neurotossicità è uno degli eventi tossicologici più seri. L'alterazione di popolazioni neuronali, o anche di un numero limitato di neuroni, può avere conseguenze significative sulla funzionalità di tutto l'organismo (37).

L'isolamento del sistema nervoso centrale (SNC), connesso all'esistenza della barriera emato-encefalica, limita in modo considerevole la possibilità di obiettivare le alterazioni a livello dell'organo *in vivo*, specie tenendo conto che, nei soggetti professionalmente esposti, tali alterazioni hanno generalmente un lungo periodo di latenza e che comunque qualsiasi metodica invasiva non appare eticamente accettabile. L'adozione di modelli *in vitro* si presta pertanto allo studio delle alterazioni biochimiche, funzionali e strutturali di singole popolazioni cellulari del SNC.

Alcune delle peculiarità morfologiche e funzionali del sistema nervoso (l'alta specializzazione e la relativa incapacità di rigenerarsi, la separazione spaziale tra corpo cellulare ed assone, la comunicazione mediante neurotrasmettitori, ecc.) lo rendono selettivamente vulnerabile all'azione di svariati composti chimici e proprio queste caratteristiche, analizzate separatamente in coltura, possono essere sfruttate dal punto di vista sperimentale (6, 20, 49, 50).

I sistemi rappresentati da linee cellulari trasformate derivanti da specie diverse (gliomi, neuroblastomi, feocromocitomi) costituiscono dei modelli sia per la valutazione della neurotossicità che per lo studio del meccanismo d'azione di ciascuna sostanza chimica e possono pertanto fornire una base iniziale per formulare successive ipotesi di ricerca da condurre, eventualmente, su sistemi *in vitro* più complessi.

I principali *end-points* valutabili mediante l'impiego di linee cellulari nervose possono essere finalizzati a studiare modificazioni sia morfologiche che funzionali relative alle modalità di morte cellulare (necrosi e apoptosi) e alle alterazioni nel citoscheletro legate all'esposizione ai tossici; può essere valutata la generazione di marcatori di stress ossidativo (come gli addotti del radicale idrossile al DNA) ed il ruolo delle modificazioni nel metabolismo energetico (variazione dei livelli di ATP e del potenziale di membrana mitocondriale) in risposta ad uno stimolo neurotossico. Inoltre, quando sia ipotizzabile un'interferenza con i meccanismi di sintesi, rilascio e metabolizzazione dei neurotrasmettitori, si possono utilizzare linee cellulari che posseggono il sistema di neurotrasmissione *target* della sostanza in esame.

## EFFETTI NEUROTOSSICI DEL METILMERCURIO

Gli effetti neurotossici legati ad alte esposizioni di Metilmercurio (MeHg) sono noti sia negli animali da laboratorio che nell'uomo. La maggior parte delle conoscenze sugli effetti tossici del MeHg deriva da episodi di avvelenamento. Il consumo di pesce proveniente da acque fortemente inquinate dagli scarichi industriali è alla base dei due eventi catastrofici che hanno provocato in Giappone negli anni 1950 e 1960 gravi effetti sulla salute. Un altro episodio di avvelenamento ha avuto luogo in Iraq agli inizi degli anni '70. In questa occasione centinaia di persone hanno manifestato effetti clinici gravi e parecchie sono morte in seguito all'ingestione di frumento che era stato trattato con un fungicida organomercurico.

Negli adulti, l'avvelenamento da MeHg è caratterizzato da danni anatomici localizzati in diverse aree cerebrali. Si osservano modificazioni nella corteccia visiva, nello strato granulare del cervelletto e degenerazione assonale associata ad una alterazione secondaria della mielina del tratto sensoriale dei nervi periferici (21, 22, 31, 46).

Il sistema nervoso centrale (SNC) immaturo è estremamente sensibile alla neurotossicità del MeHg. Il cervello fetale può essere alterato anche quando la madre non mostra segni di intossicazione e, a differenza di quanto osservato nell'adulto, il cervello in via di sviluppo mostra un danno diffuso. Esposizioni ad alte dosi possono determinare cecità, sordità e serio ritardo mentale. Da un punto di vista microscopico, nei casi di esposizione in Giappone, è stata osservata una disorganizzazione della citoarchitettura della corteccia, ed una diminuzione nel numero di cellule nervose in ciascun lobo (13). Nel cervelletto è stata inoltre osservata la scomparsa di cellule granulari accompagnata da una riduzione del numero di cellule del Purkinje. Inoltre, una caratteristica comune di entrambi i casi di intossicazione acuta sia in Giappone che in Iraq, è una marcata astrocitosi reattiva (13).

Dosi più basse possono causare deficit visivi e uditivi, ritardo nella capacità di linguaggio e di deambulazione. Sebbene gli effetti dovuti alle esposizioni acute siano stati definiti in modo inequivocabile, le implicazioni delle basse esposizioni

sono attualmente oggetto di numerosi dibattiti (17, 27).

Attualmente, la principale fonte di esposizione umana a MeHg è quella derivante dal consumo di prodotti ittici. Il mercurio ingerito viene quasi completamente assorbito dal tratto intestinale e si accumula facilmente nel cervello.

Il crescente consumo giornaliero di prodotti ittici, tipico della nostra società ed incentivato, in quanto presentato come sinonimo di una dieta sana, può determinare una cronica esposizione a basse dosi e, quindi, rappresentare un problema tossicologico di rilievo, soprattutto per individui particolarmente suscettibili o per popolazioni con diete relativamente monotone per ragioni culturali, geografiche o economiche, specie in paesi in via di sviluppo. Peraltro, non sono ancora state stabilite le dosi soglia per la comparsa di alterazioni dello sviluppo neuronale.

## EFFETTI MOLECOLARI DEL MEHG

L'elevata affinità del MeHg per i gruppi tiolici rende le proteine e i peptidi che contengono cisteina particolarmente sensibili all'attacco del tossico in tutti i compartimenti subcellulari. Numerosi meccanismi sono stati presi in considerazione per spiegare la neurotossicità del MeHg. Di seguito sono riportati alcuni degli effetti molecolari del metallo.

### Apoptosi e necrosi

L'apoptosi e la necrosi sono due modalità di morte cellulare caratterizzate da aspetti morfologici e molecolari distinti e aventi diverse implicazioni per i tessuti circostanti. La necrosi è un fenomeno passivo indotto da danni tossici o fisici diretti, che molto spesso avviene in modo casuale. È caratterizzata da danno mitocondriale intenso, rigonfiamento cellulare passivo, rapida perdita di energia e lisi della membrana, senza modificazioni evidenti nel nucleo cellulare. La conseguenza del rilascio del contenuto intracellulare, in particolare di enzimi proteolitici, è l'infiammazione locale e il danno alle cellule adiacenti (44).

L'apoptosi è invece una modalità attiva di morte cellulare le cui caratteristiche morfologiche principali implicano una diminuzione del volume cellulare, la condensazione della cromatina con una estesa frammentazione del DNA, picnosi del nucleo e formazione di corpi apoptotici. Le cellule apoptotiche vengono sequestrate dalle cellule circostanti. In questo modo l'infiammazione e i danni tissutali vengono evitati (52). Da un punto di vista biochimico, l'apoptosi implica l'attivazione di proteasi specifiche, chiamate caspasi.

Il livello di dose del tossico sembra essere uno dei fattori determinanti nell'indurre l'apoptosi o la necrosi della cellula. Il fattore critico sarebbe il grado di disfunzione mitocondriale associato con i diversi livelli di dose e, quindi, la capacità della cellula di mantenere livelli energetici sufficientemente elevati (3, 47). Inoltre i mitocondri sembrano svolgere un ruolo centrale nel processo di induzione dell'apoptosi mediata dalle caspasi. La diminuzione del potenziale elettrico della membrana mitocondriale interna ( $\psi_m$ ) accompagnata da una transizione della permeabilità mitocondriale (PT) ha come effetto quello del rilascio del citocromo c dal mitocondrio nel citosol della cellula, dove, dopo legame con un adattatore proteico, induce il clivaggio della pro-caspasi 3 e la successiva attivazione della cascata delle caspasi e quindi dell'evento apoptotico (24).

La degenerazione neuronale in seguito all'esposizione a MeHg può indurre sia necrosi (28, 33) che apoptosi, in modo dipendente dall'intensità dello stimolo (9, 11, 25, 29, 31, 32). Questi dati sono in accordo con quanto osservato *in vivo*. Infatti, in ratti ai quali erano stati somministrati 10 mg/kg/die di MeHg cloruro sono state osservate modificazioni istologiche indicative di necrosi nella corteccia cerebellare (31); esposizioni a concentrazioni più basse (4 mg/kg ogni due giorni) hanno rivelato la presenza di neuroni cerebellari aventi caratteristiche morfologiche tipiche dell'apoptosi (32).

Gli esperimenti *in vitro* confermano che l'intensità della dose di trattamento con MeHg è un fattore critico nell'indurre necrosi o apoptosi (11, 25). Concentrazioni relativamente alte di MeHg (5-10  $\mu$ M) inducono un calo significativo nell'attività mi-

tocondriale, una perdita del livello energetico dei mitocondri e lisi della membrana e necrosi cellulare. L'esposizione a dosi più basse (1  $\mu$ M) induce invece morte cellulare per apoptosi con un probabile coinvolgimento della caspasi 3 (16).

## Microtubuli

Un altro bersaglio cellulare del MeHg è rappresentato dal citoscheletro cellulare, in particolare i microtubuli. Infatti è noto che il MeHg ha una particolare affinità per i gruppi sulfidrilici delle tubuline (51) ed è in grado sia di depolimerizzare i microtubuli cerebrali *in vitro* (1) che di inibire direttamente l'assemblaggio degli stessi (40).

L'integrità della funzione dei microtubuli è un fattore critico dello sviluppo fisiologico del SN, che implica la proliferazione cellulare, la migrazione dei neuroni post-mitotici dallo strato corticale del cervello e cervelletto, l'estensione e la stabilizzazione dei neuriti e del trasporto asso-dendritico. L'interferenza del MeHg sui microtubuli sarebbe compatibile con i riscontri neuropatologici sui cervelli di bambini nati a termine, ma che erano stati esposti in utero durante le prime fasi della gravidanza, in occasione della catastrofe in Iraq negli anni '70 (14).

Il MeHg distrugge i microtubuli in numerosi modelli cellulari, compresi i fibroblasti umani (40), i linfociti splenici di ratto (39), neuroblastomi (36), cellule gliali (28, 36) e cellule embrionali tumorali (10). In seguito all'esposizione a MeHg (0,1-1  $\mu$ M) le colture primarie di neuroni cerebellari presentano frammentazione dei microtubuli e modificazioni della rete neuronale. Inoltre, questi effetti si evidenziano precocemente e precedono le manifestazioni dei segni apoptotici (11). L'accumulo di cellule in fase G2/M dovuta alla degradazione dei microtubuli è stato pure proposto come un evento importante nell'induzione dell'apoptosi mediata da MeHg nelle cellule neuronali (29). Alcuni esperimenti *in vitro* hanno dimostrato che i microtubuli immaturi nei neuroni in via di sviluppo risultano progressivamente più resistenti all'effetto del MeHg. Ciò indica che il periodo più critico della suscettibilità dei microtubuli è quello delle fasi precoci dello sviluppo (19).

## Stress ossidativo

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS), come l'anione superossido ed il radicale idrossilico, sono considerati come iniziatori del danno perossidativo. Il cervello è particolarmente sensibile al danno ossidativo e agli effetti dei radicali liberi (2, 26, 41, 43). La produzione di ROS dopo esposizione a MeHg sembra essere un evento cruciale nel determinare la progressione del danno e morte cellulare in diversi tipi cellulari, compresi i monociti umani (45), neuroni e cellule gliali di ratto (53).

Nei neuroni cerebellari di ratto, l'esposizione sia *in vitro* che *in vivo* a MeHg aumenta la produzione di ROS, a sua volta prevenuta dal trattamento con deferoxamina (2, 26).

Altri *scavengers* contro i radicali dell'ossigeno, come gli antiossidanti rappresentati dalla vitamina E, il glutatione (GSH), il selenio, la catalasi hanno mostrato una attività protettiva nei confronti degli effetti del MeHg sia *in vitro* che *in vivo* (16, 35, 54). In una linea neuronale ipotalamica di ratto (GT1-7), l'iperespressione di bcl-2 sembra proteggere il trattamento delle cellule con il MeHg inibendo la produzione di radicali liberi (41, 43).

La vulnerabilità selettiva dei neuroni al MeHg è stata correlata con l'assenza o la presenza limitata di sistemi propri protettivi come le metallothioneine, GSH, eme ossigenasi (42). In un recente studio, Ou et al (34) dimostrano che, sebbene lo stress ossidativo possa mediare alcuni aspetti della tossicità del MeHg, la sola riduzione dei livelli di GSH non giustifica la particolare sensibilità delle cellule embrionali del SNC al MeHg.

## Neurotrasmissione

Poiché la regolazione dello sviluppo del cervello è soggetta al controllo di recettori, neurotrasmettitori e della comunicazione tra cellule (30), non si può escludere che una alterazione nell'equilibrio nei processi di neurotrasmissione possa essere alla base dei deficit comportamentali osservati dopo esposizione in utero a MeHg.

## Sistemi glutammatergici

Numerosi dati sperimentali supportano l'implicazione dell'azione eccito-tossica mediata dal glutammato nella neurotossicità del MeHg. Il MeHg si accumula preferenzialmente negli astrociti dove induce un rigonfiamento cellulare e inibisce in modo specifico l'*uptake* degli aminoacidi eccitatori (5). In colture primarie di astrociti corticali di ratto, concentrazioni di MeHg dell'ordine  $10^{-3}$  M inibiscono in modo significativo l'*uptake* dell'L-glutammato e D-aspartato (4). Il conseguente aumento della concentrazione del glutammato nello spazio extracellulare può promuovere o accelerare il processo di neurodegenerazione eccitotossica (8). Questo aspetto è confermato dal fatto che utilizzando antagonisti non competitivi (MK-801) o competitivi (APV) del recettore per il glutammato N-Metil-D-Aspartato (NMDA) si osserva una inibizione degli effetti tossici del MeHg in colture di neuroni cerebrali (35).

## Sistemi muscarinici colinergici

I sistemi colinergici sono implicati nei processi di apprendimento e cognitivi. Uno studio recente (15) ha dimostrato che nei ratti l'ingestione cronica di MeHg (0,5 o 2 mg/kg/die per 16 giorni) aumenta la densità dei recettori colinergici nell'ippocampo e nel cervelletto, ma non nella corteccia cerebrale. Poiché questo effetto è evidente dopo due settimane dal termine dell'esposizione, è stato ipotizzato che la latenza nella risposta possa compensare gli effetti precoci come l'inibizione della sintesi dell'acetilcolina (ACh) nel cervello e la conseguente riduzione dei livelli cerebrali di ACh (23, 48).

## Sistemi dopaminergici

L'esposizione prenatale di ratti a MeHg attraverso il consumo materno di 0,5 mg/kg/die nell'acqua da bere ha indotto alterazioni nell'attività locomotoria dei maschi ma non delle femmine. Questo effetto, dopamina-mediato (38), è evidente dopo 21 giorni dalla nascita, periodo necessario per l'ontogenesi dei recettori della dopamina nel cervello di ratto. Va precisato che la concentrazione di mercurio

rio somministrata alle madri ha generato una concentrazione di MeHg nei cervelli di ratti neonati dell'ordine dei 50 ng/g di tessuto (38), confrontabile con i livelli individuati nei cervelli di bambini di popolazioni che consumano pesce (12).

## CONCLUSIONI

In conclusione, il processo di "valutazione del rischio" rappresenta uno degli obiettivi più stimolanti legati all'utilizzo dei sistemi *in vitro* per lo studio della neurotossicità. Quando utilizzati in modo opportuno, i modelli *in vitro* possono accelerare il processo di "identificazione del rischio" e possono migliorare la sensibilità della predizione neurotossica. Sebbene ancora ad uno stadio iniziale, l'utilizzo di batterie cellulari per la definizione della neurotossicità intrinseca rappresenta un potenziale mezzo per la definizione di composti chimici neurotossici e consente di saggiare gli effetti in un intervallo di dose continuo, anche per basse dosi di esposizione. Nel caso in cui sia possibile avere informazioni relative alla distribuzione della sostanza nei diversi compartimenti dell'organismo e delle concentrazioni della sostanza misurate *in vivo* nell'organo bersaglio, allora, osservando gli effetti *in vitro* alle dosi corrispondenti, sarà possibile formulare ipotesi sui meccanismi di azione della sostanza. Inoltre, lo studio *in vitro* delle relazioni dose-effetto e dose-risposta consente di confrontare i valori di EC50 ottenuti con quelli ricavati dai modelli animali.

Con le dovute cautele, connesse alla necessità di semplificare l'interpretazione dei fenomeni complessi, è quindi possibile impiegare utilmente i modelli *in vitro* per l'identificazione e la delucidazione di processi, come la neurotossicità, che pongono problemi peculiari nella valutazione e nella gestione del rischio chimico.

## BIBLIOGRAFIA

1. ABE T, HAGA T, KUROKAWA M: Blockage of axoplasmic transport and depolymerization of reassembled microtubules by methyl mercury. *Brain Res* 1975; 86: 504-508
2. ALI SF, LEBEL CP, BONDY SC: Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology* 1992; 13: 637-648
3. ANKARKRONA M, DYPBUKT JM, BONFOCO E, et al: Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 1995; 15: 961-973
4. ASCHNER M, DU Y-L, GANNON M, et al: Furosemide treatment reverses methylmercury-induced increases in excitatory amino acid efflux from rat primary astrocyte cultures. *Brain Res* 1993; 602: 181-186
5. ASCHNER M, YAO CP, ALLEN JW, et al: Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. *Neurochem Int* 2000; 37: 199-206
6. ATTERWILL CK, WALUM E: Neurotoxicology *in vitro*: model systems and practical applications. *Toxicol In Vitro* 1989; 3: 159-161
7. BORENFREUND E, PUERNER J: A. Short-term quantitative *in vitro* cytotoxicity assay involving an S-9 activating system. *Cancer Letters* 1987; 34: 243-248
8. BROOKES N: *In vitro* evidence for the role of glutamate in the CNS toxicity of mercury. *Toxicology* 1992; 76: 245-256
9. BULLEIT RF, CUI H: Methylmercury antagonizes the survival promoting activity of insulin-like growth factor on developing cerebellar granule neurons. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 153: 161-168
10. CADRIN M, WASTENEYS GO, JONES-VILLENEUVE EM, et al: Effects of methylmercury on retinoic acid-induced neuroectodermal derivatives of embryonal carcinoma cells. *Toxicol Cell Biol* 1988; 4: 61-80
11. CASTOLDI AF, BARNI S, TURIN I, et al: Early acute necrosis, delayed apoptosis and cytoskeletal breakdown in cultured cerebellar granule neurons exposed to methylmercury. *J Neurosci Res* 2000; 60: 775-787
12. CERNICHIARI E, BREWER R, MYERS GJ, et al: Monitoring methylmercury during pregnancy: maternal hair predicts fetal brain exposure. *Neurotoxicology* 1995; 16: 705-710
13. CHOI BH: The effects of methylmercury on the developing brain. *Prog Neurobiol* 1989; 32: 447-470
14. CHOI BH, LAPHAM LW, AMIN-ZAKI L, et al: Abnormal neuronal migration, deranged cerebral cortical organization and diffuse white matter astrocytosis of human fetal brain: a major effect of methylmercury exposure in utero. *J Neuropathol Exp Neurol* 1978; 37: 719-733
15. COCCINI T, RANDINE G, CANDURA SM, et al: Low-level exposure to methylmercury modifies muscarinic cholinergic receptor binding characteristics in rat brain and lymphocytes: physiologic implications and new op-

- portunities in biologic monitoring. *Env Health Perspect* 2000; *108*: 29-33
16. DARÉ E; GOETZ ME, ZHIVOTOVSKY B, et al: The antioxidants J811 and 17estradiol protect cerebellar granule cells from methylmercury induced apoptotic cell death. *J Neurosci Res* 2000 (in press)
  17. DAVIDSON PW; MYERS G, COX C, et al: Effects of prenatal and postnatal methylmercury exposure from fish consumption on neurodevelopment. Outcomes at 66 months of age in the Seychelles Child Developmental Study. *JAMA* 1998; *280*: 701-707
  18. EKWALL B: Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures. *Ann N Y Acad Sci* 1983; *407*: 64-77
  19. GRAFF RD, FALCONER MM, BROWN DL, et al: Altered sensitivity of posttranslationally modified microtubules to methylmercury in differentiating embryonal carcinoma-derived neurons. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; *144*: 215-224
  20. HARVEY AL: Possible developments in neurotoxicity testing *in vitro*. *Xenobiotica* 1988; *18*: 625-632
  21. HUNTER D, RUSSEL D: Focal cerebral and cerebellar atrophy in a human subject due to organic mercury compounds. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1954; *17*: 235-241
  22. IRUKAYAMA K, KAI F, FUJIKI M, et al: Studies on the origin and of the causative agent of Minamata disease. III. Industrial waste containing mercury compounds from Minamata factory. *Kunamoto Med J* 1962; *15*: 57-68
  23. KOBAYASHI H, YUYAMA A, MATSUSAKA N, et al: Effect of methylmercury on brain acetylcholine concentration and turnover in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980; *54*: 1-8
  24. KROEMER G, DALLAPORTA B, RESCHE-RIGON M: The mitochondrial death/life regulator in apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998; *60*: 619-642
  25. KUNIMOTO M: Methylmercury induces apoptosis of rat cerebellar neurons in primary culture. *Biochem Biophys Res Comm* 1994; *204*: 310-317
  26. LEBEL CP, ALI SF, BONDY SC: Deferoxamine inhibits methyl mercury-induced increases in reactive oxygen species formation in rat brain. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992; *112*: 161-165
  27. MAHAFFEY KR: Methylmercury exposure and neurotoxicity. *JAMA* 1998; *280*: 737-738
  28. MIURA K, INOKAWA M, IMURA N: Effects of methylmercury and some metal ions on microtubule networks in mouse glioma cells and *in vitro* tubulin polymerization. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984; *73*: 218-231
  29. MIURA K, KOIDE N, HIMENO S, et al: The involvement of microtubular disruption in methylmercury-induced apoptosis in neuronal and nonneuronal cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; *160*: 279-288
  30. MOTTET NK, VAHTER ME, CHARLESTON JS, FRIBERG LT: Metabolism of methylmercury in the brain and its toxicological significance. *Met Ions Biol Syst* 1997; *34*: 371-403
  31. NAGASHIMA K: A review of experimental methylmercury toxicity in rats: neuropathology and evidence for apoptosis. *Toxicol Pathol* 1997; *25*: 624-631
  32. NAGASHIMA K, FUJII Y, TSUKAMOTO T, et al: Apoptotic process of cerebellar degeneration in experimental methylmercury intoxication of rats. *Acta Neuropathol* 1996; *91*: 72-77
  33. NAKADA S, IMURA N: Susceptibility of lipids to mercurials. *J Appl Toxicol* 1983; *3*: 131-135
  34. OU YC, WHITE CC, KREJSA CM, et al: The role of intracellular glutathione in methylmercury-induced toxicity in embryonic neuronal cells. *Neurotoxicology* 1999; *20*: 793-804
  35. PARK ST, LIM KT, CHUNG YT, KIM SU: Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicology* 1996; *17*: 37-46
  36. PRASAD KN, NOBLES E, RAMANUJAM M: Differential sensitivity of glioma cells and neuroblastoma cells to methylmercury toxicity in cultures. *Environ Res* 1979; *19*: 189-201
  37. REITER LW: *Testimony before the subcommittee on toxic substances*. Environmental Oversight, Research and Development: Committee on Environment and Public Works; United States Senate, Oct 3, 1990
  38. ROSSI A, AHLBOM E, ÖGREN SO, et al: Prenatal exposure to methylmercury alters locomotor activity of male but not female rats. *Exp Brain Res* 1997; *117*: 428-436
  39. ROY C, PRASAD KVS, REUHL KR, et al: Taxol protects the microtubules of Concanavalin A-activated lymphocytes from disassembly by methylmercury, but DNA synthesis is still inhibited. *Exp Cell Res* 1991; *195*: 345-352
  40. SAGER PR, DOHERTY RA, OLMSTED JB: Interaction of methylmercury with microtubules in cultured cells and *in vitro*. *Exp Cell Res* 1983; *146*: 127-137
  41. SARAFIAN T, VERITY MA: Oxidative mechanisms underlying methyl mercury neurotoxicity. *Int J Devl Neuroscience* 1991; *9*: 147-153
  42. SARAFIAN TA, BREDESEN DE, VERITY MA: Cellular resistance to methylmercury. *Neurotoxicology* 1996; *17*: 27-36
  43. SARAFIAN TA, VARTAVARIAN L, KANE DJ, et al: bcl-2 expression decreases methyl mercury-induced free radical generation and cell killing in a neural cell line. *Toxicol Lett* 1994; *74*: 149-155

44. SCHWARTZ LM, SMITH SW, JONES MMEE, OSBORNE BA: Do all programmed cell death occur via apoptosis? *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 87: 1193-1197
45. SHENKER BJ, GUO TL, SHAPIRO IM: Induction of apoptosis in human T-cells by methyl mercury: temporal relationship between mitochondrial dysfunction and loss of reductive reserve. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 157: 23-35
46. TAKEUCHI T: Pathology of Minamata disease. With special reference to its pathogenesis. *Acta Pathol Jpn* 1982; 32: s73-s99
47. TSUJIMOTO Y: Apoptosis and necrosis: intracellular ATP levels as a determinant for cell death modes. *Cell Death Diff* 1997; 4: 429-434
48. TSUZUKI Y: Effects of chronic methylmercury exposure on activities of neurotransmitter enzymes in rat cerebellum. *Toxicol Appl Pharmacol* 1981; 60: 379-381
49. VERONESI B: The use of cell culture for evaluating neurotoxicity. In Tilson HA (ed): *Target Organ Toxicology series. Nervous System Toxicology*. New York: Raven Press, 1992: 21-49
50. VERONESI B: Characterization of the MDCK cell line for screening neurotoxicants. *Neurotoxicology* 1996; 17: 433-444
51. VOGEL DG, MARGOLIS RL, MOTTET NK: The effects of methyl mercury binding to microtubules. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985; 80: 473-486
52. WYLLIE AH: Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251
53. YEE S, CHOI BH: Oxidative stress in neurotoxic effects of methylmercury poisoning. *Neurotoxicology* 1996; 17: 17-26
54. YONAHARA M, SAITOH M, SAGAI M: Stimulation of lipid peroxidation by methyl mercury in rats. *Life Sci* 1983; 32: 1507-1514

## Seminari della Scuola di Specializzazione in Medicina del Lavoro ed Igiene Industriale

*Facoltà di Medicina e Chirurgia - via Valsabbina, 19, Brescia - Febbraio - Giugno 2003*

Giovedì 20 Febbraio 2003 - ore 14,30-17,30 *Evidence Based Medicine. Evidence Based Occupational Health* (Giuliano Franco)

Giovedì 20 marzo 2003 - ore 14,30-17,30 *Nuovi aspetti della patologia occupazionale stress-correlata* (Renato Gilioli)

Giovedì 10 aprile 2003 - ore 14,30-17,30 *Invecchiamento e lavoro* (Giovanni Costa)

Giovedì 22 maggio 2003 - ore 14,30-17,30 *D.Lgs 25/02. Monitoraggio ambientale e biologico: tra scienza e norma* (Antonio Colombi)

Giovedì 12 giugno 2003 - ore 14,30-17,30 *D.Lgs 25/02 Sorveglianza sanitaria: tra scienza e norma* (Giovanni Battista Bartolucci)

Per informazioni: Sig.ra Simona Galafassi - Scuola di Specializzazione in Medicina del Lavoro, tel. 030 3995896 Fax: 030 394902 - 030 3996080; e-mail: medlav@cci.unibs.it; sito web: [www.unibs.it/medlav](http://www.unibs.it/medlav)

# Studio degli effetti genotossici da esposizione a radiazioni cosmiche nel personale aeronavigante mediante tecniche citogenetiche e molecolari

S. IAVICOLI, A. MARINACCIO, B. PERNICONI, S. PALMI, D. CAVALLO

Dipartimento di Medicina del Lavoro, ISPESL-Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza sul Lavoro, Monteporzio Catone (Roma)

## KEY WORDS

Crew members; cosmic radiations; DNA damage; chromosomal aberrations; cytogenetics; Comet assay; cancer risk

## SUMMARY

**«Evaluation of genotoxic effects caused by cosmic radiation exposure in flight personnel using cytogenetic and molecular techniques».** **Background:** *The ever-increasing use of air travel suggests the need to study health risks in flight personnel, by means of correct exposure assessment and evaluation of genotoxic effects.* **Objectives:** *After taking into consideration occupational risk and possible confounding factors, we studied 48 pilots and flight technicians engaged on long-haul flights together with a control group of 48 ground staff, with the aim of evaluating genotoxic effects of cosmic radiation exposure. On 36/48 subjects we also evaluated the presence of DNA damage (single and double strand breaks).* **Methods:** *Traditional cytogenetics, the micronucleus test and FISH analysis, were used to study chromosome aberrations, micronuclei and translocations. The Comet test was used to analyze direct DNA damage (single and double strand breaks).* **Results:** *Our findings indicated a significant increase in gaps and breaks and a significant increase of frequency ratio for translocations in pilots compared to controls, but revealed a non-significant difference in unstable aberrations and micronuclei. The Comet test did not show any significant increase of DNA damage in flight personnel with respect to ground staff.* **Conclusions:** *The possibility of a correlation between translocations and cancer risk emphasizes the need to adopt preventive measures for air flight personnel.*

## RIASSUNTO

L'uso crescente dell'aereo come mezzo di trasporto suggerisce la necessità di studiare i possibili danni per la salute nel personale aeronavigante derivanti dall'esposizione ad una serie di fattori di rischio presenti nell'ambiente di volo. Tra questi di un certo rilievo sono le radiazioni ionizzanti cosmiche ed i conseguenti possibili danni al DNA. Dopo aver considerato i possibili fattori di confondimento abbiamo studiato la presenza di aberrazioni cromosomiche mediante tecniche di citogenetica tradizionale e analisi FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) e la presenza di micronuclei, in un gruppo di 48 piloti e tecnici di volo impegnati su rotte di lungo raggio da almeno 5 anni utilizzando come gruppo di controllo 48 soggetti appartenenti al personale di terra. Inoltre in 36 dei 48 soggetti è stato

---

Pervenuto il 24.5.2002 - Accettato il 10.7.2002

Corrispondenza: Dipartimento di Medicina del Lavoro, ISPESL-Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza sul Lavoro, Via Fontana Candida 1, 00040 Monteporzio Catone (Roma)

*effettuato anche il Comet test per la valutazione del danno diretto al DNA (singole e doppie rotture della catena polinucleotidica). I nostri risultati indicano un incremento significativo di gaps e rotture e un rapporto di frequenza significativamente aumentato di traslocazioni nel personale di volo rispetto ai controlli, mentre non è stata evidenziata una differenza significativa per quanto riguarda aberrazioni cromosomiche instabili (dicentrici, frammenti, anelli) e micronuclei. Anche il Comet test non ha evidenziato differenze significative per quanto riguarda il danno diretto al DNA. La possibilità di una relazione tra rischio di cancro e traslocazioni enfatizza la necessità di approfondire gli studi e di adottare misure preventive per il personale di volo.*

## INTRODUZIONE

L'aereo costituisce un mezzo di trasporto sempre più diffuso ed utilizzato. I rischi per la salute del personale aeronavigante e dei cosiddetti *frequent flyers* sono oggetto di attenzione e di studio anche in considerazione dell'evoluzione tecnologica che introdurrà nel futuro prossimo aerei che voleranno a quote più elevate. Alcuni autori in letteratura hanno prospettato un più elevato rischio di sviluppare cancro in equipaggi di volo (7).

In particolare sono indicati come possibili fattori di rischio l'esposizione ai gas di emissione degli aeromobili, a campi elettromagnetici generati dai sistemi di bordo, a ozono, a radiazioni cosmiche, ma anche la ridotta pressione atmosferica, la cattiva qualità dell'aria, e l'alterazione dei ritmi circadiani (stile di vita) (3, 13). Particolarmente importante, per l'insorgenza di cancro, è l'esposizione a radiazioni ionizzanti cosmiche. Il personale di volo è esposto a livelli di radiazioni di origine cosmica (che originano da fonti galattiche e solari e sono costituite da protoni, neutroni, particelle alfa e nuclei pesanti) significativamente più elevati che sulla terra. L'entità della dose assorbita dipende, comunque, dalla quota di volo, dal tempo di esposizione, dalla latitudine ( $\geq 45^\circ$  N) e dai cicli solari. Su rotte intercontinentali, ad altitudini superiori ai 10 km, è stata stimata un'esposizione cumulativa per l'aviazione civile di circa 3 mSv/anno con un range di 1-10 mSv/anno (1). A questa dose è stato stimato un rischio medio annuale di sviluppare tumori di circa 1 su 10000. La Commissione Internazionale per la Protezione Radiologica (ICRP) normalmente fissa come limite massimo per i lavoratori che operano nel settore produttivo un rischio di 1 su 1000, considerando senza pericolo per la salute un rischio di

1 su 100000, quindi un'esposizione occupazionale come è quella dell'ambiente di volo non può essere ignorata (5).

Le metodologie attualmente in uso per misurare l'esposizione a radiazioni cosmiche possono essere di tipo fisico e di tipo biologico. I metodi di misura fisica si basano sull'uso di dosimetri termoluminescenti, dosimetri a bolle per neutroni e sistemi di rivelazione e di dosimetria della componente non neutronica (camera a ionizzazione Reuter Stokes). La dosimetria biologica si avvale di studi di tipo citogenetico, biochimico ed epidemiologico per effettuare una corretta valutazione del rischio. Gli studi citogenetici disponibili in letteratura sono in numero limitato e indagano prevalentemente aberrazioni cromosomiche instabili in personale di volo e astronauti (15). Inoltre nella maggior parte dei casi la caratterizzazione delle ore volate e/o della dose assorbita di radiazioni cosmiche non è stimabile.

I risultati disponibili in letteratura non sono univoci. Zwingmann et al (1998) e Wolf et al (2000) non hanno evidenziato una maggior incidenza di aberrazioni cromosomiche instabili in *aircrew* (21, 22). D'altra parte gli studi su personale di volo pubblicati da Scheid et al (1993), Heimers et al (1995) e Romano et al (1997) supportano un eccesso di aberrazioni instabili (10, 17, 18).

In tale contesto per una corretta valutazione del rischio da esposizione a radiazioni cosmiche in personale di volo è necessario una corretta caratterizzazione dell'esposizione e l'esecuzione di analisi citogenetiche e molecolari mirate alla valutazione dei possibili danni genetici indotti da esposizioni croniche e a basse dosi con lo scopo di individuare una possibile relazione dose-risposta.

In questo contesto l'obiettivo del presente studio è stato quello di studiare la presenza di aberrazioni

cromosomiche instabili e stabili attraverso un protocollo che includesse tecniche di citogenetica tradizionale, e *Fluorescent in Situ Hybridization* (FISH). Inoltre è stato utilizzato anche il test del micronucleo e il test della cometa per evidenziare danni al DNA (rotture singole e doppie della catena), in personale di volo impegnato in rotte di lungo raggio da almeno 5 anni confrontandolo con un gruppo di controllo omogeneo composto da personale di terra.

## METODI

Lo studio comprende un gruppo di 48 piloti e tecnici di volo, con almeno 18 anni di volo, cinque anni di rotte intercontinentali, e 7000 ore volate e come gruppo di controllo 48 uomini appartenenti al personale di terra della stessa compagnia.

