

The reference values in the interpretation of toxicological data

IVO IAVICOLI¹, VERUSCKA LESO¹, LUCA FONTANA²

¹Section of Occupational Medicine, Department of Public Health, University of Naples Federico II, Naples, Italy

²Department of Occupational and Environmental Medicine, Epidemiology and Hygiene, Italian Workers' Compensation Authority (INAIL), Monte Porzio Catone, Rome, Italy

KEY WORDS: Biological limit values; biological monitoring; chemical risk; exposure assessment; reference values

PAROLE CHIAVE: Valori limite biologici; monitoraggio biologico; rischio chimico; valutazione dell'esposizione; valori di riferimento

SUMMARY

The worldwide gradual expansion of industrialization has led to a dramatic increase in the production and use of chemical substances. This has resulted in a greater dispersion of these elements in the environment and in an increased exposure of the general population and workers. In this scenario, a thorough knowledge of exposure levels is needed in order to assess chemical risks in environmental and occupational settings. Biological monitoring is among the most useful tools for assessing exposure. However, in order to provide really effective guidance in the application/implementation of risk management measures, biomonitoring results need to be compared with appropriate references. Reference values (RVs) are an excellent resource since useful information for a correct interpretation of toxicological data can be obtained by comparing them with biomonitoring results. In the field of public health, this may enable us to identify potential sources of exposure, define the principal and most frequently exploited routes of exposure, and outline chemical absorption. Similarly, in occupational medicine, RVs can be used to give meaning to biomonitoring findings, especially when a biological limit value is not available for the chemical in question. Furthermore, these values are a valid tool for assessing exposure to chemical carcinogens. Therefore, by integrating reference values in an appropriate and complete system of guide values that also includes action levels and biological limit values, we could obtain both an adequate assessment of exposure and a better understanding of toxicological data.

RIASSUNTO

«I valori di riferimento nell'interpretazione dei dati tossicologici». La progressiva industrializzazione a livello mondiale ha comportato un aumento della produzione e dell'uso di sostanze chimiche, causandone una crescente dispersione nell'ambiente e un incremento dell'esposizione umana. Una conoscenza adeguata dei livelli di esposizione a tali sostanze appare essenziale per la valutazione del rischio chimico. A tal fine, uno degli strumenti più importanti per la valutazione dell'esposizione è il monitoraggio biologico. Tuttavia, i risultati del biomonitoraggio, per essere utili nel suggerire l'adozione/implementazione di misure di gestione del rischio, devono essere confrontati con riferimenti appropriati. In un contesto di sanità pubblica, il confronto tra i risultati del biomonitoraggio e i valori di riferimento, fornisce informazioni utili per interpretare correttamente i dati tossicologici permettendo di identificare potenziali fonti e principali vie di esposizione e definire l'assorbimento delle sostanze chimiche. Analogamente, per

Pervenuto il 5.7.2019 - Accettato il 15.7.2019

Corrispondenza: Ivo Iavicoli, Section of Occupational Medicine, Department of Public Health, University of Naples Federico II, Via S. Pansini 5, 80131 Naples, Italy - E-mail: ivo.iavicoli@unina.it

quanto riguarda la medicina del lavoro, questi valori possono essere utilizzati per interpretare i risultati del biomonitoraggio, specialmente laddove non sia disponibile un valore limite biologico per la sostanza chimica di interesse. Inoltre, il loro impiego è valido anche per la valutazione dell'esposizione ad agenti cancerogeni. Pertanto, l'integrazione dei valori di riferimento in un sistema di valori guida appropriato e completo, inclusivo di livelli di azione e valori limite biologici, garantisce di ottenere sia una valutazione adeguata dell'esposizione che una maggiore e più approfondita comprensione dei dati tossicologici.

INTRODUCTION

Exposure to chemical substances in workplaces where they are produced, used or handled is one of the most important occupational risk factors that must be properly evaluated and managed within the Occupational Health and Safety systems (59). The evaluation and management of this particular type of occupational risk, both from a qualitative and a quantitative point of view, is extremely important since it has been estimated that more than 80,000 chemicals are currently used, manipulated and/or produced in a variety of industrial sectors and that chemical hazards and toxic substances may cause a wide range of adverse health effects (e.g. irritation, sensitization, carcinogenicity) (35). The "gold standard" for evaluating the risk of exposure to chemical substances is the risk assessment/risk management framework established by the U.S. National Academy of Sciences and described in the U.S. National Research Council report "Risk Assessment in the Federal Government: Managing the Process" (38).

According to this framework, the risk assessment process should be based on four critical steps (figure 1) that include: (i) hazard identification (i.e. the adverse effects a substance has an inherent capacity to cause are defined), (ii) dose-response assessment (i.e. the way potential adverse effects are related to doses are ascertained; critical doses for target organs or cells are determined; possible molecular mechanisms of toxic action are identified), (iii) exposure assessment (i.e. estimation of whether an occupational exposure may or is likely to occur; development and validation of appropriate sampling strategies and analytical methodologies) and (iv) risk characterization (i.e. assessment of the incidence and severity of the adverse effects likely to occur in an exposed human population) (38).

Biological and environmental monitoring are essential tools for the assessment of exposure to toxic

agents in both the general and the occupational environment (58). The most complete and thorough definition of biological monitoring was formulated in 1980 during a seminar held in Luxembourg and sponsored jointly by the European Economic Community, the U.S. National Institute for Occupational Safety and Health and the U.S. Occupational Safety and Health Administration (11). On this occasion, biological monitoring was defined as "the measurement and assessment of agents or their metabolites either in tissues, secreta, excreta, expired air or any combination of these to evaluate exposure and health risk compared to an appropriate reference" (11). Therefore, compared to environmental monitoring, in exposure assessment biological monitoring yields important and complementary information since, by measuring the internal dose of a chemical resulting from all sources of exposure, it provides an index of the overall absorption of a xenobiotic (48). Data regarding internal doses, when dose-response relationships have been defined, are extremely important for the prevention of diseases potentially caused by exposure to chemical substances as they are more closely related to the induction of adverse health effects than external concentrations assessed by the environmental monitoring (30).

However, as is clear from the aforementioned definition of biological monitoring a comparison with appropriate guide values must be made in order to obtain a correct interpretation of results. In the field of occupational medicine this comparison is usually carried out using limit values such as for example the biological exposure indices (BEIs) provided by the American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) (1). However, the application of limit values concerns an area of interest in which exceeding these limits is strongly correlated with the induction of adverse health effects (6). When interpreting the results of biological monitoring, important limitations in the use of limit

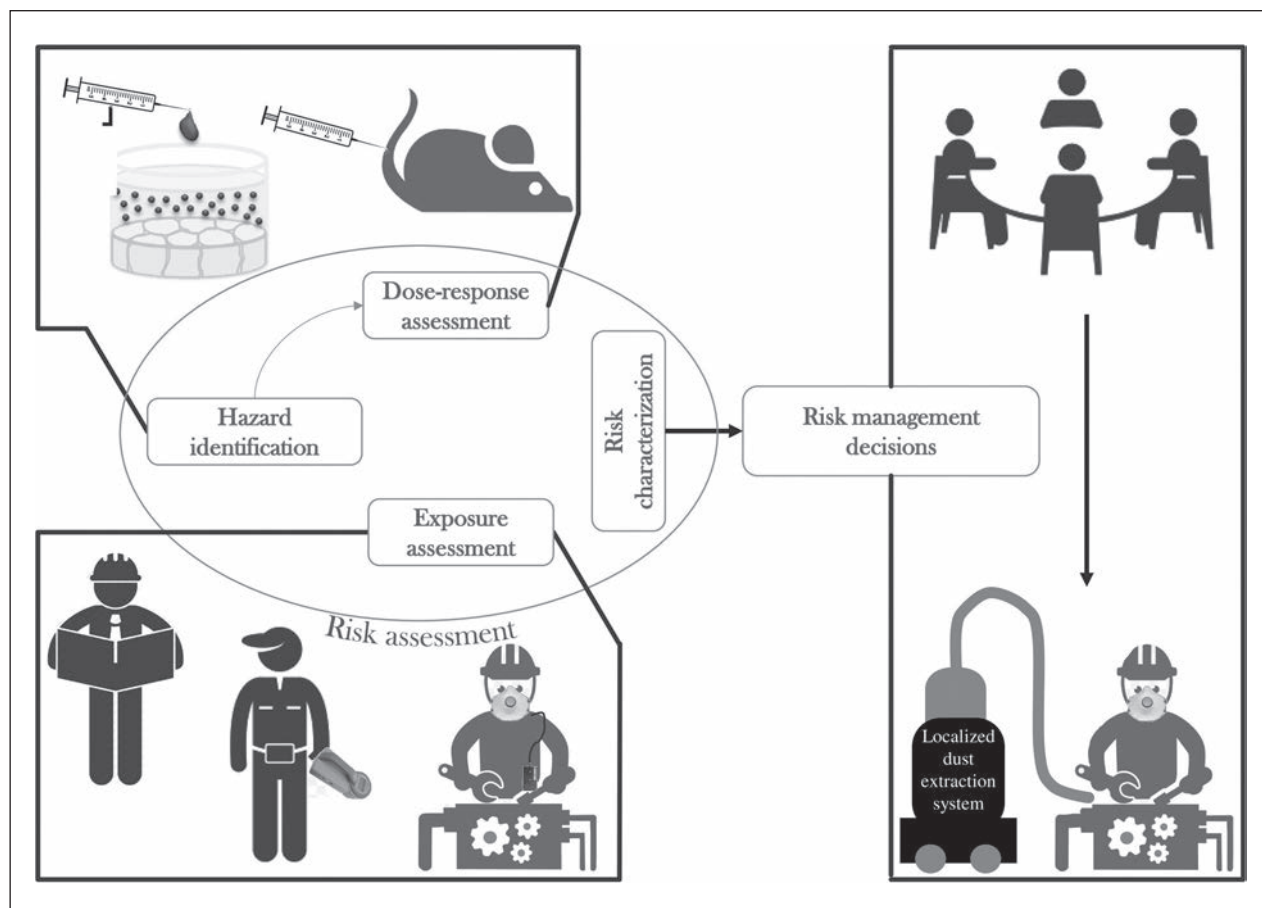


Figure 1 - Different steps of the risk assessment and management process proposed by the U.S. National Academy of Sciences (38)

Figura 1 - Le differenti fasi del processo di valutazione e gestione del rischio proposto dalla U.S. National Academy of Sciences (38)

values should be taken into consideration. First of all, biological limit values are not available for all chemical substances used in workplace (24, 31, 37); secondly, due to scientific progress and the advent of new technologies, work cycles and processes have witnessed the introduction of new chemical substances (e.g. engineered nanomaterials) for which limit values have not yet been formulated (49, 50).