Attraverso un questionario distribuito da personale medico specializzato sono state ottenute informazioni sui possibili confondenti: età, abitudini di vita quali il bere, il fumare, l'assunzione abituale di farmaci e l'eventuale esposizione a radiazioni dovute a terapie o a test diagnostici.

Nei 48 soggetti in studio e nei controlli è stato effettuato un prelievo di sangue periferico ed effettuati, su linfociti coltivati *in vitro*, test di citogenetica tradizionale per la valutazione delle aberrazioni cromosomiche, test di citogenetica molecolare (FISH) per la valutazione delle traslocazioni cromosomiche ed il test del micronucleo per la valutazione della presenza di micronuclei. I test di citogenetica tradizionale e molecolare (FISH) sono stati eseguiti su linfociti coltivati *in vitro* per 48 ore, bloccati in metafase mediante trattamento con colcemide (0,2 µg/ml) a 37°C per 2 h, quindi trattati con ipotonica KCl 0,075 M e fissati con metanolo/acido acetico 3:1. Le aberrazioni cromosomiche (AC) sono state valutate su 200 metafasi (colorazione Giemsa 5% in tampone fosfato per 15 minuti), per individuo evidenziando la presenza di cromosomi dicentrici, anelli, frammenti acentrici, *gaps*, rotture. Il test del micronucleo è stato eseguito su linfociti coltivati *in vitro* per 72 ore complessive con aggiunta di citocalasina B (6 µg/ml) alla 44<sup>ma</sup> ora di incubazione, per l'ottenimento di cellule binuclea-

te. Le cellule sono state quindi fissate con metanolo/acido acetico 3:1 e colorate con Giemsa 5% in tampone fosfato per 5 minuti. I micronuclei presenti in 1000 cellule binucleate per vetrino sono stati contati e per l'identificazione dei micronuclei sono stati applicati i criteri di Fenech e Morley (6). Per l'analisi FISH sono state utilizzate sonde cromosomiche fluorescenti che marcavano selettivamente i tre cromosomi 1, 2, 4. Nell'analisi tutte le traslocazioni (reciproche e non-reciproche) coinvolte nei tre cromosomi marcati (corrispondenti a circa il 34% del genoma totale) sono state registrate ed espresse come traslocazioni totali in 100 genomi equivalenti corrispondenti a 300 metafasi ibridizzate per soggetto (20). In 36 dei 48 soggetti in studio è stato effettuato anche il Comet test per la valutazione del danno diretto al DNA in termini di rotture singole e doppie della catena polinucleotidica. Per tale test (19) sono state esaminate in ogni caso 100 cellule che sono state classificate in base alla forma e lunghezza della coda in 5 tipi di cometa in accordo alla classificazione di Miyamae et al 1998 (12): tipo 1 (nessuna migrazione), tipi da 2 a 4 (diversi gradi di limitata migrazione), tipi 5a-5b (estesa migrazione). La valutazione del grado di danno al DNA è stata fatta per ciascun campione identificando tre categorie: 1) non danno 2) limitato danno e 3) alto danno sulla base della percentuale di comete appartenenti ai 5 diversi tipi individuate nell'analisi secondo i criteri di Baltaci et al 1998 (2). In particolare un campione veniva definito con non danno quando più del 90% delle comete era di tipo 1 (non mostrava migrazione), con limitato danno quando la percentuale totale di comete con limitata (tipi 2-4) ed estesa migrazione (tipi 5a-5b) superava il 10% ma le comete ad estesa migrazione restava comunque al di sotto del 20%, con alto danno quando la percentuale di comete ad estesa migrazione superava da sola il 20%.

E' stata svolta un'analisi multivariata, tramite la regressione logistica, per stimare i rischi di aberrazioni cromosomiche e di danno al DNA per il personale di volo controllando l'effetto dei confondenti età, farmaci ed abitudini al fumo. Nella regressione logistica le abitudini al fumo sono codificate dicotomicamente e i farmaci assunti abitualmente sono classificati come protettivi (multivitamine comples-

se C, A ed E; integratori alimentari antiossidanti come Q10, germe di grano, oligominerali come il selenio; melatonina), altri farmaci, o nessun farmaco. Nessun soggetto faceva uso di antibiotici o chemioterapici. Il consumo di alcool, pure se considerato nel questionario, è stato omesso dall'analisi perché non significativo, così come l'esposizione a radiazioni ionizzanti dovute a terapie e test diagnostici che erano per entrambi i gruppi non significative.

I soggetti sono stati codificati secondo l'età in tre classi (fino a 50 anni, da 51 a 55, più di 55 anni).

La variabile "ore volate" del personale di volo è stata caratterizzata in quattro classi secondo i quartili della distribuzione (meno di 11.350 ore volate; tra 11.350 e 15.000; tra 15.000 e 17.000; maggiore di 17.000). La relazione fra ore volate e alterazioni è stata stimata attraverso la regressione logistica nella quale la categoria di contrasto semplice è quella dei controlli (personale di terra).

## RISULTATI

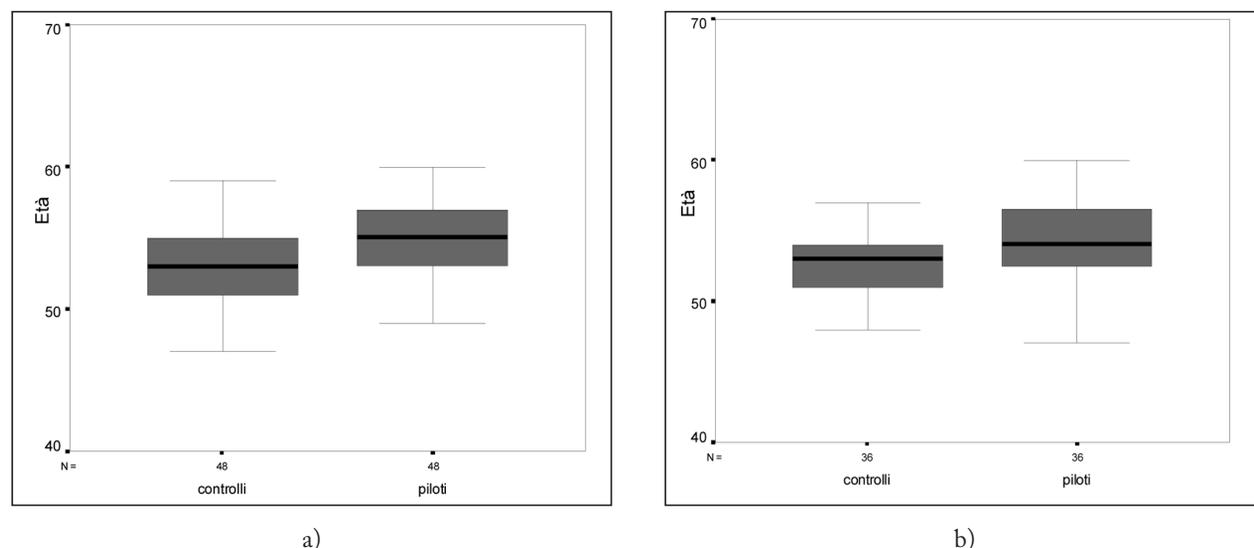
Nel gruppo dei soggetti studiati per le aberrazioni cromosomiche (48 piloti-tecnici di volo e 48 controlli) l'età media dei piloti è risultata di 54,4 anni (d.s.=3,5), quella dei controlli 52,6 anni (d.s.=3,5). La differenza fra la media nei due gruppi

è significativa ( $p=0,014$ ) (figura 1a). Per il sottogruppo dei 72 soggetti (36 piloti-tecnici di volo e 36 controlli) studiati per il danno al DNA mediante Comet test l'età media del personale di volo è risultata di 53,9 anni (d.s.=3,5), quella dei controlli 52,3 anni (d.s.=3,7). La differenza fra la media nei due gruppi non è significativa ( $p=0,07$ ) (figura 1b).

Relativamente all'insieme dei 96 soggetti è stata riscontrata una differenza non significativa fra personale di volo e controlli rispetto all'uso abituale di farmaci mentre il gruppo del personale aeronavigante presenta una quota di fumatori (6/48=12,5%) decisamente più bassa rispetto al gruppo dei controlli (15/48=31,2%). La distribuzione delle frequenze nelle categorie di fumatore, ex fumatore e non fumatore si discosta significativamente da quella attesa ( $p$  value  $\chi^2=0,014$ ). Per i 72 soggetti studiati rispetto al danno al DNA la distribuzione rispetto alle abitudini al fumo risulta anche in questo caso significativamente diversa dall'atteso ( $p$  value  $\chi^2=0,029$ ).

La distribuzione completa dei confondenti per tutti i soggetti studiati è riportata nella tabella 1.

I risultati ottenuti in termini di frequenza di aberrazioni cromosomiche valutate mediante citogenetica tradizionale e FISH, frequenza di micronuclei e presenza di danno diretto al DNA valutato mediante Comet test sono mostrati in tabella 2.



**Figura 1** - a) Età nel personale di volo e nei controlli (gruppo studiato per le aberrazioni cromosomiche; n=96); b) età nel personale di volo e nei controlli (gruppo studiato per il danno al DNA mediante Comet test; n=72)

**Tabella 1** - Distribuzione dei confondenti nel personale aeronavigante e nel gruppo di controllo

	Soggetti studiati per le aberrazioni cromosomiche (n=48)		Soggetti studiati per Comet test (n=36)	
	Personale di volo	Gruppo di controllo	Personale di volo	Gruppo di controllo
Fumo				
Fumatori				
≤5 sigarette al giorno	3	4	3	4
6-14 sigarette al giorno	1	2	1	2
≥15 sigarette al giorno	2	9	2	7
Non fumatori	22	10	17	7
Ex fumatori	20	23	13	16
Consumo di alcolici				
>0,5 lt al giorno	6	5	2	3
≤ 0,5 lt al giorno	42	43	34	33
Farmaci abituali				
Nessun farmaco	32	31	25	23
Farmaci protettivi (vitamine, antiossidanti, melatonina)	4	2	4	2
Altri farmaci	12	15	7	11
Età				
≤50	5	9	5	8
51-54	23	32	19	24
>55	20	7	12	4
Totale	48	48	36	36

**Tabella 2** - Frequenze assolute ed in percentuale (sul totale delle cellule analizzate) delle aberrazioni cromosomiche, media dei micronuclei/1000 cellule e presenza di danno al DNA (valutato mediante Comet test) osservati nel personale di volo e nei controlli

	Personale di volo (N=48)		Controlli (N=48)	
	N.	%	N.	%
<i>Aberrazioni cromosomiche</i>				
N. metafasi analizzate	9600		9600	
Dicentrici	7	0,072	3	0,031
Anelli	5	0,052	1	0,010
Frammenti acentrici	36	0,375	18	0,187
Totale aberrazioni instabili	48	0,500	22	0,229
<i>Gaps</i>	98	1,020	24	0,250
Rotture	62	0,645	19	0,197
Totale <i>gaps</i> e rotture	160	1,666	43	0,447
<i>Traslocazioni (FISH)</i>				
N. genoma equivalenti	4800		4800	
Traslocazioni (crom 1, 2, 4)	32	0,666	8	0,166
<i>Micronuclei</i> (N. micronuclei/1000 cellule binucleate) media ± DS	7,95±6,4	5,37±3,9		
	Personale di volo (N=36)		Controlli (N=36)	
<i>Comet test</i>				
(n. casi con alto danno al DNA)		3/36		4/36
(n. casi con limitato danno al DNA)		18/36		13/36
(n. casi con assenza di danno al DNA)		15/36		19/36

Il rapporto di frequenza di traslocazioni valutate mediante FISH, aggiustato per i confondenti (fumo, uso abituale di farmaci, età) è altamente significativo nel personale di volo rispetto ai controlli ( $p=0,009$ ), così come il rischio di *gaps* e rotture ( $p=0,001$ ). Considerando separatamente il rapporto di frequenza dei soggetti con *gaps* e dei soggetti con rotture gli *Odds Ratio* aggiustati si mantengono ben al di sotto della significatività statistica ( $p=0,002$  e  $p=0,003$  rispettivamente). La differenza non raggiunge la significatività statistica invece per quanto riguarda le aberrazioni cromosomiche di tipo instabile (dicentrici, frammenti e anelli) ( $p=0,2$ ) ed i micronuclei ( $p=0,05$ ) probabilmente anche a causa delle ridotte dimensioni del campione. L'ana-

lisi del danno al DNA valutato mediante comet test ha evidenziato un leggero incremento di rapporto di frequenza, che comunque non raggiunge la significatività statistica, nel personale di volo rispetto ai controlli ( $p=0,58$ ), ed un certo ruolo protettivo dell'assunzione di antiossidanti con la dieta (tabella 3).

L'analisi dose-risposta del rischio di traslocazioni nel personale di volo ha mostrato un *pattern* di linearità nelle prime tre categorie di ore volate mentre il rischio non era significativamente più alto dell'unità nella quarta categoria (figura 2); mentre nell'analisi rischio di danno al DNA valutato mediante Comet test e ore volate sembra non esserci relazione stabile (figura 3).

**Tabella 3** - Odds Ratio aggiustati per i confondenti, nel personale di volo dalla regressione logistica

Alterazioni genetiche	Numerosità campionaria	Odds Ratio aggiustati	Intervallo di Confidenza 95%		Valore di p
			Limite inferiore	Limite superiore	
Danno diretto al DNA (Comet test)	Personale di volo=36 Gruppo di controllo=36	1,4	0,5	4,0	0,58
Dicentrici	Personale di volo=48 Gruppo di controllo=48	2,6	0,4	16,1	0,30
Frammenti	Personale di volo=48 Gruppo di controllo=48	1,7	0,6	4,9	0,29
Anelli	Personale di volo=48 Gruppo di controllo=48	5,1	0,5	50,9	0,16
Dicentrici, frammenti, anelli	Personale di volo=48 Gruppo di controllo=48	1,9	0,7	5,0	0,2
<i>Gaps</i>	Personale di volo=48 Gruppo di controllo=48	4,9	1,8	13,3	0,002
Rotture	Personale di volo=48 Gruppo di controllo=48	4,6	1,7	11,8	0,003
<i>Gaps</i> e Rotture	Personale di volo=48 Gruppo di controllo=48	7,8	2,4	24,9	0,001
Traslocazioni (FISH)	Personale di volo=48 Gruppo di controllo=48	5,1	1,5	17,3	0,009
Micronuclei	Personale di volo=48 Gruppo di controllo=48	9,9	0,9	99,7	0,05

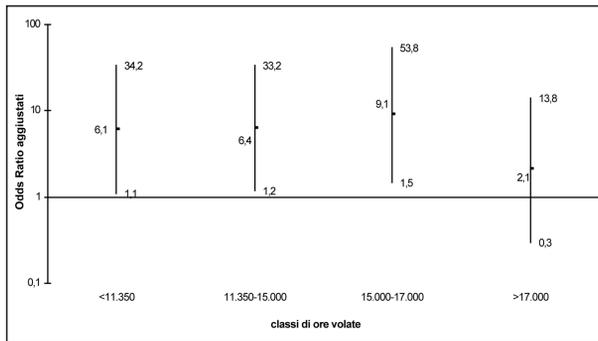


Figura 2 - Traslocazioni (valutate con metodica FISH) nel personale aeronavigante. *Odds Ratio* aggiustati e intervallo di confidenza (95%) relativamente alle ore volate

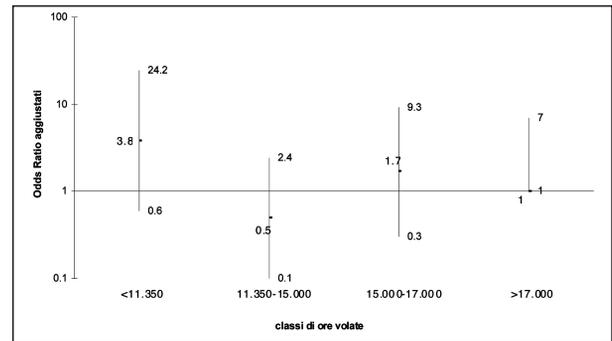


Figura 3 - Danno al DNA (valutato mediante Comet test) nel personale aeronavigante. *Odds Ratio* aggiustati e intervallo di confidenza (95%) relativamente alle ore volate

## DISCUSSIONE

L'analisi dei risultati corretta per i fattori di confondimento considerati mostra un eccesso significativo di *gaps* e rotture e di traslocazioni nei piloti rispetto ai controlli, mentre non vi sono differenze statisticamente significative per dicentrici, frammenti, anelli e per il test del micronucleo. Anche per quanto riguarda il test della cometa non c'è un incremento significativo del danno al DNA rispetto al gruppo di controllo.

L'assenza di modificazioni citogenetiche tradizionalmente associate ad esposizioni elevate e concentrate nel tempo, quali dicentrici ed anelli, come anche un non significativo aumento di positività per il test del micronucleo, e la presenza invece di un aumento statisticamente significativo di rotture e *gaps* (considerate sia insieme che separatamente) è correlabile al tipo di esposizione della popolazione studiata. Infatti rotture e *gaps* sono prodotte da singole rotture della catena cromatidica di DNA mentre i dicentrici e gli anelli richiedono due rotture indipendenti nella stessa cellula, quindi le prime si verificano più facilmente con basse ma protratte dosi di radiazioni. L'aumento di *gaps* e rotture è stato descritto in altri studi per esposizioni a radiazioni ionizzanti a basse dosi (8, 11).

Inoltre le cellule con aberrazioni cromosomiche instabili o con micronuclei tendono ad essere eliminate man mano che trascorre il tempo dalla esposizione, quindi non rappresentano un buon indicatore di esposizione nel caso di esposizioni croniche e a

basse dosi (4, 16). Il risultato più significativo dei nostri dati riguarda l'incremento di rischio di modificazioni citogenetiche stabili (traslocazioni) evidenziate dalla FISH nel personale di volo rispetto al gruppo di controllo che sembra correlato con la dose, almeno per quanto riguarda le prime tre classi di ore volate. Tale dato è estremamente significativo anche in considerazione dello scarso numero di studi (9) che analizzano traslocazioni in esposti a radiazioni cosmiche e del fatto che questo tipo di alterazioni essendo stabili possono essere trasmesse durante la divisione cellulare alle generazioni successive e si accumulano nel tempo con l'esposizione cronica, rappresentando un bioindicatore cumulativo di esposizione. L'importanza di questa osservazione sta nel fatto che molti autori in letteratura hanno trovato un'associazione tra un incremento di traslocazioni stabili e il rischio di cancro (14).

I risultati osservati nel presente studio ci inducono a considerare che probabilmente le dosi di radiazioni ionizzanti cosmiche a cui è sottoposto il personale di volo pari mediamente a 2-3 mSv annui, non sono da sole sufficienti a spiegare l'entità delle modificazioni citogenetiche osservate. Le esposizioni caratterizzate da tali dosi di radiazioni ionizzanti, pur non essendo disponibili modelli di dose risposta sufficientemente sviluppati per le traslocazioni sono tali da far considerare come concause altri fattori di rischio connessi con l'attività di volo quali l'ozono, gli idrocarburi aromatici provenienti dai prodotti di combustione dei carburanti, i campi elettromagnetici e lo stile di vita.

Sembrirebbe pertanto opportuno parlare di rischio connesso all'attività di volo piuttosto che alle sole radiazioni cosmiche anche in considerazione dell'assenza di effetti specifici attribuibili alle radiazioni ionizzanti a fronte di una corretta analisi dei fattori di confondimento e dell'età.

In conclusione i risultati confermano che per esposizioni croniche o dilazionate nel tempo, come è il caso del personale aeronavigante che ha ricevuto esposizioni a radiazioni ionizzanti a basse dosi (radiazioni cosmiche) protratte per diversi anni, l'individuazione di aberrazioni cromosomiche stabili ed in primo luogo le traslocazioni simmetriche mediante FISH rappresenta il metodo di scelta. La presenza di rischi di modificazioni citogenetiche di tipo stabile in personale di volo inducono a sviluppare ulteriori ricerche utilizzando tecniche citogenetiche mirate in associazione ad una sempre più attenta caratterizzazione dei rischi connessi all'attività di volo al fine di poter avere ulteriori informazioni sul presunto maggior rischio di sviluppare tumori e di dare utili indicazioni di carattere preventivo.

## BIBLIOGRAFIA

1. BAGSHAW M, IRVINE D, DAVIES DM: Exposure to cosmic radiation of British Airways flying crew on ultra-long-haul routes. *Occup Environ Med* 1996; 53: 495-498
2. BALTACI V, AYGUN N, AKYOL D, et al: Chromosomal aberrations and alkaline comet assay in families with habitual abortion. *Mutat Res* 1998; 417: 47-55
3. BAND PR, SPINELLI JJ, NG VT, et al: Mortality and cancer incidence in a cohort of commercial airline pilots. *Aviat Space Environ Med* 1990; 61: 299-302
4. BUCKTON KE, JACOBS PA, COURT BROWN WM, DEAL R: A study of the chromosome damage persisting after x-ray therapy for ankylosing spondylitis. *Lancet* 1962; *ii*: 676
5. CLARKE RH: Do the risks justify action? *Health Physics* 2000; 79: 610-613
6. FENECH M, MORLEY AA: Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 1985; 147: 29-36
7. GUNDERSTRUPP M, STORM HH: Radiation-induced acute myeloid leukaemia and other cancers in commercial jet cockpit crew: a population-based cohort study. *Lancet* 1999; 354: 2029-2031
8. HAGELSRUM AH, GORLA NB, LARRIPA IB: Chromosomal damage in workers occupationally exposed to chronic low level ionizing radiation. *Toxicol Lett* 1995; 76: 113-117
9. HEIMERS IA: Chromosome aberration analysis in Concorde pilots. *Mutat Res* 2000; 467: 169-176
10. HEIMERS A, SCHRODER H, LENGFELDER E, et al: Chromosome aberration analysis in aircrew members. *Radiat Prot Dosim* 1995; 60: 171-175
11. KUMAGAI E, TANAKA R, KUMAGAI T, et al: Effects of long-term radiation exposure on chromosomal aberrations in radiological technologists. *J Radiat Res* 1990; 31: 270-279
12. MIYAMAE Y, YAMAMOTO M, SASAKI YF, et al: Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the *in vivo* single cell gel electrophoresis (Comet) assay: a collaborative study by five laboratories. *Mutat Res* 1998; 418: 131-140
13. NICHOLAS JS, LACKLAND DT, DOSEMEDI M, et al: Mortality among US commercial pilots and navigators. *JOEM* 1998; 40: 980-985
14. NORDENSON I, BECKMAN L, LIDEN S, STJERNBERG N: Chromosomal aberrations and cancer risk. *Human Hered* 1984; 34: 76-81
15. OBE G, JOHANNES I, JOHANNES C, et al: Chromosomal aberrations in blood lymphocytes of astronauts after long-term space flights. *Int J Radiat Biol* 1997; 72: 727-734
16. PROSSER JS, MOQUET JE, LLOYD DC, EDWARDS AA: Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes. *Mutat Res* 1988; 199: 37-45
17. ROMANO E, FERRACI L, NICOLAI F, et al: Increase of chromosomal aberrations induced by ionising radiation in peripheral blood lymphocytes of civil aviation pilots and crew members. *Mutat Res* 1997; 377: 89-93
18. SCHEID W, WEBER J, TRAUT H, et al: Chromosome aberrations induced in the lymphocytes of pilots and stewardesses. *Naturwissenschaften* 1993; 80: 528-530
19. SINGH NP, MCCOY MT, TICE RR, SCHNEIDER EL: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175: 184-191
20. TUCKER JD, LEE DA, RAMSEY MJ, et al: On the frequency of chromosome exchanges in a control population measured by chromosome painting. *Mutat Res* 1994; 313: 193-202
21. WOLF G, PIEPER R, OBE G: Chromosomal alterations in peripheral lymphocytes of female cabin attendants. *Int J Radiat Biol* 1999; 75: 829-836
22. ZWINGMANN IH, WELLE IJ, VAN HERWIJNEN M, et al: Oxidative DNA damage and cytogenetic effects in flight engineers exposed to cosmic radiation. *Environ Mol Mut* 1998; 32: 121-129

# Studio del rilascio *in vitro* di radicali ossidrilici (HO·) da parte di polveri contenenti fibre di fluoro-edenite identificate nella roccia lavica di Biancavilla (Sicilia orientale)

V. RAPISARDA, MONICA AMATI, SABRINA COLOCCINI, LUCIA BOLOGNINI, L. GOBBI\*, DOMENICA DUSCIO\*\*

Clinica di Medicina del Lavoro, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Ancona

\* Dipartimento di Fisica e Ingegneria dei Materiali e del Territorio, Facoltà di Ingegneria Università di Ancona

\*\* Clinica di Medicina del Lavoro, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Catania

## KEY WORDS

Asbestos exposure; fluoro-edenite fibers; hydroxyl radicals production; mesothelioma

## SUMMARY

«*In vitro hydroxyl radical (HO·) generation from dust containing fluoro-edenite in volcanic rock in Biancavilla (Eastern Sicily)*». **Background:** *Epidemiological studies revealed an unusually high incidence of malignant pleural mesothelioma in Biancavilla, a town in eastern Sicily located in a volcanic area. In the absence of occupational risk factors connected with asbestos inhalation, a nearby stone quarry, which has long been providing most of the local building materials (e.g. plaster), was suspected to be the source of mineral fibres. These fibres had never been studied before and were identified as fluoro-edenite. Objective:* *To investigate the ability of the fluoro-edenite fibres present in mineral dusts and house plaster to release hydroxyl radicals in vitro. Methods:* *After fibre characterisation and the determination of particulate specific surface, the ability of quarry rock dust and house plaster dust to generate hydroxyl radicals was measured in vitro using the deoxyribose degradation assay. Treatment with 1,3-dimethyl-2-thiourea (DMTU), a hydroxyl radical scavenger, or deferoxamine (DFX), an iron chelator, was performed to confirm hydroxyl radical production and study the role of iron. Crocidolite (UICC) was used as positive control. Results:* *The rocks were found to contain fibrous amphiboles, identified as fluoro-edenite, which are chemically similar to tremolite. All samples generated hydroxyl radicals, with rocks yielding consistently higher values than plaster. Treatment of the dusts with DMTU or DFX significantly reduced hydroxyl radical production by both samples. The type of biological reactivity observed with these fluoro-edenite fibres resembled that of asbestos fibres. Conclusions:* *The hydroxyl radicals generated by asbestos fibres have long been known to mediate inflammatory fibrosis of the lung and DNA damage that may ultimately result in lung carcinoma and mesothelioma.*

## RIASSUNTO

*Studi epidemiologici hanno individuato un elevato numero di casi di mesoteliomi in un comune della Sicilia orientale, Biancavilla. L'assenza di lavorazioni a rischio di esposizione ad amianto ha permesso di stabilire che l'esposi-*

Pervenuto il 15.3.2002 - Accettato il 10.7.2002

Corrispondenza: Dott. Rapisarda Venerando, Clinica di Medicina del Lavoro, Università degli Studi di Ancona, Polo didattico-scientifico Aragosta, via Tronto 10/a, 60020 Torrette di Ancona (AN)

Tel. 071-5964302 - Fax 071-2206062 - e-mail: nandorapisarda@libero.it

zione era dovuta a fibre minerali provenienti da una cava di pietra utilizzata per l'edilizia locale. La fibra identificata è stata classificata come fluoro-edenite, chimicamente simile alla tremolite. È noto da tempo che, attraverso la formazione di radicali ossidrilici (HO<sup>•</sup>), l'amianto esplica la sua tossicità polmonare determinando fibrosi, carcinomi polmonari e mesoteliomi. Abbiamo studiato la capacità di generare radicali ossidrilici da parte di campioni di polvere prelevati dalla cava e dall'intonaco di un'abitazione, mediante il saggio della degradazione del desossiribosio. Come controllo positivo abbiamo usato un campione di crocidolite (UICC). Nei nostri esperimenti *in vitro* la produzione di radicali ossidrilici è avvenuta con entrambi i campioni; il risultato ottenuto con la cava è il più elevato mentre con l'intonaco è il più basso. Aggiungendo alla miscela reattiva la 1,3-dimetil-2-tiourea (DMTU), uno scavenger dei radicali ossidrilici, o la deferoxamina (DFX), un chelante del ferro, si osserva una significativa riduzione della produzione di radicali ossidrilici. Dai nostri risultati sembra che i campioni contenenti fibre di fluoro-edenite siano dotati di reattività biologica così come l'asbesto.

## INTRODUZIONE

Uno studio epidemiologico condotto nel quinquennio 1988-92 sulla mortalità per mesotelioma maligno in Italia, ha permesso di individuare un elevato numero di casi in un comune della Sicilia orientale, Biancavilla (6). In questo comune, sito alle pendici sud-ovest del vulcano Etna, non vi erano lavorazioni artigianali e/o industriali a rischio di esposizione ad amianto (21, 23); inoltre i soggetti deceduti erano nel 31% dei casi al disotto dei 45 anni di età e tutti, tranne 2, avevano svolto attività lavorative senza rischio di esposizione ad amianto (23).

Un'indagine ambientale, effettuata in luoghi pubblici e nelle strade del comune, ha permesso di stabilire che l'esposizione della popolazione era dovuta a fibre minerali provenienti da una cava di pietra presente in una collina, denominata Monte Calvario, posta nella parte nord-est di Biancavilla, a ridosso del paese (12, 23). La cava è stata utilizzata dal 1950 al 1998, anno della sua chiusura, per l'estrazione di sabbia e pietrisco utilizzati per l'edilizia locale; da ciò il riscontro delle fibre negli intonaci delle abitazioni (23).

La fibra identificata inizialmente come anfibolo fibroso di fase intermedia tremolite/actinolite (23), è stata classificata da Gianfagna e Oberti (2001), come fluoro-edenite e registrata alla Commissione per i Nuovi Minerali e i Nomi dei Minerali (CNMMN) dell'Associazione Mineralogica Internazionale (codice 2000-049). Essa è chimicamente simile alla tremolite ma si differenzia per la sostitu-

zione del gruppo ossidrilico (OH<sup>•</sup>) con il fluoro (F) (13).

Questa fibra, per lo più conosciuta in forma sintetica (2, 7, 22, 25), era stata già ritrovata nella lava del vulcano Kimpo nel sud-ovest del Giappone (20).

Abbiamo ritenuto interessante verificare se campioni di polvere prelevati dalla cava o dall'intonaco di un'abitazione siano in grado, *in vitro*, di generare radicali ossidrilici (HO<sup>•</sup>); abbiamo usato quale controllo positivo un campione di crocidolite.

## METODI

### Sostanze chimiche

Tutte le sostanze chimiche sono state ottenute dalla Sigma Chemical Company (St. Louis, MO).

### Campioni di minerali

Le polveri, fornite dal Dr. P. Ventura (geologo del Comune di Biancavilla), sono state raccolte direttamente dalla roccia del vecchio fronte di scavo della cava dove erano presenti le fibre e dall'intonaco di un'abitazione del Comune di Biancavilla. Abbiamo analizzato per morfologia e composizione i campioni della cava e dell'intonaco mediante un microscopio elettronico a scansione (SEM) Philips XL20 con spettrometro EDAX (*energy dispersive spectrometry x-ray analysis*). Le immagini ottenute al SEM con relativa analisi chimica elementare semiquantitativa sono mostrate nelle figure 1 (a, b) e

2 (a, b). In entrambi i campioni ci sono fibre con le caratteristiche cristallografiche simili a quelle segnalate da Gianfagna e Oberti (2001). Queste fibre sono mescolate con numerosi altri minerali, con abito non fibroso, quali ematite, quarzo, fluorapatite, ilmenite, pirosseni, feldspati, plagioclasti. Le fibre sono nettamente più numerose nel campione di polvere di cava, dove, rispetto a quelle del campione di intonaco, sono di maggiore diametro e quasi sempre più lunghe.

La crocidolite è stata fornita dall'*Union Internationale Contre le Cancer* (UICC), Ginevra.

### Determinazione della superficie specifica dei particolati minerali

La superficie specifica dei particolati minerali è stata determinata con la tecnica dell'adsorbimento dell'azoto (4).

I due campioni di polvere e la crocidolite sono stati degassati a 90°C per 16 ore e analizzati con un Sorpty 1750 (Fison Instruments, Milano); lo spazio libero è stato calcolato con l'elio. Il risultato della determinazione delle superfici specifiche è mostrato nella tabella 1.

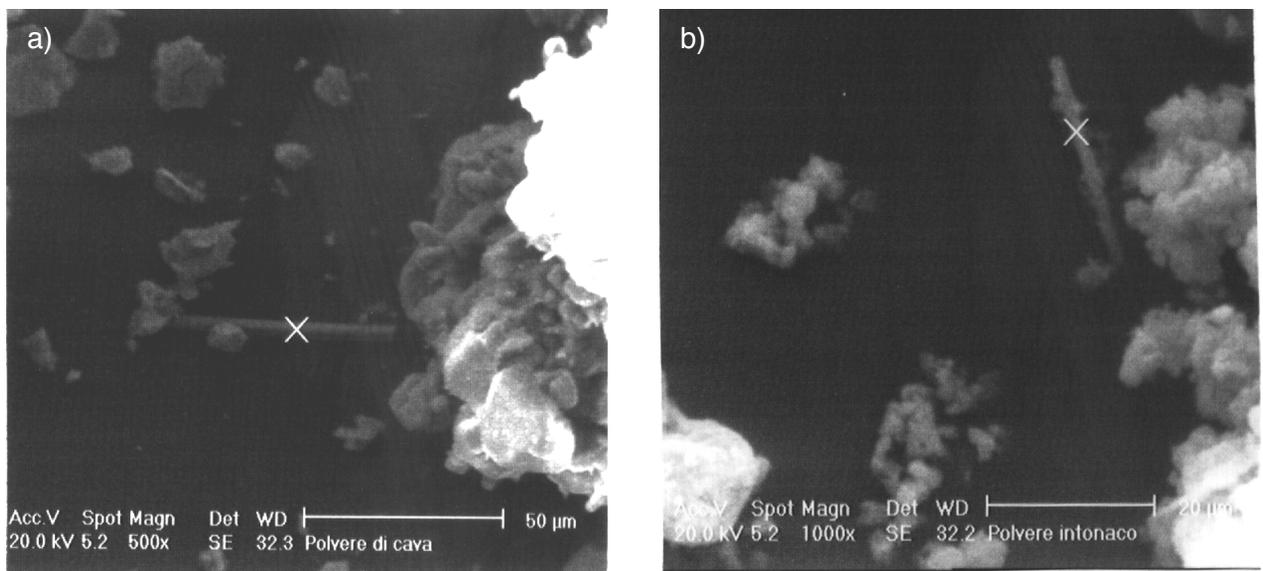


Figura 1 - Microfotografia al SEM della fibra di fluoro-edenite nel campione di cava (a) e di intonaco (b). La fibra è indicata dalla "x"

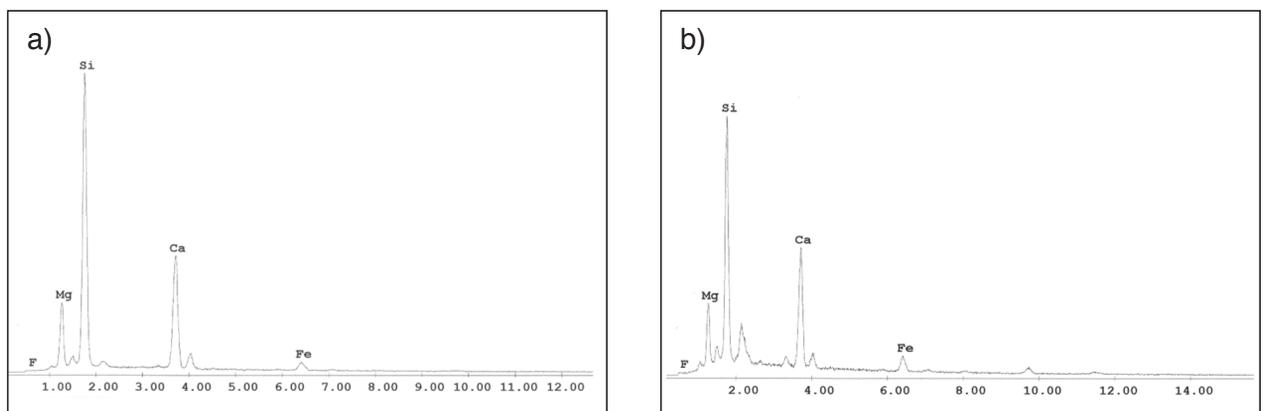


Figura 2 - Spettro ai raggi X della fibra di fluoro-edenite nel campione di cava (a) e di intonaco (b)

**Tabella 1** - Superficie specifica dei minerali

Tipo di minerale	Superficie specifica in m <sup>2</sup> /g
Cava	0,49±0,10
Intonaco	4,38±0,21
Crocidolite	8,97±0,20

I valori sono la media ± DS di tre esperimenti

### Misura della produzione di radicali ossidrilici

La generazione di radicali ossidrilici è stata misurata con il saggio della degradazione del desossiribosio, come descritta da Halliwell et al (1987). La soluzione reattiva conteneva 1 mM di 2-deossi-D-ribosio, 1 mM di perossido di idrogeno e 1 mM di acido ascorbico in tampone fosfati 0,01M (PBS). La reazione è iniziata con l'aggiunta nel *medium* di concentrazioni scalari di minerale prelevato dalla cava o dall'intonaco; per la crocidolite è stata utilizzata un'unica concentrazione. Come controllo negativo, è stato utilizzato il *medium* senza aggiunta di polveri. La miscela è stata incubata a 37°C per 30 minuti in un bagno agitante e successivamente centrifugata a 1200 x g per 10 minuti. Ad 1 ml di soprannatante sono stati aggiunti 1 ml di acido tricloroacetico (TCA) al 2,8% e 1 ml di acido tiobarbiturico (TBA) all'1%. Le provette sono state poste ad incubare a 100°C per 10 minuti e raffreddate in ghiaccio. La lettura del cromogeno formatosi è stata condotta, con uno spettrofotometro Varian Cary 50 Scan (Varian SpA, Leini, Italia), a 532 nm.

Abbiamo poi effettuato lo stesso esperimento aggiungendo alla miscela reattiva, subito prima delle polveri, 0,5 mM di 1,3 dimetil-2-tiourea (DMTU) o 0,5 mM di deferoxamina (DFX).

### Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata con il programma SPSS-PC (SSPC, Italia). I risultati sono riportati come medie e deviazioni standard. Il confronto tra le medie dei valori ottenuti con la polvere di cava, intonaco e crocidolite con quelle ottenute dopo aggiunta di DMTU e DFX è stato effettuato mediante il test t di Student per campioni indipendenti. Il confronto delle medie ottenute tra i campioni e quello tra dosi diverse dello stesso cam-

pione è stato effettuato con l'analisi della varianza (ANOVA) e confrontati con il t-test di Bonferroni. L'analisi della relazione tra le dosi e la produzione di radicali è stata effettuata mediante l'indice di correlazione di Pearson. I limiti di significatività sono stati fissati per p<0,05.

### RISULTATI

La produzione di radicali ossidrilici è stata testata per tutti i campioni alla dose corrispondente a 10 cm<sup>2</sup>/ml; inoltre la polvere di cava è stata saggiata anche alle concentrazioni di 2,5 e 5 cm<sup>2</sup>/ml, mentre l'intonaco a quelle di 45 e 60 cm<sup>2</sup>/ml. Ogni prova è stata compiuta tre volte in triplicato. I risultati ottenuti sono mostrati in tabella 2. Essi sono la media ± la deviazione standard delle prove a cui è stata sottratta la media del controllo negativo.

Dall'analisi dei dati si osserva produzione di radicali da parte di tutti i campioni in esame.

Con le polveri della cava i valori aumentano proporzionalmente alle concentrazioni (r=0,96). A 10

**Tabella 2** - Produzione di radicali ossidrilici dai campioni

Polveri in cm <sup>2</sup> /ml	Cava	Intonaco	Crocidolite
2,5	0,56±0,10	n.d.	n.d.
5	0,71±0,21	n.d.	n.d.
10	oltre il limite di rilevazione del metodo*	0,55±0,12	1,37±0,12
45	n.d.	0,72±0,30	n.d.
60	n.d.	oltre il limite di rilevazione del metodo^	n.d.

I valori sono la media ± DS di tre esperimenti, effettuati in triplicato

I risultati sono espressi come assorbanza registrata a 532 nm  
n.d. = non determinato

\* differenza significativa tra le polveri a 10 cm<sup>2</sup>/ml (p<0,05 analisi della varianza); ° differenza significativa con la polvere di cava (p<0,05 analisi della varianza); ^ differenza significativa con la polvere di intonaco (p<0,05 analisi della varianza)

cm<sup>2</sup>/ml il risultato supera il limite di rilevamento dello strumento (massimo di reattività).

Con le polveri dell'intonaco i valori aumentano proporzionalmente alle concentrazioni ( $r=0,79$ ). A 60 cm<sup>2</sup>/ml il risultato supera il limite di rilevamento dello strumento (massimo di reattività).

Confrontando i risultati a 10 cm<sup>2</sup>/ml, quello della cava è il più elevato mentre quello dell'intonaco è il più basso; con entrambi si ottengono valori che risultano differenti in modo statisticamente significativo rispetto alla crocidolite.

I risultati ottenuti aggiungendo la DMTU sono mostrati nella tabella 3. La presenza di DMTU determina una significativa riduzione della produzione di radicali ossidrilici, sia da parte delle polveri della cava e dell'intonaco, che delle fibre di crocidolite.

I risultati ottenuti con il saggio della degradazione del 2-deossi-D-ribosio con aggiunta di DFX sono mostrati nella tabella 4.

La presenza di DFX determina anch'essa una significativa riduzione della produzione di radicali ossidrilici, sia da parte delle polveri della cava e dell'intonaco, che delle fibre di crocidolite alla dose saggiata.

**Tabella 3** - Produzione di radicali ossidrilici con aggiunta di DMTU 0,5 mM

Polveri in cm <sup>2</sup> /ml	Cava	Intonaco	Crocidolite
2,5	0,17±0,03	n.d.	n.d.
5	0,31±0,10	n.d.	n.d.
10	0,39±0,11	nessuna generazione rilevata	0,19±0,04
45	n.d.	nessuna generazione rilevata	n.d.
60	n.d.	nessuna generazione rilevata	n.d.

I valori sono la media ± DS di tre esperimenti, effettuati in triplicato

I risultati sono espressi come assorbanza registrata a 532 nm  
n.d. = non determinato

**Tabella 4** - Produzione di radicali ossidrilici con aggiunta di DFX 0,5 mM

Polveri in cm <sup>2</sup> /ml	Cava	Intonaco	Crocidolite
10	nessuna generazione rilevata	nessuna generazione rilevata	0,03±0,01
60	n.d.	0,06±0,01	n.d.

I valori sono la media ± DS di tre esperimenti, effettuati in triplicato. I risultati sono espressi come assorbanza registrata a 532 nm; n.d. = non determinato

## DISCUSSIONE

È ben noto da tempo che i radicali ossidrilici sono coinvolti nella carcinogenesi attraverso la loro azione dannosa che si esplica sul DNA delle cellule (3, 19, 28). Vi sono dati sulle fibre di amianto, in base ai quali è possibile ritenere che il loro potenziale carcinogenetico sia legato alla capacità di generare radicali ossidrilici, in quanto in superficie le fibre di asbesto presentano ferro sia in forma ridotta che ossidata (17-19, 26, 27, 30). Questo ferro catalizza reazioni che formano i radicali i quali, danneggiando il DNA, possono condurre allo sviluppo di tumori. Anche per la silice cristallina è stato proposto un simile meccanismo (5, 8).

Abbiamo usato il metodo del deossiribosio proposto da Halliwell et al (1987) (15) che, integrato con prove compiute in presenza di chelanti del ferro e di *scavenger* dei radicali ossidrilici, è ritenuto adeguato (11).

Per ogni minerale, abbiamo usato come unità di misura la superficie e non il peso, poiché la produzione di radicali dalle fibre, è legata alla natura e al numero di siti attivi presenti sulla loro superficie (9, 10, 16, 24).

I risultati del nostro studio hanno dimostrato che le polveri in esame sono in grado di formare radicali ossidrilici. La reattività della polvere di cava è risultata significativamente maggiore rispetto a quella della crocidolite mentre la reattività della polvere dell'intonaco è risultata significativamente minore della crocidolite. La polvere della cava è più reattiva dell'intonaco; infatti sono sufficienti 2,5 cm<sup>2</sup>/ml di cava per ottenere circa la stessa quantità di radicali prodotta da 10 cm<sup>2</sup>/ml di intonaco.

Il differente comportamento dei due campioni può dipendere da numerosi fattori, quali, in particolare, il diverso numero di fibre di fluoro-edenite per unità di superficie. Va inoltre considerato che l'intonaco è una miscela, costituita solo in parte dalla sabbia prelevata dal fronte lavico della cava. La roccia contenente le fibre si trova entro una frattura di un fronte di scavo, largo circa 40 metri e alto 10, che è un trentesimo dell'intera superficie della cava. Di conseguenza la sabbia utilizzata per gli intonaci è una miscela di rocce provenienti da diversi fronti di scavo. Inoltre la presenza delle fibre varia a seconda dell'epoca di costruzione/ristrutturazione delle abitazioni che comprende un arco di circa 50 anni (23).

Nel nostro studio, la produzione di radicali ossidrilici è inibita quando aggiungiamo al sistema sperimentale DFX, sostanza capace di chelare il ferro dalle superficie dei minerali (1, 14). Come è noto (3) esso catalizza le reazioni di Fenton o Haber-Weiss che producono i radicali. Allo stesso modo aggiungendo la DMTU, *scavenger* specifico dei radicali ossidrilici (29), abbiamo ottenuto una riduzione dei valori; ciò dimostra che il materiale da noi studiato, verosimilmente le fibre di fluoro-edenite, possiede un meccanismo d'azione simile a quello delle fibre di asbesto.

La formazione dei radicali ossidrilici è stata indicata da molti autori come la via attraverso cui può esplicarsi la tossicità polmonare dell'amianto che può portare alla formazione di fibrosi, carcinoma polmonare e mesotelioma (17-19, 26, 27, 30).

In conclusione possiamo ritenere che le fibre di fluoro-edenite, per cui esistono evidenze clinico-epidemiologiche di un nesso di causalità con il mesotelioma (23), siano dotate di reattività biologica così come dimostrato per l'asbesto.

Sono necessari ulteriori saggi sperimentali *in vitro*, per acquisire maggiori dati e approfondire lo studio sulla tossicità di queste polveri.

## BIBLIOGRAFIA

1. ALJANDALI A, POLLACK H, YELDANDI A, et al: Asbestos causes apoptosis in alveolar epithelial cells: role of iron-induced free radicals. *J Lab Clin Med* 2001; 137: 330-339
2. BOSCHMANN KF, BURNS PC, HAWTHORNE FC, et al: A site disorders in synthetic fluor-edenite; a crystal-structure study. *Can Mineral* 1994; 32: 21-30
3. BREEN AP, MURPHY JA: Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Rad Biol Med* 1995; 18: 1033-1077
4. BRUNAUER S, EMMETT PH, TELLER E: Adsorption of gases in multimolecular layers. *J Amer Chem Soc* 1938; 60: 309-319
5. CASTRANOVA V, VALLYATHAN V, RAMSEY DM, et al: Augmentation of pulmonary reactions to quartz inhalation by trace amounts of iron-containing particles. *Environ Health Perspect* 1997; 105: 1319-1324
6. DI PAOLA M, MASTRANTONIO M, CARBONI M, e coll: *La mortalità per tumore maligno della pleura in Italia negli anni 1988-1992*. Istituto Superiore di Sanità (eds): Rapporti ISTISAN 96/40. Roma 1996: 1-30
7. EUGENE CJ, ARNOLD KJ: Study on synthetic fluor-tremolite, part 1 of synthetic asbestos investigations. *Am Mineral* 1954; 39: 537-548
8. FENOGLIO I, PRANDI L, TOMATIS M, et al: Free radical generation in the toxicity of inhaled mineral particles: the role of iron speciation at the surface of asbestos and silica. *Redox Rep* 2001; 6: 235-241
9. FUBINI B: Surface reactivity in the pathogenic response to particulates. *Environ Health Perspect* 1997; 105: 1013-1020
10. FUBINI B, BOLIS V, GIAMELLO E, VOLANTE M: Chemical functionalities at the broken fibre surface related to free radicals production. In Brown RC, Hoskin JA, Johnson NF (eds): *Mechanisms in fiber carcinogenesis*. New York: Plenum Press, 1991: 415-432
11. GHIO AJ, STONEHUERNER J: Complement activation after *in vitro* asbestos exposure corresponds to oxidant generation by the fiber. *Inhal Toxicol* 1997; 9: 31-41
12. GIANFAGNA A, PAOLETTI L, VENTURA P: Fibrous amphibole phases in the volcanic products of Monte Calvario (eastern Sicily). *Eur J Mineral* 1997; 18: 117-119
13. GIANFAGNA A, OBERTI R: Fluoro-edenite from Biancavilla (Catania, Sicily, Italy): crystal chemistry of a new amphibole end-member. *Am Mineral* 2001; 86: 1489-1493
14. HALLIWELL B: Protection against tissue damage *in vivo* by deferoxamine: what is its mechanism of action? *Free Radical Biol Med* 1989; 7: 645-651
15. HALLIWELL B, GUTTERIDGE JM, ARUOMA OI: The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 1987; 165: 215-219
16. HARDY JA, AUST AE: Iron in asbestos chemistry and carcinogenicity. *Chem Rev* 1995; 95: 97-118

17. JAURAND MC: Mechanism of fiber-induced genotoxicity. *Environ Health Perspect* 1997; *105*: 1073-1084
18. KAMP DW, WEITZMAN SA: The molecular basis of asbestos induced lung injury. *Thorax* 1999; *54*: 638-652
19. KANE AB: Mechanisms of mineral fibre carcinogenesis. In Kane AB, Boffetta P, Saracci R, Wilbourn JD (eds): *Mechanisms of mineral fibre carcinogenesis*. IARC Scientific Publications no 140 Lyon 1996: 11-34
20. KUNIAKI M, YOSHIKI Y, KATSUTOSHI T: Fluor edenite from the Ishigamiyama lava dome of the Kimpo Volcano, Kumamoto, Southwest Japan. *GANKO* 1996; *91*: 419-423
21. MANNA P, COMBA P: Comunicazione con le autorità sanitaria e con il pubblico sui rischi da amianto a Biancavilla (CT). *Epidemiol Prev* 2001; *25*: 28-30
22. OBERTI R, HAWTHORNE FC, RAUDSEPP M: The behaviour of Mn in amphiboles: Mn synthetic fluoroedenite and synthetic fluoro-pargasite. *Eur J Mineral* 1997; *9*: 115-122
23. PAOLETTI L, BATISTI D, BRUNO C, et al: Unusually high incidence of malignant pleural mesothelioma in a town of eastern Sicily: an epidemiological and environmental study. *Arch Environ Health* 2000; *55*: 392-398
24. PEZERAT H: The surface activity of mineral dusts and the process of oxidative stress. In Brown RC, Hoskin JA, Johnson NF (eds): *Mechanism in fiber carcinogenesis*. New York: Plenum Press, 1991: 387-395
25. ROBERT JL, DELLA VENTURA G, THAUVIN JL: The infrared OH-stretching region of synthetic richerites in the system Na<sub>2</sub>O-K<sub>2</sub>O-CaO-MgO-SiO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O-HF. *Eur J Mineral* 1989; *1*: 203-211
26. RYRFELDT A, BANNENBERG G, MOLDEUS P: Free radicals and lung disease. *Br Med Bull* 1993; *49*: 588-603
27. VALLYATHAN V: Generation of oxygen radicals by minerals and its correlation to cytotoxicity. *Environ Health Perspect* 1994; *102*: 111-115
28. XU A, WU LJ, SANTELLA RM, et al: Role of oxyradicals in mutagenicity and DNA damage induced by crocidolite asbestos in mammalian cells. *Cancer Res* 1999; *59*: 5922-5926
29. WASIL M, HALLIWELL B, GROOTVELD M, et al: The specificity of thiourea, dimethylthiourea and dimethyl sulphoxide as scavengers of hydroxyl radicals. Their protection of alpha 1-antiproteinase against inactivation by hypochlorous acid. *Biochem J* 1987; *243*: 867-870
30. ZALMA R, BONNEAU L, GUIGNARD J, et al: Formation of oxy-radicals by oxygen reduction arising from the surface activity of asbestos. *Can J Chem* 1987; *65*: 2338-2341

# Esposizione a *Saccharopolyspora Rectivirgula* degli allevatori di bestiame bovino della provincia di Reggio Emilia e rischio di alveolite allergica estrinseca (*Farmer's Lung*)

F. FERRI, M. DOTTORI\*, LORENA BEDOGNI, S. PERINI\*, M. LIGABUE\*\*

Servizio di Prevenzione e Sicurezza Ambienti di Lavoro, Azienda USL di Reggio Emilia

\* Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

\*\* Centro Ricerche Produzione Animale di Reggio Emilia

## KEY WORDS

Allergic extrinsic alveolitis; Farmer's Lung; hay pollution; *saccharopolyspora rectivirgula*; thermophilic actinomycetes

## SUMMARY

«**Exposure of cattle breeders to *Saccharopolyspora Rectivirgula* in the Reggio Emilia Province and risk of Farmer's Lung**». **Introduction:** Nearly 2.350 dairy farms (and 137.000 milk cows) are located in the province of Reggio Emilia, Italy, to produce the famous Parmigiano-Reggiano® cheese. Feeding is hay-based both in the cold season and (together with grazing) in the warm season. This requires a large production of hay and frequent handling by the farmers. Hay is packed in large cylindrical bales, "round bales" (nearly 2.41 m<sup>3</sup>), or, rarely, in traditional small prisms-shaped bales (about 0.15 m<sup>3</sup>), only used on small farms. We estimated there were 6.000-9.000 the workers exposed to hay dust. The risks for the farmer's health due to the hay dust exposure are well known; in particular Farmer's Lung disease (FL) is rather frequent in this Region (1.5%-3.0% among people exposed). We studied hay and air pollution by *Saccharopolyspora Rectivirgula* (SR) in relation to these two different hay-packing techniques (hay dried in the open air) both in flat and in hilly areas. **Methods:** On 56 cattle-farms, hay and air samples were collected and analyzed using a six-stage Andersen sampler and a sedimentation chamber (SC) for hay samples with plastic Petri dishes containing culture medium. **Results:** Round bales were richer in SR spores than the small prism-shaped bales (n=37, mean=6.20 log<sub>n</sub> ufc/m<sup>3</sup> in SC, ds: 3.87 vs n=15, mean=2.40 log<sub>n</sub> ufc/m<sup>3</sup> in SC; ds: 4.16) and they seem to produce higher air pollution (n=30, mean=5.30 log<sub>n</sub> ufc/m<sup>3</sup>; ds: 3.71 vs n=15, mean=2.32 log<sub>n</sub> ufc/m<sup>3</sup>; ds: 2.99). In hilly areas the pollution produced by round bales (in hay and air) was higher than in flat areas. On the contrary hay from small bales produced in hilly areas was poorest in SR spores. **Conclusions:** An heavy exposure to actinomycetes spores, therefore, comes from "round bales" hay handling, especially when the balse are produced in mountain areas. New drying systems, probably, can reduce this risk and raise hay quality.

Pervenuto il 18.1.2002 - Accettato il 27.9.2002

Corrispondenza: Dott. Fulvio Ferri, SPSAL, Azienda USL di Reggio Emilia, Via Martiri della Libertà 8, 42019 Scandiano (RE)  
e-mail: ferri@ausl.re.it

## RIASSUNTO

Nella provincia di Reggio Emilia (Italia), in 2.345 allevamenti di bovini destinati alla produzione di latte per il formaggio Parmigiano-Reggiano®, circa 137.000 vacche sono nutrite principalmente con fieno durante la stagione fredda e con foraggio fresco e fieno durante quella calda. La necessità di grandi quantità di fieno e la progressiva riduzione del n. di occupati in tale ambito zootecnico (attualmente dalle 6000 alle 9000 persone) hanno reso necessario lo sviluppo di nuove tecniche nella produzione e nell'imballaggio del fieno, per aumentare l'efficienza del lavoro. Le "rotoballe" (c.a. 2,41 m<sup>3</sup> di fieno raccolti e compressi in forma di grandi cilindri) stanno sostituendo quasi dovunque le tradizionali "balline" (parallelepipedi di fieno di c.a. 0,15 m<sup>3</sup>) per consentire ai pochi lavoratori del settore di produrre e movimentare da soli, grazie alla meccanizzazione, ingenti quantità di fieno. L'inquinamento dell'aria e del fieno da spore di *Saccharopolyspora Rectivirgula* (*Micropolyspora Faeni*), fonte di rischio di *Alveolite Allergica Estrinseca nell'uomo* (*Farmer's Lung*), è stato studiato in 56 allevamenti (mediante l'impiego del campionatore multistadi Andersen e di una Camera di Sedimentazione, CS), in rapporto sia ai diversi tipi di imballaggio del fieno che alla localizzazione geografica (pianura o collina) degli allevamenti. Il sistema di raccolta ed impiego del fieno in "rotoballe" essiccate all'aperto determina, mediamente, maggiori livelli di inquinamento del fieno stesso ( $n=37$ ,  $media=6,20 \log_{10} \text{ ufc/m}^3$  in CS; ds: 3,87) e dell'aria nelle stalle ( $n=30$ ,  $media=5,30 \log_{10} \text{ ufc/m}^3$ ; ds: 3,71) di quanto non si realizzi in caso di impiego di fieno in "balline" ( $n=15$ ,  $media=2,40 \log_{10} \text{ ufc/m}^3$  in CS; ds: 4,16 nel fieno,  $n=15$ ;  $media=2,32 \ln \text{ ufc/m}^3$ ; ds: 2,99 nell'aria). Le condizioni ambientali della collina sembrano esercitare un effetto opposto sull'inquinamento del fieno dei due differenti tipi di confezione. In conclusione, la produzione e l'impiego di "rotoballe" si associa ad un maggior rischio di esposizione a spore fungine, specialmente nelle lavorazioni effettuate in montagna. Nuove tecniche di essiccamento, oltre che migliorare la qualità del fieno, potrebbero ridurre tale rischio.

## INTRODUZIONE

La malattia dell'apparato respiratorio denominata *Farmer's Lung* (FL) è una polmonite da ipersensibilità definita anche alveolite allergica estrinseca; essa si manifesta, nella forma acuta, da brividi, febbre, dispnea, tosse secca, senso di costrizione toracica mentre nelle forme croniche sono presenti tosse secca e dispnea da sforzo.

E' sostenuta da ipersensibilità ad antigeni organici inalati ed è spesso associabile alla esposizione a spore di diverse specie di actinomiceti termofili tra cui, secondo le recenti revisioni tassonomiche (13) sono particolarmente importanti la *Saccharopolyspora Rectivirgula* (SR) (8), conosciuta anche come *Faenia Rectivirgula* o *Micropolyspora Rectivirgula* (16) o come *Micropolyspora Faeni* (2) e il *Thermoactinomyces Vulgaris* (TV), più frequentemente presenti nel fieno e nella paglia assieme ad altri actinomiceti (*A. Glaucus*, *A. Fumigatus*) (4).

Il loro sviluppo nel fieno, è condizionato, in modo analogo, da due fattori tra loro correlati: umidità e temperatura.

All'interno delle balle in cui il fieno viene confezionato, il livello di umidità può dipendere da diversi fattori (condizioni climatiche, ora della raccolta nella giornata, procedure di essiccamento, ...), mentre la temperatura è legata alle condizioni ambientali, alla residua respirazione del vegetale e, soprattutto, alla respirazione ed al metabolismo microbico, a loro volta dipendenti dall'umidità del fieno.

Da studi sulla interazione tra riscaldamento delle balle di fieno e sviluppo dei microrganismi (6, 7) si può affermare che il riscaldamento del fieno interviene velocemente dopo la produzione della palla (massimo dopo 24-36 ore), ma si riduce rapidamente dopo pochi giorni per il suo concomitante essiccamento che limita l'attività microbica. In queste condizioni i microrganismi proliferano, incrementando il pH a 7 e oltre, interviene la deaminazione delle proteine con sviluppo di azoto volatile, l'utilizzazione degli acidi grassi da parte dei funghi, mentre il glucosio si riduce rapidamente.

Mentre lo sviluppo degli actinomiceti, normalmente, richiede condizioni aerobiche, il TV cresce a 0,1% di ossigeno e sporula in presenza di tenori di

O<sub>2</sub> pari o superiore all'1%. La SR, in modo simile, si sviluppa a 0,3% di O<sub>2</sub> (5) a temperature comprese tra 30 e 65°C con un *optimum* tra 50 e 55°C (9).

Le condizioni che si creano in voluminosi imballaggi di fieno umido e pressato, dove l'aria dell'ambiente esterno difficilmente può raggiungere le parti più interne della confezione o esercitare un'azione di dispersione del calore endogeno prodotto, possono essere considerate particolarmente favorevoli per lo sviluppo di actinomiceti termofili.

La maggior parte degli allevamenti bovini della provincia di Reggio Emilia sono orientati alla produzione di latte destinato alla formazione di formaggio Parmigiano-Reggiano®; ciò vincola gli allevatori ad alimentare il bestiame principalmente con fieno durante l'inverno e con foraggio fresco e fieno nelle altre stagioni, secondo una tradizione produttiva plurisecolare.

Da ciò deriva una rilevante produzione e un elevato impiego di fieno che un numero sempre minore di addetti deve gestire. Il suo confezionamento in grandi balle cilindriche molto più voluminose delle tradizionali piccole balle a forma di parallelepipedo e la elevata meccanizzazione dei processi produttivi si stanno estendendo progressivamente in quanto aumentano l'efficienza del lavoro e consentono il mantenimento e lo sviluppo di questo importante settore produttivo; nel contempo, però, rischiano di crearsi le condizioni di possibili, intense esposizioni ad actinomiceti termofili, particolarmente nelle stagioni fredde (stalle chiuse, ridotta ventilazione, uso esclusivo di fieno ecc.).

Una parallela indagine condotta in alcuni distretti dell'Azienda USL di Reggio Emilia ha consentito di stimare la frequenza di casi di Alveolite Allergica Estrinseca (AAE) tra tutti i titolari di allevamenti bovini tra l'1,5 ed il 3,0% (Ferri F. et al: Indagine su diffusione del *Farmer's Lung* nella provincia di Reggio Emilia: relazione conclusiva, SPSAL, Dipartimento di Sanità Pubblica, AUSL di Reggio E. 1999) molto vicina a quella riscontrata (15) in province limitrofe.

La presenza di SR nell'aria o nel fieno è da ritenersi uno dei più importanti indicatori di rischio per l'insorgenza della Alveolite Allergica Estrinseca. Poiché il suo sviluppo è condizionato anche dalla posizione orografica dell'allevamento per l'influenza

delle diverse condizioni climatiche (2) con il presente studio ci siamo proposti di documentare, nelle aziende agricole della nostra provincia, dedite all'allevamento di vacche da latte destinato alla produzione di formaggio Parmigiano-Reggiano®, i rapporti esistenti tra i livelli di inquinamento dell'aria o del fieno da *Saccharopolyspora Rectivirgula*, le modalità di raccolta del foraggio e la localizzazione degli allevamenti (pianura-collina/montagna).

## METODI

La provincia di Reggio Emilia (456.000 abitanti nel 2000, estensione: 2291,67 km<sup>2</sup>) è con quella di Parma, al vertice della produzione di formaggio Parmigiano-Reggiano®. Altre province interessate sono quelle di Modena e, parzialmente, di Bologna e Mantova.

Ciò è reso possibile dalla presenza, sul suo territorio, di:

- 2.872 allevamenti bovini di cui 2.345 destinati alla produzione casearia;
- 165.501 bovini di cui 136.630 utilizzati per la produzione di formaggio (da Relazione Annuale 1999, Servizi di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Sanità Pubblica, Azienda USL di RE), con un numero di persone addette e potenzialmente esposte compreso tra le 6000 e le 9000 unità.

Per studiare l'inquinamento da SR nel fieno impiegato per l'alimentazione del bestiame e nell'aria ambiente in un campione di stalle della nostra provincia ci siamo serviti di campionatori del genere Andersen (*Andersen Microbial Sampler - AMS*) a 6 stadi per polveri di origine biologica con il quale è possibile eseguire l'inseminazione dei microrganismi ricercati direttamente su piastre. Ogni stadio viene caricato con piastre Petri contenenti appositi terreni colturali: i primi tre stadi con terreno Saboureaud per la raccolta del particolato e la crescita dei miceti e gli ultimi tre stadi con terreno Tryptone Soia Agar 1/2 forza, per la crescita degli actinomiceti (12).

Le piastre contenenti il terreno Tryptone Soia Agar 1/2 forza vengono incubate a 55°C per 5 giorni al termine dei quali le colonie di SR vengo-

no identificate mediante esami microscopici (14) e conteggiate.

Le procedure interne di laboratorio hanno consentito di quantificare correttamente le colonie presenti sulle piastre fino ad un numero non superiore a 900 per ogni campione (pari a  $10,77 \log_{10} \text{ ufc/m}^3$  per i campioni d'aria e  $12,15 \log_{10} \text{ ufc/m}^3$  in CS per quelli di fieno). Oltre tali valori, il risultato è stato espresso in forma semiquantitativa ("superiore a ...").

### Le caratteristiche degli imballaggi

Si definiscono "balline" le confezioni di fieno costituite da piccoli parallelepipedi; si definiscono "rotoballe" quelle a forma di grandi cilindri.

Una volta sfalciato, il fieno viene lasciato dai 3 ai 4 giorni ad essiccare sul campo (a seconda delle condizioni meteorologiche); quindi viene raccolto in "balline" o "rotoballe" a loro volta lasciate sui campi, all'aperto, almeno per 10-15 giorni per completarne l'essiccamento e ridurre i rischi di autocombustione.

Le caratteristiche che differenziano le due confezioni (una volta essiccate) sono illustrate di seguito:

	Balline	Rotoballe
Forma	Parallelepipedi	Cilindri
Dimensioni (standard)	95x45x35 cm	H=120 cm; diametro basi=160 cm
Superficie totale	1,84 m <sup>2</sup>	6,03 m <sup>2</sup>
Volume	0,1496 m <sup>3</sup>	2,4127 m <sup>3</sup>
Rapporto superficie/volume	12,3 m <sup>2</sup> /m <sup>3</sup>	2,5 m <sup>2</sup> /m <sup>3</sup>
Peso	18-25 kg	300-450 kg
Peso specifico (Rapporto peso/volume)	120-167 kg/m <sup>3</sup>	124-186 kg/m <sup>3</sup>

Il peso, a parità di dimensioni, può variare anche di molto (anche oltre il 50%), soprattutto per le "rotoballe", in funzione del grado di umidità residua e della compressione del fieno praticata durante l'imballaggio.

Il peso specifico (rapporto tra peso e volume) delle balle consente di verificare, a parità di umidità

residua, la diversa compressione con cui il fieno è solitamente raccolto nelle confezioni.

### I campioni di fieno

Considerate le risorse disponibili sono stati individuati con metodo random, 15 allevamenti che utilizzavano esclusivamente "balline" tradizionali e altri 41 che impiegavano "rotoballe". In tutti gli allevamenti visitati il fieno impiegato è stato prodotto direttamente nei campi adiacenti.

Per ognuno dei 56 allevamenti selezionati è stato eseguito un campionamento di fieno e uno di aria, direttamente nelle stalle.

Presso gli allevamenti coinvolti nell'indagine, il fieno è stato prelevato da uno degli imballaggi presenti nella stalla al momento del sopralluogo, nelle sue parti più interne, ancora non esposte all'aria ed alla polvere dell'ambiente: per le "rotoballe" a circa metà del raggio del cilindro e a metà dell'altezza della confezione, per le "balline" nella parte centrale, a metà della loro lunghezza. Il materiale, raccolto e sigillato in sacchetti di carta, è stato analizzato, utilizzando il metodo descritto da Lacey e Durkiewicz (10), Lozzi (11) e Dottori (3), lievemente modificato, con l'ausilio di una Camera di Sedimentazione (CS) appositamente fabbricata.

La CS utilizzata consiste in un parallelepipedo di vetro a base ottagonale con volume di circa 0,23 m<sup>3</sup> (100 cm di altezza e 55 cm di diametro del cerchio circoscritto), sostenuto all'esterno da una intelaiatura metallica, aperto nella parte sottostante per consentire l'introduzione/l'eliminazione del fieno, dotato di un foro centrale nella parte superiore e di fori laterali, muniti di filtri, per permettere l'introduzione di aria al suo interno. Durante il campionamento la CS è stata appoggiata su un'ampia superficie di gomma per garantirne la tenuta.

Campioni di 100 grammi di fieno sono stati inseriti, uno alla volta, nel fondo della CS opportunamente legati con un piccolo cavo tessile la cui estremità fuoriusciva dal foro superiore. Agendo attraverso l'estremità del cavo, ogni campione è stato agitato per un tempo di circa 60 secondi al ritmo di una trazione ed un rilascio al secondo; quindi, dopo 60 minuti di quiete per lasciare sedimentare le particelle più grossolane prodotte dall'agitazione (pol-

vere, batteri e spore fungine), si è proceduto a raccogliere i campioni di aria per la ricerca della SR. Attraverso un foro laterale e tramite un tubo collegato al campionatore Lanzoni "Spore Trap SPS 2000", a sei stadi per polveri di origine biologica (tipo Andersen), è stata condotta l'aspirazione dell'aria e della polvere sospesa. Il flusso dell'aria era di 28 litri/min ed il campionamento durava 10 secondi, per un totale di 4,7 litri di aria aspirata.

Al termine di ogni campionamento la Camera era accuratamente pulita dalla polvere depositata sulle pareti e il campionatore, ancora collegato alla camera di sedimentazione, veniva stato fatto funzionare a vuoto per tre minuti e in aria libera per pulirlo da residui di polvere (lavaggio).

### Raccolta dei campioni di aria

Il campionatore Andersen a sei stadi consente esclusivamente l'esecuzione di prelievi ambientali di aria in postazione fissa; questi sono stati eseguiti in tutti gli allevamenti al centro della corsia di alimentazione delle stalle, ad una altezza di 1,5 metri da terra.

La messa a punto della metodica di campionamento, perfezionata nel corso di una indagine conoscitiva svolta precedentemente (3), ha richiesto l'individuazione del momento migliore della giornata nel quale effettuare il prelievo stesso e del tempo di aspirazione più consono per limitare, da un lato, la probabilità di una crescita eccessiva di microrganismi, anche di genere diverso, che avrebbe impedito la lettura delle piastre e, dall'altro, di un insufficiente sviluppo di SR che avrebbe reso negativa la lettura, per il mancato impatto sulle piastre di questi microrganismi.

È necessario, prima di eseguire il prelievo, lasciare depositare il materiale aerodisperso che viene prodotto in elevata quantità durante il lavoro in stalla (periodo di latenza). Il periodo di latenza da noi considerato ottimale è di 90-120 minuti dalla fine delle operazioni lavorative condotte all'interno della stalla (distribuzione fieno, rifacimento lettiera e mungitura).

La durata ottimale dei nostri campionamenti per i prelievi in aria (all'interno delle stalle) è stata individuata in 40 secondi.

Nelle stalle dov'erano impiegate o "rotoballe" (in prevalenza) o solo "balline", quindi, sono stati prelevati 56 campioni di aria dopo un periodo di latenza non inferiore ai 120 minuti.