For all these reasons, there is growing interest in the possible use of reference values (RVs) in the field of occupational medicine (2, 4, 6, 8, 12, 51). The term “reference value” refers to the biological indicator levels of occupational and environmental xenobiotics (or of their metabolites) in the general, non-occupationally exposed population (2, 7), and could be defined as the concentration of a xenobiotic (or of its transformation product) measured in biologi-

cal matrices in reference population groups selected according to predefined criteria (54). Therefore, in principle RVs are useful for assessing whether biomonitoring findings are much higher than would normally be expected (31). RVs might therefore be a valuable tool for identifying new chemical exposures, for studying changes in exposure during periodic workplace measurements and for determining the distribution of a chemical in a number of occupational groups or workplaces (37). In point of fact, RVs are useful not only in the broader public health field where they are frequently used to investigate the relationship between humans and their life environments (especially when identifying sources of exposure, determining principal exposure routes and evaluating xenobiotic absorption), but also in occupational medicine applications (8).

Therefore, considering the importance of RVs and their potentially numerous uses in the field of occupational and environmental medicine, this study aims to provide a comprehensive and thorough analysis regarding the definition and the application of RVs. This information could be valuable for obtaining operative indications into how RVs could be used to correctly interpret the toxicological results of biomonitoring, especially in the absence of other guide values.

CRITICAL ISSUES IN DEFINING REFERENCE VALUES

In recent years, numerous biomonitoring studies have been performed in several countries in order to improve our knowledge of human exposure to chemical substances and, at the same time, provide lawmakers with useful indications for reducing (or at least controlling) environmental levels of toxicants and for implementing adequate control policies. Indeed, human biomonitoring programmes have been developed in various European countries (46) such as Belgium (31, 47), the Czech Republic (10, 18), France (29), Germany (51, 52), Italy (3, 7-9), Spain (40) and the United Kingdom (12, 37) and similar studies have also been conducted in non-European countries such as Brazil (28), Canada (45), the Republic of Korea (34) and the United States (17). The recent proliferation of such studies arises from the need to establish appropriate RVs nationwide (or in some cases at a regional or local level) as the latter can be strongly influenced by geographic, industrial, dietary, environmental and lifestyle factors (31, 37). Nevertheless, despite local differences of this kind, to obtain adequate RVs, a standardized procedure should be used that takes into account critical issues (table 1) such as sample selection, sample size, time period, exclusion criteria, partitioning criteria, and the analytical quality achieved (45, 60).

To this end, the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) and the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) have introduced the concept of reference intervals and developed statistical methodologies necessary to define chemicals background exposure in a specific reference population (41, 45, 57). In essence, the IFCC and IUPAC documents

offer a useful guidance on RVs by providing practical advice and recommendations concerning the definition of the reference population (table 1) (45).

First of all, the sample selection should be an *a priori* selection although, when this kind of recruitment is not feasible, *a posteriori* selection can be used. However, in the latter case, strict partitioning and exclusion criteria should be applied so as to take into account specific biomarkers and confounding factors (41, 45, 57). Another important issue concerns sample size which, to be effectively valid, should be wide-ranging enough to include different age, race or ethnicity groups (57). With regard to the time period, the most up-to-date biomonitoring information available should be used since environmental exposure to chemical substances in the general population can vary considerably as a function of time (41). Moreover, exclusion criteria should be adopted in order to avoid including in the sample subjects (e.g. smokers) who present characteristics that do not belong to the general population (45). Similarly, when we expect to find significant differences in various groups of the general population (e.g. in age or race), partitioning criteria should be used to develop specific RVs for these subgroups (45). Lastly, high quality analytical methods (especially in terms of specificity and sensitivity) and control procedures (collection and treatment of the samples) should be adopted (41, 45, 57).

THE ITALIAN SOCIETY FOR REFERENCE VALUES: THE PATH TOWARDS REFERENCE VALUES IN ITALY

For more than twenty-five years, the Italian Society for Reference Values (SIVR) has been actively involved in the definition and dissemination of RVs for both environmental and occupational xenobiotics (8). Its main aim is to develop technical guidelines by establishing RVs for various elements and chemical compounds (or related products of transformation). Since 1993, the number of RVs formulated by the SIVR has steadily increased from a dozen in the early years of its activity to 135 currently included in its latest list (55).

Figure 2 schematically illustrates the 8-step strategy adopted by the SIVR to process and establish reliable RVs. Once a chemical substance (or the group

Table 1 - Critical aspects in defining reference values (45)*Tabella 1* - Aspetti critici nella definizione dei valori di riferimento (45)

Issue	Recommendation
Sample selection	<ul style="list-style-type: none"> A priori selection is desirable; • Apply an adequate system of exclusion and partitioning criteria in the case of a posteriori selection; • Exclusion and partitioning criteria can not be generalized and must be established from time to time taking into consideration all the possible confounding factors.
Sample size	<ul style="list-style-type: none"> • The sample size which constitutes the reference population should be sufficiently large to include different subgroups for the main sociodemographic variables: <ul style="list-style-type: none"> o Age; o Sex; o Race; o Ethnicity. • IFCC recommends a sample size of at least 120 subjects.
Time period	<ul style="list-style-type: none"> • The reference values should be defined on the analysis of the most recent data available.
Exclusion criteria	<ul style="list-style-type: none"> • Exclusion criteria should be determined before selecting reference population; • The variables able to influence biomarker levels and that cannot be ascribed to the general characteristics of the reference population should be classified as exclusion criteria: <ul style="list-style-type: none"> o Smoking habits; o Recent surgery; o Administration of drugs; o Fasting.
Partitioning criteria	<ul style="list-style-type: none"> • When significantly different biomarker levels are observed in different subgroups (related for example to sex, age, race) of the reference population, then specific reference values should be established for each subgroup.
Analytical methods	<ul style="list-style-type: none"> • Highest quality analytical methods should be used: <ul style="list-style-type: none"> o Specificity; o Sensitivity. • Quality control procedures should be developed and applied to: <ul style="list-style-type: none"> o Sample collection and storage; o Preparation of the sample for the analysis; o Instrumental analysis.

of chemical substances) that requires the establishment of RV has been identified, a systematic review of the literature is performed in order to ascertain whether similar RVs for the substance in question have already been produced in other countries (8, 54). The next three phases (from 3 to 5) focus on the choice of the best analytical method for determining analyte levels in the biological matrices. The available analytical techniques are evaluated in or-

der to find a fair compromise between the need to have a high-quality analytical method and adequate instruments in the laboratories that will potentially carry out the analyses (8). After taking into consideration all the pre-analytical factors and selecting the method of analysis, a network of laboratories must be created that will have the practical task to carry out analyses and thereby obtaining concentrations of the chemical (or of its metabolite). During

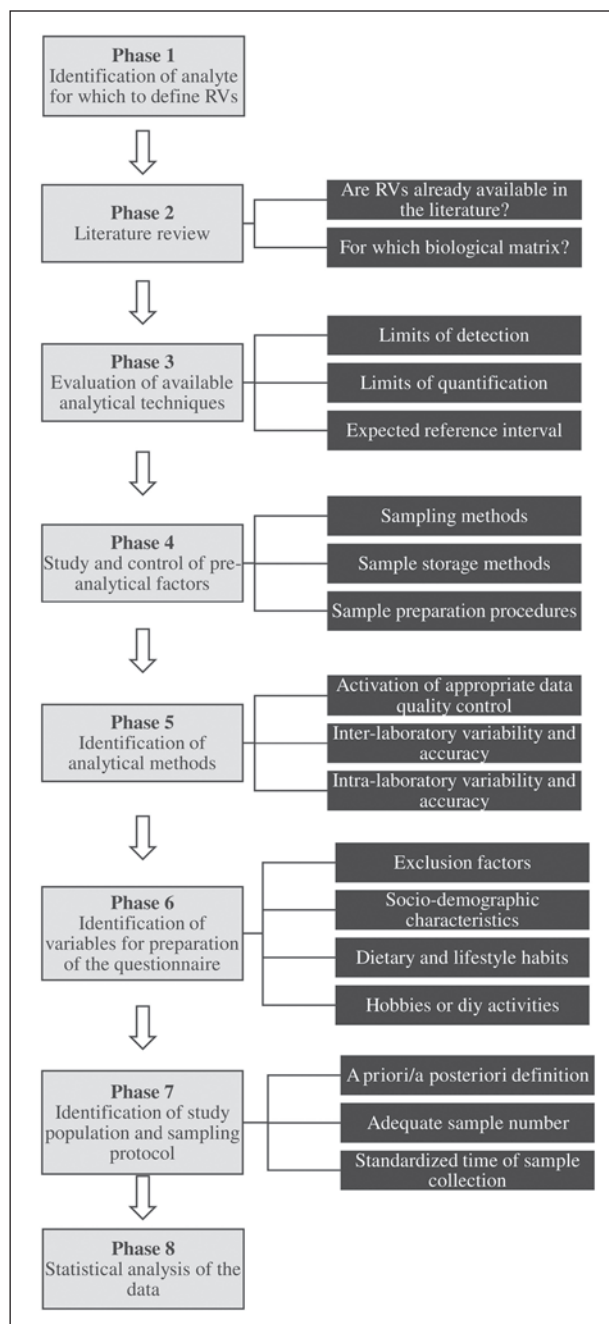


Figure 2 - The Italian Society for Reference Values methodology for defining RVs

Figura 2 - La metodologia SIVR per la definizione dei valori di riferimento

this phase, it is vital that the choice of laboratories contributing to the definition of the RVs be based on appropriate inter- and intra-laboratory data quality control (8).

When the biological sample is collected, the subjects enrolled in the study should simultaneously be given an *ad hoc* questionnaire since the information retrieved by means of this tool is of utmost importance for a correct interpretation of the biomonitoring data. In order to define RVs adequately, the questionnaire must contain items that are able to reveal exposure to the substance under investigation that come from sources not common to the general population, such as smoking or occupational exposure (exclusion criteria) (8, 41, 45, 54, 57). Furthermore, to be sufficiently informative, the questionnaire should also investigate all the possible factors (e.g. age, gender, physical activity, dietary and lifestyle habits, hobbies or “do it yourself” (DIY) activities, urban or rural residence, presence of anthropogenic or environmental emissions in proximity to home and/or work) that could play a role in influencing or altering the internal dose levels of the chemical. Subsequently, in accordance with the main IFCC and IUPAC indications, the reference population is identified *a priori*, by taking into account the principal socio-demographic and geographical variables, and the sampling protocol, which should ensure the recruitment of a truly representative sample, is established (8). Finally, step 8 involves a statistical analysis of the data. If possible, the sample is stratified into subsamples according to exposure characteristics, in order to minimize the data variability. Subsequently, Kolmogorov-Smirnov (or alternative testing for normal distribution of unaltered and log-transformed data) is used and outliers are identified and evaluated (8). Therefore, the amount of data that is below the limit of detection/limit of quantification is defined and the data is described in terms of min-max, percentiles, index of central tendency and variability of data (8). Finally, to identify possible variables that might affect the data, the analysis of variance (ANOVA) and/or multiple regression analysis is performed.