Dopo ogni prelievo veniva eseguito il "lavaggio" dello strumento facendolo funzionare all'aperto per tre minuti, a vuoto, lontano da fonti di inquinamento particellare.

La diversa latenza adottata nei campionamenti in CS e in stalla si giustifica con le diverse condizioni di moto dell'aria: condizioni di sostanziale quiete nella prima (dopo l'iniziale scuotimento del fieno), turbolenze permanenti anche dopo la fine delle operazioni (per la naturale ventilazione delle stalle, i movimenti del bestiame, ecc.) nella seconda, in grado di mantenere più a lungo in sospensione anche particelle più grossolane.

### Analisi statistica

In sintesi: l'inquinamento nel fieno da SR è stato espresso in  $\log_n \text{ ufc/m}^3$  in CS (unità formanti colonie per metro cubo di aria aspirata in CS 60' dopo il loro rilascio da 100 g di fieno); l'inquinamento dell'aria è valutato in  $\log_n \text{ ufc/m}^3$  d'aria (raccolta con prelievi di 40 secondi dopo 120' dalla fine delle operazioni svolte dagli addetti al governo del bestiame). La trasformazione logaritmica dei dati (anche dei valori uguali a 0  $\text{ ufc/m}^3$ ) è stata condotta dopo aver sommato a ciascun risultato (in  $\text{ ufc/m}^3$ ) il valore 1.

Per una più agevole lettura e per esprimere un giudizio sintetico sulla qualità di aria e fieno utilizzando tutti i dati raccolti, compresi quelli in cui la proliferazione di colonie è espressa solo in termini semiquantitativi, tutti i risultati analitici ottenuti per ciascuna matrice sono raccolti in due gruppi:

- inferiori alla mediana;
- superiori alla mediana.

La mediana di tutti i campioni di fieno è pari a 7,30 ( $\log_n 1480 \text{ ufc/m}^3$  in CS), quella dei campioni di aria è uguale a 6,27 ( $\log_n 530 \text{ ufc/m}^3$ ).

Per l'elaborazione statistica dei dati ci si è avvalsi del programma EPI-INFO, prodotto da CDC Atlanta (Georgia, USA) e WHO Ginevra (Svizzera), distribuito a cura dell'Assessorato alla Sanità della Regione Emilia Romagna.

## RISULTATI

Sono illustrati nelle tabelle 1 e 2 i livelli di inquinamento da SR dei campioni di aria e di fieno, nel loro complesso e per aree geografiche.

In 11 prelievi di aria e in 4 campioni di fieno il conteggio delle colonie di SR è risultato possibile solo in termini semiquantitativi (comunque inseribili nel gruppo "superiori alla mediana") per l'elevatissima densità delle colonie presenti. Tutti questi casi sono riferiti ad allevamenti in cui si utilizzava fieno raccolto in "rotoballe".

Nelle tabelle 1 e 2 si può notare che i valori medi di spore riscontrate nel fieno e nell'aria sono notevolmente più elevati nelle aziende che utilizzano "rotoballe" rispetto a quelle che impiegano "balline" e ciò appare particolarmente evidente nei campioni prelevati in montagna.

I valori medi dell'inquinamento dell'aria o del fieno in allevamenti che usano solo "balline" corrispondono, rispettivamente, a meno della metà e a poco meno di un terzo di quelli riscontrati negli allevamenti che impiegano soltanto o prevalentemente "rotoballe".

Le differenze, nel confronto tra medie, appaiono significative al test "t" di Student. Anche il confronto operato sui dati scomposti per area geografica mostra condizioni di inquinamento sostanzialmente diverse, in rapporto alla confezione utilizzata. Le differenze emerse, a parità di confezione impiegata, tra i dati raccolti in collina e quelli di pianura non appaiono significative.

Anche esaminando i dati raccolti in classi, assieme ad una buona, significativa concordanza (66%) dei livelli di inquinamento dell'aria e del fieno rilevati nei singoli allevamenti (sono 18 gli allevamenti con campioni di aria e di fieno risultati entrambi inferiori alle rispettive mediane e 19 quelli in cui tali valori vengono superati, su un totale di 56), emergono considerevoli differenze nella contaminazione del materiale affienato e dell'aria delle stalle al variare della tipologia di imballaggio.

Si osserva, infatti, che negli allevamenti che utilizzano "balline" solo il 27% dei campioni di fieno e il 7% di quelli di aria superano i rispettivi livelli medi di inquinamento da SR rispetto a quanto avviene in allevamenti che usano "rotoballe" essic-

cate all'aperto dove tale condizione si presenta, rispettivamente, nel 61% e nel 66% dei campioni. Le differenze valutate con il test  $\chi^2$  (corretto per Yates) sono statisticamente significative ( $p < 0,05$  per il fieno e  $p < 0,001$  per l'aria).

I risultati relativi all'inquinamento di aria e fieno sono suddivisi anche in funzione della dislocazione geografica degli allevamenti (pianura e collina/montagna).

Dall'analisi quantitativa dei dati e dall'esame della loro distribuzione rispetto ai valori medi, si desume che:

- il fieno proveniente da "rotoballe" prodotte in collina/montagna è generalmente il più inquinato da SR rispetto a qualsiasi altra confezione. Analoga tendenza si osserva sui dati di inquinamento aereo;
- il fieno di "balline" di pianura tende a risultare meno inquinato da SR rispetto alle "rotoballe" della stessa zona. Analoga tendenza si osserva sui dati di inquinamento aereo;
- il fieno delle "balline" prodotte in zona collinare o montuosa appare il meno inquinato da SR rispetto a qualsiasi altra confezione.

Non viene rilevata una analoga tendenza per i dati dell'aria: per questa matrice i valori inferiori sono documentati per impiego di balline nelle stalle di pianura seguiti da quelle di montagna che utilizzano lo stesso tipo di imballaggio.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La metodica adottata per l'analisi del fieno, in particolare la consistente quantità di matrice testata in CS, pur compensata dal prolungamento del tempo di latenza tra la fine dell'agitazione e l'inizio del campionamento, ha verosimilmente aumentato la sensibilità del metodo con la prevedibile conseguenza, di una elevata densità di ufc sulle piastre, che in quattro campioni è stata tale da impedirne il conteggio preciso.

Si è ritenuto importante adottare tale procedura, però, per confrontare con maggior ponderazione i risultati ottenuti con quelli raccolti da campioni di fieno di "rotoballe" sottoposte ad essiccamento forzato con aria (analisi in corso) e quindi ritenuti particolarmente "poveri" di spore.

**Tabella 1** - Risultati riferiti ai campioni di fieno suddivisi per tipo di confezione e in funzione della localizzazione geografica dell'allevamento. Dati quantitativi (per 100 gr di fieno in Camera di Sedimentazione) espressi in  $\log_{10}$  (ufc/m<sup>3</sup>). Mediana generale (di tutti i campioni)=7,30

Uso di	Fieno Generale			Pianura			Collina/Montagna			Pianura			Collina/Montagna									
	N. totale campioni	Camp. leggibili	Media	d.s.	mediana	Camp. leggibili	Media	d.s.	mediana	N. camp. infer. a mediana generale	N. camp. super. a mediana generale	(%)	N. camp. infer. a mediana generale	N. camp. super. a mediana generale	(%)							
Balline	15	15	2,40	4,16	0	8	2,51	4,66	0	7	2,26	3,87	0	6	2	5	2	(75%)	(25%)	(71%)	(29%)	
Rotoballe	41 (*)	37	6,20	3,87	7,76	22	5,54	3,71	6,06	15	7,18	4,01	7,91	11	15	5	10	(42%)	(58%)	(33%)	(67%)	
Test "t" di Student (confronto tra medie)				d.f.=50 t=3,1489 p<0,01				d.f.=28 t=1,8496 p<ns				d.f.=20 t=2,6594 p<0,02										Confronto balline vs rotoballe: distribuzione rispetto alla mediana Test del $\chi^2_{(corr. Yates)}=3,841$ p<0,05

(\*) Per 4 campioni di fieno (tutti da rotoballe) piastre non leggibili: ufc >900 (superiore a 12,15  $\log_{10}$  ufc/m<sup>3</sup> in CS)

**Tabella 2** - Risultati riferiti ai campioni di aria suddivisi per tipo di confezione e in funzione della localizzazione geografica dell'allevamento. Dati quantitativi espressi in  $\log_{10}$  (ufc/m<sup>3</sup>). Mediana generale (di tutti i campioni)=6,27

Uso di	Aria Generale			Pianura			Collina/Montagna			Pianura			Collina/Montagna									
	N. totale campioni	Camp. leggibili	Media	d.s.	mediana	Camp. leggibili	Media	d.s.	mediana	N. camp. infer. a mediana generale	N. camp. super. a mediana generale	(%)	N. camp. infer. a mediana generale	N. camp. super. a mediana generale	(%)							
Balline	15	15	2,32	2,99	0	8	1,57	2,93	0	7	3,19	3,04	4,67	7	1	7	0	(88%)	(12%)	(100%)	(0%)	
Rotoballe	41 (*)	30	5,30	3,71	6,62	20	4,79	3,81	6,28	10	6,31	3,48	7,81	11	15	3	12	(42%)	(58%)	(20%)	(80%)	
Test "t" di Student (confronto tra medie)				d.f.=43 t=2,6915 p<0,02				d.f.=26 t=2,1446 p<0,05				d.f.=15 t=1,6105 p<ns										Confronto balline vs rotoballe: distribuzione rispetto alla mediana Test del $\chi^2_{(corr. Yates)}=15,389$ p<0,001

(\*) Per 11 campioni di aria (tutti da stalle con uso di rotoballe) piastre non leggibili: ufc >900 (superiore a 10,77  $\log_{10}$  ufc/m<sup>3</sup>)

Per quanto attiene al rapporto tra le modalità di raccolta del fieno e i suoi livelli di inquinamento, appare evidente il maggior carico inquinante da SR del fieno confezionato in “rotoballe” confrontato con quello raccolto in “balline”, in accordo con quanto osservato da Ranalli et al (13).

I quattro gruppi di confezioni esaminati possono essere ordinati, per livello decrescente di inquinamento riscontrato, nel seguente modo:

- “rotoballe” di montagna;
- “rotoballe” di pianura;
- “balline” di pianura;
- “balline” di montagna.

Questo dato porta ad esprimere un giudizio negativo, dal punto di vista sanitario, su un sistema di fienagione che prevede la produzione di “rotoballe” essiccate dopo la fermentazione che, accanto ad un indubbio incremento di produttività, determinerebbe un altrettanto sicuro incremento dell’esposizione ad actinomiceti termofili. Ciò va collegato, con ogni probabilità, alla maggiore difficoltà a disperdere in ambiente sia l’umidità residua del fieno ancora presente al momento dell’imballaggio che l’elevato calore prodotto dalla fermentazione all’interno della confezione, a causa del più sfavorevole rapporto tra superficie e volume.

Sempre riguardo all’inquinamento del fieno i nostri dati fanno ritenere che in ambiente montano si realizzino due situazioni opposte: il minimo livello di inquinamento nel fieno delle “balline” e quello massimo nelle “rotoballe”. È noto che l’ambiente montano (oltre i 1000 metri) può svolgere un ruolo di protezione e di limitazione dell’esposizione in quanto la temperatura più bassa può ostacolare lo sviluppo degli actinomiceti nel fieno (2). Tuttavia riteniamo che anche sotto i 1000 metri, dove sono collocati gli allevamenti di “montagna” da noi studiati, le condizioni ambientali possano ancora costituire un certo fattore protettivo se il fieno viene confezionato in “balline” (almeno rispetto alla nostra pianura), mentre possono essere considerate complessivamente più sfavorevoli in caso di produzione di “rotoballe”.

Nelle “balline” prodotte in montagna, infatti, pur costituite da fieno raccolto con maggiore umidità residua (maggiore piovosità, minore soleggiamento) rispetto alla pianura, il più favorevole rapporto su-

perficie/volume rispetto a quello delle “rotoballe” e la minore compressione raggiungibile durante il loro confezionamento facilitano la dispersione dell’umidità e del calore prodotto nei primi giorni dopo la raccolta, quando esse vengono lasciate sul campo per completare l’essiccamento, in condizioni di temperatura esterna più fresca e di maggiore ventilazione.

Con tali presupposti è ragionevole ritenere che i livelli di temperatura necessari al comodo sviluppo degli actinomiceti siano più facilmente raggiunti all’interno delle “rotoballe”, termicamente meglio isolate, che non nelle “balline”.

Il maggiore inquinamento del fieno delle “rotoballe” rispetto alle “balline” viene rilevato, peraltro, anche negli allevamenti di pianura, seppure in modo meno evidente.

Per quanto attiene all’inquinamento aereo da SR, oltre che l’esistenza di una buona concordanza con i risultati riferiti all’inquinamento del fieno, va ricordato che i dati illustrati rappresentano i valori presenti in stalla due ore dopo la fine dei lavori di governo del bestiame. Anche se le spore degli actinomiceti, a causa della loro ridotta dimensione, restano a lungo sospese in aria, tuttavia è verosimile che durante la distribuzione del fieno o la movimentazione della paglia si realizzino condizioni di esposizione personale anche molto più intense di quelle desumibili dai livelli ambientali di inquinamento riscontrati.

In conclusione, i risultati del nostro studio confermano che l’esposizione a spore di actinomiceti termofili è maggiore laddove si utilizzano “rotoballe” essiccate in campo anziché le tradizionali “balline” e dimostrano che tale differenza è particolarmente evidente in aree collinari/montuose. L’utilità di nuovi sistemi di essiccamento delle “rotoballe” (essiccamento forzato con aria con inibizione della fermentazione) potrebbe tuttavia contribuire a contenere il rischio e dovrà essere documentata in studi successivi.

## BIBLIOGRAFIA

1. ARDEN JONES MP, MCCARTY AJ, CROSS T: Taxonomic and serological studies on *Micropolyspora* strains from soil bearing the specific epithet *Rectivirgula*. *Journal of General Microbiology* 1979; 115: 343-354

2. DEPIERRE A, DALPHIN JC, PERNET D, et al: Epidemiological study of farmer's lung in five districts of the French Doubs province. *Thorax* 1988; 43: 429-435
3. DOTTORI M, BEDOGNI L, FERRI F, e coll: Metodi utilizzati per la ricerca di attinomiceti termofili responsabili di patologie respiratorie da campioni di aria ambientale in stalle di bovine da latte. In *La Selezione Veterinaria*. Supplemento 2000 Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (Brescia)
4. DUCHAINE C, MÉRIAUX A, BROCHU G, CORMIER Y: Airborne microflora in Quebec dairy farms: lack of effect of bacterial hay preservatives. *Am Ind Hyg Assoc J* 1999; 60: 89-95
5. DEPLOEY JJ, FERGUS CL: Growth and sporulation of thermophilic fungi and actinomycetes in O<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> atmospheres. *Mycologia* 1975; 67: 780-797
6. FENSTENSTEIN GN, LACEY J, SKINNER FA, et al: Self-heating of hay and grain in Dewar flasks and the development of farmer's lung hay antigens. *Journal of General Microbiology* 1965; 41: 389-407
7. GREGORY PH, LACEY ME, FENSTENSTEIN GN, SKINNER FA: Microbial and biochemical changes during the moulding of hay. *Journal of General Microbiology* 1963; 33: 147-174
8. KORN-WEINDISH F, KEMPF A, GRUND E, et al: Transfer of *Faenia rectivirgula* Kurup and Agre 1983 to genus *Saccharopolyspora* Lacey and Goodfellow 1975, elevation of *saccharopolyspora hirsuta* subsp. *taberi* Labeda 1987 to species level, and amended description of genus *Saccharopolyspora*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1989; 39: 430-441
9. LACEY J: Nocardioform Actinomycetes, Genus *Faenia*. In Stanley T Williams, M. Elisabeth Sharpe, John G: *Holt Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (ed Hensyl WR). Baltimore: Williams & Wilkins, 1989; 4: 2389
10. LACEY J, DURKIEWICZ J: Isolation of actinomycetes and fungi from mouldy hay using a sedimentation chamber. *Journal of Applied Bacteriology* 1976; 41: 315-319
11. LOZZI R, QUARONI S, PETROLINI B: Segnalazione della presenza in Italia di *Micropolyspora Faeni* in prodotti affienati. *Giornale Italiano Malattie del Torace* 1987; 41: 159-161
12. PETROLINI B, QUARONI S, SARDI P: Actinomiceti responsabili del "farmer's lung disease": indagini su ceppi di *faenia rectivirgula* isolati da prodotti affienati. *Atti 1° Congresso Nazionale S.I.M.U.A.* Milano 13-15 settembre 1990: 181-184
13. RANALLI G, GRAZIA L, ROGGERI A: The influence of hay-packing techniques on the presence of *Saccharopolyspora Rectivirgula*. *Journal of Applied Microbiology* 1999; 87: 359-365
14. REIJULA KE: Two bacteria causing Farmer's Lung: fine structure of *Thermoactinomyces vulgaris* and *Saccharopolyspora rectivirgula*. *Mycopathologia* 1993; 121: 143-147
15. SAIA B, MASTRANGELO G, MARCER G, et al: Prevalence and risk factors of chronic respiratory disease in a farming population. *Med Lav* 1984; 75: 101-109
16. SKERMAN VBD, MCGOWAN V, SNEATH PHA: Approved list of bacterial names. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1980; 30: 225-420

RINGRAZIAMENTI: *Un sincero ringraziamento a tutti gli operatori dei SPSAL che hanno fornito un fattivo contributo all'espletamento delle indagini, al dr. Claudio Arcari per il supporto statistico, al professor Luigi Grazia per la consulenza microbiologica, ai colleghi Veterinari del Servizio di Medicina Veterinaria per la collaborazione prestata e al sig. Loris Caraffi, abilissimo saldatore, che, costruendola per noi, ci ha consentito di disporre della Camera di Sedimentazione, indispensabile strumento per le nostre indagini*

# Esposizione a solventi organici volatili in un gruppo di falegnamerie artigiane

G. MISCETTI, P. GAROFANI., P. BODO, A. MENCARELLI, A. BALLERANI, A. CEPPITELLI, R. ANGELONI, V. PECCETTI\*

Servizio di Prevenzione e Sicurezza nei Luoghi di Lavoro, Distretto Assisano, ASL 2 Perugia

\* ASL Arezzo

## KEY WORDS

Solvents; wood; carpentry

## SUMMARY

«*Exposure to volatile organic solvents in a group of small carpentry enterprises*». **Background:** *The wide use of volatile organic solvent-based products in wood carpentry and the possible effects of long-term exposure to low dose mixtures of these solvents prompted an investigation in a group of small enterprises.* **Objectives:** *The investigation aimed at estimating risk in wood carpentry work via assessment of exposure.* **Methods:** *Exposure to solvents was studied in a group of 13 enterprises (selected from a group of 52), via personal samplings, both active and passive. The solvents to be examined were selected on the basis of the information contained in the technical-toxicity sheets of the products used in these factories.* **Results:** *The results show an average exposure generally within the TLV-TWA recommended by the various industrial hygiene associations. However, considering the wide variability of the concentration values observed, the possibility that these limits might be exceeded in the long term cannot be excluded. Comparison of the results of active and passive samplings, showed a substantial similarity of the two systems, with evident advantages of the passive system, as far as ease of use, workers' acceptance and costs are concerned.* **Conclusions:** *The results of this study can be a useful reference for all those (employers, occupational physicians, technicians, workers' representatives) who are required to take preventive measures especially in cases where environmental investigations are hindered by technical difficulties or are not regularly used in evaluation systems.*

## RIASSUNTO

*E' stata studiata l'esposizione a solventi in un gruppo di 13 aziende, estratte da una popolazione di 52 falegnamerie artigiane, effettuando campionamenti personali sia attivi che passivi. Attraverso le informazioni desunte dalle schede tecnico-tossicologiche dei prodotti utilizzati, sono stati individuati i singoli solventi da studiare. I risultati ottenuti evidenziano una condizione espositiva media generalmente contenuta entro i TLV-TWA proposti dalle associazioni igienistiche. Tuttavia, in virtù dell'estrema variabilità riscontrata tra i singoli valori di concentrazione, non si può escludere la possibilità di superamento di detti limiti nel lungo periodo. La stessa tendenza si è evidenziata nel confronto con i valori limite consigliati per esposizioni a miscele di solventi (indice miscela). Dal confronto tra i due sistemi di campionamento, attivo e passivo, emerge inoltre una sostanziale sovrapponibilità dei due metodi di misura, con indubbi vantaggi di semplicità d'uso, tollerabilità del lavoratore, nonché di costi del campionamento passivo rispetto all'attivo. I risultati di tale studio possono costituire un utile punto di riferimento per quanti (Datori di Lavoro, Medici Competenti, Tecnici, Rappresentanti dei Lavoratori, ecc.) siano chiamati a svolgere azioni preventive e soprattutto nei casi in cui l'effettuazione di indagini metrico ambientali sia ostacolata da difficoltà tecniche o non venga comunque privilegiata quale strumento da utilizzare nel percorso valutativo.*

Pervenuto il 20.11.2001 - Accettato il 28.9.2002

Corrispondenza: Dott. Giorgio Miscetti, Servizio Prevenzione e Sicurezza Ambienti di Lavoro, ASL 2 Perugia, Via Ugo Foscolo 8 - 06083 Bastia Umbra (PG)

## INTRODUZIONE

E' ampiamente documentato come nella lavorazione del legno vengano utilizzati in larga misura (in forma di pitture, catalizzatori, diluenti, solventi, fondi, induritori, collanti ed altro ancora) solventi organici volatili, costituiti soprattutto da idrocarburi alifatici (alcoli, esteri, eteri, aldeidi, ...) ed aromatici (toluene, xilene, impurità di benzene, ...), anche alogenati, in molti casi dotati di effetti irritanti o allergizzanti, acuti e cronici, per l'apparato respiratorio, le mucose e la pelle (3, 7, 13). Gran parte di tali sostanze possiedono anche effetti epato, nefro, emato e neurotossici (1, 11, 13) ed alcune di loro sono anche classificate dalla IARC ai fini di cancerogenicità (Benzene 1A, Stirene 2B, Formaldeide 2A, Dicloropropano 3, Xilene 3, Toluene 3) (10). Sono inoltre tuttora oggetto di studio i possibili effetti a lungo termine per esposizione a basse dosi di miscele dei solventi in questione. Evento, quest'ultimo, molto frequente tra i lavoratori del settore e che rende particolarmente complessa l'interpretazione ai fini preventivi dei dati ambientali rilevati sul campo, soprattutto per le complesse interazioni che possono stabilirsi tra i diversi composti in causa (1, 9).

In relazione a quanto sopra si è ritenuto interessante attivare una indagine ambientale in un gruppo di falegnamerie artigiane di seconda lavorazione del legno al fine di pervenire, attraverso valutazioni metrico-espositive, ad una stima della condizione di rischio da solventi organici vigente nelle imprese selezionate, intese come insieme produttivo omogeneo. Il tutto anche alla luce delle grandi difficoltà che le aziende artigiane, soprattutto se di piccole dimensioni, possono incontrare nell'affrontare un passo preventivo così complesso come la valutazione del rischio da agenti chimici; difficoltà legate alla incostanza dei cicli tecnologici, alla mutabilità della condizione ambientale (spazi, mezzi di bonifica, attrezzature, ...) e della organizzazione del lavoro, ai comportamenti degli addetti ed altro ancora. Fattori questi che complicano notevolmente lo studio dell'esposizione dei lavoratori e che, unitamente ad un atteggiamento culturale non sempre favorevole all'analisi metrico-ambientale del luogo di lavoro, possono ostacolare fortemente l'affermazione

della valutazione del rischio quale adempimento cardine dell'azione preventiva. Scopo ultimo dell'indagine, quindi, è anche quello di fornire alle imprese ed ai tecnici del settore un contributo conoscitivo da utilizzare nell'attuazione dei diversi adempimenti previsti dal D.lgs. 626/94 ed in primis di quelli di cui all'art. 4.

## METODI

L'indagine ha riguardato 13 aziende, estratte da una popolazione di 52 falegnamerie artigiane con dipendenti, per un totale di 152 lavoratori, di cui 21 addetti, più o meno costantemente, a mansioni di verniciatura, ed è stata preceduta da sopralluogo preliminare durante il quale sono state raccolte informazioni circa i prodotti utilizzati (in particolare pitture e collanti).

In base alle informazioni desunte dalle schede tecnico-tossicologiche acquisite, sono stati ricercati i seguenti composti: acetone, MEK, etilacetato, dicloropropano, toluene, isobutilacetato, n-butilacetato, alcol n-butilico, xilene, stirene, metilisobutilchetone, diclorometano. Nelle aziende identificate sono stati effettuati 35 campionamenti personali di tipo attivo e 59 campionamenti personali di tipo passivo, utilizzando fiale a carbone attivo, rispettivamente, di tipo Jumbo e di tipo Orsa (14). Carbone attivo che, in relazione alle caratteristiche chimiche e di polarità dei composti citati, ai tempi di campionamento adottati ed alle indicazioni di letteratura (8, 12, 14), è stato ritenuto un substrato certamente idoneo al campionamento dell'insieme degli idrocarburi ricercati, pur in presenza di gradienti di affinità per le varie sostanze.

I campionamenti personali attivi hanno avuto una durata media di 6,82 ore (deviazione standard=0,7) i campionamenti personali passivi di 6,97 ore (deviazione standard=0,6). Tutti i campionamenti hanno comunque avuto una durata tale da risultare rappresentativi della condizione di maggior esposizione all'interno del turno di lavoro (15). Successivamente sull'intera popolazione dei campionamenti personali, attivi e passivi, sono stati elaborati i seguenti parametri: medie aritmetiche, espresse come media dei valori medi di ogni singo-

la azienda, e relativi limiti fiduciali superiori al 95%, deviazioni standard e medie geometriche (6). Allo scopo di avere un termine di riferimento con cui confrontare tendenze medie e variabilità dei livelli di esposizione, si è quindi proceduto ad un confronto con i TLV-TWA proposti dall'ACGIH (2), utilizzando anche l'OTL Test con vincolo probabilistico del 95%.

Per valutare le condizioni di lavoro anche in riferimento alla esposizione contemporanea a più solventi, affini da un punto di vista tossicologico (idrocarburi), sono stati inoltre calcolati gli indici miscela, secondo la procedura definita dall'ACGIH (TLV per miscele); indici rappresentativi del rischio legato all'effetto combinato delle diverse sostanze nocive.

Inoltre per verificare la sovrapposibilità dei risultati ottenuti con i diversi metodi di prelievo, i valori medi rilevati con campionamento passivo sono stati confrontati con quelli del campionamento attivo, attraverso il test del t di Student, dopo trasformazione logaritmica dei dati originari. Ciò sia per campioni indipendenti che, in prelievi appaiati, per campioni non indipendenti; in quest'ultimo caso è stata studiata anche la relativa correlazione attraverso il calcolo del Coefficiente di Pearson.

Infine per poter evidenziare eventuali gradienti di inquinamento, per alcuni solventi (acetone, MEK, etilacetato, dicloropropano, toluene, isobutilacetato, n-butilacetato, xilene) sono stati raffrontati i valori di esposizione dei lavoratori suddividendo le aziende in 2 gruppi omogenei e cioè: aziende con operazioni di verniciatura costantemente attive ed aziende con operazioni di verniciatura saltuaria. Anche in questo caso alle medie aritmetiche ottenute nei due gruppi è stato applicato il test del t di Student, dopo trasformazione logaritmica dei dati.

## RISULTATI

Nelle tabelle 1 e 2 viene rispettivamente illustrata la distribuzione delle aziende per numero di addetti e per tipo di verniciatura praticata, considerando sia la frequenza delle operazioni che il sistema di abbattimento utilizzato.

Le tabelle 3 e 4 descrivono, per ogni sostanza, i valori di esposizione medi rilevati rispettivamente tramite campionamenti passivi ed attivi.

In tabella 5 è riportato il risultato del confronto tra i valori medi dei campionamenti passivi e attivi, per campioni indipendenti, ed in tabella 6 per campioni non indipendenti, in quest'ultimo caso rilevando anche il grado di correlazione.

La tabella 7 mostra i risultati del confronto tra i valori medi di esposizione, ottenuti con campionamento attivo e passivo, rilevati nei due gruppi omogenei di aziende identificati ed i relativi confronti statistici.

I grafici 1 e 2 descrivono l'andamento degli "indici miscela" calcolati per campionamenti sia passivi che attivi.

**Tabella 1** - Distribuzione falegnerie per numero di dipendenti

Classe	N. addetti	N. falegnerie
1	1-10	7
2	11-20	4
3	>20	2

**Tabella 2** - Distribuzione falegnerie per frequenza e tipo di verniciatura

Frequenza e tipo di verniciatura	N. falegnerie
Tutti i giorni, continuativamente Cabina a velo d'acqua	2
Tutti i giorni, saltuariamente Cabina a velo d'acqua	3
Tutti i giorni, continuativamente Velo d'acqua "aperto"	1
1-2 volte/settimana Cabina a velo d'acqua	1
1-2 volte/settimana Velo d'acqua "aperto"	4
1-2 volte/settimana Aspirazione	2

**Tabella 3 - Concentrazione di solventi in campionamenti passivi**

Solvente TLV-TWA (mg/m <sup>3</sup> )	N#	N*	MA <sup>°</sup> (mg/m <sup>3</sup> )	DS	LFS95%	OTL	
						k	Giudizio
Acetone 1780 mg/m <sup>3</sup>	9	59	186	480	502	2,2	IND
MEK 590 mg/m <sup>3</sup>	9	59	27,6	50,3	60,7	1,6	IND
Esano 176 mg/m <sup>3</sup>	3	30	0,4	0,7	1,8	3,6	IND
Etilacetato 1440 mg/m <sup>3</sup>	8	53	67,6	151	175	3,2	ACC
Dicloropropano 347 mg/m <sup>3</sup>	9	59	9,5	13	18	1,9	IND
Toluene 188 mg/m <sup>3</sup>	9	59	48,4	82,3	102,5	1,9	IND
Isobutilacetato 713 mg/m <sup>3</sup>	9	59	12,8	17,6	24,3	2,9	IND
N-Butilacetato 713 mg/m <sup>3</sup>	9	59	15,5	24,5	31,7	2,1	IND
Alcool N-Butilico 76 mg/m <sup>3</sup> (TLV-STEL/C)	2	12	2,5	3,5	24,3	-	-
Xilene 434 mg/m <sup>3</sup>	9	59	45,6	60	85,1	2,7	IND
Stirene 213 mg/m <sup>3</sup>	3	30	92,7	160,3	423,5	1,3	IND
Metilisobutilchetone 205 mg/m <sup>3</sup>	7	46	8,2	57	9,8	2,8	IND
Diclorometano 174 mg/m <sup>3</sup>	4	16	12,3	17,6	36,1	2,2	IND

\* Numero osservazioni; # Numero di aziende esplorate; ° Media aritmetica; OTL Test=*One sided tolerance limit test*; IND=Condizione di indecisione; ACC=Condizione di accettabilità

**Tabella 4 - Concentrazione di solventi in campionamenti attivi**

Solvente TLV-TWA (mg/m <sup>3</sup> )	N#	N*	MA <sup>°</sup> (mg/m <sup>3</sup> )	DS	LFS95%	OTL	
						k	Giudizio
Acetone 1780 mg/m <sup>3</sup>	7	35	12,3	9,8	20,1	7,5	ACC
MEK 590 mg/m <sup>3</sup>	7	35	8,2	4,4	11,7	7,6	ACC
Esano 176 mg/m <sup>3</sup>	5	24	0,1	0,1	0,2	5,6	ACC
Etilacetato 1440 mg/m <sup>3</sup>	7	35	5,8	6,5	10,9	6,0	ACC
Dicloropropano 347 mg/m <sup>3</sup>	7	35	2,4	3,3	5,0	3,8	ACC
Toluene 188 mg/m <sup>3</sup>	7	35	11,2	6	15,9	6,4	ACC
Isobutilacetato 713 mg/m <sup>3</sup>	7	35	9,6	10,2	17,7	2,9	IND
N-Butilacetato 713 mg/m <sup>3</sup>	7	35	8,6	5,4	12,8	7,1	ACC
Alcool n-butilico 76 mg/m <sup>3</sup> (TLV-STEL/C)	4	16	0,9	1,6	3,1	2,6	IND
Xilene 434 mg/m <sup>3</sup>	7	35	18,1	9,1	25,3	9,1	ACC
Stirene 213 mg/m <sup>3</sup>	3	17	0,7	1,2	3,2	3,2	IND
Metilisobutilchetone 205 mg/m <sup>3</sup>	5	28	7,4	15,7	24,1	2,2	IND

\* Numero osservazioni; # Numero di aziende esplorate; ° Media aritmetica; OTL Test=*One sided tolerance limit test*; IND=Condizione di indecisione; ACC=Condizione di accettabilità

**Tabella 5** - Confronto tra medie per campioni indipendenti (test "t di Student" su logaritmi dei valori): campionamenti passivi vs campionamenti attivi

Solvente	CP (59)			CA (35)			t di Student (p)
	MA	DS	MG	MA	DS	MG	
Acetone	471	1477	15	13,6	18,5	5,3	n.s.
MEK	16	31	1	8,2	14,9	2,1	n.s.
Etilacetato	156	642	1,4	5,8	12,4	1,4	n.s.
Dicloropropano	12,2	30,4	0,3	2,2	3,9	0,3	n.s.
Toluene	95	350	12,3	10,6	11,3	6,2	n.s.
Isobutilacetato	17,7	33,5	1,4	8,4	11,1	1,7	n.s.
N-Butilacetato	22,6	87	0,8	9,1	13,4	3,4	n.s.
Xilene	55	168	8,7	17,6	22	8,2	n.s.

( )=numero osservazioni; MA=media aritmetica; DS=deviazione standard; MG=media geometrica

**Tabella 6** - Confronto tra medie per campioni non indipendenti (test "t di Student" su logaritmi dei valori): campionamenti passivi vs campionamenti attivi

Solvente	CP (35)			CA (35)			Correlazione #		t di Student (p)
	MA	DS	MG	MA	DS	MG	(r)	(p)	
Acetone	21	20,5	7,8	14,2	18,8	5,5	0,5	<0,01	n.s.
MEK	11,7	16,5	0,7	8,2	15	1,9	0,3	n.s.	n.s.
Etilacetato	47,6	214	0,5	6,2	12,9	1,5	0,5	<0,01	n.s.
Dicloropropano	8,4	18	0,3	2,2	3,9	0,3	0,7	<0,001	n.s.
Toluene	37,8	134	8,1	10,6	11,4	6,2	0,7	<0,001	n.s.
Isobutilacetato	12,8	22,6	1,1	8,4	11,1	1,7	1	<0,001	n.s.
N-Butilacetato	10,5	22	0,6	9,1	13,4	3,5	0,8	<0,001	<0,001
Xilene	24,6	30,6	9,1	17,6	22	8,2	0,5	<0,01	n.s.

( )=numero osservazioni; MA=media aritmetica; DS=deviazione standard; MG=media geometrica; # Coefficiente di Correlazione di Pearson (r) e sua significatività (p) dopo trasformazione logaritmica dei valori originari

**Tabella 7** - Confronto tra medie (campionamenti attivi + campionamenti passivi): verniciatura saltuaria (11) vs verniciatura costante (2)

Solvente	A			B			t di Student (p)
	MA	DS	MG	MA	DS	MG	
Acetone	23,3	27,7	6,8	590	1656	15,5	n.s.
MEK	14,8	30,9	1,3	11,3	21,4	0,8	n.s.
Etilacetato	9,3	15,3	0,7	180	688	2,7	n.s.
Dicloropropano	7,8	12,5	0,5	9,2	33	0,2	n.s.
Toluene	21	21,5	10,6	108	396	8,4	n.s.
Isobutilacetato	14,2	21	2,4	14,3	33	0,9	n.s.
N-Butilacetato	10,5	19	0,7	25	97	2,5	n.s.
Xilene	39,6	100	6,5	43	164	11,4	n.s.