In addition to RVs produced according to such SIVR procedure, the Society proposes also tentative RVs (TRVs) which are the result of a preliminary phase of definition of SIVR RVs. TRVs may be motivated by the unavailability of a RV for a particular analyte and/or the lack of information regarding possible confounding factors. They are generally de-

fined by specific experimentation between a small number of labs (at least two) in the SIVR circuit using different analytical methods or, alternatively, by a single SIVR lab if it uses a validated analytical method with estimated uncertainty. SIVR includes also RVs based on scientific literature (LRVs), which are defined according to a critical revision of publications, produced in the last 10 years and preferentially investigating Italian or European populations (8).

REFERENCE VALUES IN THE CONTEXT OF ENVIRONMENTAL MEDICINE AND PUBLIC HEALTH

Over recent decades, the number of chemical substances produced commercially has increased exponentially because of a worldwide expansion in industrialization (13). However, little is known regarding the quantity of xenobiotics produced (and their related diffusion in environmental matrices). A fairly representative estimate, that provides a good example of the huge dimensions of the problem, can be made by consulting the Chemical Abstracts Service (CAS) RegistrySM that currently contains more than 150 million chemicals (16). Commercial chemical production is responsible for the appearance of approximately 200,000 new chemicals per week, but many substances are also emitted into the environment as a result of natural processes (e.g. volcanic eruptions, large forest fires, sea spray aerosols) or as by-products of fossil fuel combustion or industrial processes (39, 43). Furthermore, in some cases, contamination of environmental matrices is of geological origin, e.g. arsenic contamination in groundwater, a well-known public health issue in several countries such as Hungary, Italy, Romania, Argentina, Chile, Mexico, Afghanistan, Bangladesh, Nepal and Pakistan (21, 44, 56).

Regardless of the source of emission, a growing body of evidence suggests that environmental chemical levels (in outdoor and indoor air, soil, water and foods) have increased significantly in recent years, thereby contributing to a greater likelihood of exposure for the general population (13, 33). These substances, which can come into contact with or enter the body via three major routes: ingestion, inhalation and dermal absorption, are potentially

hazardous for human health. Everyday sources of exposure include contaminated food and/or drinking water, airborne pollutants, consumer products, soil and household dust (figure 3) (14, 25).

For a number of chemicals that are essential but also toxic elements, or for various substances that have a physiological role (e.g. chromium, manganese, nickel), RVs can be considered the result of physiological-homeostatic processes and general environmental exposure (6, 8). On the other hand, the presence of measurable biological levels of toxic xenobiotics (which should normally not be present in the biological matrices of the general population) is proof of their absorption following environmental exposure (6, 8). In both cases, the contribution of environmental exposure to chemical concentrations in the human body is extremely important, and for this reason, RVs represent a powerful tool for investigating the complex interplay between people and the environment in which they live.

RVs can provide interesting information for obtaining a deeper insight into the significance of toxicological data reported in human biomonitoring studies. First of all, appropriate RVs are essential for identifying subjects (or subpopulations) that have been seriously exposed to a specific substance and might consequently need targeted prevention or protection measures and intervention (27, 32, 36, 45). However, from a public health point of view, although it is certainly necessary to identify highly-exposed individuals, that alone is not sufficient to protect people from hazardous chemicals. It is also vital to determine the exposure sources and factors that made the biological concentrations in these subjects exceed background levels. An analysis of the findings obtained from questionnaires (that are an integral part of biomonitoring studies aimed at establishing RVs) can provide very useful information on this subject by highlighting the exposure characteristics shared by subjects with higher exposure levels (32, 45). In addition, RVs can also be helpful in defining new statistical associations between a specific health outcome observed in a particular subpopulation and the related (increased) level of exposure (32, 36, 45). As mentioned previously, the presence of biological concentrations of chemical substances above RVs calls for special corrective ac-

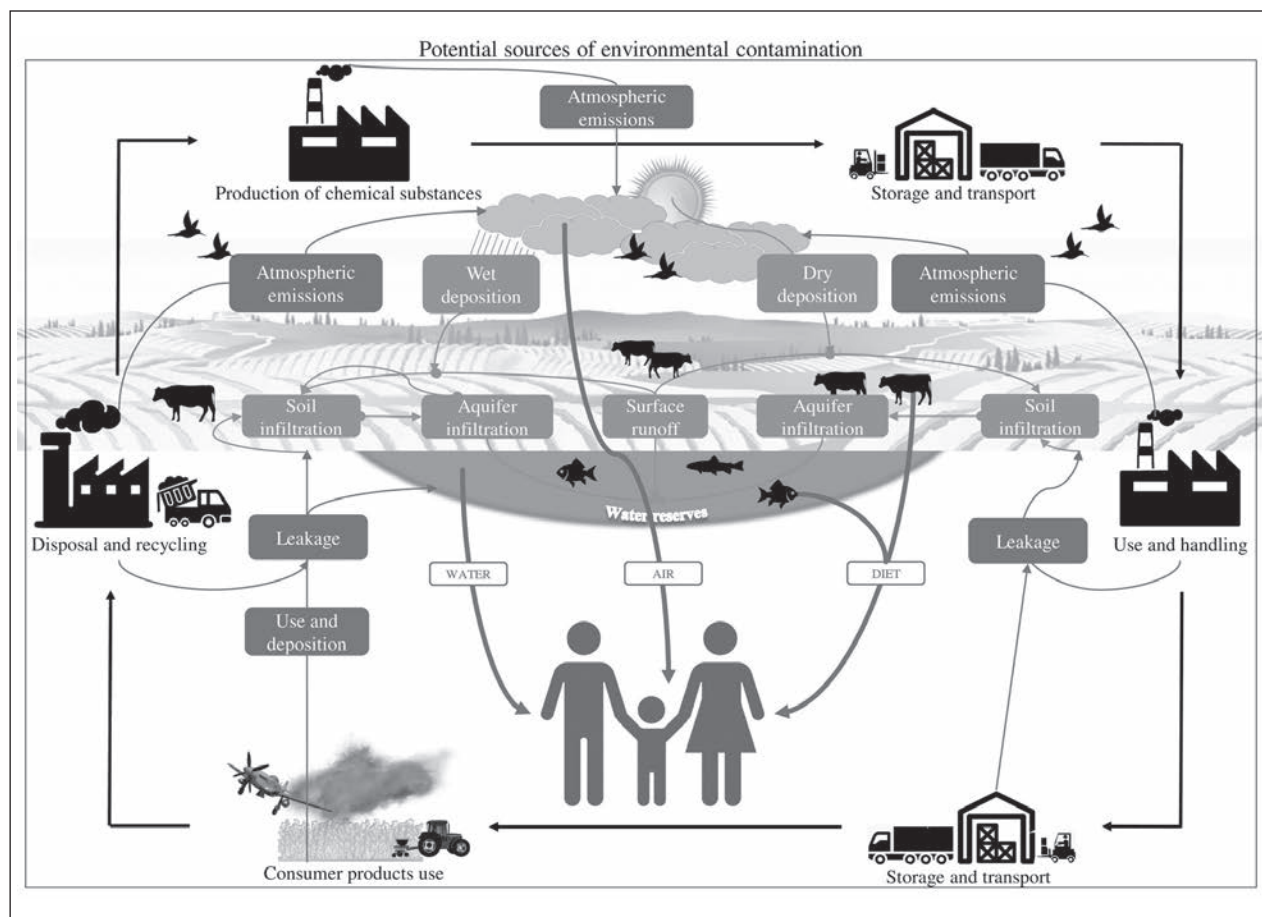


Figure 3 - Possible environmental sources of exposure to chemical substances for the general population
Figure 3 - Possibili fonti di esposizione ambientale a sostanze chimiche per la popolazione generale

tion to be taken in order to reduce suspected environmental exposure. RVs could also be employed periodically to evaluate the effectiveness of such intervention and provide information on temporal and geographical trends or changes in exposure.

REFERENCE VALUES IN THE CONTEXT OF OCCUPATIONAL MEDICINE

Biological monitoring is a key component in occupational risk assessment and the management of chemical substances, since evaluation of the internal dose of chemicals (or related metabolites) in human biological samples obtained from all potential sources and exposure routes can provide an accurate estimate of the body burden of these substances (30, 48). The integration of information obtained

from biological monitoring and data derived from environmental monitoring is the safest and most effective way of adequately assessing workers' occupational exposure to chemicals and also of implementing, when necessary, appropriate countermeasures to reduce or at least control exposure levels. Therefore, in workplaces, an analysis of these data on the part of occupational health and safety professionals ensures that highly-exposed worker groups will be detected, or that possible differences in exposure in these groups will be assessed. Furthermore, this analysis would make it possible to monitor whether and in what way chemical exposure changes over time, and to verify the effectiveness of the control measures undertaken (36).

However, biomonitoring results alone are of little value since their correct interpretation necessar-

ily requires comparison with appropriate references (11). The need to have guide values for comparison is widely recognized also at a legislative level, since the Chemical Agents EC Directive 98/24 (concerning worker health and safety protection from chemical risks) provides a basis for establishing biological limit values (19). Nevertheless, in the European Union, there is currently only one binding biological limit value that the aforementioned Directive set in reference to blood lead levels. Similarly, there is also a significant lack of biological guide values concerning industrial chemical legislation. The Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) regulation (42) has developed, for workplace air, the Derived No-Effect Level (DNEL) defined as the level of a substance above which a human should not be exposed, and under which no adverse effects are expected. Interestingly, DNELs may be expressed as internal exposure biomarker values ($\text{DNEL}_{\text{biomarker}}$). These apply to substances for which internal exposure data are available and have been reliably associated with effects. However, REACH lacks specific fields that aim to understand the relationship between internal exposure biomarkers of a substance and resulting effects as $\text{DNEL}_{\text{biomarkers}}$ are not commonly included in Registration dossiers (26, 36). In this context, the recommended biological limit values or biological guidance values proposed for several chemicals by the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits (SCOEL) can be used. From 1995 to 2018 this Committee assisted the European Commission in making a scientific evaluation of the relationship between the levels of occupational exposure to hazardous chemical agents and health effects (53). SCOEL biological limit values were health-based limit values that referred to exposure levels below which adverse health effects were unlikely to occur (36). Differently, biological guidance values are the upper concentration of a substance (or a metabolite of the substance) in any appropriate biological medium corresponding to a certain percentile (generally 90 or 95 percentile) in a defined reference population (53). Unfortunately, the number of chemicals for which the SCOEL set biological limit values or biological guidance values is very limited (53). Since 2019, the European Commission has

handed over the responsibilities of SCOEL to the Risk Assessment Committee (RAC) of the European Chemicals Agency (ECHA).