(A)=falegnamerie con verniciatura saltuaria (48 osservazioni); (B)=falegnamerie con verniciatura costantemente attiva (46 osservazioni); MA=media aritmetica; DS=deviazione standard; MG=media geometrica

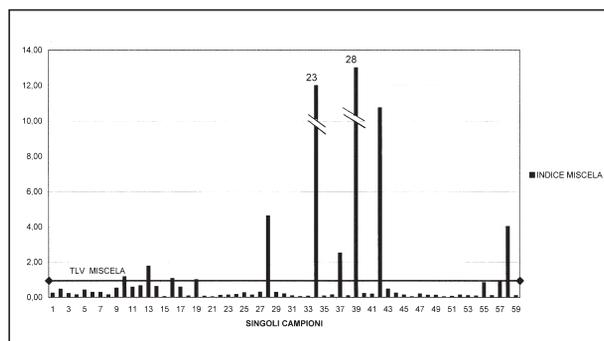


Grafico 1 - Indice miscela (campionamenti passivi)

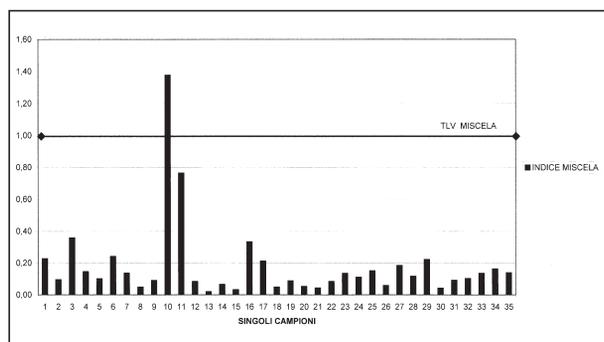


Grafico 2 - Indice miscela (campionamenti attivi)

## DISCUSSIONE

Per quanto riguarda il campionamento personale, le concentrazioni delle sostanze studiate, sia in termini di media che di LFS95%, sono risultate piuttosto basse ed ampiamente contenute nei rispettivi TLV-TWA (ACGIH).

Solo nel caso dello stirene, campionamento passivo, il LFS95% depono per una possibilità di superamento del valore limite proposto. Tuttavia e soprattutto in relazione all'ampio campo di variazione dei valori riscontrati, evento ben testimoniato dall'andamento delle DS, l'OTL Test si attesta sulla fascia di indecisione.

Tale fenomeno, in virtù di una variabilità meno accentuata, non caratterizza i campionamenti attivi deponenti per condizioni di prevalente accettabilità dei livelli di esposizione.

Nel comparto studiato, quindi, si evidenzia una condizione di esposizione ampiamente contenuta entro i TLV-TWA proposti dalle associazioni igienistiche, pur in presenza di un OTL Test che, per alcuni solventi ed in ragione della forte variabilità riscontrata, esprime qualche incertezza probabilistica circa il superamento di detti limiti nel lungo periodo.

Per quanto riguarda il confronto tra i campionamenti passivi e attivi, le differenze medie sono risultate non statisticamente significative per i campioni indipendenti; lo stesso dicasi per i campioni appaiati, dove fa eccezione l'n-butilacetato. In quest'ultimo confronto il grado di correlazione tra i due tipi di campionamento appare sempre elevato e statisticamente significativo, tranne che per il MEK.

Il tutto conferma la sostanziale sovrapposibilità dei due metodi di misura, anche se in alcuni casi ed in relazione al tipo di solvente studiato emergono problemi di correlabilità, verosimilmente legati ad una diversa affinità dei singoli agenti chimici per il substrato contenuto nelle fiale di campionamento ed all'interferenza dovuta alle altre numerose variabili incontrollabili (fattori fisico-ambientali, movimenti dei lavoratori, oscillazioni produttive, ...) che sempre intervengono durante i campionamenti sul campo.

Relativamente agli indici miscela, in alcuni campioni si osserva un superamento dell'unità, quale limite di riferimento; ciò avviene con maggior frequenza nei campionamenti passivi (10/59) che in quelli attivi (1/35), a dimostrazione del verificarsi di occasionali situazioni espositive potenzialmente lesive per il lavoratore, sottoposto all'effetto combinato di più sostanze tossiche.

In talune determinazioni (soprattutto tra i campionamenti passivi) si osserva infatti un valore largamente al di sopra dell'unità (TLV miscela=23, 28) e ciò soprattutto in virtù delle forti escursioni di alcuni degli idrocarburi componenti le miscele di solventi.

Non si sono infine apprezzate differenze statisticamente significative nelle esposizioni medie rilevate nei diversi sottogruppi omogenei di aziende suddivise in base al tipo e alla frequenza delle operazioni di verniciatura.

## CONCLUSIONI

I risultati del nostro studio consentono di caratterizzare i livelli di esposizione vigenti all'interno delle aziende studiate, sia in termini di tendenze medie che di variabilità degli stessi; il tutto configurando una condizione di inquinamento globalmente contenuto, ma tuttavia meritevole di attenzione preventiva.

In tal senso depongono anche i confronti con i TLV-TWA proposti e ciò pur in presenza di una variabilità dei livelli di esposizione che, per alcune sostanze e nel lungo periodo, impone qualche riserva circa una seppur probabilisticamente remota ipotesi di superamento dei limiti previsti. Evenienza quest'ultima che propone la necessità di raccogliere informazioni aggiuntive e seriate nel tempo, qualora si intenda esplorare in dettaglio la singola impresa, confrontandosi con i valori limite indicati dall'ACGIH o da altre fonti igienistiche e normative.

Stesse considerazioni scaturiscono dall'esame dell'andamento dell'indice per miscele, esemplificativo di una esposizione che, soprattutto nel lungo periodo, profila una seppur bassa possibilità di effetti biologici, anche tossici, sui lavoratori. Condizione questa che, soprattutto in relazione alle ancora scarse conoscenze sui fenomeni connessi alla esposizione prolungata a basse dosi di xenobiotici, fenomeni che possono andare dalla ormesi alla produzione di sinergie tossiche di vario genere (modello additivo, moltiplicativo, esponenziale, ...) (4), impone la massima attenzione valutativa e preventiva.

Una attenzione che deve esplicitarsi prioritariamente in termini di continuo intervento di miglioramento tecnico impiantistico, di controllo ambientale, di informazione e formazione degli addetti, di controllo sanitario e di protezione individuale, prevedendo anche una continua integrazione tra le diverse misure di prevenzione.

Sul piano del percorso di valutazione la nostra esperienza consente di affermare come il controllo dell'esposizione dei lavoratori, e quindi la metrica dell'agente tossico, costituisca certamente uno strumento di grande utilità per valutare correttamente

la condizione di rischio e ciò anche nella piccola impresa. In tal senso e come già evidenziato da altri, anche in questo settore il campionamento passivo, peraltro in continua evoluzione sul versante delle tecnologie (5), a parità di contenuti informativi, sembra offrire, rispetto al campionamento attivo, indubbi vantaggi in termini di semplicità d'uso delle attrezzature, tollerabilità da parte del lavoratore, nonché di costi economici. Riteniamo che i risultati dello studio possano costituire un utile supporto conoscitivo per quanti (Datori di Lavoro, Medici Competenti ed altri Tecnici, Rappresentanti dei Lavoratori ed altri soggetti della prevenzione) siano chiamati a confrontarsi sul campo con le problematiche descritte. Ciò non solo attraverso la produzione di riferimenti utili nell'allestimento di augurabili controlli della esposizione dei lavoratori (metodologia da adottare, numero e durata dei prelievi da effettuare, gruppi omogenei da monitorare, aspetti di variabilità da affrontare, definizione di eventuali inferenze statistiche, ...), ma anche nei casi in cui l'effettuazione di indagini metrico ambientali sia ostacolata da difficoltà tecniche insuperabili o non venga comunque privilegiata quale strumento da utilizzare nel percorso valutativo.

## BIBLIOGRAFIA

1. ALESSIO L, APOSTOLI P, CRIPPA M: Esposizioni multiple. Atti 56° Congresso SIMLII. Venezia 20-23 Ottobre 1993; 1: 65-94
2. AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS: *Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices*. Cincinnati (OH): ACGIH, 2000
3. ARFAIOLI C, BAVAZZANO P, CARNEVALE F, e coll: I solventi nei luoghi di lavoro. *Rassegna Med Lav* 1988; 8 (suppl)
4. CALABRESE EJ, BALDWIN LA: U shaped dose-responses in biology, toxicology and public health. *Folia Med* 2000; 71: 7-19
5. COCHEO V: Gas e vapori: il campionario passivo a simmetria radiale. In Atti "Risch '96": *Il rischio chimico negli ambienti di lavoro*. Modena 10-12 Ottobre 1996
6. COLTON T: *Statistica in Medicina*. Padova: Piccin Editore. Ristampa, 1991
7. GIAMBATTISTELLI S, SALERNO A: I solventi organici nelle applicazioni industriali: caratterizzazione, campi

- d'impiego e modalità d'uso ai fini della definizione dei potenziali rischi igienico-ambientali. Fogli d'informazione ISPESL 1995; 1: 63-70
8. HIROHIKO U, SHIRO T, SHUNEN I, et al: Occupational exposure to solvent mixtures: effects on health and metabolism. *Occup Environ Med* 1994; 51: 523-529
  9. IAVICOLI I, CASTELLANI G, MASCI O: Esposizione multipla a sostanze tossiche e patologia cancerogena, un caso. *Folia Med* 2000; 71: 517-523
  10. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER: *List of IARC Evaluations*. Lyon: IARC, June 1995
  11. MAZZELLA DI BOSCO M: Esposizione a solventi e patologia renale. *Arch Scienze Lav* 1986; 2: 221-228
  12. MEI-YUAN H, CHUI J, YU-TANG L, et al: Exposure of workers to a mixture of toluene and xylenes. *J Metabolism Occup Environ Med* 1994; 51: 42-46
  13. PAOLETTI A, CASTELLINO N: Rischi, patologie e prevenzione nelle lavorazioni artigiane del legno e del mobile. In *Atti del 50° Congresso Nazionale SIMLII*. Roma: Monduzzi Editore, 21-24 ottobre 1987
  14. POZZOLI L, MAUGERI U: *Igiene Industriale: campionamento gas, vapori, polveri*. Pavia: La Goliardica Pavese Editrice, 1986
  15. UNI EN 689: *Guida alla valutazione dell'esposizione per inalazione a composti chimici ai fini del confronto con i valori limite e strategia di misurazione*. Giugno, 1997

# *Audit* della sorveglianza sanitaria negli esposti a polvere di legno

LILIANA BEVILACQUA, A. SACCO\*, N. MAGNAVITA\*\*

Responsabile Pres.S.A.L. RM-F, Civitavecchia (Con la collaborazione dei Dirigenti Medici dei Distretti della RM-F: Giorgio Becchetti, Andrea Capri, Paolo Caspani, Gianni Giunta, Franco Lancia, Maria Presto)

\* U.O. Pre.S.A.L., ASL Frosinone

\*\* Istituto di Medicina del Lavoro, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

## KEY WORDS

Wood dust; audit; occupational carcinogen; nasal polyposis; nose cancer

## SUMMARY

«*Audit of medical surveillance in wood dust exposure*». **Background:** *Medical surveillance of wood-dust exposed workers has been compulsory in Italy since 1956. The Law 66 of 25/2/2000, as a consequence of the EU Directive regarding occupational carcinogenic and mutagenic agents, has recently enforced preventive measures for wood dust exposure.* **Objectives:** *The Local Health Unit RM-F, Civitavecchia, has developed a Workplace Vigilance Plan, specifically aimed at the enhancement of preventive measures against carcinogens. The Plan includes the "audit" of the Occupational Health physicians responsible for workers' surveillance.* **Methods:** *Physicians are invited to revise the quality of their work and to consider the inclusion of specific occupational health measures in the health plan, such as rhinoscopic examination.* **Results:** *In many cases, this action leads to the revision of the Security Document, the improvement of programs and protocols, and the enhancement of training activities. In a few cases, medical surveillance allowed diagnosis of wood dust-related occupational diseases, such as nasal polyposis and adenocarcinoma of paranasal sinuses.* **Conclusions:** *Audit in occupational medicine is a feasible and efficient tool to improve quality of health care.*

## RIASSUNTO

Il D.lgs. 66 del 25/2/00 nel recepire le Direttive europee sugli agenti cancerogeni e mutageni, dispone misure di prevenzione per il benzene, il cloruro di vinile e la polvere di legno duro. L'Area Sanitaria del PRESAL dell'ASL RM/F di Civitavecchia ha messo in opera un Piano di Vigilanza specificamente rivolto al controllo del rischio da cancerogeni sui luoghi di lavoro nel comparto del legno. Elemento qualificante di tale intervento è l'audit dei medici competenti. I medici competenti sono invitati ad effettuare una verifica e revisione del proprio lavoro, con riferi-

Pervenuto il 8.5.2002 - Accettato il 4.9.2002

Corrispondenza: Nicola Magnavita, Istituto di Medicina del Lavoro, Università Cattolica del Sacro Cuore, Largo Gemelli 8, 00168 Roma  
Tel. 347/3300367 - Fax 06/3054481 - e-mail: nmagnavita@rm.unicatt.it

Il presente lavoro è stato parzialmente finanziato con Fondi di Ateneo dell'Università Cattolica del Sacro Cuore.

*I dati preliminari del presente lavoro sono stati esposti nella III Giornata Romana di Medicina del Lavoro 2001. (Liliana Bevilacqua, Esperienze dall'ASL RMF in tema di vigilanza sui cancerogeni. Audit dei medici competenti del comparto legno. Sanità e Sicurezza 2001; 1: 177-179)*

*mento a parametri di qualità riconosciuti. In questo ambito, viene proposta l'inclusione nei protocolli sanitari di esami specifici, come ad esempio la visita specialistica ORL con rinoscopia. L'intervento ha determinato in molti casi l'aggiornamento e integrazione del Documento di Valutazione dei Rischi, il miglioramento di procedure e programmi di sorveglianza, lo sviluppo di attività formative e informative. In alcuni casi, il miglioramento del livello di sorveglianza sanitaria ha portato all'identificazione di malattie professionali derivanti dall'esposizione cronica a polvere di legno, quali la poliposi e l'adenocarcinoma delle fosse nasali.*

## INTRODUZIONE

Il D.lgs. 25/2/2000 n. 66, in materia di protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da esposizione ad agenti cancerogeni o mutageni durante il lavoro (benzene, CVM, polveri di legno), consente l'applicazione di quanto disposto in materia di cancerogeni dal D.lgs. 626/94, segnatamente per quanto riguarda le polveri di legno duro.

Dai dati INAIL risulta che la percentuale dei tumori da polveri di legno riconosciuti dall'Istituto nel quinquennio 1994-1999 è di circa il 5,8% del totale dei tumori professionali (circa 70 tumori su 1228); essi sono tutti localizzati nelle fosse nasali (17). Non è improbabile che una quota significativa di patologia neoplastica del naso e delle fosse nasali di natura professionale sfugga alla diagnosi. L'ASL RM-F di Civitavecchia si è proposta un piano di applicazione del D.lgs. 66/00, nel cui ambito è stato individuato all'interno del territorio il comparto a rischio: lavorazione del legno (lavorazione di legno duro ed altri tipi di legni).

## METODI

La determinazione del comparto a rischio è stata ottenuta sulla base di:

- un'analisi della struttura produttiva dell'area territoriale, che si estende dal litorale romano alla zona nord-occidentale della provincia, comprendendo al suo interno numerose imprese artigianali e piccole industrie del legno;
- il recepimento delle direttive regionali in merito alla priorità da assegnare all'esame del rischio antinfortunistico nelle falegnamerie.

Lo strumento base della vigilanza è una scheda operativa di comparto, alla cui elaborazione hanno

concorso tutte le aree funzionali del Servizio di vigilanza (area medica, anti-infortunistica, igiene industriale) nel corso di una serie di incontri. La scheda operativa è stata inizialmente testata in un campione ridotto di aziende e successivamente applicata su tutto il territorio.

La scheda operativa è costituita da quattro sezioni, rispettivamente riguardanti: la tenuta delle documentazioni obbligatorie; la valutazione ambientale; la sicurezza delle macchine; la sorveglianza sanitaria.

Le schede hanno costituito il supporto per l'attività di vigilanza, e sono state quindi analizzate sia a fini di vigilanza, sia come stimolo per il miglioramento delle attività di formazione, informazione e sorveglianza.

I medici competenti sono stati invitati a partecipare ad un colloquio per la verifica della qualità dell'intervento da loro effettuato per poi confrontare tale intervento con gli standard (*audit* di processo), secondo una metodologia da tempo impiegata in ambito aziendale (9-11, 28) e più di recente in medicina del lavoro (2, 3, 8, 14, 24, 32, 35). In campo sanitario, il termine *audit* è usato per descrivere procedure (basate su specifici criteri) di sistematica revisione delle attività sanitarie, condotte da colleghi medici (31), che possono essere interni o esterni all'unità. La verifica può riguardare tanto la struttura (*audit* di struttura), quanto i processi produttivi (*audit* di processo) e i prodotti (*audit* di prodotto). L'*audit* consiste nell'osservare i comportamenti e confrontarli con gli standard (20); ciò implica la necessità di definire a priori uno standard di riferimento. Lo scopo dell'*audit* è quello di porre i professionisti che vi partecipano nella condizione di migliorare la qualità della propria attività mediante una verifica critica di ciò che viene effettuato correntemente. Più in generale, l'*audit*, dalla pa-

rola latina *audire*, sentire, è un processo di consultazione, all'interno del quale datori di lavoro, lavoratori, medici del lavoro ed altri professionisti della salute sottopongono il proprio lavoro a sistematica revisione, al fine di migliorarne gli aspetti di criticità. L'*audit* dovrà dunque essere finalizzato al controllo della correttezza dei protocolli, della loro applicabilità e della loro reale applicazione, e non deve essere limitato alla sola verifica del formale rispetto delle norme. Ciò proprio perché i suoi obiettivi vanno oltre fini formalistici, ma sono orientati ad apportare benefici sul singolo lavoratore (incrementando gli standard di assistenza nel rispetto della segretezza dei dati clinici), sul datore di lavoro (incrementando l'efficacia e l'efficienza, e applicando specifici parametri clinici ed epidemiologici di qualità dell'*audit*), sul medico del lavoro, incrementando la qualità dei processi di lavoro.

Nella tabella 1 è esemplificato come si possa pervenire dalla evidenza scientifica ai criteri di *audit* che indicano la non adesione del professionista.

I colloqui di *audit* con i medici competenti sono avvenuti sulla base di una matrice strutturata relativa a dieci aree, attinenti alle risorse strutturali (2 aree) ed alle pratiche adottate (8 aree). I criteri per la definizione della matrice sono stati scelti sulla base dell'assunzione che essi fossero facilmente revisionabili da un osservatore esterno. Le risorse analizzate riguardavano: il livello di formazione e di aggiornamento del medico competente (possessione della specializzazione in medicina del lavoro, aggiornamento continuo in medicina) e la conoscen-

za dei rischi professionali specifici (partecipazione diretta all'elaborazione, o almeno conoscenza del documento di valutazione dei rischi). I processi, da valutare in riferimento alle buone pratiche di medicina del lavoro, riguardavano: l'aggiornamento delle informazioni ricevute (redazione del verbale di sopralluogo sui luoghi di lavoro, frequenza e completezza dei sopralluoghi); l'inserimento e l'approfondimento dell'anamnesi lavorativa nella cartella sanitaria e di rischio; la tutela della segretezza; l'esistenza di un protocollo sanitario preventivo e periodico; l'informazione e la formazione dei lavoratori sui rischi professionali; la politica relativa all'uso dei dispositivi di protezione individuale; l'analisi dei dati anonimi collettivi ricavati dalla sorveglianza sanitaria. Infine sono state esaminate specificamente le modalità di esecuzione, interpretazione ed analisi statistica della spirometria. I medici sono stati invitati a riflettere sulle procedure operative, su tipo e qualità degli strumenti usati, su frequenza e modalità delle tarature, sulle procedure adottate per l'esecuzione dei test, sull'uso dei valori di riferimento e sulla interpretazione dei risultati in termini individuali e collettivi.

In accordo con i principi del miglioramento continuo della qualità e della qualità totale, i processi e le risorse devono essere riconoscibili e documentabili; gli obiettivi delle attività devono essere noti e devono esseri indirizzati ad elementi sostanziali e significativi dei processi oggetto di revisione critica; il processo deve essere ripetibile dopo un certo intervallo di tempo e la sua ripetizione deve entrare nella pratica della prevenzione. In questa prima fa-

**Tabella 1** - Un esempio di verifica della qualità dell'intervento di sorveglianza sanitaria

Evidenza scientifica	Linea guida pratica	Criteri di <i>audit</i> che indicano la non adesione
Il controllo ORL periodico dei lavoratori esposti a polvere di legno è efficace nel <i>depistage</i> delle affezioni irritativo-neoplastiche del naso (*) e dei seni paranasali (6)	I lavoratori professionalmente esposti a polvere di legno devono essere sottoposti ad esame obiettivo ORL periodico	Pratiche mediche che non includono l'esame obiettivo ORL nel protocollo preventivo e periodico dei lavoratori esposti a polvere di legno

(\*) E' noto che la diagnosi precoce degli stati di displasia della mucosa nasale permette di evitare la progressione dell'alterazione verso forme neoplastiche attraverso la messa in atto di interventi di prevenzione secondaria (aumento dell'igiene nasale e allontanamento del lavoratore dal rischio). Tale evidenza è stata raccolta nel caso dei lavoratori professionalmente esposti a nickel (Boysen et al: Sci Total Environ 1994; 148: 311-318)

se dell'indagine non è stata richiesta alcuna documentazione scritta a conferma della qualità dichiarata da parte dei medici competenti, essendosi scelto di rimandare la verifica documentale al follow-up previsto per il prossimo anno.

## RISULTATI

Tra il 1° ottobre ed il 31 marzo 2002 l'indagine ha riguardato la totalità delle aziende del legno censite nel territorio dell'ASL RMF. Presso tali aziende venivano utilizzati in varia misura sia legni duri sia altri tipi di legno. Per l'individuazione del tipo di legno ci si è riferiti alla Monografia IARC n. 62<sup>1</sup>). Sono stati coinvolti complessivamente 47 medici competenti (7 operanti prevalentemente nel territorio di Civitavecchia, 7 nel territorio di Bracciano, 33 nel territorio di Rignano); di questi, 36 (76,6%) erano in possesso della specializzazione in medicina del lavoro.

L'*audit* dei medici competenti ha permesso di rilevare quanto segue.

### *Formazione*

Appena il 25,5% (12/47) dichiara di avere partecipato ad attività di formazione ed informazione dei lavoratori.

### *Conoscenza dei rischi*

Solo una minoranza di medici (12,7%) dispone di un documento di valutazione dei rischi; la maggioranza, operando in piccole aziende, ricava la conoscenza dei rischi dai sopralluoghi e dalle informazioni fornite direttamente dal datore di lavoro.

### *Verbale di sopralluogo*

Soltanto 26 su 47 redigono abitualmente un verbale di sopralluogo (55,3%).

### *Anamnesi lavorativa*

Solo il 72,3% dei medici competenti (34/47) inserisce abitualmente nelle cartelle sanitarie l'anamnesi lavorativa.

### *Riservatezza*

Nella maggior parte dei casi (55,3%) le procedure adottate per garantire la segretezza dei dati sanitari risultano insufficienti a giudizio degli stessi medici, per mancanza di un luogo chiuso in cui custodire i libretti sanitari, o per l'inosservanza dei principi di riservatezza nella trasmissione degli accertamenti sanitari.

### *Programma sanitario*

Il 68% dei medici ha comunicato per iscritto il programma sanitario prima dell'inizio della sorveglianza sanitaria.

### *Dispositivi di protezione*

Praticamente tutti i medici competenti prescrivono dispositivi per la prevenzione del rischio rumore (tappi e cuffie), o di altri rischi, ma meno della metà (40,4%) esprime questa indicazione sui certificati in modo chiaro, senza ricorrere a sigle non universalmente comprensibili ("d.p.i.") e verifica che il dispositivo prescritto sia effettivamente accessibile al lavoratore.

### *Dati anonimi collettivi*

Meno della metà (21/47 pari al 44,7%) fornisce regolarmente ai rappresentanti dei lavoratori ed al datore di lavoro i dati anonimi collettivi.

L'analisi delle modalità di esecuzione degli esami audiometrici e di quelli di funzionalità respiratoria ha messo in luce in tutti i casi scostamenti dalle procedure standardizzate indicate dalla SIMLII. Inoltre, in nessun caso i protocolli sanitari utilizzati per la sorveglianza sanitaria dei lavoratori esposti al rischio di inalazione di polveri di legno comprendevano un esame specialistico otorino-laringoiatrico con rinoscopia. I medici competenti hanno unanimemente osservato che tale esame avrebbe potuto rappresentare un valido strumento per l'identificazione precoce di patologie irritative croniche e/o neoplastiche a carico delle fosse nasali nei lavoratori con esposizione protratta.

In seguito all'*audit*, alcuni medici competenti hanno inserito l'esame ORL nei protocolli di sorveglianza sanitaria.

<sup>1</sup> Per l'individuazione del tipo di legno ci si è riferiti alla monografia IARC n. 62 "Wood Dust and Formaldehyde", IARC, Lione 1995

I primi dati disponibili dalla sorveglianza sanitaria effettuata secondo tale linea, spontaneamente segnalati da alcuni medici competenti, hanno già fornito, nella primissima fase di applicazione, risultati che confermano la validità della scelta operativa, e, in particolare, della introduzione, all'interno del protocollo sanitario preventivo e periodico, dell'esame mirato otorinolaringoiatrico. Infatti, in un caso è stato identificato un adenocarcinoma delle fosse nasali, in un artigiano con esposizione di lunga durata (>30 anni) a polvere di legno. In un altro caso si è osservata poliposi delle fosse nasali. Non è possibile al momento valutare quanti medici abbiano modificato le proprie procedure operative, né quanti lavoratori siano stati esaminati (o riesaminati) nel corso dell'*audit*. I risultati clinici indotti dall'esperienza qui documentata saranno valutabili solo nel medio periodo.

I medici competenti hanno convenuto sulla necessità di potenziare l'informazione dei lavoratori circa il corretto uso dei dispositivi di protezione individuale, in particolare quelli miranti alla prevenzione dei rischi da polvere, rumore e vernici.

I medici competenti si sono inoltre impegnati a svolgere un'azione di stimolo per il costante aggiornamento dei documenti di valutazione dei rischi (ove presenti) tramite la puntuale trasmissione delle osservazioni ricavate dai sopralluoghi in tutti i casi in cui le misure di protezione ambientale dovessero rivelarsi transitoriamente o stabilmente inefficaci.

L'organo di vigilanza si propone di effettuare un follow-up ad un anno dall'inizio dell'intervento mirato e di implementare, nel contempo, una strategia tendente alla riduzione della polverosità ambientale finalizzata al rispetto dei valori limite (<5 mg/m<sup>3</sup>) attraverso il controllo negli ambienti di lavoro; tale misura dovrebbe infatti garantire una significativa riduzione del rischio (4).

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La letteratura scientifica è concorde nel ritenere che la polvere di legno ha effetti irritativi, allergizzanti e cancerogeni per la mucosa del naso e dei seni paranasali. E' stato segnalato che l'esposizione professionale a polvere di legno determina sintomi

di ostruzione nasale, con una chiara relazione con la dose cui il lavoratore è esposto (30). E' noto da tempo il fatto che l'esposizione professionale a certi tipi di legno può causare rinite allergica (19) o asma bronchiale, e nei lavoratori del legno asmatici si osserva rinorrea e congestione nasale (33).

L'analisi degli studi sull'uomo, a carattere clinico (5, 7, 21, 25, 36) ed epidemiologico (1, 12, 23, 26, 29), ha indotto lo IARC ad affermare la cancerogenicità della polvere di legno (18), pur in assenza di sufficienti dati sperimentali che possano chiarire il meccanismo patogenetico. La posizione dello IARC ha trovato conferma epidemiologica in lavori più recenti (15). Non è ancora noto se l'agente eziologico delle neoplasie sia la polvere di legno come tale, o i pesticidi ed altri additivi del legno, anche se la maggiore incidenza di tumori in popolazioni che maneggiano legni non trattati farebbe propendere per la prima ipotesi (27). I tumori di più frequente riscontro sono gli adenocarcinomi; ma sono stati segnalati anche tumori rari come i neuroblastomi (22).

Nel nostro paese il legislatore ha inserito le malattie neoplastiche causate dalla polvere di legno (carcinoma delle cavità nasali e paranasali) nella nuova tabella delle malattie professionali dell'industria, per le lavorazioni che espongono all'azione delle polveri di legno (voce 57 del DPR 336/1994).

L'INAIL nel volume "Malattie professionali tabellate - elementi diagnostici" (16) considera tra gli organi bersaglio della polvere di legno (di legni esotici e non esotici) il naso ed i seni paranasali, segnalando il rischio di adenocarcinoma e carcinoma squamoso. Tra gli accertamenti indicati a fini preventivi, nello stesso volume viene indicata "una anamnesi accurata, specie quella lavorativa, esami clinici e esami strumentali (Rx cranio per naso e seni paranasali, rinfibroscopia, biopsia)". Lo studio diagnostico dei seni paranasali è importante, in quanto si tratta di neoplasie associate all'esposizione a polvere di legno di più difficile (e tardiva) diagnosi (6). Un protocollo simile, che prevede come esame di routine la rinoscopia e gli eventuali approfondimenti, è stato di recente proposto nel corso del Convegno Nazionale organizzato dalla Società Italiana di Medicina del Lavoro e Igiene Industriale su "Linee guida per la formazione conti-

nua e l'accreditamento del medico del lavoro. Sorveglianza sanitaria degli esposti a cancerogeni in ambiente di lavoro" svoltosi a Torino il 27-28 maggio 2002 (34).

Il D.lgs. 66/00 si configura dunque come un indispensabile elemento per la prevenzione del rischio professionale da cancerogeni. Il Servizio di Vigilanza della ASL RM-F ha scelto, tra le innumerevoli modalità attuative, quella che meglio sembra prestarsi ad un reale miglioramento dei livelli di sicurezza del lavoro, tramite un diretto stimolo alla verifica e revisione della qualità della sorveglianza sanitaria.

La metodologia dell'*audit* rappresenta uno stimolo alla formazione permanente dei medici competenti e consente di utilizzare al meglio l'effettiva che la diffusione capillare delle conoscenze in tema di prevenzione può avere sui lavoratori nel corso delle visite periodiche. Essa permette inoltre di implementare il corretto utilizzo delle linee-guida (13), spesso necessarie nell'ambito delle attività di medicina preventiva dei lavoratori e, se del caso, di modificare comportamenti ed abitudini sbagliati. Nel nostro caso, ad esempio, il processo di consultazione operato tra i medici competenti è stato in grado di divulgare l'evidenza scientifica della efficacia del controllo otorinolaringoiatrico dei lavoratori esposti a polvere di legno, le caratteristiche delle linee guida disponibili (che prevedono, nell'ambito dell'accertamento preventivo e periodico di tali lavoratori, il ricorso ad un esame ORL con rinoscopia) e, di conseguenza, l'adesione dei sanitari al protocollo medesimo (34).

La metodologia dell'*audit*, basata su un processo di consultazione e confronto tra pari, appare praticabile e vantaggiosa per favorire il miglioramento del livello qualitativo dei servizi di medicina del lavoro e per aumentarne progressivamente l'efficacia e l'efficienza. La procedura, che è volontaria, ma verificabile, induce i medici competenti ad una adesione unanime e convinta. Tramite questa formula il servizio di vigilanza può esercitare un forte effetto di stimolo sui servizi sanitari preventivi aziendali, e riservare gli interventi a carattere sanzionatorio a quei deprecabili e limitati casi in cui l'inefficienza del servizio determini una palese violazione delle norme di legge. Riteniamo auspicabile

una progressiva applicazione delle tecniche di *auditing* anche ad altri aspetti della sorveglianza sanitaria, ad esempio per verificare l'aderenza alle linee-guida che la nostra Società Scientifica ha prodotto o sta predisponendo da parte dei medici competenti, o per vagliare il loro atteggiamento verso taluni aspetti della medicina del lavoro di cruciale importanza anche sul piano etico, come la salvaguardia della riservatezza, la gestione dei lavoratori con malattie che potrebbero mettere in pericolo la salute degli altri, l'aggiornamento continuo e la competenza del medico competente, il diritto all'informazione dei lavoratori, gli accertamenti preventivi all'assunzione, l'analisi costo/benefici della sorveglianza sanitaria e molte altre questioni che sarebbe troppo lungo enumerare.