Clearly, when biological limit values have not been established by law, it is possible to refer to values proposed by foreign governmental agencies or approved prestigious and reliable non-governmental agencies (e.g. ACGIH, Deutsche Forschungsgemeinschaft's (DFG), Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area) (1, 22). However, even in this case, compared to the enormous quantity of chemicals that are commonly produced, used or handled in the workplace, the availability of BEIs or Biological Tolerance Values for Working Materials is still rather limited (in both cases fewer than 100 biological limit values) (1, 22).

Consequently, in the absence of biological limit values, RVs can clearly be an excellent resource since they can be used as guidance for interpreting biological monitoring data (6, 37). In other words, the upper limit (95 percentile) of the range observed in the reference population (non-exposed subjects) can act as a reference to be compared with biomonitoring data so as to gain insight into workers' exposure (31). The detection of biomarker levels significantly above that upper limit would suggest occupational exposure to a chemical agent. However, it is important to emphasise that RV use should not be limited exclusively to cases of biomonitoring interpretation in which there are no biological limit values. Even if these values are not health-based (as they do not take into account toxicological information on biomarkers), and cannot be exploited to evaluate health risks or considered as threshold levels for undertaking clinical action (45), their combined use with biological action levels and limit values, as part of an integrated guide values system, could contribute significantly to improving the assessment and management of chemical risk (6).

For example, when using biological limit values, it is important to keep in mind that for many chemicals these values also include the background levels of the determinant that can usually be detected in subjects not-occupationally exposed to the substance in question (6). Furthermore, some biomarkers used in biological monitoring are not

specific for the chemical under observation and their concentrations in biological matrices may be strongly affected by non-occupational exposure to other agents (6). In these cases, the co-ordinated and simultaneous use of both RVs and limit values guarantees a much more accurate interpretation of the toxicological data, which, in turn, leads to a more thorough assessment of exposure and its related health risks. Therefore, in order to make an assessment of biomonitoring data as complete and detailed as possible, RVs should be included, even when adequate biological limit values are available. In fact, the different types of guide values (i.e. RVs, action levels and limit values) should not be considered separately as they are conceptually related to each other and refer to specific areas of interest that often tend to overlap (figure 4) (6).

In occupational medicine, exposure to carcinogenic chemicals is another interesting field in which RVs are applied. The EC Directive 2004/37 on the protection of workers from risks related to exposure to carcinogens or mutagens at work states (Annex II) that the health surveillance system for workers exposed to these substances should include, where appropriate, biological surveillance (20). However, this Directive fails to indicate biological limit values for any substance. Therefore, in cases of occupational exposure to carcinogens, RVs could be used to interpret the toxicological data in order to identify individuals with exposure levels above RVs and correlate these levels with possible adverse health effects. For example, in epidemiological studies, RVs that express the amount of carcinogenic agents present in the environment and then indicate the exposure levels of the general population could be used to calculate the potential excess of cancer mortality in groups occupationally-exposed to these substances (6). Furthermore, for some carcinogens, whose adverse effects can also be caused by exposure to low doses due to a genotoxic type of action mechanism, defining biological limit values has little meaning in terms of prevention (5, 15, 54). For other chemical substances in which epigenetic mechanisms are principally responsible for carcinogenic action, it is possible to establish a threshold level below which the occurrence of an adverse effect should not occur (15, 23). In both cases, levels of occupational

exposure to these substances should be kept as low as possible. In this context, the RVs that refer to the general, non-occupationally exposed population should indicate the lowest exposure levels and would seem to be vital in controlling, monitoring over time and maintaining worker exposure at the lowest possible levels.

CONCLUSIONS

Biomonitoring studies are being used more and more frequently in both the fields of public health and occupational medicine to improve our knowledge of human exposure to chemical substances in both general life environments and workplaces. In fact, health risks caused by chemical exposure in workplaces, environmental matrices, diet, lifestyle habits and consumer products are one of the most important issues in the aforementioned medical research areas. However, the detection of measurable levels of chemicals in human biological matrices does not necessarily imply the onset of adverse health effects. A health risk occurs when a quantitative relationship between a health effect and biomarker level is observed (health-based guide values such as action levels or biological limit values). Although RVs cannot be used to predict any adverse health outcomes, they represent a reference point for interpreting the toxicological data provided by human biomonitoring studies.

Therefore, from a public health point of view, it is necessary to define chemical RVs in a specific reference population so as to identify comparatively high levels of exposure, since these play a significant role in public health management. In fact, when a comparison of biological monitoring findings with RVs indicates that high exposure has occurred, it is important to determine the possible exposure sources and factors involved so that appropriate prevention and/or protection measures can be implemented. RVs are also useful for evaluating temporal and spatial changes in exposure to chemicals; for indicating appropriate policy actions to control and limit chemical exposure of the general population; and for verifying the adequacy and validity of such strategies.

In occupational medicine, RVs are a valuable resource that should be used (together with action

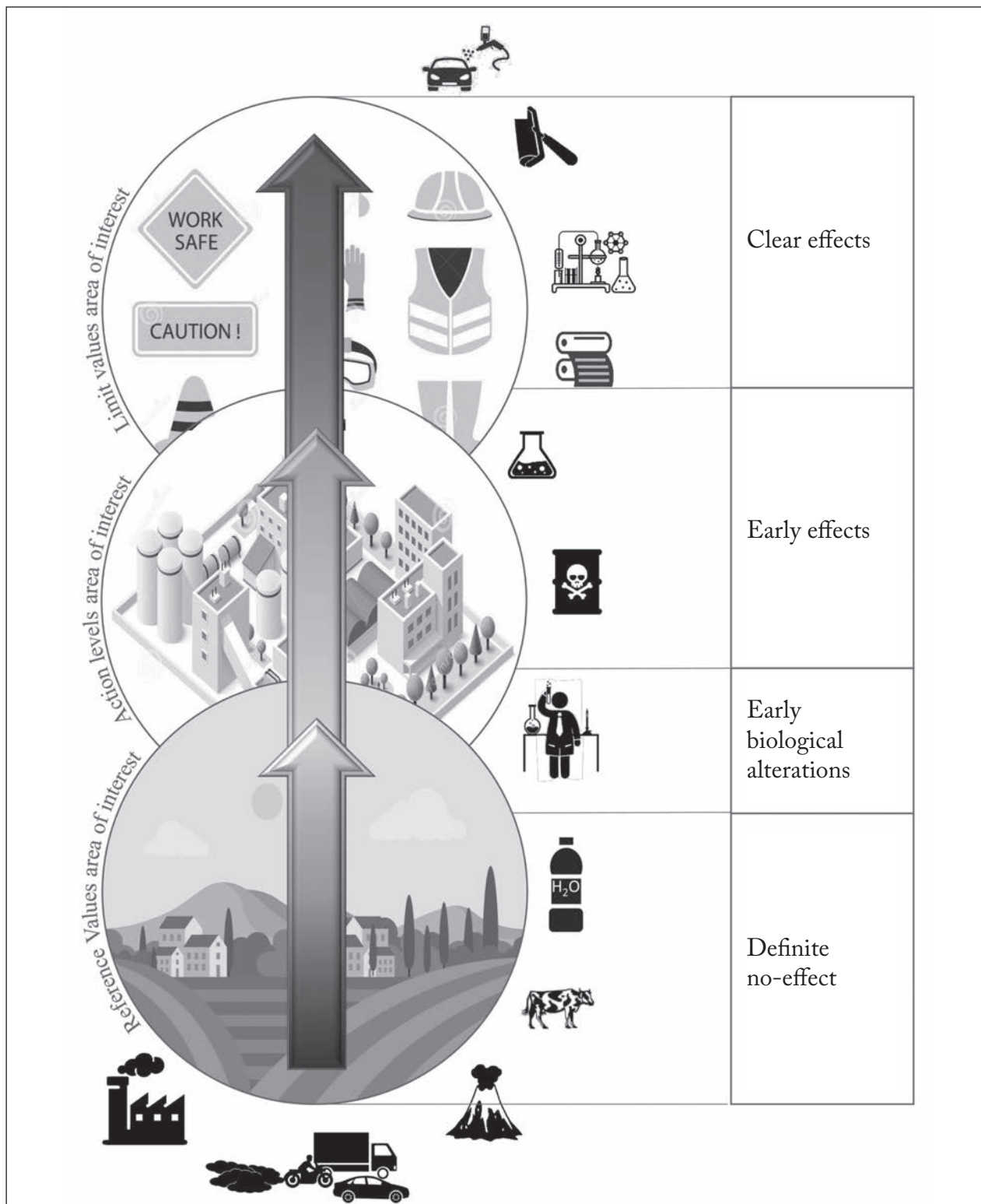


Figure 4 - Integrated and harmonized guide values system including reference values, action levels and biological limit values
Figure 4 - Sistema integrato di valori guida che comprende i valori di riferimento, i livelli di azione ed i valori limite biologici

levels and biological limit values) in an integrated and co-ordinated system of guide values to ensure a thorough assessment of chemical exposure in workplaces. RVs are especially useful for evaluating the toxicological data of substances for which biological limit values are not available or for which a toxicity threshold has not yet been established. They could therefore indicate and guide the eventual adoption of specific prevention and protection measures in the workplace.