## BIBLIOGRAFIA

1. ACHESON ED, PIPPARD EC, WINTER PD: Mortality of English furniture makers. *Scand J Work Environ Health* 1984; 10: 211-217
2. AGIUS RM: Auditing occupational medicine. *Occup Med* 1999; 49: 261-264
3. AGIUS RM, LEE R, FLETCHER G, UTTLEY J: Quantitative methods in medical audit for OHS evaluation. In Menckel E, Westerholm P (eds): *Evaluation in Occupational Health Practice*. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1999: 53-66
4. BLOT WJ, CHOW WH, McLAUGHLIN JK: Wood dust and nasal cancer risk. A review of the evidence from North America. *J Occup Environ Med* 1997; 39: 148-156
5. CECCHI F, BUIATTI E, KRIEBEL D, et al: Adenocarcinoma of the nose and paranasal sinuses in shoemakers and woodworkers in the province of Florence, Italy (1963-77). *Br J Ind Med* 1980; 37: 222-225
6. DILHUYDY JM, LAGARDE P, ALLAL AS, et al: Ethmoidal cancers: a retrospective study of 22 cases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 25: 113-116
7. DUCLOS JC, DUBREUIL C, CONTASSOT JC, et al: Nasal ethmoid adenocarcinomas in woodworkers. Clinical and forensic aspects. *Arch Mal Prof* 1979; 40: 909-917
8. FIRMAN E, PARK R, MADAN I: Audit of pre-employment risk identification form. *Occup Med* 1997; 47: 277-280
9. GALANTI C, GIOCHETTI V (a cura di): *Valutazione della assistenza sanitaria. Parte Prima*. Salute e Territorio, Monografia n. 43, 1985

10. GALANTI C, GIOCHETTI V (a cura di): *Valutazione della assistenza sanitaria. Parte Seconda*. Salute e Territorio, Monografia n. 44, 1986
11. GALGANO A: *La qualità totale*. Milano: Il Sole 24 Ore Libri, 1990
12. GERHARDSSON MR, NORELL SE, KIVIRANTA HJ, AHLBOM A: Respiratory cancers in furniture workers. *Br J Ind Med* 1985; 42: 403-405
13. HARRISON J: Implementation of Department of Health guidelines for hepatitis B vaccination: a regional audit of NHS occupational health policies and procedures. *Occup Med* 1997; 47: 5-10
14. HARRISON J, WOODHOUSE J, DOWSON AJ: The management of occupational health by NHS Trusts in the north of England. *Occup Med* 1999; 49: 525-533
15. HILDESHEIM A, DOSEMECI M, CHAN CC, et al: Occupational exposure to wood, formaldehyde, and solvents and risk of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 1145-1153
16. ISTITUTO NAZIONALE PER L'ASSICURAZIONE CONTRO GLI INFORTUNI SUL LAVORO (INAIL): *Malattie professionali tabellate. Elementi diagnostici*. Roma, II Edizione, 1994: 124
17. ISTITUTO NAZIONALE PER L'ASSICURAZIONE CONTRO GLI INFORTUNI SUL LAVORO (INAIL): *Primo rapporto annuale 1999*. Roma, 13 luglio 2000
18. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER: Wood dust and formaldehyde. *IARC Monograph Eval Carcinog Risks Hum* 1995; 62: 35-215
19. KANERVA L, VAHERI E. Occupational allergic rhinitis in Finland. *Arch Occup Health*, 1993; 64: 565-568
20. MACDONALD EB: Audit and quality in occupational health. *Occup Med* 1992; 42: 7-11
21. MAGNAVITA N: Alla ricerca delle anamnesi perdute. *Med Lav* 1992; 83: 605-608
22. MAGNAVITA N, SACCO A, BEVILACQUA L, et al: Aesthesioneuroblastoma in woodworker. *Occup Med* 2002 (in press)
23. MALKER HSR, McLAUGHLIN JK, BLOT WJ, et al: Nasal cancer and occupation in Sweden, 1961-1979. *Am J Ind Med* 1986; 9: 477-485
24. MARTIMO KP: Audit matrix for evaluating Finnish occupational health units. *Scand J Work Environ Health* 1998; 24: 439-443
25. MERLER E, CARNEVALE F, D'ANDREA F, et al: Neoplasm of the nasal cavities and the paranasal sinuses and occupational exposure to wood dust. *Med Lav* 1981; 72: 87-95
26. NUNEZ F, SUAREZ C, ALVAREZ I, et al: Sino-nasal adenocarcinoma: epidemiological and clinico-pathological study of 34 cases. *J Otolaryngol* 1993; 22: 86-90
27. NYLANDER LA, DEMENT JM: Carcinogenic effects of wood dust: review and discussion. *Am J Ind Med* 1993; 24: 619-647
28. PALMER RH: *Considerations in defining quality of health care*. Boston, 1988
29. RANG EH, ACHESON ED: Cancer in furniture workers. *Int J Epidemiol* 1981; 10: 253-261
30. SCHLUNSEN V, SCHAUMBURG I, ANDERSEN NT, et al: Nasal patency related to dust exposure in woodworkers. *Occup Environ Med* 2002; 59: 23-29
31. SHAW CD: Aspects of audit. 1: the background. *BMJ* 1980; 280: 1256-1258
32. SMEDLEY J, COGGON D, HEAP D, ROSS A: Management of sharp injuries and contamination incidents in health care workers; an audit in the Wessex and Oxford regions. *Occup Med* 1995; 45: 273-275
33. SKOVSTED TAA, SCHLUNSEN V, SCHAUMBURG I, et al: Hypersensitivity to wood dust. *Allergy* 2000; 55: 1089-1090
34. SOCIETÀ ITALIANA DI MEDICINA DEL LAVORO E IGIENE INDUSTRIALE: *Linee Guida per la formazione continua e l'accreditamento del medico del lavoro. Sorveglianza sanitaria degli esposti a cancerogeni in ambiente di lavoro*. Torino, 27-28 maggio 2002: 56
35. WHITAKER S, AW TC: Audit of pre-employment assessments by occupational health departments in the National Health Service. *Occup Med* 1995; 45: 75-80
36. WOLF J, HARTUNG M, SCHALLER KH, et al: Occurrence of adenocarcinoma of the nasal and paranasal sinuses in woodworkers. *Arbeitsmed Sozialmed Präventivmed* 1986; 7: 3-22

# Significato degli indicatori biologici di esposizione a mercurio

P. APOSTOLI, A. MANGILI, L. ALESSIO

Cattedra di Medicina del Lavoro e Cattedra di Igiene Industriale, Università degli Studi di Brescia

## KEY WORDS

Mercury; exposure indicators; biological monitoring

## SUMMARY

«*Exposure indicators for inorganic mercury: an updating*». **Background:** *It was considered appropriate to update of the significance and use of the different mercury exposure indicators. Objective:* *The aim of the this paper was to correctly select biological media and sampling time and to understand the toxic kinetics of mercury for assessment of accurate biological monitoring. Results:* *It was confirmed that mercury in blood (B-Hg) is a good indicator of recent exposure, while urinary mercury (U-Hg) indicates current exposure when mercury reaches the renal steady state. B-Hg values are greatly influenced by fish consumption, while the variables influencing U-Hg values are amalgam fillings, commercial  $\gamma$ -globulin preparations, vaccines, topical remedies, environmental pollution and hobbies, occupational exposure and, partly, fish consumption. The speciation of mercury ( $Hg^0$ ,  $Hg^{+2}$ , methylmercury and ethylmercury) in biological media, should provide additional and important information in evaluating mercury toxicity. Conclusion:* *It was stressed that the appropriate choice of exposure indicators has to take account of the different variability factors and the characteristics of the toxic kinetics of mercury. The results of biological monitoring must be compared with references values, which are generally in the order of several  $\mu g/g$  creatinine, and limit values such as ACGIH BEI (U-Hg 35  $\mu g/g$  creatinine and B-Hg 15  $\mu g/l$ ) or the DFG BAT (U-Hg 100  $\mu g/l$  and B-Hg 25  $\mu g/l$ ).*

## RIASSUNTO

Il dosaggio di mercurio nel sangue è ritenuto un buon indicatore di "esposizione recente", mentre quello nelle urine indica un'esposizione corrente, se questa dura da almeno un anno. Nella popolazione generale i valori di HgB sono prevalentemente influenzati dal consumo di pesce, mentre quelli di HgU dipendono da fattori quali: la presenza di amalgami dentali, l'uso di prodotti medicali (disinfettanti, vaccini), l'inquinamento dell'ambiente di vita, l'esposizione hobbistica ed, almeno in parte, anche dalla dieta ricca di pesce. Un ruolo importante nella definizione degli indicatori di dose ha la speciazione del mercurio, che permette di differenziare nelle matrici biologiche  $Hg^0$ ,  $Hg^{+2}$ , metilmercurio ed etilmercurio, specie che hanno un diverso significato sia nella tossicocinetica che nella tossicodinamica dell'elemento. Per interpretare i dati del monitoraggio biologico, infine, devono essere utilizzati, da una parte, i valori di riferimento (valori più frequentemente riscontrati 1-15  $\mu g/g$  creatinina) e dell'altra quelli limite (valori ACGIH 35  $\mu g/g$  creatinina urina e 15  $\mu g/l$  sangue e valori DFG 100  $\mu g/l$  e 25  $\mu g/l$ ).

## INTRODUZIONE

In tossicologia industriale si definisce con il termine di dose, la concentrazione di uno xenobiotico a livello dei siti ove esso causa i suoi effetti. Non essendo eticamente, ma spesso anche tecnicamente, possibile una determinazione diretta dello xenobiotico al sito critico, la dose viene approssimata con la misura dei cosiddetti indicatori di dose interna che possono per comodità essere divisi in: indicatori di esposizione corrente, indicatori di esposizione cumulativa, indicatori di accumulo ed indicatori di dose vera (3). Tranne poche eccezioni i termini indicatore di dose interna e indicatore di esposizione hanno lo stesso significato e servono, oltre che per l'interpretazione dei dati dell'inquinamento ambientale, per quella degli *adverse effects*, anzi per alcuni autori sono orientati più verso questi ultimi (29).

Il monitoraggio biologico permette attraverso la misura di appropriati indicatori di ottenere informazioni su: esposizione e dose interna degli xenobiotici, effetti precoci-reversibili degli stessi.

Il mercurio è uno degli elementi più tradizionalmente studiati dalla tossicologia industriale ed ambientale, e molto numerose sono le pubblicazioni che hanno affrontato il problema del significato e dell'utilità del dosaggio dell'elemento in diverse matrici biologiche quali sangue, urina e capelli. In questo contributo è rivisitato, anche alla luce delle più recenti pubblicazioni sull'argomento, il significato degli indicatori biologici di esposizione a mercurio.

## MERCURIO EMATICO

I vapori di mercurio elementale ( $Hg^0$ ) una volta inalati vengono rapidamente assorbiti in misura dell'80% ed il metallo si ritrova nel sangue, per la maggior parte all'interno dei globuli rossi. Una parte di essi viene ossidata a  $Hg^{++}$  che invece si trova ugualmente distribuito (50%) nel plasma, legato all'albumina o ad altre proteine e nei globuli rossi, legato ai gruppi sulfidrilici dell'emoglobina e del glutathione. Il mercurio mercurioso, infine, una volta assorbito dopo ingestione, è rapidamente trasformato

nei tessuti in mercurio mercurico e mercurio elementale.

Il metilmercurio, invece, è assorbito nell'ordine del 95% a livello del tratto gastrointestinale ed è probabilmente assorbito anche a livello polmonare e cutaneo. Dopo l'assorbimento si accumula prevalentemente (90%) all'interno dei globuli rossi e solo in misura del 10% circola legato alle proteine plasmatiche. Data la diversa distribuzione delle specie di mercurio nel sangue (elementale, mercurico e metilmercurio), nella valutazione del mercurio ematico sarebbe opportuno analizzare il plasma separatamente dai globuli rossi o eseguire una speciazione delle differenti specie di mercurio (20).

Il tempo di dimezzamento del mercurio nel sangue è stato ampiamente studiato in soggetti con esposizione acuta ad alte dosi e sono state osservate due differenti fasi di eliminazione del mercurio dal sangue: una fase iniziale rapida ed una seconda fase più lenta. In studi sperimentali con marcatori radioattivi è stata valutata la durata della fase rapida, circa tre giorni, e si è ritenuto che tale fase fosse la conseguenza della captazione del mercurio a livello tissutale e della sua eliminazione attraverso l'aria espirata. La seconda fase di eliminazione più lenta è stata stimata attorno alle 2-3 settimane.

I risultati di studi sperimentali nell'uomo indicano che i livelli di mercurio nel sangue possono essere indicativi di "esposizione recente". La raccolta dei campioni di sangue deve essere effettuata alla fine del turno lavorativo l'ultimo giorno della settimana lavorativa. E' opportuno segnalare recenti visite odontoiatriche, l'uso di disinfettanti contenenti mercurio e l'eventuale coesposizione ad altri metalli. Una buona correlazione fra livelli giornalieri di mercurio nel sangue ed entità giornaliera di esposizione a vapori di mercurio (concentrazioni ponderate nel tempo), si ritrova quando i soggetti esaminati sono esposti a vapori di mercurio ininterrottamente da almeno un anno, e quando la rilevazione dei vapori di mercurio nell'aria viene fatta per mezzo di campionatori personali. Se ciò si verifica, ad una concentrazione ambientale di  $50 \mu g/m^3$  corrisponde una concentrazione ematica di  $22,6 \mu g/l$  (32).

La concentrazione di mercurio nel sangue è fortemente influenzata dal consumo di pesce. Numerosi studi riportati in letteratura indicano che il pesce e i prodotti da esso derivati, introdotti con la dieta, rappresentano la principale fonte d'esposizione per l'uomo al mercurio organico ed in particolare al metilmercurio. L'*uptake* giornaliero di composti organici del mercurio dipende non solo dal consumo di pesce ma anche dalla concentrazione di mercurio nel pesce stesso (che a sua volta dipende dalla concentrazione e dal pH delle acque marine), nonché dalla taglia e dall'età dei pesci (42). In particolare è stato osservato che pesci di mare quali tonno, pesce spada e spigola possono contenere nella parte commestibile una quantità di mercurio variabile da pochi mg/kg ad oltre 10 mg/kg. Il metilmercurio può, altresì, essere incorporato anche da animali (per esempio uccelli) che si nutrono di pesce, ma, la concentrazione in questi ultimi, non raggiunge mai i valori trovati nei pesci. In un gruppo di 395 soggetti svedesi con un consumo variabile di pesce, sono stati valutati i livelli di mercurio nel sangue ed è stata dimostrata una relazione significativa fra consumo di pesce e mercurio nel sangue. Infatti, il mercurio nel sangue era in media pari a 1,8 ng/g per i soggetti che non consumavano pesce, mentre era 6,7 ng/g per i soggetti che mangiavano pesce due volte la settimana (39).

Un ulteriore esempio è rappresentato da un recente studio che ha evidenziato come, fra gli abitanti lungo la riva del fiume Tapajos, le persone che consumavano pesci piscivori avevano livelli di mercurio ematico più alti di quelli che consumavano pesci erbivori. Inoltre, i livelli di mercurio erano correlati con la frequenza dell'apporto di pesce (17).

In uno studio sull'*uptake* di mercurio nella popolazione della Groenlandia è stato osservato un elevato apporto di mercurio con la dieta, pari a 846 mg/settimana per persona, soprattutto attraverso il fegato e la carne di foca (24).

Quando il consumo di pesce è elevato, dunque, per valutare l'effettiva esposizione lavorativa ed eliminare l'interferenza del metilmercurio di origine alimentare, si rende necessaria la speciazione o in alternativa è opportuno considerare separatamente il plasma dai globuli rossi.

## MERCURIO URINARIO

Se l'esposizione a mercurio avviene da più di un anno i valori di mercurio urinario indicano l'entità dell'esposizione corrente. Viceversa, se l'esposizione a mercurio avviene da meno di un anno, i valori di mercurio urinario indicano la quantità di mercurio depositata nel rene.

Applicando il modello farmacocinetico per esposizioni occupazionali continuative, descritto da Droz e Fiserova-Bergerova (18), per tempi di dimezzamento compresi fra 40 e 90 giorni, i valori di mercurio urinario sono determinati per il 10% dall'esposizione più recente (ultima settimana), per il 20-25% dall'esposizione nell'ultimo mese, per il 60-70% dall'esposizione cumulativa dell'ultimo anno. Questa analisi suggerisce di adottare un monitoraggio biologico che preveda il campionamento delle urine ogni tre mesi, con un campionamento più frequente (ogni mese) in caso di preoccupanti aumenti di HgU. In soggetti esposti acutamente per un breve periodo a mercurio il picco di mercurio urinario si ha 2-3 settimane dopo l'avvenuta esposizione, rappresentando il tempo necessario per la captazione renale e la successiva eliminazione (8).

Il tempo di dimezzamento del mercurio urinario, dopo cessazione dell'esposizione, è stato oggetto di numerosi studi, effettuati sia su lavoratori con una storia di esposizione prolungata a basse dosi sia su individui con esposizione acuta ad alte dosi di mercurio (9). Sono stati ottenuti risultati variabili. Il tempo di dimezzamento è risultato pari a 41 giorni (37), 91 giorni (19) e 55 giorni (33) in soggetti esposti a basse dosi per lunghi periodi. E' stato suggerito che la riportata variabilità nei tempi di dimezzamento fosse dovuta a fattori individuali quali la differente induzione di metalotionina renale, che lega il mercurio, e il fatto che livelli inizialmente più alti di mercurio urinario portassero a tempi di dimezzamento più lunghi.

In soggetti esposti da più di un anno, Roels et al (32) hanno trovato una correlazione eccellente fra livello di esposizione giornaliera e mercurio nelle urine, nonché tra mercurio nelle urine e nel sangue: a concentrazioni di mercurio urinarie di 50 µg/g

creatinina, corrispondevano concentrazioni ematiche di 18  $\mu\text{g/l}$  e ambientali di 40  $\mu\text{g/m}^3$ .

È noto che le concentrazioni di mercurio sono altamente variabili quando i campioni di urina sono raccolti in tempi diversi nello stesso individuo. In questo senso è importante conoscere l'influenza dei fattori che determinano tale variabilità, quali il tempo ed il metodo di campionamento, le variazioni diurne dell'escrezione di mercurio ed i livelli di precisione delle metodiche analitiche dei vari laboratori.

Per ridurre gli effetti delle variazioni diurne, la raccolta delle urine deve essere fatta sempre alla stessa ora. Inoltre, deve avvenire in modo da evitare ogni possibile contaminazione con l'impiego di contenitori idonei, quali quelli in polietilene. Il campione più rappresentativo sembra essere quello raccolto la mattina, al risveglio, dopo il riposo notturno (campione corrispondente ad un accumulo di urine nella vescica di 6-8 h, contro le 4 h dei campioni raccolti in giornata) (15).

Poiché la concentrazione di mercurio nelle urine varia al variare del flusso urinario, è necessario correggere la concentrazione di mercurio nelle urine, per le variazioni di flusso. Questo può essere fatto dividendo la concentrazione del mercurio nelle urine per il peso specifico, l'osmolalità o i grammi di creatinina. Si è a lungo dibattuto se la correzione delle concentrazioni di mercurio nelle urine con creatinina, peso specifico, osmolalità fornissero un indicatore migliore dell'escrezione "vera" di mercurio rispetto alle concentrazioni non corrette. Le conclusioni in merito sono discordanti. Il razionale per l'applicazione della correzione con creatinina è stato presentato da Clarkson et al (14). Le motivazioni da lui addotte sono le seguenti: il valore di escrezione urinaria di creatinina dipende dalla massa muscolare, dunque non presenta grosse variazioni in soggetti aventi il medesimo peso. Il flusso urinario, viceversa, varia al variare dello stato d'idratazione, e non è quindi un parametro stabile. Esprimere l'escrezione del mercurio, corretta per i grammi di creatinina, significa dunque evitare gli errori conseguenti alla diversa diluizione dei campioni di urina.

Woods et al (44), hanno tratto conclusioni opposte. In un recente studio essi hanno confrontato

la concentrazione di mercurio e di creatinina in campioni random di urine rispetto alle stesse concentrazioni in campioni raccolti per 24 ore. Hanno così osservato che la concentrazione di mercurio urinario corretta con creatinina peggiorava la correlazione statisticamente significativa fra concentrazione di mercurio nell'urina raccolta random e la concentrazione di mercurio nell'urina raccolta nelle 24 ore.

Mason et al (28), infine, hanno osservato che la correzione con creatinina della concentrazione urinaria del mercurio è in grado di ridurre la variazione media intraindividuale della concentrazione stessa.

Va ricordato, inoltre, che i fattori in grado di influenzare i livelli di mercurio urinario sono molteplici. Fra questi i più importanti sono: la presenza di amalgami dentali, l'uso di prodotti medicali (disinfettanti, farmaci ad uso topico per occhio e orecchio, liquidi per la conservazione e la pulizia di lenti a contatto, alcuni vaccini, preparazioni commerciali di  $\gamma$  globuline e creme schiarenti), l'uso domestico di fungicidi, battericidi e disinfettanti (o la contaminazione di cibi da parte di queste sostanze), la dieta a base di pesce. La presenza e la superficie degli amalgami dentali influenzano significativamente i livelli di mercurio urinario. L'OMS ha recentemente definito gli amalgami dentali la principale fonte d'esposizione a mercurio nella popolazione generale (41). Le otturazioni in amalgama rilasciano continuamente, per fenomeni di ossidoriduzione o di abrasione, piccole quantità di mercurio sotto forma di vapori, rapidamente assorbiti per via respiratoria o di particelle che vengono assorbite attraverso l'apparato gastroenterico. È stato inoltre suggerito che fenomeni di abrasione o riscaldamento degli amalgami potessero facilitare la liberazione e l'assorbimento di mercurio (35). Secondo i più accurati studi riportati in letteratura la quantità di mercurio rilasciata giornalmente dagli amalgami ed assorbita dall'organismo varia fra 2 e 25  $\mu\text{g/die}$  con un valore medio pari a 10-12  $\mu\text{g/die}$  (43). È stato, inoltre, suggerito che ogni otturazione può produrre un'escrezione urinaria di 0,08  $\mu\text{g/l}$  Hg nell'urina (38).

Il contributo fornito da ciascun pasto a base di pesce sull'eliminazione urinaria di mercurio è risul-

tato di poco superiore a  $0,5 \mu\text{g/g}$  creatinina (30). Il consumo di pesce, rappresenta la principale fonte d'esposizione per l'uomo al mercurio organico ed in particolare al metilmercurio. Il metilmercurio introdotto con la dieta viene escreto con la bile, quindi viene ampiamente riassorbito (nell'ordine del 95%) a livello intestinale. Dopo l'assorbimento, più del 90% di esso viene trasportato nel sangue legato all'emoglobina nei globuli rossi o legato a proteine plasmatiche (10%). Il 95% dell'escrezione totale di mercurio, dopo l'esposizione a metilmercurio, avviene con le feci sia sotto forma di mercurio organico che inorganico. La microflora intestinale è in grado di convertire una parte del metilmercurio in Hg inorganico. Tale conversione è un processo chiave per l'escrezione del mercurio e i dati modellistici più recenti dimostrano che il 5% del metilmercurio viene eliminato con le urine, sotto forma di composti inorganici e che tale escrezione aumenta all'aumentare del tempo di esposizione (12, 13).

In conclusione, data la varietà di fattori in grado di influenzare i livelli di mercurio urinario, la raccolta dei campioni di urina deve essere sempre preceduta da un'attenta anamnesi.

Una stima della dose accumulata può essere condotta con test di chelazione mediante farmaci chelanti come l'Acido, 2-3, Dimercaptosuccinico (HgU-DMSA/24 h test), misurando l'escrezione di mercurio nelle ventiquattro ore prima e dopo la somministrazione di una singola dose orale (2 grammi) di DMSA. Il test è giudicato "positivo" quando si ha una mobilizzazione del mercurio  $\geq 160 \mu\text{g}/24 \text{ h}$ . La chelazione fornisce una misura del *rapid exchange pool* costituito dal metallo liberato dai depositi e dalla quota presente in circolo. I risultati di uno studio di Roels et al (34) suggeriscono che il mercurio escreto con le urine, dopo DMSA, deriva dai depositi di mercurio del rene.

## SPECIAZIONE

L'uomo risulta esposto a numerose specie chimiche di mercurio, che comprendono il mercurio elementare  $\text{Hg}^0$ , il mercurio mercurioso  $\text{Hg}_2^{2+}$

(composto da 2 atomi di Hg che hanno perduto un elettrone ciascuno), il mercurio mercurico  $\text{Hg}^{2+}$  (deriva dalla perdita di 2 elettroni), i composti inorganici del mercurio ed un gruppo di composti di grande interesse tossicologico quali i composti organici del mercurio (Clorometilmercurio, Fenilmercurio acetato e Etilmercurio). Tutte le specie di mercurio hanno effetti tossici, tuttavia, la distribuzione del mercurio nei tessuti può variare secondo la specifica forma di mercurio presa in considerazione. Per questo metallo, capacità e velocità di ossidazione condizionano la distribuzione e la tossicità dell'elemento. Infatti, solo la quota non ossidata del mercurio è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica, mentre la forma ionica tende a legarsi alle proteine plasmatiche. Il mercurio metallico e i suoi composti inorganici tendono primariamente ad accumularsi ed ad avere effetti tossici, a livello renale, mentre i composti organici hanno una diffusa distribuzione sistemica ed hanno una maggiore tossicità a livello del tessuto neurale. Il mercurio è dunque un esempio dell'importanza della speciazione in ambito tossicocinetico.

L'interesse nei riguardi della speciazione è andato via via crescendo negli anni '90 traendo forti ed originali impulsi dalle aree tossicologiche nell'ambito delle quali sono state acquisite nozioni sul metabolismo dei vari stati ossidativi o dei composti di alcuni elementi.

In Medicina del Lavoro la speciazione riveste particolare importanza sia per la tossicocinetica degli elementi sia per la tossicodinamica. Essa, infatti, se da un lato mette a disposizione indicatori più accurati per lo studio di esposizioni a metalli, dall'altro può aiutare a comprendere l'interazione fra metalli e sistemi biologici proprio grazie a tali indicatori (6).

In tossicologia occupazionale la speciazione può essere applicata sia al monitoraggio ambientale che a quello biologico. Nel primo caso la misura delle specie in aria, acqua, suolo, alimenti, fornisce informazioni su concentrazioni, meccanismi di rilascio e di deposito dei metalli nelle varie matrici. Nel secondo caso aiuta a comprendere assorbimento, distribuzione ed escrezione del tossico nell'organismo. Il fattore che maggiormente è in gra-

do di influenzare lo sviluppo della speciazione in ambito biologico è la disponibilità di metodi analitici, i quali risultano complessi a causa della bassa concentrazione delle specie, della loro possibile modificazione durante le fasi dell'analisi, della loro interferenza dovuta alle matrici biologiche.

Una procedura analitica ideale dovrebbe garantire la conservazione della specie originaria, l'identificazione della specie e la sua misura nella matrice data. La speciazione viene condotta attraverso l'uso combinato di due differenti e concatenate procedure analitiche: la prima che consente la separazione della specie da esaminare, la seconda che permette la determinazione dell'elemento. Le due fasi possono essere collegate semplificando, migliorando e rendendo più versatili le analisi. Questo metodo (*hybrid approach* alla speciazione) è stato impiegato anche per il mercurio, accoppiando la cromatografia con la spettrometria in assorbimento atomico.

Allo stato attuale la speciazione del mercurio può essere effettuata per tre specie (HgII, composti organomercuriali, complessi proteici) su diverse matrici (urina, sangue, fegato, capelli, denti e tessuti) e su vari alimenti. Le tecniche impiegate per la separazione sono: vapori freddi, SEC, GC, HPLC, estrazione con solventi, cromatografia ionica e distillazione; quelle impiegate per la determinazione sono: AAHy, ETA AA, AA AE, ICP-MS. Nell'aggiornamento del 2001 del JAAS, su 16 articoli recensiti, viene confermato quanto sopra riportato per matrici e tecniche analitiche e 6 articoli riportano varie tecniche di speciazione su sangue, estratti tissutali e cellulari (40).

#### COME INTERPRETARE I RISULTATI DEL MONITORAGGIO BIOLOGICO

Alla base di una corretta interpretazione degli indicatori di esposizione sta un'adeguata scelta della matrice e dei tempi di campionamento, la conoscenza dei fattori interferenti e delle condizioni fisiopatologiche in grado di modificare i livelli di xenobiotici e dei loro metaboliti e si deve poi passare all'impiego di quelli che nella classica definizione di monitoraggio biologico del 1984 venivano defi-

niti "appropriati riferimenti" (10). Un appropriato riferimento dovrebbe permettere con immediatezza di interpretare il dato dell'indicatore di esposizione circa:

- esposizione rispetto a quella della popolazione generale o suoi gruppi particolari;
- comparsa di effetti (precoci, reversibili, *adverse*) sulla salute cui viene attribuito un significato di allerta o di necessità di intervento, organizzativo, preventivo, terapeutico.

Già dal 41° Congresso SIMLII di S. Margherita (22) era stato proposto uno schema di lettura dei risultati del monitoraggio biologico che prevedeva per molti xenobiotici un livello di non intervento, un livello di sorveglianza, due livelli di intervento di crescente importanza ed entità.

Per il monitoraggio biologico in caso di esposizione a mercurio ed ai suoi composti (esclusi gli alchili) erano stati fissati 4 livelli di mercurio urinario e cioè: liv. 1 <10 µg/g creatinina; liv. 2 10-50 µg/g creatinina; liv. 3 50-100 µg/g creatinina e liv. 4 >150 µg/g creatinina. Si riteneva, quindi, opportuno adottare provvedimenti individuali solo in caso di esposizioni di 3° e 4° livello quando i livelli di HgU fossero stati confermati da almeno altri due controlli ravvicinati.

Per i composti alchilati del mercurio, invece, erano stati fissati 2 livelli di mercurio ematico e cioè: liv. 1 <1 µg/100 ml e liv. 2 1-10 µg/ml e si stabiliva che il superamento del livello 2 imponesse l'allontanamento dal rischio, l'esame delle modalità di lavoro e l'adozione di controlli più completi e ravvicinati.

Nel successivo 48° Congresso di Pavia (1), gli elementi per l'interpretazione dei dati del monitoraggio biologico venivano ridotti a due: il valore di riferimento ("normale" della popolazione generale) ed il valore limite, in genere mutuato dai BEI ACGIH. Veniva sottolineato come differenze rilevanti nella letteratura, numero di osservazioni spesso molto basso, fattori analitici, differenti esposizioni dei gruppi di popolazione, rendessero difficile proporre valori di riferimento accurati e si suggeriva di utilizzare il valore limite, specie per gli xenobiotici organici, con grande prudenza per la elevata variabilità biologica e la necessità di maggiori conferme scientifiche.

Nei soggetti esposti a mercurio elementale ed ai suoi composti inorganici il valore limite del HgU veniva fissato a 50 µg/l (40 µg/g creatinina) mentre come valore di riferimento era stato fissato un limite superiore di 10 µg/l (8 µg/g creatinina) con ampie variazioni dei livelli di HgU in rapporto al luogo di residenza, all'età e al sesso.

Nei soggetti esposti a composti inorganici ed organici del mercurio il valore limite di HgB veniva fissato a 100 µg/l (anche se alcuni autori ritenevano tale limite elevato) mentre, come valore di riferimento era stato fissato un limite superiore di 10 µg/l, con ampie variazioni in rapporto al luogo di residenza e alle abitudini alimentari. Infine il valore limite del mercurio nei capelli (HgH) era stato definito pari a 25 µg/g tessuto mentre il valore di riferimento di HgH era <5 µg/g tessuto.

Nel congresso SIMLII del 1999 (23), Foà e coll, hanno proposto i seguenti valori limite biologici: HgU <35 µg/g creatinina e HgB <10 µg/l, mentre i valori di riferimento (media e range) del mercurio urinario proposti dai medesimi erano 0,85 (0,30-2,89) e 1,28 (0,30-3,25) µg/g creatinina nella popolazione generale italiana rispettivamente senza e con amalgami dentali.

In base alle evidenze fornite dagli studi sugli effetti neurologici, renali e sull'embrione la *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* ha adottato, per i soggetti professionalmente esposti a basse dosi di mercurio per periodi prolungati, un limite per il mercurio inorganico urinario, in campioni di urina raccolti prima dell'inizio del turno, di 35 µg/g creatinina ed ha raccomandato un indice di esposizione biologica (BEI) pari a 15 µg di Hg inorganico/l, in campioni di sangue raccolti al termine dell'ultimo turno della settimana lavorativa (4).

Per valori di mercurio urinario inferiori ai 50 µg/g creatinina gli effetti neurologici sono lievi ed osservabili in una limitata frazione di individui suscettibili ed a livello renale è stata osservata solo una riduzione delle PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> e dei trombossani TXB<sub>2</sub>, risultato attualmente di difficile interpretazione (43).

Il valore limite di 35 µg/g creatinina, è stato riconfermato dall'ACGIH nel 2001. La DFG ha in-

vece proposto come valori limite per il mercurio urinario 100 µg/l e per il mercurio ematico 25 µg/l (16).

Nel 1991, Brune et al (11), hanno utilizzato il metodo della metanalisi per produrre valori di riferimento del mercurio.

Tale metodo consiste nel combinare i risultati di più studi condotti su uno stesso argomento, ottenendo un rafforzamento delle evidenze ed un miglioramento complessivo della loro qualità informativa. Essi hanno preso in considerazione 98 articoli pubblicati, scritti fra il 1976 e il 1990, sulla concentrazione del mercurio nel sangue, nei globuli rossi e nel plasma di soggetti non esposti professionalmente.

Scartate 19 pubblicazioni che contenevano informazioni insufficienti o errori evidenti nel campionamento e nell'analisi, hanno osservato che i livelli ematici di mercurio sono condizionati, soprattutto, dal consumo di pesce e hanno dunque proposto valori di riferimento diversi per le diverse classi di consumo di pesce.

Nei soggetti che non consumano pesce i valori di riferimento sono per HgB 2±1,8 µg/l (media, DS), per Hg nei globuli rossi 3,8±0,8 µg/kg e per Hg nel plasma 1,3±0,8 µg/l. I valori nei consumatori di pesce erano 4 volte più alti per Hg nel plasma e fino a 20 volte maggiori per HgB e Hg nei globuli rossi.

La *Federal Environmental Agency* ha effettuato uno studio su larga scala della popolazione tedesca della Germania dell'Est definito Sorveglianza ambientale tedesca (GerES) studio che fino ad oggi è stato condotto per tre volte. La prima versione (GerES I) è stata condotta fra il 1985 e il 1986, la seconda nel 1990/1991 (GerES IIa) e nel 1991/1992 (GerES IIb).

Nel GerES II sono stati raccolti e analizzati campioni di urina, sangue e capelli di 4021 adulti con età compresa fra 25 e 69 anni e di 736 bambini con età compresa fra i 6 e 14 anni. La media geometrica del mercurio nel sangue degli adulti era 0,51 µg/l, quella del mercurio urinario era 0,54 µg/l. I valori di mercurio ematico e urinario dei bambini erano minori (36).

I valori limite e di riferimento del mercurio nelle diverse matrici sono riportati in tabella 1 e 2.

**Tabella 1 - Valori limite del mercurio in diverse matrici biologiche**

Riferimento bibliografico	Elemento chimico	Matrice biologica	Tempo di campionamento	Valore limite
Abbritti e coll, 1985 (1)	Mercurio inorganico	Urina	Inizio turno fine settimana	40 µg/g creat
		Sangue	Indifferente	100 µg/l
	Mercurio organico	Sangue	Indifferente	100 µg/l
		Capelli		25 µg/g tessuto
Lauwerys, 1994 (27)	Mercurio inorganico	Urina	NC	50 µg/g creat
		Sangue	NC	2 µg/100ml
	Metilmercurio	Sangue	NC	10 µg/100ml
LaDou, 1994 (25)	Mercurio inorganico	Urina	NC	50 µg/l
Foà e coll, 1999 (23)	Mercurio inorganico	Urina	NC	35 µg/g creat
		Sangue	NC	10 µg/l
ACGIH, 2000 (4)	Mercurio inorganico	Urina	Inizio turno	35 µg/g creat
		Sangue	Fine turno fine settimana	15 µg/l
DFG, 2000 (16)	Mercurio inorganico	Urina	NC	100 µg/l
		Sangue	NC	25 µg/l

NC=non specificato

**Tabella 2 - Valori di riferimento del mercurio**

Riferimento bibliografico	Matrice biologica	N. soggetti	Sesso	Valori di riferimento	
				Media	Range
Roels et al, 1985 (33)	Urina	114	M	0,9 µg/g cr	0,1-4,9 µg/g cr
		48	F	1,7 µg/g cr	0,1-4,9 µg/g cr
Akesson et al, 1991 (2)	Urina	21	M	1,2 µg/g cr	-
		60	F	2,3 µg/g cr	-
		81	Totale	1,9 µg/g cr	0,2-10,3 µg/g cr
Ehrenberg et al, 1991 (19)	Urina	70	(87%F)	4,2 µg/g cr	(nd-10)
Langworth et al, 1991(26)	Urina	75	M/F	1,9 µg/g cr	0-7,6 µg/g cr
Ellingsen et al, 1993 (21)	Urina	17	M/F	2,3 µg/g cr	0,5-6,7 µg/g cr
Ritchie et al, 1995 (31)	Urina	20	(25%F)	1,7 µg/g cr	0,3-26,5 µg/g cr
		20	(60%F)	2,2 µg/g cr	0,9-10,8 µg/g cr
Brune et al, 1991 (11) metanalisi	Sangue				2±1,8 µg/l
	Globuli rossi				3,8±0,8 µg/kg
	Plasma				1,3±0,8 µg/l
Seifert et al, 2000 (36)	Urina	4021		m.g. 0,54 µg/l	
	Sangue	4021		m.g. 0,51 µg/l	
Apostoli, 2002 (5)	Urina	383	Totale	1,25 µg/g cr (HGAAS)	0,10-17,79 mg/g cr
				1,38 µg/g cr (FI ICPMS)	0,03-19 mg/g cr

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il mercurio ematico, così come il mercurio urinario, è ben correlato con l'entità giornaliera di esposizione a vapori di mercurio (concentrazioni ponderate nel tempo) quando i soggetti sono esposti a vapori di mercurio ininterrottamente da almeno un anno e quando la rilevazione dei vapori di mercurio nell'aria viene condotta per mezzo di campionatori personali. Tuttavia, a differenza del mercurio urinario, il mercurio ematico si innalza rapidamente anche a seguito di un'esposizione acuta a vapori di mercurio.

Il mercurio ematico è fortemente influenzato anche dal consumo di pesce. Quando quest'ultimo è elevato, dunque, per valutare l'effettiva esposizione lavorativa ed eliminare l'interferenza del metilmercurio di origine alimentare, si rende necessaria la speciazione del mercurio nel sangue o in alternativa è opportuno considerare separatamente il plasma dai globuli rossi.

I valori di mercurio urinario indicano l'entità dell'esposizione corrente, se l'esposizione a mercurio avviene da più di un anno. Viceversa, se l'esposizione a mercurio avviene da meno di un anno, i valori di mercurio urinario indicano la quantità di mercurio depositata nel rene. È noto che le concentrazioni di mercurio sono altamente variabili quando i campioni di urina sono raccolti in tempi diversi nello stesso individuo. In questo senso è importante conoscere l'influenza dei fattori che determinano tale variabilità, quali il tempo ed il metodo di campionamento, le variazioni diurne dell'escrezione di mercurio ed i livelli di precisione delle metodiche analitiche dei vari laboratori.

Come ricordato, va tenuta presente anche la percentuale (circa 5%) di metilmercurio che può essere convertita in forma inorganica e che è, pertanto, eliminata con le urine.

Data la varietà di fattori in grado di influenzare i livelli di mercurio urinario, la raccolta dei campioni di urina deve essere sempre preceduta da un'attenta anamnesi.

Nel congresso SIMLII del 1999, per valutare i dati del monitoraggio biologico, è stato proposto un sistema di valori comprendenti valori di riferimento, livelli di azione e valori limite. In questo si-

stema, gli indicatori di esposizione assumono un significato attraverso il confronto con dosaggi dello stesso xenobiotico nella popolazione generale o sulla base di studi delle relazioni dose-effetto e dose-risposta (7).

Nel caso specifico del mercurio, la diminuzione dei livelli di esposizione nell'ambiente lavorativo, unitamente al fatto che le esposizioni in ambiente extraprofessionale sono numerose (amalgami dentali, pesce, creme e farmaci, vaccini), fa sì che spesso la concentrazione degli indicatori biologici nella popolazione professionalmente esposta non sia molto più elevata, rispetto a quella della popolazione generale.

La Società Italiana Valori di Riferimento ha recentemente promosso una ricerca multicentrica con l'obiettivo di definire i valori di riferimento del mercurio urinario della popolazione italiana. Nella casistica indagata, che includeva 383 soggetti provenienti da quattro città italiane (Brescia, Bari, Siena e Genova) il valore mediano dell'escrezione urinaria di mercurio (HgU) è risultato pari a 0,79 µg/g creatinina con valori compresi fra 0,12 e 5,02 µg/g creatinina (5° e 95° percentile) (5).

Il valore medio di HgU rilevato nella popolazione italiana di riferimento è risultato più basso rispetto a quello riscontrato in altri paesi europei (vedi tabella 2). Tale differenza, probabilmente, deriva da fattori ambientali legati alle caratteristiche dell'area geografica nella quale sono stati selezionati i soggetti di riferimento e dalle differenti tecniche analitiche utilizzate, anche se, gli intervalli di concentrazione da noi rilevati sono simili a quelli riscontrati in altri paesi europei.

## BIBLIOGRAFIA

1. ABBRITTI G, ALESSIO L, BISCALDI GP, e coll: Indicatori biologici nell'esposizione professionale a metalli. 48° Congresso Società Italiana Medicina del Lavoro e Igiene Industriale. Pavia, 18-21 settembre 1985: 97-100
2. AKESSON I, SCHUTZ A, ATTEWELL R, et al: Status of mercury and selenium in dental personnel: impact of amalgam work and own filling. Arch Environ Health 1991; 46: 102-109
3. ALESSIO L, CORTESI I: Il monitoraggio biologico dell'esposizione occupazionale a tossici con effetti determi-

- nistici. In Alessio L, Bertazzi PA, Forni A, Gallus G, Imbriani M: *Il monitoraggio biologico dei lavoratori esposti a tossici industriali*. Maugeri Foundation Books: A giornamenti in medicina occupazionale 2000; 1: 17-21
4. AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS: *Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices*, 2000
  5. APOSTOLI P, ELIA G, VALENTE T, et al: Assessment of reference values for mercury in urine: the results of an Italian polycentric study. *Sci Total Environ* 2002; 289: 13-24
  6. APOSTOLI P, ALESSIO L: La speciazione dei metalli in medicina del lavoro. *Med Lav* 1998; 89: 3-16
  7. APOSTOLI P, PERBELLINI L, BRUGNONE F: Valori di riferimento, livelli di azione e valori limite nell'interpretazione del monitoraggio biologico. *Atti 62° Cong. Naz. SIMLII Lavoro e Medicina*, 1999: 47-57
  8. BARREGARD L: Biological monitoring of exposure to mercury vapor. *Scand J Work Environ Health* 1993; 19: 45-49
  9. BARREGARD L, SALLSTEN G: Kinetics of mercury in blood and urine after brief occupational exposure. *Arch Environ Health* 1992; 47: 176-184
  10. BERLIN A, YODAIKEN RE, HENMAN BA: *Assessment of toxic agents at the workplace. Roles of ambient and biological monitoring*. Boston: Hague Njihoft Publ, 1984
  11. BRUNE D, NORDBERG GF, VESTERBERG O, GERHARDSSON L. A review of normal concentrations of mercury in human blood. *Sci Tot Environ* 1991; 10: 235-282
  12. CARRIER G, BRUNET RC, CAZA M, et al: A toxicokinetic model for predicting the tissue distribution and elimination of organic and inorganic mercury following exposure to methyl mercury in animals and humans. I. Development and validation of the model using experimental data in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 171: 38-49
  13. CARRIER G, BRUNET RC, CAZA M, et al: A toxicokinetic model for predicting the tissue distribution and elimination of organic and inorganic mercury following exposure to methyl mercury in animals and humans. II. Application and validation of the model in humans. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 171: 50-60
  14. CLARKSON TW, ASTOLFI E, BARAC-NIETO M, et al: Dose-response relations in the nephrotoxic action of mercury based on spot urine samples. *Acta Pharmacol Toxicol* 1986; 59: s410-s415
  15. CLARKSON TW, HURSH JB, SAGER PR, SYVERSEN TLM: Mercury. In Clarkson TW, Friberg L, Nordberg GF, Sager PR (eds): *Biological Monitoring of toxic metals*. New York and London: Plenum Press, 1988: 199-246
  16. DEUTSCHE FORSCHUNGSEMEINSCHAFT (DFG): *List of MAK and BAT values*. Commission for the Investigation of Health Hazard of Chemical Compounds in the Work Area. Report No 36. VCH. Wienheim, Germany: Verlag Sgesellschaft, 2000
  17. DOLBEC J, MERGLER D, SOUSA PASSOS CJ, et al: Methylmercury exposure affects motor performance of a riverine population of the Tapajos river, Brazilian Amazon. *Int Arch Occup Environ Health* 2000; 73: 195-203
  18. DROZ PO, FISEROVA-BERGEROVA V: Biological monitoring VI. Pharmacokinetic models in setting biological exposure indexes. *Appl Occup Environ Hyg* 1992; 7: 574-580
  19. EHRENBERG RL, VOGT RL, BLAIR SMITH A, et al: Effects of elemental mercury exposure at a thermometer plant. *Am J Ind Med* 1991; 19: 495-507
  20. ELINDER CG, GERHARDSSON L, OBERSTDOESTER G: Biological monitoring of toxic metals. In Clarkson W, Friberg L, Nordberg GF, Sager PR (eds): *Overview. Biological monitoring of toxic metals*. New York and London: Plenum Press, 1988: 1-72
  21. ELLINGSEN D, THOMASSEN Y, LANGARD S, KJUUS H: Urinary mercury excretion in chloralkali workers after cessation of exposure. *Scand J Work Environ Health* 1993; 19: 334-341
  22. FOÀ V, ALESSIO L, CHIESURA P, e coll: Controllo sanitario e monitoraggio biologico per soggetti professionalmente esposti. *41° Congresso Società Italiana Medicina del Lavoro e Igiene industriale*. Santa Margherita Ligure 4-7 ottobre 1978: 184-185
  23. FOÀ V, CARRER P, CAVALLO D: Criteri di riferimento per il monitoraggio biologico dei lavoratori esposti a metalli. *Atti 62° Cong. Naz. SIMLII Lavoro e Medicina* 1999: 47-57
  24. JOHANSEN P, PARS T, BJERREGAARD P: Lead, cadmium, mercury and selenium intake by Greenlanders from local marine food. *The Science of Total Environment* 2000; 245: 187-194
  25. LADOU MD: *Occupational Medicine* 1994; 34: 460
  26. LANGWORTH S, ELINDER CG, GOTHE CJ, VESTERBERG O: Biological monitoring of environmental and occupational exposure to Hg. *Int Arch Occup Environ Health* 1991; 63: 161-167
  27. LAUWERYS R, HOET P: *Industrial Chemical Exposure. Guidelines for Biological Monitoring*. Second Edition 1994: 292
  28. MASON HJ, HINDELL P, WILLIAMS NR: Biological monitoring and exposure to mercury. *Occup Med* 2001; 51: 2-11
  29. MUTTI A: Use of intermediate end point to prevent long term outcomes. *Toxicol Lett* 1995; 77: 121-125

30. PESOLA G, VIMERCATI L, ELIA G, e coll: Influenza dell'area geografica sull'eliminazione urinaria di mercurio in soggetti non esposti professionalmente al metallo. *Folia Med* 1999; 70: 139-146
31. RITCHIE KA, McDONALD EB, HAMMERSLEY R, et al: A pilot study of effect of low level exposure on health of dental surgeon. *Occup Environ Med* 1995; 52: 813-817
32. ROELS H, ABDELADIM S, CEULEMANS E, LAUWERYS R: Relationships between the concentrations of mercury in air and in blood or urine in workers exposed to mercury vapour. *Ann Occup Hyg* 1987; 31: 135-145
33. ROELS H, GENNART JP, LAUWERYS R, et al: Surveillance of workers exposed to mercury vapour: validation of a previously proposed biological threshold limit value for mercury concentration in urine. *Am J Ind Med* 1985; 7: 45-71
34. ROELS HA, BOECKX M, CEULEMANS E, LAUWERYS RR: Urinary excretion of mercury after occupational exposure to mercury vapour and influence of the chelating agent meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA). *Brit J Ind Med* 1991; 48: 247-253
35. SALLSTEN G, BARREGARD L, SCHUTZ A: Clearance half-life of mercury in urine after cessation of long-term occupational exposure influence of a chelating agent (DMPS) on excretion of mercury in urine. *Occup Environ Med* 1994; 51: 337-342
36. SEIFERT B, BECKER K, HELM D, et al: The German Environmental Survey 1990-1992 (GerESII): reference concentrations of selected environmental pollutants in blood, urine, hair, house dust, drinking water and indoor air. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2000; 10: 552-565
37. SKARE I, ENQUIST A: Urinary mercury clearance of dental personnel after a long-term intermission in occupational exposure. *Swed Dent J* 1990; 14: 255-259
38. SOLEO L, PESOLA G, VIMERCATI L, e coll: Amalgami dentari ed eliminazione urinaria di mercurio in lavoratori esposti a basse concentrazioni di mercurio inorganico. *Med Lav* 1998; 89: 232-241
39. SVENSSON BG, SCHUTZ A, NILSSON A, et al: Fish as a source of exposure to mercury and selenium. *Sci Total Environ* 1992; 126: 61-74
40. TAYLOR A, BRANCH S, HALLS D, et al: Clinical and biological materials, foods and beverages. *J Anal Spectrom* 2001; 16: 421-446
41. WHO: *Consultation on Dental Amalgam and its Alternatives*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1997
42. WHO: *Environmental Health Criteria 101. Methylmercury*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1990
43. WHO-IPCS: *Environmental Health Criteria 118. Inorganic Mercury*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1991
44. WOODS J, MARTIN M, LEROUX B: Validity of spot urine samples as a surrogate measure of 24-hour porphyrin excretion rates. *JOEM* 1998; 40: 1090-1101

## A P P U N T I D I M E T O D O

# Controllo di qualità tecnica sui radiogrammi del torace effettuati per la sorveglianza sanitaria dei lavoratori esposti al rischio di pneumoconiosi: proposta di un metodo di *screening* qualitativo

GIOVANNA. MANZARI, E. VALENTI, F. D'EPIFANIO\*, A. QUERCIA, E. CARDONA\*

Dipartimento di Prevenzione – Servizio PISLL, ASL Viterbo

\*Dipartimento Ospedaliero di Civita Castellana – UO Radiologia

## KEY WORDS

Chest radiography; quality control; pneumoconiosis

## SUMMARY

**«Technical quality control of chest radiographs performed for purpose of health control of workers exposed to pneumoconiosis risk: proposal of a qualitative screening method».** **Background:** The necessity of a qualitative screening has arisen from the fact that good technical quality is of fundamental importance for evaluating initial pneumoconiosis, for reducing inter- and intra-reader variability, for effective secondary prevention and for forensic medicine purposes. **Objectives:** The authors report experience in use of a method to evaluate the quality of chest radiographs performed in health surveillance programs for workers at risk for development of pneumoconiosis. **Methods:** 747 postero-anterior chest radiographs concerning employees of 21 ceramic factories in the Province of Viterbo were examined. A standardized pattern was created for this evaluation. The pattern considers the main factors that can influence the quality of chest radiographs and assigns points for each of them. That factors are: 1) reproduced image of the lung's vascular structure, chiefly in the peripheral portions; 2) reproduced image of heart border, aorta, diaphragm; 3) deep inspiration; 4) symmetric image of the chest; 5) position of the scapulae; 6) visualization of the costal-phrenic angles; 7) technical impairments. **Results:** The application of the method revealed that half of the chest radiographs examined had poor image quality for a suitable reading, in conformity with the ILO 1980 guidelines. The critical points are poor visualization of the lung's vascular structure due to overexposure or underexposure, technical impairments, non-correct scapulae position. **Conclusions:** The authors believe that the suggested method can be a useful instrument for self-testing the quality of chest radiographs performed in radiology centers and for the National Health Service to test the quality of chest radiographs performed in health surveillance programs.

Pervenuto il 14.12.2001 - Accettato il 9.9.2002

Corrispondenza: Dr.ssa G. Manzari Servizio Prevenzione Igiene e Sicurezza nei Luoghi di Lavoro ASL Viterbo, Via Ferretti 169, 01033 Civita Castellana (VT) - Tel. 0761.541034 - Fax 0761.541032 - e-mail spisllciv@libero.it

## RIASSUNTO

*Gli autori riportano l'esperienza di utilizzo di un metodo valutativo della qualità dei radiogrammi del torace, eseguiti a scopo di sorveglianza sanitaria su lavoratori esposti a rischio di pneumoconiosi. L'esigenza di uno screening qualitativo nasce dalla fondamentale importanza che riveste la buona qualità tecnica nell'interpretazione dei quadri iniziali di pneumoconiosi, per ridurre la variabilità intra/interindividuale dei lettori, per una efficace prevenzione secondaria e a scopi medico-legali. Sono stati esaminati 747 radiogrammi del torace in proiezione postero-anteriore, eseguiti in 21 aziende del comparto di produzione ceramica della Provincia di Viterbo. Per tale valutazione è stata messa a punto una griglia standardizzata che considera i principali aspetti che influiscono sulla qualità dei radiogrammi toracici, consentendo di attribuire un "punteggio" ad ognuno di essi. Gli aspetti presi in esame sono: 1) riproduzione della struttura vascolare del polmone, soprattutto nelle porzioni periferiche; 2) riproduzione dei bordi di cuore, aorta, diaframma; 3) inspirazione profonda; 4) riproduzione simmetrica del torace; 5) posizione delle scapole; 6) visualizzazione degli angoli costo-frenici; 7) eventuali artefatti tecnici. L'applicazione del metodo ha messo in evidenza che la metà dei radiogrammi esaminati risulta qualitativamente insufficiente per una efficace lettura secondo le linee guida ILO 1980, facendo emergere, come elementi critici la non buona visualizzazione del disegno vascolare per sovra o sottoesposizione, la presenza di artefatti tecnici e la non corretta posizione delle scapole. Gli autori ritengono che tale metodo possa rappresentare un utile strumento di verifica interna per i laboratori radiologici e di controllo di qualità sulla sorveglianza sanitaria nel territorio da parte dei Servizi delle ASL.*

## INTRODUZIONE

Il comparto di produzione di manufatti in ceramica, rappresentati in prevalenza da idrosanitari e stoviglie occupa, nella provincia di Viterbo, circa 4000 addetti, gran parte dei quali sono esposti a polveri contenenti silice libera cristallina.

Negli anni passati in tale settore vi è stato un gran numero di denunce di silicosi polmonare, che ha portato a numerosi riconoscimenti da parte dell'INAIL, ma anche a contenziosi tecnico scientifici, sociali e legali, dovuti alle differenti interpretazioni dei quadri radiologici da parte dei medici radiologi del territorio, dell'Istituto assicuratore e da consulenti dell'Autorità Giudiziaria.

E' nota del resto l'esistenza di una grande variabilità di interpretazione inter e intraindividuale soprattutto nel caso di quadri iniziali di pneumoconiosi (1, 3, 8, 9, 11). Tale situazione ha generato grande incertezza circa la reale prevalenza della patologia nella popolazione lavorativa esposta.

La letteratura scientifica è concorde nel ritenere che solo radiogrammi del torace di qualità consentono di individuare quadri iniziali o sospetti di pneumoconiosi (9, 10, 12, 14). Il Servizio Prevenzione Igiene e Sicurezza nei Luoghi di Lavoro in collaborazione con UO di Radiologia dell'Ospedale

di Civita Castellana ha affrontato il problema della qualità delle radiografie del torace, molto rilevante nella specifica realtà di Civita Castellana, con una serie di azioni sintetizzabili come di seguito:

- formazione specifica di radiologi e medici del lavoro mediante un corso per conseguire la certificazione di lettori esperti (*B readers*), realizzato in collaborazione con il *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) e con l'Osservatorio Epidemiologico Regionale (OER);
- promozione all'adozione di protocolli tecnici di esecuzione e lettura dei radiogrammi del torace, rispondenti alle linee guida ILO 1980 presso tutte le strutture sanitarie interessate;
- costruzione di una griglia di valutazione per la qualità dei radiogrammi del torace;
- controllo di qualità sui radiogrammi del torace eseguiti a scopo di sorveglianza sanitaria sui lavoratori esposti a polveri contenenti silice.

Il presente studio illustra i risultati di una indagine volta a valutare la qualità tecnica dei radiogrammi del torace eseguiti nel corso della sorveglianza sanitaria degli esposti a rischio di pneumoconiosi polmonare nel comparto della ceramica della provincia di Viterbo; inoltre viene proposto un metodo standardizzato di *screening* per esprimere un giudizio qualitativo, da parte dei soggetti

chiamati a vario titolo ad effettuare o controllare gli esami. Tale metodo consente di selezionare i radiogrammi di qualità tecnica sufficiente per procedere alla classificazione ILO 1980, e di escludere quelli gravati da difetti tali da rendere questa classificazione inattendibile o fortemente dubbia.

Il metodo proposto può inoltre essere impiegato in fase di autorizzazione o di verifica di laboratori da autorizzare o già autorizzati ai sensi dell'art. 161 del DPR 1124.

## METODI

Il Servizio PISLL della ASL Viterbo in collaborazione con l'Osservatorio Epidemiologico della Regione Lazio e con il *National Institute for Occupational Safety and Health* ha realizzato nel 1998 il corso di formazione sulla classificazione ILO 1980, che negli Stati Uniti abilita i lettori certificati come *B-reader* alla lettura dei radiogrammi secondo i criteri dettati da tali linee guida internazionali (13).

Al fine di valutare la qualità delle radiografie del torace per la sorveglianza sanitaria dei lavoratori esposti, è stata messa a punto una griglia valutativa, che esamina i principali aspetti di qualità tecnica che sono indicati dalla letteratura scientifica sull'argomento (2, 6, 7).

Tale griglia prende in considerazione 7 aspetti ai quali è stato attribuito un peso diverso in relazione alla diversa rilevanza nel condizionare il livello qualitativo finale del radiogramma.

Nell'applicare la griglia si parte da un punteggio massimo di 10 e se i criteri vengono tutti soddisfatti a pieno non si sottraggono punti; negli altri casi vengono scalati punti o frazioni di punto in maniera crescente in rapporto all'inadeguatezza riscontrata. Le sottrazioni effettuate classificano un radiogramma qualitativamente accettabile fino al punteggio di 6/10, inaccettabile al di sotto.

L'esame qualitativo presta attenzione in particolare ai seguenti aspetti.

1) *Riproduzione della struttura vascolare dell'intero polmone, con particolare attenzione alla rappresentazione dei vasi periferici soprattutto del mantello; evidenza delle linee mediastiniche.*

Tale aspetto tiene conto delle influenze sul disegno vascolare derivanti dalla sotto o sovraesposizione del radiogramma e non dagli altri fattori presi in esame dalle voci successive. Se il disegno vascolare può essere ben seguito visivamente fino alla periferia dei campi polmonari, non vengono sottratti punti; all'opposto si sottraggono 5 punti nel caso in cui una eccessiva sovraesposizione del radiogramma rende completamente invisibile il disegno vascolare oppure nel caso in cui una eccessiva sottoesposizione confonde totalmente il disegno vascolare con l'immagine sovrapposta delle altre strutture parenchimali; altro indicatore di sottoesposizione è la difficoltà di distinguere le linee mediastiniche nell'ambito dell'ombra cardiaca. Nei casi intermedi tra le opposte situazioni sopra descritte si sottraggono punti o frazioni di punto intermedi tra 0 e 5.

2) *Netta riproduzione dei bordi del cuore, dell'aorta e del diaframma.*

Tale aspetto può risentire di artefatti da movimento che rendono meno netti i contorni di tali strutture; un radiogramma "mosso" compromette la visibilità delle piccole opacità. Anche per tale aspetto si possono sottrarre fino a 5 punti in base a quanto è compromessa la visualizzazione del parenchima polmonare, secondo i criteri sopra esposti.

3) *Inspirazione profonda valutata sia dalla posizione delle coste sopra il diaframma sia dalla buona visualizzazione dei vasi in sede inter-ilo-diaframmatica.*

L'inspirazione è giudicata buona se consente di visualizzare al di sopra del diaframma la X costa posteriormente o la VI anteriormente. Tale grado di inspirazione determina una adeguata distensione delle basi polmonari con buona visualizzazione delle ramificazioni vasali comprese tra l'ilo e il diaframma. Quanto minore è l'inspirazione tanto maggiore è l'"affastellamento" dei vasi a tale livello che interferisce con l'identificazione di eventuali piccole opacità. Per tale aspetto si sottraggono fino a 3 punti, poiché l'interferenza riguarda soprattutto la corretta visualizzazione delle porzioni basali del polmone.

4) *Riproduzione simmetrica del torace.*

Si è utilizzato come riferimento la posizione delle estremità medialì delle clavicole, in corrispon-

denza dell'articolazione con lo sterno, che devono risultare sostanzialmente equidistanti dalla linea mediana dello sterno stesso. Anche in tale caso la sottrazione massima è di 3 punti.

5) *Bordo mediale delle scapole al di fuori dei campi polmonari.*

Le scapole devono risultare completamente fuori dai campi polmonari. Quando entrambe le scapole risultano totalmente all'interno dei campi polmonari si sottraggono 2 punti; nelle situazioni intermedie si sottraggono punti intermedi tra 0 e 2. Tale aspetto deve essere rigorosamente valutato nel caso in cui si voglia ricercare l'eventuale presenza di placche pleuriche per le quali la sovrapposizione delle immagini scapolari rappresenta un notevole fattore di confondimento.

6) *Completa visualizzazione degli angoli costo-frenici.*

Gli angoli costo-frenici devono essere entrambi completamente visibili nel radiogramma. Quando entrambi sono totalmente tagliati fuori si sottraggono 2 punti; nelle situazioni intermedie si sottraggono punti intermedi.

7) *Eventuale presenza di artefatti tecnici* (anomalie di sviluppo, anomalie di fissaggio, da rullo di trascinamento, scariche elettriche elettrostatiche, difettoso essiccamento, esposizione impropria alla luce, ...).

Tali artefatti dipendono da problemi nel buon funzionamento delle apparecchiature o nelle procedure tecniche o di manutenzione. Il radiogramma potrà risultare ingiallito, striato, macchiato, con settori più o meno ampi in cui ha preso luce, con la sovrapposizione di collane, ciondoli o altri materiali radioopachi.

Quando tali difetti compromettono totalmente la visualizzazione del parenchima, possono bastare da soli a rendere un radiogramma insufficiente, con la sottrazione di 5 punti.

Il controllo di qualità è stato effettuato valutando i radiogrammi del torace più recenti effettuati in alcune Aziende ceramiche del territorio da quattro differenti laboratori radiologici, due dei quali utilizzano mezzi mobili per effettuare gli esami presso le sedi delle aziende.

L'esame qualitativo è stato effettuato congiuntamente da almeno due medici B readers, dei quali uno specialista in radiologia, che hanno compilato

e sottoscritto per ogni radiogramma lo schema in figura 1.

Tale metodo viene utilizzato per esprimere un giudizio qualitativo su radiogrammi del torace in proiezione postero-anteriore.

## RISULTATI

Lo *screening* qualitativo sui radiogrammi del torace ha coinvolto 21 aziende del comparto ceramico. Sono stati esaminati 747 radiogrammi del torace in postero-anteriore, effettuati da 4 laboratori radiologici operanti sul territorio, indicati coi numeri da 1 a 4.

I radiogrammi erano stati effettuati in un arco di tempo compreso tra il novembre 1995 e l'ottobre 2000.

L'analisi dei dati nel suo complesso, riportata in tabella 1, ha mostrato che il 49,9% degli esami valutati erano di qualità insufficiente, tale da non consentire di procedere in maniera attendibile alla classificazione ILO 1980 per pneumoconiosi. L'alta percentuale di radiogrammi insufficienti è stata determinata soprattutto dalla scarsa qualità riscontrata nel laboratorio indicato con il numero 1. Ciò ha consentito al Servizio di identificare in tale laboratorio delle criticità da segnalare per gli opportuni provvedimenti, come di seguito sarà illustrato. Nella tabella sono riportati il punteggio medio ottenuto nei quattro laboratori, dopo la sottrazione dei punti derivante dall'applicazione della griglia valutativa, la mediana dei punteggi e la moda.

Nella tabella 2 è riportato, per l'intero gruppo di radiogrammi, l'analisi dei punti sottratti per ognuno dei sette aspetti esaminati nella griglia; sono indicati, per ogni singolo aspetto, il numero e la percentuale di radiogrammi in cui sono stati sottratti punti con media e deviazione standard di tali sottrazioni.

Le maggiori sottrazioni di punti, per frequenza ed entità, sono rappresentate dalla non ottimale visualizzazione del parenchima per sovra o sottoposizione e dalla presenza di difetti tecnici. Di rilievo risulta anche la non corretta posizione delle scapole, mentre globalmente trascurabili appaiono i problemi rilevati per gli altri aspetti.

COGNOME \_\_\_\_\_ NOME \_\_\_\_\_  
 DATA NASCITA \_\_\_\_\_ DATA RX \_\_\_\_\_

	0	1	2	3	4	5	FRAZIONI
STRUTTURA VASCOLARE E LINEE MEDIASTINICHE							
BORDI CUORE, AORTA E DIAFRAMMA							
INSPIRAZIONE PROFONDA							
SIMMETRIA TORACE							
BORDI SCAPOLARI							
ANGOLI COSTO-FRENICI							
DIFETTI TECNICI							

**PUNTEGGIO TOTALE:**

**GIUDIZIO CONCLUSIVO:**  SUFFICIENTE  
 INSUFFICIENTE

DATA \_\_\_\_\_

FIRMA DEI COMPILATORI

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Figura 1 - Scheda di valutazione qualitativa dei radiogrammi del torace in postero-anteriore

Tabella 1 - Valutazione qualitativa dei radiogrammi esaminati mediante griglia

Laboratorio radiologico	N. radiogrammi valutati	Giudicati sufficienti	Giudicati insufficienti	Punteggio medio attribuito	Mediana	Moda
1	511	164 (32%)	347 (68%)	4,5±2,5	4	3
2	189	169 (89%)	20 (11%)	7,3±1,5	7,5	8
3	29	23 (79%)	6 (21%)	6,4±1,4	6,5	6
4	18	18 (100%)	/	9,2±0,6	9	9
Totale	747	374 (50,1%)	373 (49,9%)	5,4±2,6	6	6

**Tabella 2** - *Analisi dei punti sottratti ai radiogrammi per ogni singolo aspetto esaminato*

Aspetto esaminato	N. prove con sottrazione di punti	%	Media dei punti sottratti	D.S.
Visualizzazione vasi/linee med.	664	89,5	2,1	1,1
Difetti tecnici	479	64,1	2,5	1,1
Posizione delle scapole	387	52,2	1,2	0,5
Bordi cuore/diaframma	150	20,2	0,8	0,5
Simmetria campi polmonari	150	20,2	0,6	0,3
Angoli costo-frenici	106	14,3	0,9	0,4
Inspirazione profonda	81	10,9	0,8	0,3

Nella tabella 3 l'analisi dei punti sottratti per ogni singolo aspetto è stata condotta separatamente per i quattro laboratori, raffrontando le sottrazioni medie ottenute nelle prove sufficienti e insufficienti. Le medie dei punti sottratti per la sovra o sottoposizione è paragonabile nei laboratori 1, 2 e 3 (per il laboratorio 4 sono stati esaminati pochi radiogrammi, risultati tutti di buona qualità), a dimostrazione che tale fattore rappresenta un elemento "critico" diffuso nella effettuazione di radiogrammi standard del torace. Una netta differenza si riscontra invece nei punti sottratti a causa di difetti tecnici, che sono risultati determinanti nel produrre la scarsa qualità riscontrata nel laboratorio 1. Per gli altri aspetti alcune differenze meno evidenti emergono per la posizione delle scapole (mediamente meno corretta nei laboratori 1 e 3), nella visualizzazione degli angoli costo-frenici e nei bordi cardio-diaframmatici (mediamente meno correttamente riprodotti nel laboratorio 2).

Una analisi specifica dei dati è stata condotta nel laboratorio 1, essendo quello nel quale sono stati

valutati il maggior numero di radiogrammi ed è stata riscontrata la più alta percentuale di esami inadeguati. Tale laboratorio utilizza un mezzo mobile per eseguire le radiografie direttamente presso le aziende, mentre i laboratori 2 e 3 utilizzano strutture fisse. Il laboratorio 4 ha utilizzato un mezzo mobile, ma l'esiguo numero di radiogrammi valutati, tutti di buona qualità, non consente di trarre ulteriori deduzioni.

All'interno degli esami del laboratorio 1 bisogna distinguere tra un gruppo di 444 eseguiti prima dell'anno 2000 e un gruppo di 67 eseguiti nell'ottobre 2000; questi ultimi vanno considerati separatamente in quanto sono stati effettuati dopo che, dietro nostra segnalazione, il Ministero della Sanità era intervenuto presso il laboratorio per verificare l'idoneità ad eseguire esami radiologici ai sensi dell'art. 161 del DPR 1124/65. Dopo tale intervento il laboratorio radiologico ha provveduto ad effettuare migliorie e modifiche, successivamente alle quali il Ministero della Sanità ha acquisito un campione di 67 radiogrammi, chiedendo al nostro Servizio di

**Tabella 3** - *Media dei punti sottratti ad ogni singolo Laboratorio, per ogni aspetto esaminato, nei radiogrammi giudicati sufficienti e insufficienti, e del totale punti sottratti*

Aspetto	Laboratorio 1		Laboratorio 2		Laboratorio 3		Laboratorio 4
	Suf.	Insuf.	Suf.	Insuf.	Suf.	Insuf.	Suf.
Visualizzazione vasi/linee mediastiniche	0,8	2,8	1,4	2,5	1,4	2,7	0,2
Difetti tecnici	0,9	3,0	0,01	0,05	0,6	1,2	0,2
Posizione delle scapole	0,5	0,9	0,2	0,3	0,7	1,3	0,2
Bordi cuore/diaframma	0,03	0,2	0,2	0,9	0,04	0	0
Simmetria campi polmonari	0,1	0,1	0,2	0,7	0,1	0,1	0,2
Angoli costo-frenici	0,06	0,04	0,2	0,9	0,2	0,3	0,06
Inspirazione profonda	0,03	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0
Totale medie punti sottratti	5,5		2,7		3,6		0,8

procedere ad una nuova valutazione, applicando la medesima griglia valutativa. Il risultato è stato di un netto miglioramento, con un solo radiogramma risultato insufficiente ed un punteggio medio negli altri 66 di 7,9 decimi.

Il fattore che ha più pesato negativamente negli esami effettuati dal laboratorio 1 prima dell'anno 2000 è stato la presenza di gravi difetti tecnici nello sviluppo/fissaggio, nella presa di luce, negli artefatti da trascinamento; tali difetti tendono ad accentuarsi con l'aumento del numero di radiogrammi effettuati nello stesso giorno, come riportato in tabella 4. L'applicazione del test  $\chi^2$  per la diversità delle frequenze risulta altamente significativo. Il netto miglioramento riscontrato nei 67 radiogrammi effettuati dallo stesso laboratorio nell'anno 2000, dopo che era stato sollevato il problema della qualità degli esami, conferma la possibilità di influire positivamente su quelle variabili che avevano pesato sul prodotto finale.

**Tabella 4** - Laboratorio 1: diversa frequenza nella qualità dei radiogrammi per numero di esami effettuati in una singola giornata precedentemente e successivamente al controllo di qualità (anno 2000)

N. radiogrammi/die	Giudicati sufficienti	Giudicati insufficienti	Totale
90-107	12 (6%)	185 (94%)	197
40-61	23 (23%)	78 (77%)	101
da 1 a 36	63 (43%)	83 (57%)	146
totale	98 (22%)	346 (78%)	444
67 (anno 2000)	66 (99%)	1 (1%)	67

## CONCLUSIONI

La necessità di assicurare sufficienti livelli di sensibilità e specificità degli esami strumentali eseguiti a scopo preventivo nonché il rispetto delle vigenti norme radioprotezionistiche in merito all'esposizione a scopi diagnostici delle persone, richiedono che chi effettua esami radiologici garantisca la miglior qualità ottenibile per il tipo di esame e per le finalità per cui è fatto (4, 5); su un altro versante, il ruolo anche di controllo che il D.lgs. 626/94 attribuisce ai Servizi di Prevenzione delle ASL sull'operato dei soggetti aziendali della prevenzione, impone che questi Ser-

vizi si dotino di strumenti valutativi che, oltre ad essere efficaci, garantiscano anche l'imparzialità, la trasparenza e la esplicitazione dei criteri utilizzati. Nel caso degli esami radiologici del torace effettuati come sorveglianza sanitaria per gli esposti al rischio di pneumoconiosi, l'esistenza di linee guida da tempo stabilite e riconosciute rappresenta una riferimento certo ed autorevole cui si deve ispirare sia chi esegue sia chi controlla tali esami. Nella letteratura sull'argomento sono riportati i criteri da rispettare per l'ottimizzazione dell'esame radiografico del torace, che raccomandano l'uso di alte tensioni ( $\geq 120$  kV), adeguata distanza fuoco-pellicola ( $\geq 180$  cm), ridotti tempi di esposizione (5 ms e comunque  $< 20$  ms) ed altri criteri di qualità cui gli autori si sono riferiti nella messa a punto della griglia valutativa.

L'esigenza di assicurare la buona qualità radiologica per l'identificazione precoce delle alterazioni pneumoconio gene ai fini di sorveglianza sanitaria era certamente già presente negli anni in cui è stato promulgato il DPR 1124, che all'art. 161 recita "...Gli enti che intendono ottenere l'autorizzazione a compiere gli esami medici di cui al presente capo (esame clinico e radiografia del torace) devono essere autorizzati (...) previo accertamento della adeguata organizzazione ed attrezzatura dell'ente stesso...".