NO POTENTIAL CONFLICT OF INTEREST RELEVANT TO THIS ARTICLE WAS REPORTED BY THE AUTHORS

REFERENCES

1. ACGIH, American Conference of Governmental Industrial Hygienists. (2018). TLV®/BEI® Guidelines: Biological Exposure Indices. Disponibile on line all'indirizzo: <https://www.acgih.org/tlv-bei-guidelines/biological-exposure-indices-introduction> (ultimo accesso il 17-06-2019)
2. Alessio L: Reference values for the study of low doses. *Sci Total Environ* 1992; 120: 1-6
3. Alimonti A, Bocca B, Mattei D, Pino A: Programme for Biomonitoring the Italian Population Exposure (PROBE): Internal Dose of Metals. *Rapporti ISTISAN*, Vol. 11-19. Rome (Italy): Istituto superiore di sanità, 2011
4. Angerer J, Aylward LL, Hays SM, et al: Human biomonitoring assessment values: approaches and data requirements. *Int J Hyg Environ Health* 2011; 214: 348-360
5. Angerer J, Ewers U, Wilhelm M: Human biomonitoring: state of the art. *Int J Hyg Environ Health* 2007; 210: 201-228
6. Apostoli P, Minoia C, Hamilton EI: Significance and utility of reference values in occupational medicine. *Sci Total Environ* 1998; 209: 69-77
7. Apostoli P, Baj A, Bavazzano P, et al: Blood lead reference values: the results of an Italian polycentric study. *Sci Total Environ* 2002; 287: 1-11
8. Aprea MC, Scapellato ML, Valsania MC, et al: Methodology to define biological reference values in the environmental and occupational fields: the contribution of the Italian Society for Reference Values (SIVR). *Med Lav* 2017; 108: 138-148
9. Aprea MC, Apostoli P, Bettinelli M, et al: Urinary levels of metal elements in the non-smoking general population in Italy: SIVR study 2012-2015. *Toxicol Lett* 2018; 298: 177-185
10. Batářiová A, Spevácková V, Benes B, et al: Blood and urine levels of Pb, Cd and Hg in the general population of the Czech Republic and proposed reference values. *Int J Hyg Environ Health* 2006; 209: 359-366
11. Berlin A, Yodaiken RE, Henman BA: Assessment of toxic agents at the workplace. Roles of ambient and biological monitoring. Boston (United States): Hague Nijhoff, 1984
12. Bevan R, Jones K, Cocker J, et al: Reference ranges for key biomarkers of chemical exposure within the UK population. *Int J Hyg Environ Health* 2013; 216: 170-174
13. Bijlsma N, Cohen MM: Environmental Chemical Assessment in Clinical Practice: Unveiling the Elephant in the Room. *Int J Environ Res Public Health* 2016; 13: 181
14. Bueckers J, David M, Koppen G, et al: Development of Policy Relevant Human Biomonitoring Indicators for Chemical Exposure in the European Population. *Int J Environ Res Public Health* 2018; 15. pii: E2085
15. Carnero A, Blanco-Aparicio C, Kondoh H, et al: Disruptive chemicals, senescence and immortality. *Carcinogenesis* 2015; 36 Suppl 1: S19-37
16. CAS, Chemical Abstracts Service. (2019). CAS REGISTRY—The Gold Standard for Chemical Substance Information. Available on line at: <https://www.cas.org/support/documentation/chemical-substances> (last access 25-06-2019)
17. CDC, Centers for Disease Control and Prevention. (2015). National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES): Fourth National Exposure Report on Human Exposure to Environmental Chemicals, Updated Tables. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Environmental Health, Division of Laboratory Sciences, February 2015. Available on line at: https://www.cdc.gov/biomonitoring/pdf/FourthReport_UpdatedTables_Feb2015.pdf (last access 21-06-2019)
18. Cerna M, Spevácková V, Batářiová A, et al: Human Biomonitoring system in the Czech Republic. *Int J Hyg Environ Health* 2007; 210: 495-499
19. Council Directive 98/24/EC of 7 April 1998 on the protection of the health and safety of workers from the risks related to chemical agents at work, April 1998. Available on line at <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:01998L0024-20140325> (last access 26-06-2019)
20. Council Directive 2004/37/EC of 29 April 2004 on the protection of workers from the risks related to exposure to carcinogens or mutagens at work (Sixth individual Directive within the meaning of Article 16(1) of Council Directive 89/391/EEC), April 2004. Available on line at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?u>

- ri=CELEX:02004L0037-20190220 (last access 27-06-2019)
21. D'Ippoliti D, Santelli E, De Sario M, et al: Arsenic in Drinking Water and Mortality for Cancer and Chronic Diseases in Central Italy, 1990-2010. *PLoS One* 2015; 10: e0138182
 22. DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft's. (2018). List of MAK and BAT Values 2018. Bonn (Germany): Wiley, 2018. Available on line at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9783527818402> (last access 22-06-2019).
 23. Drake TM, Sørøide K: Cancer epigenetics in solid organ tumours: A primer for surgical oncologists. *Eur J Surg Oncol* 2019; 45: 736-746
 24. Du X, Graedel TE: Global in-use stocks of rare earth elements: a first estimate. *Environ Sci Technol* 2011; 45: 4096-4101
 25. EC, European Commission. Study for the Strategy for a Non-Toxic Environment of the 7th Environment Action Programme. Final Report. European Commission, Brussels, 2007. Available on line at: <http://ec.europa.eu/environment/chemicals/non-toxic/pdf/NTE%20main%20report%20final.pdf> (last access 25-06-2019).
 26. ECHA, European Chemicals Agency. (2012). Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment, Chapter R.8: Characterisation of Dose [concentration]-Response for Human Health, Helsinki, 2012. Available on line at: https://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r8_en.pdf (last access 25-06-2019).
 27. Ewers U, Krause C, Schulz C, Wilhelm M: Reference values and human biological monitoring values for environmental toxins. Report on the work and recommendations of the Commission on Human Biological Monitoring of the German Federal Environmental Agency. *Int Arch Occup Environ Health* 1999; 72: 255-260
 28. Freire C, Koifman RJ, Fujimoto D, et al: Reference values of cadmium, arsenic and manganese in blood and factors associated with exposure levels among adult population of Rio Branco, Acre, Brazil. *Chemosphere* 2015; 128: 70-78
 29. Fréry N, Vandentorren S, Etchevers A, Fillol C: Highlights of recent studies and future plans for the French human biomonitoring (HBM) programme. *Int J Hyg Environ Health* 2012; 215: 127-132
 30. Hernberg S, Aitio A: Validation of biological monitoring. In: Foà V, Emmett EA, Maroni K, Colombi A, editors. Occupational and environmental hazards: cellular and biochemical indices for monitoring toxicity. New York: J. Wiley and Sons, 1987:41-49
 31. Hoet P, Jacquerye C, Deumer G, et al: Reference values and upper reference limits for 26 trace elements in the urine of adults living in Belgium. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51: 839-849
 32. Joas A, Schöpel M, David M, et al: Environmental health surveillance in a future European health information system. *Arch Public Health* 2018; 76: 27
 33. Johnson CH, Athersuch TJ, Collman GW, et al: Yale school of public health symposium on lifetime exposures and human health: the exposome; summary and future reflections. *Hum Genomics* 2017; 11: 32
 34. Lee JW, Lee CK, Moon CS, et al: Korea National Survey for Environmental Pollutants in the Human Body 2008: heavy metals in the blood or urine of the Korean population. *Int J Hyg Environ Health* 2012; 215: 449-457
 35. Loomis D, Guha N, Hall AL, et al: Identifying occupational carcinogens: an update from the IARC Monographs. *Occup Environ Med* 2018; 75: 593-603
 36. Louro H, Heinälä M, Bessems J, et al: Human biomonitoring in health risk assessment in Europe: Current practices and recommendations for the future. *Int J Hyg Environ Health* 2019; 222: 727-737
 37. Morton J, Tan E, Leese E, Cocker J: Determination of 61 elements in urine samples collected from a non-occupationally exposed UK adult population. *Toxicol Lett* 2014; 231: 179-193
 38. NRC, National Research Council. Risk Assessment in the Federal Government: Managing the Process. Committee on the Institutional Means for Assessment of Risks to Public Health, Commission on life sciences, National Academy Press, Washington D.C., 1983
 39. Obodovskiy I: The effect of chemicals on biological structures. In: Obodovskiy I. editor. *Fundamentals of Radiation and Chemical Safety*. Amsterdam (The Netherlands): Elsevier, 2015
 40. Pérez-Gómez B, Pastor-Barriuso R, Cervantes-Amat M, et al: BIOAMBIENT.ES study protocol: rationale and design of a cross-sectional human biomonitoring survey in Spain. *Environ Sci Pollut Res Int* 2013; 20: 1193-1202
 41. Poulson O, Holst E, Christensen J: Calculation and application of coverage intervals for biological reference values (technical report). *Pure Appl Chem* 1997; 69: 1601-1612
 42. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), December 2006. Available on line at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02006R1907-20140410> (last access 26-06-2019)
 43. Rosenthal GJ: *Toxicological Testing Handbook: Principles, Applications, and Data Implementation*. Boca Raton (USA): CRC Press, 2000.

44. Sappa G, Ergul S, Ferranti F: Geochemical modeling and multivariate statistical evaluation of trace elements in arsenic contaminated groundwater systems of Viterbo Area, (Central Italy). *Springerplus* 2014; 3: 37
45. Saravanabhavan G, Werry K, Walker M, et al: Human biomonitoring reference values for metals and trace elements in blood and urine derived from the Canadian Health Measures Survey 2007-2013. *Int J Hyg Environ Health* 2017; 220: 189-200
46. Schindler BK, Esteban M, Koch HM, et al: The European COPHES/DEMOCOPHES project: towards transnational comparability and reliability of human biomonitoring results. *Int J Hyg Environ Health* 2014; 217: 653-661
47. Schoeters G, Den Hond E, Colles A, et al: Concept of the Flemish human biomonitoring programme. *Int J Hyg Environ Health* 2012; 215: 102-108
48. Schulte PA: A conceptual framework for the validation and use of biological markers. *Environ Res* 1989; 48: 129-144
49. Schulte P, Leso V, Niang M, Iavicoli I: Biological monitoring of workers exposed to engineered nanomaterials. *Toxicol Lett* 2018; 298: 112-124
50. Schulte PA, Leso V, Niang M, Iavicoli I: Current state of knowledge on the health effects of engineered nanomaterials in workers: a systematic review of human studies and epidemiological investigations. *Scand J Work Environ Health* 2019; 45: 217-238
51. Schulz C, Angerer J, Ewers U, et al: Revised and new reference values for environmental pollutants in urine or blood of children in Germany derived from the German environmental survey on children 2003-2006 (GerES IV). *Int J Hyg Environ Health* 2009; 212: 637-647
52. Schulz C, Wilhelm M, Heudorf U, et al: Update of the reference and HBM values derived by the German Human Biomonitoring Commission. *Int J Hyg Environ Health* 2011; 215: 26-35
53. SCOEL, Scientific Committee on Occupational Exposure Limits. (2014). List of recommended health-based biological limit values (BLVs) and biological guidance values (BGVs). Available on line at: <file:///C:/Users/XF51380/Downloads/SCOEL%20Recommended%20BLVs-BGVs%20June%202014.pdf> (last access 17-06-2019)
54. SIML, Società Italiana di Medicina del Lavoro. (2015). Criteri metodologici per la valutazione e proposta di valori-guida (VG) nazionali per il controllo dell'esposizione professionale a fattori di rischio chimici. In collaborazione con l'Associazione Italiana degli Igienisti Industriali e la Società Italiana Valori di Riferimento. Available on line at: http://www.sivr.it/documenti/paper_valguida.pdf (last access 17-06-2019).
55. SIVR, Società Italiana Valori di Riferimento. (2017). Quarta lista dei Valori di Riferimento per elementi, composti organici e loro metaboliti con integrazioni sul sito web www.valoridiriferimento.it
56. Smadley PL, Kinniburgh DG: A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Appl Geochem* 2002; 17: 517-568
57. Solberg HE: The IFCC recommendation on estimation of reference intervals. The RefVal program. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 710-714
58. Stellman JM: *Encyclopaedia of occupational health and safety* 4th ed. Geneva (Switzerland): International Labour Office, 1998.
59. Van Leeuwen CJ, Vermeire TG: *Risk Assessment of Chemicals: An Introduction*. Dordrecht (The Netherlands): Springer, 2007
60. Vogel N, Conrad A, Apel P, et al: Human biomonitoring reference values: Differences and similarities between approaches for identifying unusually high exposure of pollutants in humans. *Int J Hyg Environ Health* 2019; 222: 30-33

I valori di riferimento nell'interpretazione dei dati tossicologici

IVO IAVICOLI¹, VERUSCKA LESO¹, LUCA FONTANA²

¹Section of Occupational Medicine, Department of Public Health, University of Naples Federico II, Naples, Italy

²Department of Occupational and Environmental Medicine, Epidemiology and Hygiene, Italian Workers' Compensation Authority (INAIL), Monte Porzio Catone, Rome, Italy

INTRODUZIONE

L'esposizione a sostanze chimiche nei luoghi di lavoro, dovuta alla produzione, all'uso o alla manipolazione di questi xenobiotici, è uno dei più rilevanti fattori di rischio professionale che deve essere adeguatamente valutato e gestito nell'ambito dei servizi di salute e sicurezza sul lavoro (59). Infatti, la valutazione e gestione di questo particolare tipo di rischio professionale, sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo, è estremamente importante considerato il numero elevato di sostanze chimiche comunemente usate, manipolate e/o prodotte nei diversi settori industriali, stimate in più di 80.000 sostanze, e l'ampia serie di effetti negativi sulla salute che possono causare, dall'irritazione, alla sensibilizzazione, agli effetti cancerogeni (35). A tal riguardo, il "gold standard" per la valutazione del rischio chimico è rappresentato dal modello di valutazione/gestione del rischio stabilito negli USA dall'Accademia Nazionale delle Scienze e descritto nel rapporto del Consiglio Nazionale delle Ricerche "Valutazione del rischio nel governo federale: gestione del processo" (38).

Secondo questo modello, il processo di valutazione del rischio deve essere basato su quattro fasi essenziali (figura 1): (i) l'identificazione dei pericoli, finalizzata alla definizione degli effetti avversi che una sostanza è intrinsecamente in grado di provocare, (ii) la valutazione della relazione dose-risposta, che comprende la definizione di come i potenziali effetti avversi siano correlati alle dosi, le concentrazioni critiche per gli organi o le cellule bersaglio, l'identificazione di possibili meccanismi molecolari di azione tossica, (iii) la valutazione dell'esposizione, che si riferisce all'accertamento della possibilità/probabilità che un'esposizione professionale possa verificarsi, e la misura dei livelli di esposizione mediante validate strategie di campionamento ed appropriate metodiche analitiche; (iv) la caratterizzazione del rischio, che stima l'incidenza e la gravità degli effetti avversi che possono verificarsi in una popolazione esposta (38).

Il monitoraggio biologico e il monitoraggio ambientale sono strumenti fondamentali nella valutazione dell'esposizione ad agenti chimici nell'ambiente di vita e di lavoro (58). La definizione più completa ed esauriente di monitoraggio biologico

è stata formulata durante un seminario tenutosi nel 1980 a Lussemburgo e promosso congiuntamente dalla Comunità Economica Europea, l'Istituto Nazionale Statunitense per la Sicurezza e la Salute Occupazionale e l'Amministrazione Statunitense per la Salute e la Sicurezza Occupazionale (11). In questa occasione, il monitoraggio biologico è stato definito come "la misura e la valutazione di sostanze chimiche o di loro metaboliti in tessuti, fluidi, secrezioni, escrezioni, aria espirata, in qualsiasi combinazione, effettuate per valutare l'esposizione e i rischi per la salute, rispetto ad un riferimento appropriato" (11). Pertanto, per quanto riguarda la valutazione dell'esposizione, il monitoraggio biologico fornisce informazioni importanti e complementari rispetto al monitoraggio ambientale poiché, misurando la dose interna di una sostanza chimica derivante da tutte le possibili fonti di esposizione, fornisce indicazioni sull'assorbimento complessivo di uno xenobiotico (48). Il monitoraggio della dose interna, qualora la relazione dose-risposta sia nota, è utile per la prevenzione di malattie potenzialmente causate dall'esposizione a sostanze chimiche, in quanto tale parametro è più strettamente correlato a possibili effetti avversi sulla salute rispetto alle informazioni derivate dal monitoraggio ambientale (30).

È evidente come la corretta interpretazione dei risultati del monitoraggio biologico necessiti del confronto con appropriati riferimenti. Nell'ambito della medicina del lavoro, tale confronto viene solitamente effettuato utilizzando dei valori limite, come, ad esempio, gli indici di esposizione biologica (BEI) forniti dalla Conferenza Americana degli Igienisti Industriali Governativi (1). La loro applicazione protegge da possibili effetti avversi derivanti da esposizioni a concentrazioni di sostanze chimiche superiori a tali valori (6). Tuttavia, l'uso di valori limite ha delle limitazioni importanti che devono essere prese in considerazione quando si interpretano i risultati del monitoraggio biologico. Tra queste, prima di tutto, la mancanza di valori limite per tutti gli agenti chimici impiegati nei luoghi di lavoro (24, 31, 37). Inoltre, l'avvento di nuove tecnologie e il progresso scientifico hanno determinato l'introduzione, nei cicli e nei processi lavorativi, di nuove sostanze chimiche, come i nanomateriali ingegnerizzati, per i quali non sono stati ancora proposti dei valori limite (49, 50).

Per tali motivi, un crescente interesse si è sviluppato in merito al possibile uso di valori di riferimento (VR) nel campo della medicina del lavoro (2, 4, 6, 8, 12, 51). Il termine "valori di riferimento" si riferisce ai livelli di indicatori biologici di esposizione a xenobiotici (o dei loro metaboliti) nella popolazione generale, non professionalmente esposta (2, 7). Potrebbero essere definiti come la concentrazione di uno xenobiotico (o dei suoi metaboliti) misurato in matrici biologiche campionate da gruppi di popolazione di riferimento selezionati secondo criteri predefiniti (54). Pertanto, i VR sono utili per valutare se i risultati del biomonitoraggio sono molto più alti di quanto ci si aspetterebbe nella popolazione generale (31). Inoltre, i VR possono rappresentare un valido strumento per identificare nuove esposizioni chimiche, per definire la distribuzione di una sostanza in diversi gruppi di lavoratori o in differenti luoghi di lavoro o studiarne le variazioni mediante misurazioni periodiche (37). Attualmente, i VR trovano ampio impiego nell'ambito della sanità pubblica al fine di valutare l'interazione tra l'uomo e il suo ambiente di vita, con particolare riferimento all'individuazione delle fonti di esposizione, delle più importanti vie di esposizione e alla valutazione dell'assorbimento di xenobiotici (8). Tuttavia, la loro utilità sta emergendo anche nell'ambito della medicina del lavoro.

Pertanto, considerando l'importanza dei VR e dei loro possibili, molteplici usi nel campo della medicina occupazionale e ambientale, lo scopo di questo studio è stato fornire un'analisi completa e approfondita della definizione e dell'applicazione dei VR. Queste informazioni potrebbero essere utili nel provvedere indicazioni operative per utilizzare correttamente i VR nell'interpretazione dei risultati tossicologici del biomonitoraggio, specialmente in assenza di altri valori guida.

ASPETTI CRITICI NELLA DEFINIZIONE DEI VALORI DI RIFERIMENTO

Negli ultimi anni, numerose indagini di biomonitoraggio sono state condotte in diversi paesi per migliorare le conoscenze sull'esposizione umana alle sostanze chimiche e, allo stesso tempo, fornire ai legislatori indicazioni utili per ridurre i livelli ambientali di agenti pericolosi attuando adeguate politiche di controllo dell'esposizione. Studi di biomonitoraggio su uomo sono stati effettuati in diversi paesi europei (46) come il Belgio (31, 47), la Repubblica Ceca (10, 18), la Francia (29), la Germania (51, 52), l'Italia (3, 7-9), la Spagna (40) e il Regno Unito (12, 37) ma anche in paesi non europei come il Brasile (28), il Canada (45), la Repubblica di Corea (34) e gli Stati Uniti (17). La recente proliferazione di tale tipologia di studi deriva dalla necessità di definire VR appropriati a livello nazionale (se non in alcuni casi a livello regionale o locale) dal momento che tali valori possono

essere influenzati da fattori geografici, industriali, dietetici, ambientali, nonché legati allo stile di vita (31, 37). Tuttavia, nonostante tali specifiche differenze, la procedura con cui ottenere VR adeguati dovrebbe essere standardizzata tenendo conto di alcune peculiari criticità (tabella 1) riguardo la scelta e la dimensione del campione, il periodo temporale analizzato, i criteri di esclusione e di suddivisione del campione e la qualità delle metodiche analitiche (45, 60).

A questo proposito, la Federazione Internazionale di Chimica Clinica e Medicina di Laboratorio (IFCC) e l'Unione Internazionale di Chimica Pura ed Applicata (IUPAC) hanno formulato il concetto di intervalli di riferimento, elaborando metodologie statistiche necessarie alla definizione dell'esposizione di fondo ad agenti chimici in una specifica popolazione di riferimento (41, 45, 57). In dettaglio, i documenti IFCC e IUPAC rappresentano una guida utile per un'adeguata elaborazione di VR includendo anche indicazioni pratiche e raccomandazioni sulla identificazione di appropriate popolazioni di riferimento (tabella 1) (45).

La selezione del campione dovrebbe essere fatta *a priori* anche se, qualora questo tipo di reclutamento non sia fattibile, è possibile procedere con una selezione *a posteriori*. Tuttavia, in quest'ultimo caso, è necessario stabilire rigorosi criteri di suddivisione ed esclusione che potrebbero variare a seconda dei differenti biomarcatori e dei relativi fattori di confondimento (41, 45, 57). Un altro aspetto di rilievo riguarda la dimensione del campione che, per essere valida, dovrebbe essere sufficientemente ampia da includere gruppi di differente età, razza o etnia (57). Per quanto riguarda il periodo temporale di riferimento, dovrebbero essere utilizzate le informazioni più recenti sul monitoraggio biologico considerato che l'esposizione ambientale della popolazione generale alle sostanze chimiche può variare significativamente in funzione del tempo (41). Inoltre, alcuni criteri di esclusione dovrebbero essere adottati al fine di evitare l'inclusione nel campione di soggetti (es. fumatori) che presentano caratteristiche non rappresentative della popolazione generale (45). Allo stesso modo, quando è plausibile che ci siano differenze significative tra diversi gruppi della popolazione generale, in relazione all'età o alla razza, sarebbe auspicabile sviluppare VR per i diversi sottogruppi adottando specifici criteri di suddivisione (45). Infine, si raccomanda di utilizzare metodi analitici di alta qualità (soprattutto in termini di specificità e sensibilità) e adeguate procedure di controllo per la raccolta e il trattamento dei campioni (41, 45, 57).