Il protocollo di valutazione qualitativa messo a punto presso la ASL di Viterbo è concepito quindi come strumento predefinito e standardizzato utile a svolgere correttamente il proprio ruolo di controllo ed autorizzativo, potendo entrare in merito alla verifica di qualità del "prodotto" radiologico e non solo dei "prerequisiti" necessari ad ottenerlo. La griglia valutativa consente inoltre di pesare separatamente le principali variabili che contribuiscono a condizionare la qualità di un radiogramma standard del torace, al fine di fornire precise indicazioni in merito ai provvedimenti correttivi da mettere in atto.

L'analisi qualitativa condotta con tale protocollo, analizzata nel suo complesso, ha mostrato che:

- Il problema della qualità dei radiogrammi del torace è reale e richiede un rigoroso controllo.

Nel nostro studio, anche se il laboratorio 1 è risultato essere gravemente deficitario rispetto agli altri, la percentuale di radiogrammi insufficienti nei laboratori 2 e 3 richiede ugualmente interventi migliorativi.

- Il problema della sovra/sottoesposizione dei radiogrammi appare preminente nella gran parte degli esami valutati. Ciò dimostra che tale aspetto è probabilmente quello più problematico da mettere a punto, nonostante esistano indicazioni abbastanza precise circa il chilovoltaggio ed i tempi di esposizione, sia nelle linee guida ILO 1980 che in altri riferimenti bibliografici già citati (2, 7).

- Nel caso del laboratorio 1, oltre alle criticità comuni agli altri laboratori, è stato possibile dimostrare l'influenza negativa svolta dalla presenza di gravi artefatti tecnici, ripetuti in numerosi radiogrammi successivi.

- Anche la scorretta posizione delle scapole è apparsa rilevante nel condizionare la qualità degli esami, essendosi rilevata in oltre la metà dei radiogrammi valutati. Ricordiamo la particolare importanza di tale aspetto quando si voglia ricercare l'eventuale presenza di placche pleuriche, come nell'esposizione a fibre di amianto.

- Gli altri aspetti esaminati (riproduzione netta dei profili cardio-diaframmatici, corretta inspirazione, simmetria dei campi polmonari e visualizzazione degli angoli costo-frenici) sono risultati complessivamente rispettati, non essendo stati sottratti punti nell'80-90 % degli esami valutati.

Per la radiografie effettuate dai laboratori 2 e 3, il Servizio ha provveduto a comunicare i risultati ottenuti nello screening valutativo, esortando al rigoroso rispetto degli standard di qualità per ridurre le percentuali di radiogrammi insufficienti, risultate rispettivamente del 11% e 21%.

Nel caso del laboratorio 1, dove la percentuale di insufficienze qualitative è risultata notevolmente maggiore, il Servizio ha provveduto a segnalare all'Autorità Giudiziaria la possibile violazione delle norme radioprotezionistiche e ai Ministeri del Lavoro e della Sanità la necessità di revocare ovvero di rivalutare l'esistenza dei requisiti per l'autorizzazione rilasciata ai sensi dell'art 161 del DPR 1124/65.

Gli autori credono che lo strumento valutativo messo a punto risponda agli scopi per cui è stato concepito, ritenendo che possa essere utilizzato come verifica interna in qualsiasi laboratorio radiologico, per mirare al miglioramento qualitativo dei radiogrammi del torace effettuati nell'ambito della sorveglianza sanitaria di lavoratori esposti a rischi professionali per l'apparato respiratorio.

## BIBLIOGRAFIA

1. ATTFIELD MD, ALTHOUSE R, REGER RB: An investigation of inter- reader variability among X-ray readers employed in the underground coal miner surveillance program. *Ann Am Conf Gov Ind Hyg* 1986; *14*: 401-409
2. BONOMO L, BERARDI P, BERGAMINI C, e coll: *Assicurazione della qualità in radiologia: l'esame radiografico del torace*. Documentazione SIRM - n. 1/95
3. BOURBEAU J, ERNST P: Between- and within reader variability in the assessment of pleural abnormality using the ILO 1980 international classification of pneumoconiosis. *Am J Ind Med* 1988; *14*: 537-543
4. D.lgs. 26 maggio 2000 n. 187, *Gazzetta Ufficiale* n. 157 del 7 luglio 2000 Suppl Ord 105
5. INDOVINA PL, REGGIANI A, CALICCHIA A, NICOLOSI A: L'esame radiografico del torace per i lavoratori a rischio di pneumoconiosi: considerazioni critiche sugli aspetti normativi e radioprotezionistici. *Med Lav* 1986; *77*: 489-495
6. INTERNATIONAL LABOUR OFFICE: *Guidelines for the use of ILO international classification of radiographs of pneumoconioses*. Geneva ILO 1980
7. MOORES BM: *Technical and physical parameters for quality assurance in medical diagnostic radiology*. Quality Assurance Working Group, Diagnostic Method Committee - BIR Report 18, 1989
8. MUSCH DC, HIGGINS IT, LANDIS JR: Some factors influencing interobserver variation in classifying simple pneumoconiosis. *Br J Ind Med* 1985; *42*: 346-349
9. MUSCH DC, LANDIS JR, HIGGINS IT, et al: An application of K-type analyses to interobserver variation in classifying chest radiographs for pneumoconiosis. *Stat Med* 1984; *3*: 73-83
10. PAAKKALA T: Training of general practitioners in interpreting chest radiographs. *Med Educ* 1988; *22*: 449-453
11. PARISI E, BATTISTA G, COVIELLO G, e coll: Studio radiologico su lavoratori esposti a polveri silicee. *Atti del Convegno Nazionale Comparto Ceramica*. Civita Castellana (VT) 1989: 281-289
12. PEARSON NG, ASHFORD JR, MORGAN DC, e coll: Effect of quality of chest radiographs on the categorization of coalworkers' pneumoconiosis. *Br J Ind Med* 1965; *22*: 81-92
13. WAGNER GR, ATTFIELD MD, KENNEDY RD, PARKER JE: The NIOSH B Reader Certification Program. *JOM* 1992; *34*: 879-884
14. WAGNER GR, ATTFIELD MD, PARKER JE: Chest radiography in dust-exposed miners: promise and problems, potential and imperfections. *Occup Med* 1993; *8*: 127-141

## NOTIZIARIO

## 10th Congress on Occupational Health Services Amsterdam 13-16 Novembre 2002

Organizzato dall'Academic Medical Centre di Amsterdam si è tenuto dal 13 al 16 novembre il 10° Congresso dell'ICOH Scientific Committee Occupational Health Services, Research and Evaluation. Il congresso, al quale hanno partecipato oltre 200 ricercatori e professionisti, la metà dei quali provenienti da 19 stati europei e 10 extraeuropei, è stato preceduto da 4 *workshops* aventi come oggetto dimostrazioni di applicabilità della medicina basata sulle prove di efficacia nel campo della medicina del lavoro, utilizzo di linee guida, valutazione tecnica dell'efficacia dei servizi e sviluppo di servizi e prodotti.

I lavori si sono articolati secondo un programma (*What do our clients expect from us? What do occupational health services have to offer to their clients? Occupational Health Services: do they work?*) che prevedeva il succedersi di *key-note address* e comunicazioni sui diversi temi. Dopo l'introduzione di J. Rantanen che ha proposto una lettura sulle tendenze dei servizi di prevenzione in una prospettiva internazionale, nella prima sessione (*What do our clients expect from us?*) sono state esplorate la relazione esistente tra cliente e fornitore attraverso la misura di indicatori appropriati (P. Peltomaki) e le esigenze del cliente stesso attraverso la descrizione dei problemi con i quali più di frequente i servizi si devono confrontare (I.S. Mehlum, C.G. van Deursen, H. Fukuda). Nella seconda sessione (*What do occupational health services have to offer to their clients?*) dopo le *keynotes* dell'economista inglese A. Maynard (che ha proposto una lettura in chiave di costo/benefici degli interventi preventivi e, più in generale, di quelli sanitari) e di G. Franco (sulla necessità di adottare pratiche basate sull'efficacia piuttosto che sulla consuetudine attraverso l'applicazione di nuovi paradigmi professionali) i lavori hanno avuto come oggetto una nutrita serie di presentazioni articolate su sessioni parallele (Ritorno al lavoro, Malattie occupazionali, Valutazione del rischio). Successivamente alla *keynote* di N. Pronk (sulla possibilità di considerare come prodotto del servizio gli interventi sui comportamenti individuali enfatizzando i benefici che ne derivano), sono state presentate comunicazioni sui temi della cooperazione tra professionisti e sulla rilevanza dei fattori psicosociali. Nella terza sessione (*Occupational Health Services: do they work?*) dopo le *keynotes* di G. Pransky (che

ha illustrato la possibilità di utilizzare misure per il monitoraggio dell'efficiacia degli interventi) e di P. Westerholm (su qualità e efficacia dei servizi di prevenzione in Europa) sono stati affrontati i temi della soddisfazione del cliente (G. Moens), della valutazione dell'efficacia dell'intervento attraverso indagini che hanno utilizzato il disegno sperimentale dello studio randomizzato controllato (J.C. Van Beek), degli effetti dell'applicazione di raccomandazioni nelle decisioni (D.L. Bruinvels).

Oltre alle sessioni scientifiche sono stati organizzati dibattiti sul modello del faccia a faccia sui temi del futuro dei servizi: (i) la prospettiva del libero mercato (F. van Dijk) contro quella della regolamentazione (E. Macdonald rappresentato da K Hulshof) e (ii) il funzionamento dei sistemi di prevenzione e protezione, che ha visto contrapposti L. Vogel, rappresentante dell'European Trade Union Technical Bureau for Health and Safety, e B Luten (responsabile dei servizi sanitari di una multinazionale) che hanno dato luogo a una vivace discussione sulle diversità tra l'approccio collettivo/ambiente di lavoro e quello individuale/comportamentale.

Hanno trovato spazio all'interno del Congresso sia un *exploratory meeting* per verificare la possibilità di attivare una linea di medicina del lavoro nell'ambito della Cochrane Collaboration che la riunione annuale dell'ICOH Scientific Committee Occupational Health Services, Research and Evaluation. Il prossimo appuntamento scientifico è previsto per il mese di novembre 2003 a Ghent. L'evento avrà come tema *Human resources management in occupational health services*. Gli argomenti trattati saranno: (i) i bisogni del personale, (ii) l'organizzazione interna, (iii) il ruolo e la funzione del personale, (iv) gli aspetti etici.

Il riferimento per informazioni è Mrs S. Verbecke – Ghent University, Dept. Public Health, University Hospital, Bloc A, De Pintelaan 185, 9000 Ghent BE, fax +32 9 240 49 94, e-mail: Sonja.Verbecke@rug.ac.be. Il comitato ha inoltre deciso la sede dell'11° Congresso dell'ICOH Scientific Committee Occupational Health Services, Research and Evaluation (Modena, settembre 2004). Per informazioni su quest'ultimo evento: medlav@unimo.it.

Giuliano Franco  
Università degli Studi di Modena

## Conferenza Internazionale "Indoor Air 2002" Monterey (California)

Si è tenuta in luglio a Monterey (California) la nona edizione del Congresso Internazionale sulla qualità dell'aria *indoor* "Indoor Air 2002". Al congresso, che ha cadenza quadriennale, hanno partecipato circa 1100 persone provenienti da tutti i continenti e sono stati presentati circa 750 lavori. Numerosi e molto diversificati sono stati gli argomenti trattati, alcuni di interesse ingegneristico ed architettonico, altri medico-sanitario, tutti comunque proiettati alla progettazione ed al mantenimento di edifici sani (*healthy buildings*). Di seguito si riportano i seminari di maggior interesse per i medici del lavoro.

Numerose sessioni sono state dedicate alla valutazione della qualità dell'aria *indoor*. Ad esempio, nella sessione sui progetti di ricerca internazionali sono stati presentati i risultati preliminari dello studio europeo EXPOLIS (*Exposure Distribution of Adult Urban Population in Europe*) che ha confermato la priorità dell'impatto della esposizione *indoor* rispetto a quella *outdoor* negli abitanti di cinque importanti città europee tra le quali Milano.

Tre sessioni sono state dedicate al problema delle polveri sottili (PM10 e PM 2,5), con approfondimenti che hanno riguardato le sorgenti, i metodi migliori di campionamento e di analisi, gli effetti sulla salute e gli interventi preventivi necessari per ridurre le concentrazioni negli ambienti *indoor*. Informazioni molto interessanti sono attese dal nuovo filone di ricerca che prevede la caratterizzazione chimica delle polveri.

La sessione sul fumo passivo in ambienti confinati (*environmental tobacco smoke*), dopo alcuni studi inerenti la stima degli effetti sulla salute, ha visto l'intervento di rappresentanti di diverse organizzazioni americane, tra cui l'EPA, con un vivace dibattito sul tema delle normative e delle leggi in materia necessarie per prevenire tale importante rischio.

Da segnalare anche due sessioni dedicate allo studio dei contaminanti microbiologici degli ambienti confinati, con particolare riferimento alle muffe ed ai relativi effetti sulla salute, nonché alla necessità di definire nuovi indici microbiologici per la valutazione della qualità dell'aria.

Una giornata intera è stata dedicata agli allergeni presenti negli ambienti *indoor*. In particolare, vivace e stimolante è stato il dibattito sui motivi del recente e rapido incremento dei casi di allergie e di asma osservato un po' in tutto il mondo. Al momento non sono noti i motivi di tale "epidemia" e viene solo segnalata una possibile molteplicità

di cause tra le quali: incremento della esposizione ad allergeni *indoor* e ad inquinanti *outdoor*, riassetto immunitario conseguente alle vaccinazioni, alle terapie antibiotiche ed al miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie, modifica delle abitudini di vita (dieta e attività fisica).

In questa conferenza un tema poco trattato fino ad ora è stato invece oggetto di una intera sessione: la presenza di pesticidi negli ambienti confinati e possibili effetti sulla salute degli occupanti.

Di particolare interesse per il medico del lavoro è stata anche la sessione sulle patologie più strettamente correlate agli edifici (*Sick Building Syndrome* e *Multiple Chemical Sensitivity*). A tale proposito alcuni studi hanno ribadito l'importanza dell'utilizzo dei questionari come primo approccio allo studio del comfort ambientale percepito dagli occupanti.

Quattro sessioni sono state dedicate al delicato problema del rapporto tra la qualità dell'aria *indoor* e la tutela della salute dei bambini; a tal fine particolare enfasi è stata data alla necessità di standard ambientali di riferimento per le scuole.

Numerose sessioni sono state dedicate alla valutazione dei sistemi di ventilazione e condizionamento, alla elaborazione di nuovi standard di costruzione degli impianti di condizionamento che garantiscano un adeguato comfort termico e sulle differenti cause di disagio microclimatico. Due sessioni in particolare sono state dedicate alla presentazione di programmi governativi su nuovi standard di riferimento e sullo sviluppo di modelli matematici per lo studio del comfort relativo al microclima.

A sottolineare, infine, quanto lo studio delle problematiche relative agli ambienti confinati stia diventando importante, due simposi sono stati dedicati alla qualità dell'aria *indoor* nei paesi in via di sviluppo, con contributi dalla Cina, India, Zimbabwe, Costa Rica, Guatemala e Sud Africa, con proposta di linee guida per la qualità dell'aria anche per questi paesi.

Ulteriori informazioni, nonché i moduli per la richiesta degli atti del congresso (disponibili anche su compact disk), sono disponibili al sito [www.indoorair2002.org](http://www.indoorair2002.org).

Paolo Carrer  
Massimiliano Della Torre  
Dipartimento di Medicina del Lavoro,  
Università degli Studi di Milano

## R E C E N S I O N I

## Nuovi testi di Medicina del Lavoro

Recentemente due nuovi testi di Medicina del Lavoro si sono aggiunti all'offerta formativa che la nostra disciplina, la medicina del lavoro, offre agli studenti dei diversi corsi di laurea per la preparazione dell'esame di medicina del lavoro, agli specialisti in formazione di medicina del lavoro e di altre specializzazioni, ai medici già specialisti in medicina del lavoro ed ai cultori della materia per l'approfondimento di singole tematiche e, in generale, per l'aggiornamento nella disciplina.

Dei due testi, quello comparso nel settembre 2002 è opera di Ferdinando Gobbatto. Essa ha per titolo Medicina del Lavoro ed è edito dalla Casa Editrice Masson di Milano. Il prof. Gobbatto continua così la sua infaticabile attività formativa attraverso le sue pubblicazioni letterarie. Questo testo è una ulteriore testimonianza del suo impegno nella disciplina finalizzato alla formazione e informazione e all'aggiornamento.

Le problematiche sanitarie, preventive e medico-legali inerenti il rapporto lavoro-lavoratore, che vedono il medico del lavoro tra i principali operatori nel garantire la sicurezza e la prevenzione nei luoghi di lavoro, sono distribuite in quattro parti, ciascuna delle quali raggruppa specifici argomenti. La trattazione privilegia l'ottica medicalistica proprio perché diretta ai medici del lavoro e raggruppa tutti gli argomenti o capitoli, come indicato dallo stesso Autore. Sotto il termine di sorveglianza sanitaria e medici competenti, a significare che la sorveglianza sanitaria non si esaurisce nella esecuzione della visita medica ma è l'insieme delle attività, compresa la visita medica, che il medico del lavoro deve svolgere nei luoghi di lavoro per la tutela della salute dei lavoratori, quali ad esempio partecipare con un ruolo attivo alla valutazione del rischio.

La prima parte del libro è dedicata agli infortuni sul lavoro, alle emergenze in medicina del lavoro e agli incidenti rilevanti. È il primo testo ove questi argomenti sono presentati con l'approfondimento tecnico-scientifico che essi meritano. Ciascun argomento è introdotto partendo dagli aspetti legislativi, cui seguono i dati epidemiologici e quindi gli aspetti medico-sanitari e preventivi.

La seconda parte è dedicata alla valutazione dei rischi da agenti biologici, chimici, fisici, da cancerogeni e da organizzazione del lavoro. Questa parte è preceduta da un ca-

pitolo sul concetto di rischio e sui metodi per la sua valutazione. Quindi per classe di agenti di rischio sono riportati a seconda dei casi gli elementi conoscitivi sulla tossicologia e igiene industriale, cancerogenesi, microbiologia, psicologia del lavoro, necessari al medico competente per il suo apporto tecnoscientifico alla valutazione dei rischi.

La terza parte tratta delle malattie professionali per organi e apparati. Sono considerate le malattie del sistema nervoso, osteoarticolari, polmonari, cardiovascolari, del sangue, del fegato, renali, della funzione riproduttiva, della pelle e oculari. Ognuno di questi capitoli prende in considerazione innanzitutto gli agenti causali e quindi la patologia caratteristica da essi prodotta, gli elementi per la diagnosi clinica e quelli per la prevenzione.

Infine, la quarta parte è dedicata alla sorveglianza sanitaria, alla ricerca epidemiologica e all'etica in medicina del lavoro. Comprende otto capitoli che riguardano la tutela della salute e sicurezza nei luoghi di lavoro, il medico del lavoro ed i servizi di medicina del lavoro, i controlli sanitari, l'idoneità al lavoro, il libretto sanitario e di rischio, i sistemi esperti in medicina del lavoro, le indagini di *screening* e ricerca epidemiologica, l'etica in medicina del lavoro.

L'opera, come si può apprezzare dalla sua suddivisione in capitoli, è in grado di fornire le conoscenze tecnico-scientifiche che deve possedere oggi il medico del lavoro per svolgere nel migliore dei modi la sua attività professionale. Essa può essere definita un compendio molto ricco di contenuti tecnici, che non ne appesantiscono la lettura e forniscono al medico del lavoro una risposta pronta per risolvere le problematiche che di volta in volta si presentano.

Il secondo testo è comparso nei primi mesi dell'anno 2000 con il titolo Medicina del Lavoro. Ne sono autori Giovanni Scansetti, Pier Giorgio Piolatto e Giorgio Perrelli. Esso è pubblicato dalle Edizioni Minerva Medica di Torino. Si tratta della 5ª edizione del testo che nelle edizioni precedenti aveva come autori Giovanni F. Rubino e Luigi Pettinati.

Questa 5ª edizione del testo appare completamente rinnovata nella presentazione della materia rispetto alle edizioni precedenti e le patologie professionali non sono più riportate per settore produttivo capace di determinarle,

aspetto veramente innovativo nella prima edizione del 1976 ed in quelle successive, al quale è dovuta la rapida diffusione dei testi negli anni passati. In questa edizione, invece, gli autori nella prima parte riportano gli argomenti che rappresentano il *background* per la formazione del medico del lavoro. I primi 8 capitoli, a carattere monografico, sono dedicati, infatti, alla fisiologia del lavoro, ergonomia, tecnologia, organizzazione del lavoro, sperimentazione, epidemiologia occupazionale, igiene e sicurezza del lavoro e tossicologia industriale.

Si passa quindi alla trattazione della clinica delle malattie professionali, ove le patologie sono presentate sia per organo (apparato respiratorio, fegato, sangue, rene, sistema nervoso, cute) che per tipo di patologie (tumori, malattie infettive, intossicazioni professionali), per gruppo di agenti lesivi professionali (metalli, solventi industriali, rumore, vibrazioni meccaniche, sovraccarico biomeccanico, alte e basse temperature, radiazioni ionizzanti e non ionizzanti, elettricità, baropatie) e per settore produttivo (patologia rurale, patologia ospedaliera).

Gli ultimi tre capitoli si riferiscono ai rischi per l'ambiente, la psicologia del lavoro e la legislazione sul lavoro.

Quest'opera è apprezzabile per la presentazione sistematica degli argomenti, sia nella parte generale che nella parte più tecnica ove sono trattate le malattie da lavoro.

Entrambi i testi riportano l'aggiornamento legislativo in tema di sicurezza e prevenzione nei luoghi di lavoro fino all'anno e mese della loro pubblicazione. Essi, pur differenti nell'impostazione, rispondono molto bene alle attese formative e di aggiornamento sia degli studenti che degli specialisti che cercano un riscontro bibliografico per lo svolgimento della loro attività professionale di medicina del lavoro. La ricerca dell'argomento di interesse è inoltre facilitata dalla presenza di un esteso indice analitico che i due volumi possiedono. Se ne consiglia, pertanto, l'uso sia come strumento da consultare che come fonte per l'aggiornamento.

Leonardo Soleo  
Università degli Studi di Bari

*66° Congresso Nazionale Società Italiana di Medicina del Lavoro e Igiene Industriale (SIMLII)  
Bari 15-18 ottobre 2003 - Sheraton Nicolaus Hotel*

Organizzato dall'Università di Bari, si articola essenzialmente su due sezioni, la prima dedicata all'epidemiologia occupazionale ed ambientale e la seconda alla valutazione del rischio in tossicologia occupazionale.

Verranno presentate anche alcune linee guida della SIMLII e verranno effettuate tavole rotonde sui temi congressuali ed una sulla promozione della salute in ambiente di lavoro.

Ai partecipanti è garantita sia la certificazione di credito formativo ECM che i crediti per l'Accreditamento di Eccellenza degli specialisti in Medicina del Lavoro.

La Segreteria Scientifica è presso la Sezione di Medicina del Lavoro del Dipartimento di Medicina Interna e Medicina Pubblica (e-mail: [l.soleo@medlav.uniba.it](mailto:l.soleo@medlav.uniba.it)) mentre quella organizzativa è affidata al: Centro Italiano Congressi, v.le Escrivà, 28 - 70124 Bari; tel. 080/5043737; fax 080/5043736; e-mail: [info@cicsud.it](mailto:info@cicsud.it)

## Revisori 2002

*La «Medicina del Lavoro» ringrazia – oltre ai colleghi del Dipartimento di Medicina del Lavoro «Clinica L. Devoto» che in molti modi collaborano alla riuscita della rivista – tutti gli esperti, elencati di seguito, per il pronto, anonimo e non retribuito impegno profuso nella revisione dei dattiloscritti giunti alla Redazione nell'anno 2002. La loro preziosa collaborazione ha permesso alla nostra rivista di assumere un corretto atteggiamento critico a garanzia sia degli Autori che dei nostri lettori.*

AGNELLI Gianna	Istituti Clinici di Perfezionamento	MILANO
APOSTOLI Pietro	Istituto di Medicina del Lavoro dell'Università	BRESCIA
ASENNATO Giorgio	Dip. Med. Interna e Med. Pubblica - Scuola Spec. Med. Lav. dell'Università	BARI
BASILICO Stefano	Istituti Clinici di Perfezionamento	MILANO
BERETTA Ezio	Istituti Clinici di Perfezionamento	MILANO
BOCHICCHIO Francesco	Istituto Superiore di Sanità	ROMA
BOLT Hermann	Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität	DORTMUND-D
BUCHET J.P.	Université Catholique de Louvain	BRUXELLES-B
CAMERINO Donatella	Dipartimento di Medicina del Lavoro dell'Università	MILANO
CARRER Paolo	Istituti Clinici di Perfezionamento	MILANO
CAPODAGLIO Paolo	Servizio di Ergonomia - Fondazione Maugeri	MONTESCANO (Pv)
CASSITTO Maria Grazia	Istituti Clinici di Perfezionamento	MILANO
CATTANEO Andrea	Scuola di Specializzazione in Medicina del Lavoro	MILANO
CAVALLO Domenico	Dipartimento di Medicina del Lavoro dell'Università	MILANO
CHIAPPINO Gerolamo	Dipartimento di Medicina del Lavoro dell'Università	MILANO
CIRLA Angelo M.	Azienda Istituti Ospitalieri - Servizio di Medicina del Lavoro	CREMONA
CLONFERO Erminio	Istituto di Medicina del Lavoro dell'Università	PADOVA
COLOMBINI Daniela	CEMOC - Istituti Clinici di Perfezionamento	MILANO
CONSONNI Dario	Istituti Clinici di Perfezionamento	MILANO
FORNI Alessandra	Dipartimento di Medicina del Lavoro dell'Università	MILANO
FUBINI Bice	Dip. Chimica Inorganica, Fisica e dei Materiali dell'Università	TORINO
FUSTINONI Silvia	Istituti Clinici di Perfezionamento	MILANO
GIAVINI Erminio	Dipartimento di Biologia dell'Università	MILANO
IMBRIANI Marcello	Serv. di Fisiopatol. Resp. del Lavoro ed Ergonomia-Fondaz. S. Maugeri	PAVIA
INNOCENTI Andrea	UF PISLL USL 3	PISTOIA
L'ABBATE Nicola	Dip. di Medicina Interna e Medicina Pubblica dell'Università	BARI
LA VECCHIA Carlo	Istituto Mario Negri	MILANO
LUCCHINI Roberto	Istituto di Medicina del Lavoro dell'Università	BRESCIA
MARIANI Emilio	Servizio di Neurofisiopatologia Istituti Clinici di Perfezionamento	MILANO
MARONI Marco	Dipartimento di Medicina del Lavoro dell'Università	MILANO
MENSI Carolina	Dipartimento di Medicina del Lavoro dell'Università	MILANO
MERLUZZI Franca	Dipartimento di Medicina del Lavoro dell'Università	MILANO
MOSCATO Gianna	Fondazione "S. Maugeri" - IRCCS	PAVIA
OCCHIPINTI Enrico	CEMOC - Istituti Clinici di Perfezionamento	MILANO
PAGGIARO Luigi	Istituto di Fisiopatologia Respiratoria dell'Università	PISA
PAOLETTI Antonio	Dipartimento di Medicina Interna e Sanità Pubblica dell'Università	L'AQUILA
PERETTI Giovanni	Istituto di Clinica Ortopedica dell'Università	MILANO
PESATORI Angela C.	Dipartimento di Medicina del Lavoro dell'Università	MILANO
PICCOLI Bruno	Istituti Clinici di Perfezionamento	MILANO
PIOLATTO Giorgio	Dip. di Traumatologia, Ortopedia e Medicina del Lavoro dell'Università	TORINO
PONTELLO Mirella M.	Istituto di Igiene dell'Università	MILANO
RIBOLDI Luciano	Istituti Clinici di Perfezionamento	MILANO
RIVOLTA Giuseppe	Istituti Clinici di Perfezionamento	MILANO
RULLI Giovanni	Servizio Autorizzazioni e Accreditamento Strutture Sanitarie	VARESE
SARTORELLI Piero	Istituto di Medicina del Lavoro dell'Università	SIENA
SCHALLER Karl-Heinz	Institut für Arbeits-Sozial und Umweltmedizin der Universität	ERLANGEN NÜRNBERG-D
SCULLICA Luigi	Clinica Oculistica Università Cattolica del S. Cuore	ROMA
TERRANA Tommaso	Istituti Clinici di Perfezionamento	MILANO
TROIANO Pasquale	Clinica Oculistica - Ospedale Maggiore	MILANO
VIOLANTE Francesco	Servizio di Medicina del Lavoro - Policlinico "S. Orsola"	BOLOGNA
ZAHM Jean Marie	INSERM	REIMS - F

«LA MEDICINA DEL LAVORO» pubblica lavori originali, rassegne, brevi note e lettere su argomenti di medicina del lavoro e igiene industriale. I contributi non devono essere già stati pubblicati o presentati ad altre riviste. I dattiloscritti, in lingua italiana o inglese, devono essere inviati in duplice copia alla *Redazione de «La Medicina del Lavoro» - Via S. Barnaba, 8 - 20122 Milano*. I lavori saranno sottoposti a revisori; sulla base dei loro giudizi la Redazione si riserva la facoltà di suggerire modificazioni o di respingerli. Gli autori verranno informati delle motivazioni che hanno portato la Redazione a formulare suggerimenti o giudizi negativi. Le opinioni espresse dagli autori non impegnano la responsabilità della Rivista.

**DATTILOSCRITTI** - I lavori dovranno essere chiaramente dattiloscritti in doppia spaziatura e con un ampio margine su un lato. Tutte le pagine, compresa la bibliografia, devono essere numerate progressivamente e portare indicato il nome del primo autore e le prime parole del titolo dell'articolo; analoga indicazione deve figurare sulle tabelle e sul retro delle figure. Nella prima pagina del dattiloscritto deve essere indicato il titolo dell'articolo, il cognome e il nome dell'autore o degli autori, l'istituto di appartenenza e l'indirizzo completo. Nella stessa pagina dovrà essere indicato in forma abbreviata il titolo che dovrà figurare in testa a ciascuna pagina dello stampato. Qualora il lavoro sia già stato oggetto di comunicazione orale, è necessario che in una nota a piè di pagina ne vengano indicate la data, il luogo, la sede. Al momento della accettazione finale del lavoro, per favorire le successive operazioni di stampa agli Autori sarà richiesto di allegare al manoscritto un dischetto per personal computer contenente l'elaborato stesso.

**TABELLE** - Le tabelle dovranno essere battute su carta bianca, in pagine separate dal testo. Ogni tabella deve essere numerata progressivamente in caratteri arabi. La didascalia deve contenere le informazioni necessarie a interpretare la tabella stessa senza fare riferimento al testo. Nel testo la tabella deve essere citata per esteso (es.: tabella 1).

**FIGURE** - Le figure devono essere numerate in successione con numeri arabi a matita sul retro; le didascalie devono essere separate dalle figure. Le figure devono essere disegnate su carta bianca con inchiostro di china. Eventuali fotografie in bianco e nero devono essere ben contrastate e stampate e le dizioni ben leggibili. Per le figure a colori è opportuno poter disporre di diapositive. Nel caso che gli autori intendano pubblicare figure o grafici tratti da altre riviste o libri, dovranno previamente ottenere il permesso scritto dall'autore e dalla casa editrice, copia del quale deve essere inviato alla redazione della rivista; nell'articolo gli autori dovranno indicare le fonti da cui il materiale stesso è tratto. La base delle figure deve essere di 7 cm. o di suoi multipli. Non vengono accettate figure prodotte con calcolatore, a meno che la qualità delle stesse non sia elevata (uso di stampanti grafiche di qualità, plotter, stampanti laser). Nel testo la figura deve essere citata per esteso (es.: figura 1).

**PRESENTAZIONE DEGLI ARTICOLI** - I lavori dovranno in linea di massima, essere suddivisi in: *Introduzione, Metodi, Risultati, Discussione, Riassunto, Bibliografia*. Dovranno essere dettagliatamente descritti i metodi solo quando siano originali o presentino delle modifiche sostanziali rispetto ai precedenti. Per i metodi già noti e riportati in letteratura è sufficiente citare gli articoli originali.

Nella presentazione dei risultati si deve evitare di ripetere nel testo i dati presentati nelle tabelle e nelle figure.

**RIASSUNTO** - Il Riassunto in lingua italiana ed inglese deve esporre nella lingua originale del testo in modo conciso ma chiaro e sufficientemente illustrativo i risultati della ricerca. La sua estensione nell'altra lingua potrà essere maggiore al fine di comunicare al maggior numero di lettori i dati sostanziali della ricerca. Il riassunto in lingua inglese dovrà essere strutturato in: *background, objectives, methods, results, conclusions*

**BIBLIOGRAFIA** - La correttezza e la completezza delle citazioni bibliografiche ricade sotto la responsabilità degli autori. Nella Bibliografia le citazioni vanno elencate in ordine alfabetico e numerate progressivamente.

Per la stesura attenersi agli esempi sottoelencati:

- KALLIOMAKI PL, KALLIOMAKI K, KORHONEN O, et al: Respiratory status of stainless steel and mild steel welders. *Scand J Work Environ Health* 1986; 8 (suppl 1): 117-121

- MC MAHON B, PUGH TF: *Epidemiology. Principles and methods*. Boston (MA): Little Brown and Co, 1970

- FOGARI R, ORLANDI C: Essential hypertension among workers of a metallurgical factory. In Rosenfeld JB, Silverber DS, Viskoper R (eds): *Hypertension control in the community*. London: Libbey J, 1985: 270-273

- GALLI DA, COLOMBI A, ANTONINI C, CANTONI S: Monitoraggio ambientale e biologico dell'esposizione professionale a pigmenti e coloranti azoici. In Foà V, Antonini C, Galli DA (eds): *Atti del convegno Materie coloranti ed ambiente di lavoro*. Milano, 14-15 marzo 1984. Fidenza: Tipografia Mattioli, 1985: 129-137

- RANOFSKY AL: *Surgical operations in short-stay hospitals: United States 1975*. Hyattsville (MA): National Center for Health Statistics, 1978 (DEHW publ no PHS 78-1785; Vital and health statistics, series 13, no 34)

- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER: *Some chemicals used in plastics and elastomers*. Lyon: IARC, 1986 (IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans no 39)

Il nome della rivista deve essere abbreviato secondo le norme dell'Index Medicus. Le comunicazioni personali e le comunicazioni a congressi, se non pubblicate, non devono far parte della bibliografia, ma devono essere citate per esteso nel testo.

Nel testo i riferimenti bibliografici dovranno essere indicati con numeri arabi tra parentesi corrispondenti al numero della citazioni in Bibliografia.

**BOZZE** - Gli autori riceveranno le bozze dell'articolo per controllare eventuali errori tipografici. Sulle bozze non potranno essere apportate modifiche sostanziali. La correzione delle bozze solleva la redazione da ogni responsabilità per eventuali errori presenti nel testo.

**RECENSIONI** - I libri e i lavori di medicina del lavoro e di igiene industriale che gli autori o gli editori desiderano far recensire sulla rivista, devono essere inviati alla Redazione.

**PUBBLICITÀ, NUMERI ARRETRATI E RICHIESTE DI ESTRATTI** - Per inserzioni pubblicitarie, oppure ordini di fascicoli arretrati o estratti, si prega di contattare: Mattioli 1885 SpA - Casa Editrice, Via Coduro 1/b, 43036 Fidenza (Parma), Tel. 0524/84547, Fax 0524/84751.

La rivista è sotto la tutela delle leggi internazionali sulla proprietà letteraria.