LA SOCIETÀ ITALIANA VALORI DI RIFERIMENTO: LA POSIZIONE ITALIANA SUI VALORI DI RIFERIMENTO

Da oltre venticinque anni, la Società Italiana Valori di Riferimento (SIVR) è attivamente impegnata nella definizione e diffusione di VR di xenobiotici, sia ambientali sia occu-

pazionali (8). Pertanto, lo scopo principale di tale Società è quello di elaborare liste di VR per diversi elementi e composti chimici o loro metaboliti. A tal proposito è importante notare come, dal 1993, il numero di VR proposti dalla SIVR sia cresciuto costantemente, da una dozzina nei primi anni di attività della Società a 135 attualmente inclusi nell'ultima lista prodotta (55).

La strategia operativa adottata dalla SIVR per elaborare e stabilire adeguati VR consiste di 8 fasi che sono schematicamente rappresentate in figura 2. Una volta identificata la sostanza chimica, o il gruppo di sostanze, per cui si ritiene opportuno stabilire dei VR, la procedura prevede la realizzazione di una revisione sistematica della letteratura scientifica al fine di verificare se VR per la sostanza di interesse siano già stati prodotti in altri paesi (8, 54). Le tre fasi successive (da 3 a 5) si concentrano sull'analisi e sulla scelta del miglior metodo analitico mediante il quale determinare i livelli delle sostanze chimiche o dei loro metaboliti nelle matrici biologiche. A questo proposito, si effettua una valutazione delle tecniche analitiche disponibili al fine di trovare un giusto compromesso tra la necessità di avere un'alta qualità analitica e la disponibilità laboratoristica di strumenti che possano garantirla (8, 54). Pertanto, dopo aver effettuato tutte le opportune considerazioni pre-analitiche e aver scelto il metodo di analisi più appropriato, è necessario definire una rete di laboratori che abbiano i criteri per poter effettuare le analisi. In questa fase, è essenziale selezionare i laboratori che effettueranno le analisi contribuendo alla definizione dei VR sulla base di appropriati controlli di qualità dei dati, inter ed intra-laboratorio (8).

Al momento della raccolta del campione, è importante somministrare un questionario *ad hoc* ai soggetti arruolati nello studio in quanto le informazioni ottenute sono fondamentali per interpretare correttamente i dati di biomonitoraggio. Tale questionario, per essere adeguato ai fini della definizione dei VR, deve essere in grado di discriminare possibili esposizioni alla sostanza di interesse derivanti da fonti non comuni alla popolazione generale, quali il fumo o l'esposizione professionale (criteri di esclusione) (8, 41, 45, 54, 57). Inoltre, per essere sufficientemente informativo, il questionario dovrebbe anche investigare tutti i possibili fattori in grado di influenzare o alterare i livelli di dose interna delle sostanze chimiche, come l'età, il genere, l'attività fisica, la dieta e lo stile di vita, hobby o attività fai da te, residenza in aree urbane o rurali, la presenza di emissioni antropogeniche o ambientali in prossimità di casa e/o lavoro. In conformità con le principali indicazioni IFCC e IUPAC, la popolazione di riferimento viene identificata *a priori* tenendo conto delle principali variabili socio-demografiche e geografiche e il protocollo di campionamento è definito al fine di assicurare l'identificazione di un campione sufficientemente rappresentativo (8). Infine, la fase 8 riguarda la valutazio-

ne statistica dei dati ottenuti. A questo proposito, laddove sia possibile, il campione viene inizialmente suddiviso, sulla base delle differenti caratteristiche espositive, in diversi sotto campioni al fine di minimizzare la variabilità dei dati. In seguito, viene impiegato il test di Kolmogorov-Smirnov (o strumenti statistici equivalenti) e vengono identificati e valutati i valori anomali osservati nella distribuzione dei dati (8). Il passaggio successivo, dopo aver definito la quota dei risultati che si trovano al di sotto del limite di rilevazione o quantificazione, prevede la descrizione dei dati in termini di valori minimi e massimi, percentili, indice di tendenza centrale e variabilità (8). Infine, viene eseguita l'analisi della varianza (ANOVA) e/o la regressione multipla per identificare le possibili variabili che potrebbero influenzare i dati ottenuti (8).

Oltre ai VR ottenuti secondo tale specifica procedura, la Società propone anche dei Tentative Reference Values (TRV) che sono il risultato della fase preliminare di elaborazione dei VR secondo la procedura descritta. I TRV sono proposti quando non sono disponibili VR per un determinato analita e/o mancano informazioni in merito a possibili fattori di confondimento. Sono generalmente ottenuti da un piccolo numero di laboratori, almeno due del circuito SIVR, in base a metodiche analitiche differenti o, in alternativa, da esperienze di singoli laboratori del circuito SIVR utilizzando metodi di analisi validati con incertezza dichiarata. La SIVR adotta anche VR basati su dati della letteratura scientifica (LVR), ottenuti mediante una revisione critica delle pubblicazioni prodotte nei 10 anni precedenti che abbiano analizzato preferibilmente popolazioni Italiane o Europee (8).

I VALORI DI RIFERIMENTO NEL CONTESTO DELLA MEDICINA AMBIENTALE E DELLA SANITÀ PUBBLICA

Negli ultimi decenni, il numero di sostanze chimiche prodotte e commercializzate è aumentato in modo esponenziale a causa della crescente industrializzazione mondiale (13). Sebbene il numero di questi xenobiotici a livello globale, e la relativa diffusione in matrici ambientali, siano poco conosciuti, una stima sufficientemente indicativa può essere derivata dall'analisi del Registro dei numeri CAS che attualmente contiene più di 150 milioni di sostanze chimiche (CAS). La produzione chimica per scopi commerciali è responsabile dell'introduzione settimanale di circa 200.000 nuove sostanze. Tuttavia, va sottolineato che molti agenti chimici sono emessi nell'ambiente come risultato di processi naturali (cioè eruzioni vulcaniche, incendi forestali, aerosol marini) o come prodotti della combustione di sostanze fossili o di processi industriali (39, 43). Inoltre, in alcuni casi la contaminazione delle matrici ambientali è di origine geologica, come la contaminazione da arsenico nelle acque sotterranee che rappresenta un problema di sanità pubblica in di-

versi paesi Europei ed extraeuropei come l'Ungheria, l'Italia, la Romania, l'Argentina, il Cile, il Messico, l'Afghanistan, il Bangladesh, il Nepal e il Pakistan (21, 44, 56).

Recenti evidenze scientifiche hanno documentato come i livelli ambientali, in aria, suolo, acqua ed alimenti, di sostanze chimiche siano significativamente aumentati negli ultimi anni contribuendo ad un incremento dell'esposizione della popolazione generale (13, 33). Pertanto, tra le fonti quotidiane di esposizione ritroviamo alimenti e/o acqua potabile, prodotti di consumo, suolo e polvere domestica contaminati, oltre che inquinanti aerodispersi (figura 3) (14, 25). Le sostanze chimiche contenute in tali matrici possono entrare in contatto con l'organismo ed essere assorbite attraverso la via inalatoria, digerente e cutanea potendo indurre effetti avversi sulla salute.

A questo proposito, per diverse sostanze che sono contemporaneamente elementi essenziali, ma possono avere anche un effetto tossico, come il cromo, il manganese, e il nickel, i VR possono essere concepiti come il risultato di processi omeostatici-fisiologici e di esposizione chimica occorsa nell'ambiente di vita (6, 8). D'altra parte, per gli xenobiotici tossici, che normalmente non dovrebbero essere presenti nelle matrici biologiche della popolazione generale, la determinazione di livelli misurabili dimostra il loro assorbimento a seguito di un'esposizione ambientale (6, 8). In entrambi i casi, il contributo dell'esposizione ambientale alle concentrazioni chimiche nell'organismo è estremamente importante e per questo motivo i VR rappresentano un potente strumento per indagare la complessa interazione tra gli individui e l'ambiente in cui vivono.

In questo contesto, i VR possono fornire informazioni interessanti per comprendere il significato dei dati tossicologici derivanti da studi di biomonitoraggio. La disponibilità di VR adeguati è essenziale per poter identificare i soggetti o sottogruppi di popolazione esposti a concentrazioni elevate di una specifica sostanza per cui potrebbero essere necessarie misure ed interventi mirati di prevenzione o di protezione (27, 32, 36, 45). Tuttavia, nell'ottica della sanità pubblica, l'identificazione di individui altamente esposti, sebbene sia una condizione necessaria, non è sufficiente a proteggere le persone da possibili agenti pericolosi. È importante, infatti, definire le principali fonti di esposizione ed i fattori che hanno causato l'incremento dei livelli biologici nei soggetti studiati rispetto ai livelli della popolazione generale. A questo proposito, l'analisi delle informazioni ottenute dalla somministrazione dei questionari (che sono parte integrante degli studi di biomonitoraggio mirati a stabilire i VR) può fornire informazioni utili ad evidenziare condizioni di esposizione condivise dai soggetti che presentano livelli di esposizione aumentati (32, 45). Inoltre, i VR potrebbero essere anche utili per definire associazioni statisticamente significative tra uno specifico effetto osservato in una particolare sottopopo-

lazione e il livello (aumentato) di esposizione associato (32, 36, 45). Infine, come accennato in precedenza, l'osservazione di concentrazioni biologiche di sostanze chimiche superiori ai VR richiede l'adozione di speciali azioni correttive al fine di ridurre la presunta esposizione ambientale. In questo caso, i VR rappresentano un valido strumento per verificare l'efficacia delle politiche di gestione del rischio adottate in base anche alle variazioni di concentrazione documentate in relazione al periodo analizzato e alle aree geografiche considerate.

I VALORI DI RIFERIMENTO NEL CONTESTO DELLA MEDICINA DEL LAVORO

Nella valutazione e gestione del rischio chimico in ambito occupazionale, il monitoraggio biologico è uno strumento essenziale in quanto, permettendo la valutazione della dose interna delle sostanze chimiche (o dei relativi metaboliti), derivanti da tutte le possibili fonti e vie di esposizione, in campioni biologici, fornisce una stima accurata dell'assorbimento di queste sostanze (30, 48). L'integrazione delle informazioni fornite dal monitoraggio biologico con quelle derivate dal monitoraggio ambientale rappresenta la strategia più efficace e sicura per valutare adeguatamente l'esposizione professionale dei lavoratori ed eventualmente implementare le misure appropriate per ridurla o controllarla. L'analisi di questi dati da parte di professionisti della salute e della sicurezza sui luoghi di lavoro offre la possibilità di identificare gruppi di lavoratori altamente esposti, valutando eventuali differenze tra gruppi, monitorando le variazioni dei livelli di esposizione nel tempo e verificando l'efficacia delle misure di controllo adottate (36).

Tuttavia, i risultati del biomonitoraggio avrebbero poco valore da soli dal momento che la loro corretta interpretazione richiede necessariamente il confronto con opportuni riferimenti (11). La direttiva sugli agenti chimici 98/24/CE (in materia di protezione della salute e della sicurezza dei lavoratori dai rischi chimici), a tal proposito, sottolinea la necessità di avere a disposizione valori guida con cui confrontare i dati del monitoraggio biologico e fornisce la base per la definizione di valori limite biologici (19). Tuttavia, attualmente nell'Unione Europea esiste un solo valore limite biologico stabilito dalla suddetta direttiva che riguarda i livelli di piombo ematico. Allo stesso modo, anche nel contesto della legislazione sui prodotti chimici di utilizzo industriale è evidente un'importante carenza di valori guida biologici. Infatti, il Regolamento sulla Registrazione, Valutazione, Autorizzazione e Restrizione dei prodotti chimici (42) ha introdotto per gli ambienti di lavoro il livello derivato senza effetto (DNEL), cioè il livello di esposizione al di sopra del quale gli esseri umani non dovrebbero essere esposti, e al di sotto del quale la sostanza non ha effetti pericolosi per la sa-

lute umana. È interessante notare come i DNEL potrebbero anche essere espressi come biomarcatori di esposizione interna ($DNEL_{\text{biomarker}}$) per quelle sostanze per cui sono disponibili dati relativi alla dosi interne adeguatamente correlati con gli effetti sulla salute. Tuttavia, nell'ambito del regolamento REACH, la comprensione della relazione tra la dose interna di un determinato indicatore e gli effetti sulla salute non appare adeguatamente attenzionata dal momento che i $DNEL_{\text{biomarker}}$ non rappresentano dati comunemente inseriti in fase di registrazione (26, 36).

In tale contesto è possibile utilizzare i valori limite o i valori guida biologici proposti per diverse sostanze chimiche dal Comitato Scientifico sui Valori Limite Occupazionali (SCOEL) che ha supportato dal 1995 al 2018 l'Unione Europea nella valutazione della relazione tra esposizione a sostanze chimiche pericolose ed effetti avversi. I valori limite biologici proposti dallo SCOEL sono basati sulla tutela della salute e pertanto indicano i livelli di esposizione al di sotto dei quali è improbabile che si verifichino effetti avversi (36, 53). Lo stesso Comitato ha proposto inoltre valori guida biologici, intesi come la più elevata concentrazione di una determinata sostanza chimica o di un suo metabolita in una qualsiasi, appropriata, matrice biologica, corrispondente ad un determinato percentile, generalmente il 90° o il 95°, dei dati relativi ad una popolazione rappresentativa (53). Tuttavia, il numero di sostanze chimiche per cui lo SCOEL ha proposto dei valori limite o dei valori guida biologici è molto limitato (53). Dal 2019, le funzioni dello SCOEL sono state affidate al Comitato per la Valutazione dei Rischi (RAC) dell'Agenzia Europea per le Sostanze Chimiche (ECHA). Ovviamente, in assenza di valori limite biologici stabiliti dalla legge c'è sempre la possibilità di riferirsi a quelli proposti sia dalle agenzie governative straniere sia da agenzie non governative di riconosciuto prestigio (ossia ACGIH, Deutsche Forschungsgemeinschaft's (DFG) Commissione per la ricerca di pericoli per la salute da composti chimici nell'area di lavoro) (1, 22). Tuttavia, anche in questo caso, rispetto alla grande quantità di sostanze chimiche comunemente prodotte, utilizzate o manipolate negli ambienti di lavoro, la disponibilità di BEI o di valori di tolleranza biologica per le sostanze di lavoro rimane piuttosto limitata (in entrambi i casi meno di 100 valori limite biologici) (1, 22). In questo contesto, è evidente come i VR possono rappresentare una risorsa eccellente da utilizzare in assenza di valori limite biologici supportando l'interpretazione dei dati di monitoraggio (6, 37). In altre parole, il limite superiore (95° percentile) dell'intervallo osservato nella popolazione di riferimento (soggetti non esposti) può essere confrontato con i dati del monitoraggio biologico dei lavoratori per ricavarne informazioni sui livelli di esposizione (31). A questo proposito, la rilevazione di concentrazioni di un indicatore biologico significativamente più elevati di tale limite superiore

suggerirebbe una possibile esposizione professionale all'agente chimico. Tuttavia, è importante sottolineare il fatto che l'uso dei VR non dovrebbe essere limitato esclusivamente all'interpretazione dei dati di biomonitoraggio nei casi in cui manchino dei valori limite. Infatti, anche se i VR non tengono conto del profilo tossicologico del biomarcatore e quindi non possono essere impiegati per valutare i rischi per la salute dei lavoratori né considerati come livelli soglia per intraprendere interventi clinici (45), il loro uso combinato con i livelli di azione e i valori limite biologici, come parte di un sistema di valori guida integrato, potrebbe fornire un significativo valore aggiunto al processo di valutazione e gestione del rischio chimico (6).

Ad esempio, quando si utilizzano valori limite biologici, si dovrebbe tenere presente che per molte sostanze chimiche, questi valori sono inclusivi anche dei livelli di fondo dell'agente riscontrabili in soggetti non professionalmente esposti alla sostanza di interesse (6). Inoltre, alcuni indicatori utilizzati nel monitoraggio biologico non sono specifici per la sostanza chimica oggetto di osservazione ed è possibile che le loro concentrazioni possano essere influenzate da co-esposizioni occupazionali o dall'esposizione non occupazionale ad altri agenti chimici (6). In questi casi, l'uso armonizzato e simultaneo di VR e valori limite garantisce un'interpretazione molto più accurata dei dati tossicologici a supporto di una valutazione più approfondita dell'esposizione e dei relativi rischi per la salute.

Pertanto, al fine di ottenere una valutazione dei dati di biomonitoraggio che sia il più esauriente e completa possibile, i VR dovrebbero essere inclusi, anche se sono disponibili valori limite biologici adeguati. I diversi tipi di valori guida (VR, livelli di azione e valori limite) non dovrebbero essere considerati separatamente in quanto sono concettualmente correlati tra loro ed in parte sovrapponibili (figura 4) (6).

Nella medicina del lavoro, un altro interessante campo di applicazione dei VR riguarda l'esposizione a sostanze chimiche cancerogene. A tale riguardo, è opportuno sottolineare che la direttiva 2004/37/CE del Parlamento Europeo, sulla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti dall'esposizione ad agenti cancerogeni o mutageni durante il lavoro, ha esplicitato che (allegato II) la sorveglianza sanitaria dei lavoratori esposti a queste sostanze dovrebbe includere, ove necessario, il controllo biologico (20). Tuttavia, nella presente direttiva non sono indicati valori limite biologici per alcuna sostanza. Pertanto, in caso di esposizione occupazionale a sostanze cancerogene, i VR potrebbero essere utilizzati come mezzo di confronto per interpretare correttamente i dati tossicologici di biomonitoraggio identificando individui con livelli di esposizione superiori ai VR e correlando tali livelli con possibili effetti avversi sulla salute. Ad esempio, negli studi epidemiologici, i VR, indicando i livelli di esposizione della popolazione generale a sostanze cancerogene presen-

ti nell'ambiente, potrebbero essere utilizzati per calcolare il potenziale eccesso di mortalità per cancro nei gruppi di lavoratori esposti a queste sostanze (6). Inoltre, per alcuni agenti cancerogeni, i cui effetti avversi possono verificarsi anche per esposizione a basse dosi, in considerazione del meccanismo di azione genotossico, la definizione di valori limite biologici avrebbe un limitato significato preventivo (5, 15, 54). Per altre sostanze chimiche, per cui il meccanismo sotteso all'azione cancerogena è principalmente di tipo epigenetico, è possibile stabilire un livello di soglia al di sotto del quale non dovrebbero manifestarsi effetti avversi (15, 23). In entrambi i casi, i livelli di esposizione professionale a queste sostanze dovrebbero essere mantenuti ai livelli più bassi possibili. In questo contesto, l'uso dei VR, che si riferiscono alla popolazione generale non esposta per motivi professionali, appare importante per il controllo, il monitoraggio nel tempo e il mantenimento dei più bassi livelli di esposizione.

CONCLUSIONI

Gli studi di biomonitoraggio sono sempre più utilizzati sia nell'ambito della sanità pubblica che nella medicina del lavoro per migliorare la conoscenza in merito all'esposizione a sostanze chimiche negli ambienti di vita e di lavoro. Infatti, i rischi per la salute conseguenti all'esposizione a sostanze chimiche derivanti da attività lavorative, da matrici ambientali, dalla dieta, dalle abitudini di vita e dai prodotti di consumo, rappresentano una delle tematiche di maggiore interesse per entrambe le aree di ricerca medica. Tuttavia, la determinazione di livelli misurabili di agenti chimici nelle matrici biologiche di soggetti esposti non implica necessariamente l'insorgenza di effetti avversi sulla salute. Il rischio per la salute può essere stimato quando è stata dimostrata una relazione

quantitativa tra un effetto e il livello di indicatore biologico (valori guida basati sulla salute come i livelli di azione o i valori limite biologici). Sebbene i VR non possano essere impiegati per prevedere eventuali effetti avversi sulla salute, rappresentano un punto di riferimento per l'interpretazione dei dati tossicologici forniti dagli studi di biomonitoraggio su uomo.

Pertanto, dal punto di vista della sanità pubblica, la definizione di VR per sostanze chimiche in una popolazione specifica è necessario al fine di identificare livelli elevati di esposizione che possano avere implicazioni per la gestione della salute pubblica. Quando il confronto dei risultati del monitoraggio biologico con i VR suggerisce che si sia verificata un'esposizione elevata, è importante identificare le potenziali fonti di esposizione e i possibili fattori coinvolti al fine di mettere in atto misure di prevenzione e protezione adeguate. In quest'ottica, i VR in sanità pubblica appaiono strumenti utili per valutare le variazioni temporali e spaziali nell'esposizione alle sostanze chimiche; supportare la pianificazione di appropriate misure per il controllo e la riduzione dell'esposizione della popolazione generale; verificare l'adeguatezza e la validità di tali strategie.

L'uso di VR nella medicina del lavoro rappresenta una risorsa preziosa che dovrebbe essere impiegata (insieme ai livelli di azione e ai valori limite biologici) in un sistema integrato e armonizzato di valori guida per garantire una valutazione adeguata dell'esposizione occupazionale ad agenti chimici. In particolare, i VR sono particolarmente utili per valutare i dati tossicologici delle sostanze per le quali non sono disponibili valori limite biologici o non è stata definita una soglia di tossicità. Pertanto, i VR potrebbero indicare e guidare l'eventuale adozione di specifiche misure di prevenzione e protezione sul luogo di lavoro.